UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO TRANSCRIPTOMA DO FRUTO DO CACAU INFECTADO PELO FUNGO *Moniliophthora roreri*

BRAYAN MAUDIEL DÍAZ REYES

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Julho de 2022

BRAYAN MAUDIEL DÍAZ REYES

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO TRANSCRIPTOMA DO FRUTO DO CACAU INFECTADO PELO FUNGO *Moniliophthora roreri*

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

Área de conhecimento:
Genética Molecular e de Micro-organismos

Orientador: Prof. Dr. Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Julho de 2022

BRAYAN MAUDIEL DÍAZ REYES

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO TRANSCRIPTOMA DO FRUTO DO CACAU INFECTADO PELO FUNGO *Moniliophthora roreri*

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular

Dra. Karina Peres Gramacho	Dr. Ronan Xavier Corrêa
(CEPLAC/UESC)	(UESC)
Dr. Thiago Mafra Batista	Dr. Eric Roberto G. R. Aguiar
(UFSB)	(UESC/Orientador)

DEDICO

A Deus por cuidar de mim em cada momento da minha vida, pelo seu amor incondicional, quando eu não o mereci.

Ao meu avô Celeo, Tio Nestor, irmão Irvin, com amor ao céu, lamento muito a sua ausência.

OFEREÇO

Aos meus queridos pais Darsy, Chicho e irmã Naszlyn, pelos seus esforços e ensinamentos, por apoiar meus sonhos, mesmo tendo dificuldades em casa.

À minha esposa Zoila e nossa filha Lauren, por todo o amor, apoio, força, por esperarem por mim todo esse tempo.

“ Os que conhecem o teu nome confiam em ti, pois tu, Senhor, jamais abandonas os que te buscam ”

(Salmos 9:10)

AGRADECIMENTOS

A Deus porque seus planos são perfeitos, por seu amor fiel, por sua sabedoria;

Ao meu orientador Dr. Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar, por todo apoio, confiança, ensinamentos, conselhos, por toda orientação ao longo do mestrado;

Ao meu co-orientador Dr. Carlos Priminho Pirovani, pela paciência, conhecimento e ajuda desde minha chegada à Universidade;

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao programa de pós-graduação de Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade do mestrado e fornecer-me tudo o que preciso para a minha investigação;

Às queridas secretárias do programa de pós-graduação, Fabrícia e Mara, por todo o apoio diante de qualquer dificuldade no mestrado;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao programa Becas Brasil PAEC-OEA-GCUB, pela oportunidade de vir ao Brasil para me tornar um profissional melhor;

A todos os professores do programa, por todos os conhecimentos adquiridos durante estes dois anos;

A todos os meus colegas do Laboratório de Bioinformática de Vírus (Biovirlab), por todos os conselhos, ajuda;

À minha querida amiga Emiliyn Moron, pela sua sincera amizade e apoio em momentos difíceis da minha vida;

Aos meus amigos especiais Nadia, Gustavo, Patrícia, Jonathan, por me terem acolhido na minha chegada ao Brasil e me terem dado todo o apoio de que precisava;

Aos meus pais Darsy, Chicho e irmã Naszlyn, por todas as suas orações, apoio emocional e amor sincero.

À minha mulher Zoila e à nossa filha Lauren Carolina, por estarem sempre comigo, o vosso amor alimenta a minha alma.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para mim, muito obrigado!

INDICE

RESUMO i
ABSTRACT iii
LISTA DE FIGURAS v
1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 4
2.1. OBJETIVO GERAL 4
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS 4
3. REVISÃO DE LITERATURA 5
3.1. Theobroma cacao L. 5
3.2. *Moniliophthora roreri* 6
3.2.1. Ciclo biológico do fungo *M. roreri* 7
3.2.2. Métodos de controle do *M. roreri* 8
3.3. Outros patógenos que atingem o cacaueiro 8
3.4. Estudo do MICROBIOMA no Cacau 9
3.5. Abordagens ômicas no estudo do microbioma 10
4. MATERIAIS E MÉTODOS 11
4.1. Produção de esporos e micélio 11
4.2. Extração e quantificação de RNA total 12
4.3. Construção e sequenciamento de bibliotecas 12
4.4. Pré-processamento da biblioteca 13
4.5. Análise Metagenômica com dados Metatranscriptomicos 13
4.6. Análise filogenética 14
4.7. Análise das bibliotecas públicas 15
5. RESULTADOS 16
5.1. Montagem de transcriptoma *de novo* 16
5.2. Classificação taxonômica das espécies presentes na microbiota associada à infecção por *M. roreri* em frutos de cacau 16
5.3. Presença de sequências virais em *M. roreri* 22
5.4. Caracterização de sequências virais 23
5.5. Análise filogenética com contigs virais 24
5.6. Presença dos vírus associados a *M. roreri* em dados públicos 25
6. DISCUSSÃO 26
7. CONCLUSÃO 31

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 32
9. MATERIAL SUPLEMENTAR 42

RESUMO

DÍAZ REYES, BRAYAN MAUDIEL, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2022. **CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO FRUTO DO CACAU INFECTADO COM O FUNGO** *Moniliophthora roreri* **UTILIZANDO RNA-Seq** Orientador: Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar. Co-orientador: Carlos Priminho Pirovani.

As sementes do cacau (*Theobroma cacao* L.) após fermentadas e secas dão origem às amêndoas que são a matéria prima para a indústria do chocolate, sendo este um dos principais produtos de exportação de países da América Central e do Sul, influenciando diretamente a economia da região. Das 22 espécies que constituem o gênero Theobroma (família *Sterculiaceae*), o mais importante é o *Theobroma cacao L*., devido ao valor comercial das suas amêndoas. Sabe-se que o chocolate tem uma grande demanda e aceitação no mundo, porém a sua oferta depende do cultivo do cacau em condições climáticas favoráveis e o controle eficiente de pragas e doenças. Mas, as condições que o cacaueiro necessita para se desenvolver às vezes podem mimetizar as que os fitopatógenos requerem para seu crescimento e proliferação. Os fitopatógenos são os principais agentes de doenças que acometem às plantações de cacau em todos os países tropicais. Algumas doenças que atingem o cacaueiro parecem estar restritas há especificas regiões do mundo, como o fungo *Phytophthora megakarya*, e o vírus *Cacao Swollen shoot virus (CSSV*) nos países produtores de cacau da África Ocidental. Nas américas, as doenças da vassoura-de-bruxa e a monilíase são duas das mais prejudiciais para a lavoura cacaueira e são causadas pelos fungos *Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri,* respectivamente. De forma preocupante, o fungo *M. roreri* está em fase invasiva e já foi encontrado em diversos países da América do Sul, o ultimo relato da chegada da doença foi recentemente no Estado do Acre, norte do Brasil, com a detecção do primeiro foco da doença. Contudo, apesar da importância desse fungo hemibiotrófico especializado em infectar só frutos de espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania*, tornando inviáveis as amêndoas, aspectos da sua biologia e interação com outros micro-organismos permanecem desconhecidos. Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas para o

entendimento da base funcional da patogenicidade como análise da sua expressão gênica e efetoroma, até estudos focados na diversidade de organismos presentes em diferentes tecidos que tenham o potencial de controle das diferentes doenças. O advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) e o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) revolucionaram o estudo da expressão gênica e permitiram estudar a diversidade microbiana oculta em termos de diferentes parâmetros ambientais, com o diferencial de identificar organismos transcricionalmente ativos. Em nosso trabalho, realizamos o sequenciamento de RNA de amostra derivada do fruto do cacau infectados naturalmente pelo fungo *M. roreri* da variedade susceptível ICT 7121 para caracterizar a microbiota associada em diferentes tempos de infecção e fazer a avaliação da diversidade de fungos, bactérias e vírus presentes nas amostras baseado em análises de similaridade de sequências contra bancos de dados públicos de sequências de referência. O nosso trabalho permitiu a identificação e classificação taxonômica da microbiota associada à infecção pelo *M. roreri* tendo como resultados grande diversidade de espécies fúngicas e bacterianas, além de sequências virais. De forma interessante, nós identificamos espécies fúngicas do gênero *Trichoderma sp* já relatadas com potencial controle biológico, assim como espécies do gênero *Colletotrichum sp*. Quanto à diversidade bacteriana, o gênero *Pseudomonas*, foi o mais abundante, *Pantoea*, espécies desse gênero tem potencial de controle biológico contra alguns patógenos. Inesperadamente, nós ainda identificamos sequências virais que pudemos deignar a pelo menos três vírus diferentes que apresentaram similaridade com elementos da família *Narnaviridae*, o que foi posteriormente confirmado pelas análises filogenéticas. Dois desses contigs virais ainda foram encontrados em dados públicos derivados de *M. roreri* de amostras do Equador, evidenciando a grande circulação destes vírus. Este é o primeiro trabalho avaliando a dinâmica de microrganismos associados à infecção do *M. roreri* em frutos do cacaueiro assim como o primeiro relato de vírus que infectam o fungo *M. roreri*, demostrando que a nossa abordagem permitiu uma robusta exploração das espécies presentes na amostra, incluindo espécies virais as quais a diversidade ainda é pouco explorada em fungos.

Palavras Chaves:*Theobroma Cacao*; RNA-Seq; Moniliase; Microbiota.

ABSTRACT

DÍAZ REYES, BRAYAN MAUDIEL, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, March. 2022. **CHARACTERIZATION OF THE GENETIC DIVERSITY OF MICRO-ORGANISMS IN COCOA FRUIT INFECTED WITH THE FUNGUS** *Moniliophthora roreri* **USING RNA-Seq.** Advisor: Eric Roberto Guimarães Rocha Aguiar. Co-Advisor: Carlos Priminho Pirovani.

The fermented and dried cocoa (*Theobroma cacao L.*) seeds are the raw material for the chocolate industry, which is one of the main exported products from Central and South America, directly influencing the region's economy. Out of the 22 species that constitute the genus Theobroma (family *Sterculiaceae*), the most important is *Theobroma cacao L*., due to the commercial value of its beans. It is known that chocolate has a great demand and acceptance in the world, however, its supply depends on the cultivation of cocoa in favorable climatic conditions and the efficient control of pests and diseases. But the conditions that the cocoa tree needs to develop can sometimes mimic those that phytopathogens require for their growth and proliferation. Phytopathogens are the main agents of diseases that affect cocoa plantations in all tropical countries. Some diseases that affect cocoa trees seem to be restricted to specific regions of the world, such as the fungus *Phytophthora megakarya*, and the *Cacao Swollen shoot virus (CSSV)* in West African cocoa producing countries. In the Americas, witches' broom diseases and moniliasis are two of the most harmful to cocoa crops and are caused by the fungi *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*, respectively. Worryingly, the *M. roreri* fungus is in an invasive phase and has been found in several countries in South America, the last report of the arrival of the disease was recently in the state of Acre, northern Brazil, with the detection of the first outbreak of the disease. However, despite the importance of this hemibiotrophic fungus specialized in infecting only fruits of species of the genera *Theobroma* and *Herrania*, making the kernels unviable, aspects of its biology and interaction with other microorganisms remain unknown. Several researches have been developed to understand the functional basis of pathogenicity such as gene expression and effectorome analysis, to studies focused on the diversity of organisms present in different tissues that have the potential to control different

diseases. The advent of next-generation sequencing (NGS) and RNA sequencing (RNA-Seq) technologies have revolutionized the study of gene expression and made it possible to study the hidden microbial diversity in terms of different environmental parameters, with the differential of identifying transcriptionally active organisms. In our work, we performed the RNA sequencing of samples derived from the cocoa fruit naturally infected by the fungus *M. roreri* of the susceptible variety ICT 7121 to characterize the associated microbiota at different times of infection and to evaluate the diversity of fungi, bacteria and viruses present. in samples based on sequence similarity analyzes against public reference sequence databases. Our work allowed the identification and taxonomic classification of the microbiota associated with *M. roreri* infection, resulting in a great diversity of fungal and bacterial species, in addition to viral sequences. Interestingly, we identified fungal species of the genus *Trichoderma* sp already reported with potential biological control, as well as species of the genus *Colletotrichum sp*. As for bacterial diversity, the genus *Pseudomonas* was the most abundant, *Pantoea*, species of this genus has the potential for biological control against some pathogens. Unexpectedly, we still identified viral sequences that we could assign to at least three different viruses that showed similarity to elements of the *Narnaviridae* family, which was later confirmed by phylogenetic analyses. Two of these viral contigs were still found in public data derived from *M. roreri* from samples from Ecuador, showing the wide circulation of these viruses. This is the first study evaluating the dynamics of microorganisms associated with *M. roreri* infection in cocoa fruits, as well as the first report of viruses that infect the *M. roreri* fungus, demonstrating that our approach allowed a robust exploration of the species present in the sample, including viral species whose diversity is still poorly explored in fungi.

Keywords: *Theobroma cacao*; RNA-Sequencing; Moniliase; Microbiota; Narnavirus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo dos contigs classificados e não classificados para as 5 bibliotecas em estudo. 16

Figura 2. A abundância taxonômica de fungos e bactérias para as 5 bibliotecas em estudo. 17

Figura 3. Os gêneros fúngicos mais abundantes para cada biblioteca..... 18

Figura 4. Espécies do gênero Trichoderma e sua abundancia nas diferentes condições. 20

Figura 5. Gêneros bacterianos mais abundantes para cada condição em estudo. 22

Figura 6. Árvore filogenética para os transcritos virais identificados neste estudo... 24

Figura 7. Quantificação de transcritos virais nas cinco bibliotecas desenvolvidas no presente trabalho (Esporos e Micélio) e duas bibliotecas públicas (BP) de *M. roreri.* .. 25

1. INTRODUÇÃO

*Theobroma cacao L. (*família *Malvaceae)* é uma planta tropical da Amazônia que cresce à sombra de flores tropicais (GARCIA et al., 2018). *Theobroma cacao L.* é a espécie mais importante do gênero Theobroma, que possui 22 espécies diferentes, sendo a mais importante *Theobroma cacao L*., devido ao valor comercial das amêndoas produzidas a partir de suas sementes fermentadas e secas (BARTLEY, 2005). O cacau Crioulo (*Theobroma cacao ssp. Cacao*) originou - se na América do Sul, onde foi cultivado pela civilização Maia por mais de 1500 anos antes de ser introduzido na América Central (MOTAMAYOR et al., 2002). O cacau é considerado a principal matéria - prima na indústria do chocolate , além dos benefícios à saúde associados ao seu consumo (FRANCO; OÑATIBIA-ASTIBIA; MARTÍNEZ-PINILLA, 2013). O cacau é um dos produtos globais mais importantes que ajuda os agricultores a melhorar sua subsistência econômica (OSORIO-GUARÍN et al., 2020).

O chocolate está em alta demanda e amplamente aceito em todo o mundo, mas sua disponibilidade depende do cultivo do cacau em condições climáticas favoráveis e controle eficaz de pragas e doenças (DANTAS NETO et al., 2005). Os fungos fitopatogênicos são os agentes de doenças mais comuns que atacam as plantações de cacau em todo o mundo, em uma variedade de zonas climáticas (DOS SANTOS et al., 2017). Um exemplo é a Monilíase, causada por *Moniliophthora roreri*, um patógeno basidiomiceto hemibiotrófico, pertencente à família *Marasmiaceae* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005a). *M. roreri* é geralmente encontrado infectando frutos dos gêneros *Herrania* e *Theobroma* (BAILEY et al., 2018). Esta espécie fúngica gera danos aos grãos de cacau que podem levar a perdas de rendimento de até 80% (HIDALGO et al., 2003). Outro táxon próximo *Moniliophthora perniciosa* também ataca o cacau e é conhecido como vassoura-de-bruxa (WBD) e causa graves perdas econômicas que variam de 50 a 90% em todas as regiões produtoras de cacau (MEINHARDT et al., 2008).

Com base no modelo de variabilidade genética descrito em (PHILLIPS-MORA; AIME; WILKINSON, 2007) a origem de *M. roreri* foi na Colômbia, havendo posterior migração para o Equador , antes de se espalhar para outros países como Venezuela, Peru , e países da América Central. O último relato da

presença da doença em fase invasiva foi na Jamaica (JOHNSON et al., 2017). O primeiro caso da doença no Brasil foi descoberto recentemente, com os sintomas da doença sendo identificados na cidade de Cruzeiro do Sul, Acre. Amostras do fungo foram coletadas e verificadas em ambos os casos pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Goiânia (AGROLINK, 2021).

Outros fitopatógenos fúngicos também causam perdas no cacau. Por exemplo, devido à sua alta virulência, a espécie *Phytophthora megakarya* na África Ocidental representa uma ameaça à cultura em outras regiões (MARELLI et al., 2019). *Ceratocystis cacaofunesta* é um dos patógenos mais agressivos, causando perdas em diversos países e levando à destruição de um grande número de árvores de *Theobroma cacao* (MORA-OCAMPO et al., 2021). A antracnose é um fator que limita a produção, e o agente causador tem sido associado a uma variedade de espécies de Colletotrichum (GAUTAM, 2014). Em Gana, um surto de antracnose cobriu 248,47 hectares de terras cultivadas, resultando em perdas significativas (ASARE et al., 2021), assim como no Brasil , onde foi descoberto *Colletotrichum aeschynomenes* infectando plantas de cacau em outubro de 2016 (NASCIMENTO et al., 2019). Além disso, muitos países produtores de cacau na África Ocidental foram infectados por doenças virais, como a doença *do caule inchado do cacau* (CSSD) causada pelo *Cocoa Swollen Shoot Virus* (CSSV) (ABROKWAH et al., 2016).

O cacau em seus tecidos vegetais é abundante para diferentes micro-organismos, tendo assim uma microbiota composta por diferentes espécies, como por exemplo o fungo entomopatógeno *Beauveria bassiana* recuperado em cultura a partir de caules, folhas e raízes, *Penicillium oxalicum* detectado como endófito nas sementes (POSADA; VEGA, 2005). Nos tecidos internos do tronco de cacau foi isolado *Trichoderma brevicompactum* (BASTOS, 2012), espécies de *Trichoderma* tem a capacidade de colonizar os tecidos acima do solo no cacau e além disso formar associações endofítica dentro dos tricomas (BAILEY; STREM; WOOD, 2009). Frutos infetados com o fungo *M. roreri* apresentaram presença de organismos para os gêneros, *Cylindrocladium, Dichobotrys, Moniliophthora, Colletotrichum* e *Phytophthora* identificados com critérios morfológicos (CARRERA-SÁNCHEZ et al., 2016)¸diversos estudos são realizados para isolar esses organismos e testar *in vitro* e *in vivo* contra os

diferentes patógenos e conhecer o potencial de inibição que teriam para o controle da doença, assim como entender melhor como acontecem essas interações microbianas.

A avaliação da diversidade de fungos em comunidades mistas é importante porque diferentes taxas de espécies fúngicas podem exibir fenótipos distintos e, consequentemente, podem ter diferentes patogenicidades ou funções (MARCELINO et al., 2019). A metagenômica aplica um conjunto de tecnologias genômicas e ferramentas de bioinformática para acessar diretamente o conteúdo genético de comunidades inteiras de organismos. O campo da metagenômica tem sido responsável por avanços substanciais na ecologia, evolução e diversidade microbiana nos últimos 5 a 10 anos (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012).Os avanços na transcriptômica forneceram uma oportunidade excepcional para estudar implicações funcionais da variabilidade genética. Tecnologias como o sequenciamento massivo de RNAs (RNA-Seq) surgiram como técnicas de ponta para análise do conjunto de transcritos de um organismo/ambiente que aproveitam o sequenciamento de próxima geração de alto rendimento .(MOROZOVA; HIRST; MARRA, 2009). Nesse contexto, por exemplo, o RNA-Seq tem sido aplicado para registrar transcritos expressos dentro de um microbioma em um determinado ponto no tempo (estratégia referida como Metatranscriptômica) sob um conjunto de condições ambientais, fornecendo uma visão mais detalhada dos membros ativos (SHAKYA; LO; CHAIN, 2019).

Em nosso trabalho, utilizando metatranscriptômica associada a análises de Bioinformática foi possível identificar e caracterizar a microbiota (Analise metagenômica) associada à infecção por *M. roreri* em frutos de cacau, resultando em maior presença de espécies para gêneros fúngicos seguidos por bactérias e, por fim, sequencias virais. Em fungos identificamos espécies com potencial para controle biológico das diversas doenças que acometem a cultura, assim como também espécies previamente descritas como endofiticas de diferentes tecidos vegetais do cacau. Não menos importante, relatamos novas espécies virais pertencentes à família *Narnaviridae*, sendo a primeira descrição de vírus infectando o fungo *M. roreri*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade genética de microrganismos presentes no fruto do cacau infectado com o fungo *Moniliophthora roreri* utilizando RNA-Seq.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Montar os transcritos presentes na amostra derivada do fruto do cacau infectado com *M. roreri*.

Identificar os microrganismos presentes na amostra baseado em análises de similaridade de sequências contra bancos de dados públicos de referência.

Avaliar a diversidade de fungos, vírus e bactérias presentes no fruto do cacau em comparação com estudo anteriores da literatura e durante diferentes tempos da infecção.

Investigar possíveis associações entre os microrganismos identificados e o *M. roreri.*

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Theobroma cacao L.

O cacaueiro (*Theobroma cacao L.*) é uma árvore tropical originária da Amazônia, onde cresce naturalmente à sombra das florestas tropicais (GARCIA et al., 2018). Das vinte e duas espécies que constituem o gênero Theobroma (família *Malvaceae*), o mais importante é o *Theobroma cacao L*., devido ao valor comercial das amêndoas produzidas a partir de suas sementes fermentadas e secas (BARTLEY, 2005). O cacau Crioulo (*Theobroma cacao ssp. Cacao*) foi cultivado pelos maias há mais de 1500 anos. A sua origem é da América do Sul e posteriormente introduzido pelo homem na América Central (MOTAMAYOR et al., 2002).

A principal fonte para elaboração do chocolate são as amêndoas fermentadas e secas do fruto de *Theobroma cacao L*. (ZARRILLO et al., 2018). O chocolate combina algumas características organolépticas com propriedades afrodisíacas e antidepressivas que contribuem para efeitos benéficos à saúde (MONTAGNA et al., 2019). A bebida primitiva de chocolate foi considerada pelos maias como uma "bebida dos Deuses" misturada com ingredientes como canela e pimenta, apreciada pelos seus efeitos estimulantes e não pela qualidade do sabor que era amargo e forte (VERNA, 2013). Pesquisas recentes mencionam que o principal fator que influencia os atributos de qualidade do cacau é o cultivar e genótipo de cacau (LIMA et al., 2011).

O cacau (*Theobroma cacao L.),* por ser a principal matéria prima para a elaboração de chocolate, é uma das *commodities* mais importantes em todo o mundo que ajuda a melhorar a subsistência econômica dos agricultores (OSORIO-GUARÍN et al., 2020). O cacaueiro apresenta crescimento de 4 a 8 metros de altura além de ser uma arvore perenifólia, as flores crescem diretamente dos galhos (Cauliflora), as quais vão se converter em frutos indeiscentes, que em média podem conter de 20 a 60 sementes (BHATTACHARJEE; KUMAR, 2007). Todo o cacau produzido para o grande mercado mundial é obtido a partir da espécie *Theobroma cacao L* (DOSTERT et al., 2012). O cacau é cultivado em regiões quentes e úmidas em mais de 50 países localizados em 4 continentes (África, América, Ásia e Oceania). Um total

de 23 desses países são da América onde o cacau é produzido para fins comerciais, o que faz do cacau uma cultura de grande importância econômica, social, ambiental e particularmente cultural (SÁNCHEZ et al., 2017).

Onde é cultivado, o cacaueiro (*Theobroma cacao L.)* sempre foi alvo de várias doenças de grande impacto econômico (DANTAS NETO et al., 2005). Os fitopatógenos são os principais agentes de doenças que promovem o ataque às plantações de cacau em todos os países tropicais. A semelhança dos sintomas causados por diferentes fitopatógenos torna um desafio a identificação confiável das diversas espécies. A identificação correta é importante no monitoramento e gerenciamento dessas pragas (DOS SANTOS et al., 2017). Doenças fúngicas e espécies de Moniliophthora em particular, continuam sendo uma das principais restrições da produção de cacau nas Américas e, se ultrapassarem sua faixa atual, ameaçam danificar seriamente a indústria de chocolate em todo o mundo (MCELROY et al., 2018). Dessa forma, continuam se fazendo extremamente necessárias pesquisas que possam contribuir ao entendimento dessas interações planta-patógeno para os programas de manejo e melhoramento.

3.2. *Moniliophthora roreri*

A monilíase é causada por *Moniliophthora roreri*, um patógeno hemibiotrófico basidiomiceto, pertencente à família *Marasmiaceae* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005a). *M. roreri* é especializado em atacar os frutos, principalmente das espécies pertencentes aos gêneros *Herrania* e *Theobroma*. Contudo, as naturezas dessas interações ainda não foram compreendidas totalmente (BAILEY et al., 2018). Danos que podem ser internos e externos nas amêndoas do cacau podem levar a perdas em rendimento de até 80% (HIDALGO et al., 2003). A análise de cinco regiões nucleares (28S rDNA, 18S rDNA, ITS, RPB1 e EF1-α) indica que *M. roreri* pertence ao mesmo gênero do agente causal da vassoura-de-bruxa, *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005b), um outro agente responsável por severas perdas econômicas em todas as regiões produtoras de cacau para as quais se espalhou, levando a reduções na produção que variam de 50 a 90%(MEINHARDT et al., 2008).

Baseado no padrão de variabilidade genética relatado no trabalho de (PHILLIPS-MORA; AIME; WILKINSON, 2007) a origem de *M. roreri* ocorreu na

Colômbia, e em seguida, houve uma migração para o Equador e depois uma disseminação posterior para países como a Venezuela, Peru e países da América Central. O último relato da presença da doença que se encontra em uma fase invasiva tinha sido na Jamaica (JOHNSON et al., 2017). Recentemente foi detectado o primeiro foco da doença no Brasil, os sintomas da doença foram identificados na cidade de Cruzeiro do Sul, no estado do Acre. Amostras do fungo foram coletadas e validadas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Goiânia (AGROLINK, 2021). Com a detecção do primeiro foco no Brasil, a necessidade de medidas a curto prazo visando o entendimento e controle da doença se tornou urgente para tentar manter a sustentabilidade econômica do produtor.

3.2.1. Ciclo biológico do fungo *M. roreri*

M. roreri é um fungo hemibiotrófico que apresenta duas etapas em seu ciclo: a fase biotrófica e a necrotrófica. Fungos hemibiotróficos tem enzimas envolvidas na degradação da parede celular o que promove a degradação de compostos vegetais e facilita a infecção (BARBOSA et al., 2018). Os esporos que são os únicos propágulos infectivos do fungo são espalhados pelo vento, chuva e atividade humana (EVANS, 2016). O ciclo começa quando esses esporos chegam aos novos frutos e os penetram através da epiderme ou via estômatos ao penetrar no fruto o fungo se desenvolve de forma intercelular (fase biotrófica), a fase biotrófica é a mais longa com um intervalo de 45-95 dias. As condições climáticas e a resposta do hospedeiro são fatores que vão determinar o período de incubação que em média pode ter duração de três até oito semanas (JOHNSON et al., 2008). Massas de esporos, de origem assexual aparente, são produzidas na superfície do fruto após o início da fase necrotrófica. Os sintomas da fase biotrófica podem incluir manchas necróticas e, em alguns casos, malformação dos frutos (BAILEY et al., 2018). Os frutos são mais suscetíveis à infecção nas fases iniciais de seu desenvolvimento (45 dias), e à medida que ocorre o crescimento do fruto, este se torna menos suscetível ao patógeno (BARBOSA et al., 2018).

3.2.2. Métodos de controle do *M. roreri*

Países como a Costa Rica, onde se tem a presença da doença monilíase, tem instituições de pesquisa como o Centro Agronômico Tropical de Pesquisa e Ensino (CATIE) que começaram investigações em busca de soluções visando selecionar variedades resistentes ou tolerantes contra a monilíase, tendo como resultado nos seus programas de melhoramento clones com propriedades desejáveis como o CATIE - R1, CATIE - R4, CATIE - R6, CC - 137, ICS - 95 e PMCT - 58 ((PHILLIPS-MORA et al., 2012). Esses clones, atualmente, estão disponíveis para mais de 6.000 agricultores no Panamá, Costa Rica, Nicarágua, Honduras, El Salvador, Guatemala e Belize, por meio de jardins clonais, e foram recentemente introduzidos no México, Brasil e EUA para diferentes pesquisas (BAILEY et al., 2018).

Alternativas como o controle químico, com fungicida a base de cobre, também tem sido uma opção para o controle da monilíase e resultou ainda em maior rendimento (HIDALGO et al., 2003). Espécies do gênero *Trichoderma sp*. e *Bacillus sp*. são agentes promissores como biocontroladores para o controle de *M. roreri* (CABRERA et al., 2018). As práticas de manejo cultural, como por exemplo, poda regular de árvores, colheita frequente de frutos, remoção regular de frutos infestados, manejo de ervas daninhas e um sistema agroflorestal de cacau tem conseguido limitar a incidência de pragas e doenças, apesar de não serem suficientes para eliminação do patógeno (ARMENGOT et al., 2020).

3.3. Outros patógenos que atingem o cacaueiro

Outros fitopatógenos que também causam perdas no cacau são as espécies do género *Phytophthora spp.* A espécie *Phytophthora megakarya* na África ocidental apresenta uma ameaça para a cultura em outras regiões devido a sua alta virulência (MARELLI et al., 2019). O fungo *Ceratocystis cacaofunesta* é um dos patógenos mais agressivos causadores de perdas em diferentes países levando a destruição de grande quantidade de árvores de Theobroma (MORA-OCAMPO et al., 2021). A antracnose também se apresenta como um fator limitante na produção. O agente causal dessa doença tem sido relatado para espécies do gênero *Colletotrichum sp* (GAUTAM, 2014). Em Gana um surto de antracnose cobriu uma área de cultivo de 248,47 hectares, levando a perdas em

outubro de 2016 (ASARE et al., 2021). Folhas com sintomas de antracnose foram obtidas de plantas de cacau e mediante análises laboratoriais houve o primeiro relato de *Colletotrichum aeschynomenes* causando antracnose nos cacaueiros no Brasil (NASCIMENTO et al., 2019). Na África Ocidental, plantações de cacau também tem sido infectada por doenças virais de importância econômica como a doença do caule inchado do cacau (CSSD) causada pelo vírus do caule inchado do cacau (CSSV) (ABROKWAH et al., 2016). Dependendo das cepas as perdas na produção pelo vírus no cacau podem ser de 15-50 %, sendo considerada a doença viral mais importante no cacaueiro (AMEYAW, 2019).

3.4. Estudo do MICROBIOMA no Cacau

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para conhecer a microbiota associada à infecção por patógenos no cacau, assim como, avaliar o potencial dos endófitos como agentes de controle biológico dessas doenças. No trabalho de (CARRERA-SÁNCHEZ et al., 2016), com base em critérios morfológicos, a microbiota de frutos de cacau na Amazônia do Equador foi caracterizada revelando abundante quantidade de espécies dos gêneros Cylindrocladium, Dichobotrys, Moniliophthora, Colletotrichum e Phytophthora. Na parte dos ramos do Cacau a diversidade de fungos endofíticos foi identificada por características morfológicas e sequenciamento de DNA ribossomal (rDNA) tendo como resultado a presença de espécies aos gêneros Acremonium, Blastomyces, Botryosphaeria, Cladosporium, Colletotrichum, Cordyceps, Diaporthe, Fusarium, Geotrichum, Gibberella, Gliocladium , Lasiodiplodia , Monilochoetes , Nectria , Pestalotiopsis, Phomopsis, Pleurotus, Pseudofusarium, Rhizopycnis, Syncephalastrum , Trichoderma , Verticillium e Xylaria (RUBINI et al., 2005). Diversos organismos endofíticos foram isolados diretamente no campo de troncos de arvores saudáveis e vagens, mais de 40 gêneros foram identificados e registrados principalmente representando anamorfos de Hypocreales nos gêneros Acremonium, Clonostachys, Trichoderma (EVANS; HOLMES; THOMAS, 2003).

3.5. Abordagens ômicas no estudo do microbioma

O advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) e o sequenciamento de RNA (RNA-seq) revolucionaram o estudo da expressão gênica e permitiram estudar a diversidade microbiana oculta em termos de diferentes parâmetros ambientais (COLGAN; CAMERON; KRÖGER, 2017). A metagenômica aplica um conjunto de tecnologias genômicas e ferramentas de bioinformática para acessar diretamente o conteúdo genético de comunidades inteiras de organismos. O campo da metagenômica tem sido responsável por avanços substanciais na ecologia, evolução e diversidade microbiana nos últimos 5 a 10 anos (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012). Seu escopo tem sido surpreendente, pois permitiu a descoberta de novos antibióticos, genes, enzimas, estruturas proteicas e vias metabólicas, além de permitir conhecer a dinâmica populacional de vários habitats (CORTÉS-LÓPEZ et al., 2014). A metatranscriptômica, onde o foco é o sequenciamento de nova geração de moléculas de RNA, revela membros ativos da comunidade e permite mapear vias metabólicas (URICH et al., 2008). As ciências ômicas têm fornecido uma visão mais detalhada das interações dos microrganismos nos microbiomas enquanto a metagenômica tradicional baseada no sequenciamento de DNA é utilizada principalmente para inferir o perfil taxonômico e avaliar aspectos genômicos dos indivíduos do microbioma estudado (AGUIAR-PULIDO et al., 2016). Em geral, esses estudos ômicos vem revelando informações importantes sobre a diversidade microbiana e a interpretação dessas interações tem sido utilizadas com sucesso para desenvolver práticas agrícolas sustentáveis (PRIYA; ANEESH; HARIKRISHNAN, 2021).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Produção de esporos e micélio

Os esporos e o micélio vegetativo do fungo *M. roreri* foram produzidos a partir de frutos de cacau naturalmente infectados da variedade de cacau suscetível ICT 7121. Frutos de cacau com quatro meses de idade infectados pelo *M. roreri*, apresentando sinais e sintomas (manchas necróticas, pseudoestroma branco) foram selecionados e coletados na fazenda de pesquisa do Instituto de Cultivos Tropicales (ICT) localizado na cidade de Tarapoto, Peru. O ICT tem parceria com a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) com intercâmbio de alunos para desenvolver pesquisas como a seleção de alguns clones com resistência à monilíase.

Os frutos foram lavados com água corrente com auxílio de uma escova para eliminação do micélio e, em seguida, imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2% por cinco minutos. Em seguida, foram secas com papel toalha, cortadas em fatias de dois cm de espessura, transversais ao eixo longitudinal do fruto, e colocadas na superfície das placas de Petri (**Figura 1A-B complementar**). As placas de Petri inoculadas foram mantidas em câmara úmida por três a quatro dias a 21 - 25 ºC para crescimento do micélio vegetativo. Após o cultivo, o micélio foi cuidadosamente removido por raspagem da superfície das fatias com auxílio de bisturi estéril (**Figura 1C complementar**). A massa micelial foi lavada duas vezes com ácido tricloracético (TCA) (SIGMA, USA) a 10% em acetona. Mais tarde, 2 mL de RNA foram adicionados ao pellet seco para posterior extração de RNA total. Uma alíquota deste material foi inoculada no meio, bem como um controle positivo, a fim de mostrar que os tratamentos químicos realizados inviabilizaram os esporos.

Os esporos foram germinados em meio contendo caldo de cacau após a incubação das fatias de cacau por cinco a oito dias **(Figura 1D complementar)**. Para preparo do meio de cultura foram utilizados 250 g de frutos de cacau da variedade suscetível sadia ICT 7121, autoclavados em um litro de água destilada. Em seguida, o caldo foi coado e adicionou-se ágar a 0,15%. Após o resfriamento, o meio de ágar cacau foi semeado em placas de Petri. Um total de 20 placas de Petri foram utilizadas para inocular 1 mL de solução de esporos de

M. roreri na concentração de 4,2 x 10^6 para os tempos de 8, 16, 24 e 48 horas após a germinação (HAG).

Os esporos não germinados foram coletados com pincel fino e béquer com 100 mL de água autoclavada contendo estreptomicina na concentração de 0,01%. Esta solução foi homogeneizada com 0,01% de Tween 80, depois filtrada através de gaze estéril. Os esporos foram contados em câmara de Neubauer. Em seguida, a solução foi centrifugada para obtenção da massa de esporos, que foi lavada em (TCA) 10% (SIGMA, USA) em acetona duas vezes, adicionado 2 mL de RNA posteriormente *ao pellet seco* para posterior extração do RNA total.

4.2. Extração e quantificação de RNA total

Após a remoção do RNA, o micélio inativo seco e os pellets de esporos nos tempos de germinação 0, 8, 16, 24 e 48 horas foram macerados usando nitrogênio líquido. Para cada amostra, os pesos secos foram obtidos e então armazenados a -80°C. O RNA total foi extraído com o kit ZR Plant RNA MiniPrepTM (Zymo Research/USA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado pelo fluorímetro Qubit (Invitrogen) utilizando kits Qubit® dsRNA HS/BR, de acordo com as recomendações do fabricante. E as razões 260/280nm e 260/280nm foram obtidas pelo Nanodrop 2000c (THERMO SCIENTIFIC/USA) (**Tabela Complementar 1**).

4.3. Construção e sequenciamento de bibliotecas

As bibliotecas de RNA mensageiro (mRNA) foram construídas usando o kit TruSeq RNA® v2 Low Sample (LS) (ILLUMINA) de acordo com as instruções do fabricante. Ao final do protocolo, o nível de pureza e o tamanho dos fragmentos obtidos das bibliotecas de mRNA dos esporos em diferentes tempos de germinação (0, 8, 16 e 48 horas) e do micélio foram verificados por gel de agarose 3%, utilizando marcadores de DNA de 50 pb (New England/Biolabs), 100 pb (Gene Ruler/Fermentas) e utilizando corante gelRed (Uniscience, Brasil) (**Figura 2 complementar**). A quantificação absoluta das bibliotecas foi realizada utilizando o kit Kapa Library Quantification ABI Prism® qPCR Mix (KAPA BIOSSYSTEMS) de acordo com as instruções do fabricante **(Tabela Suplementar 2)**.

O sequenciamento das cinco bibliotecas foi distribuído em três corridas, utilizando como parâmetro o valor da concentração final de cada biblioteca. Assim, o sequenciamento ocorreu: **i.** Apenas a biblioteca de mRNA de esporo sem germinar (controle); **ii**. As bibliotecas do mRNA de micélio e de esporo com 48 hs de germinação; **iii**. As bibliotecas de mRNA de esporos com 8 hs e 16 hs de germinação. Para cada sequenciamento utilizou um pool das amostras na concentração de 15 pM e 5% do controle PhiX na mesma concentração. O sequenciamento foi realizado no MiSeq System (ILLUMINA) situado no CBG (Centro de Biotecnologia e Genética/UESC) utilizando o MiSeq® Reagent Kit v3 (ILLUMINA) de 150 ciclos.Toda a etapa de aquisição do material biológico e sequenciamento foi realizada pela estudante de Doutorado do programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular Katiucia Tícila, como parte da sua Tese.

4.4. Pré-processamento da biblioteca

As leituras brutas obtidas (35 a 76 pb) foram submetidas a pré-processamento. Inicialmente, leituras com qualidade igual ou superior a Phred 30 e tamanho superior a 20 bp foram selecionadas com a ferramenta Trimmomatic 0,33 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). As leituras restantes foram utilizadas em uma análise de qualidade com a ferramenta FASTQC (ANDREWS, 2017). As sequências filtradas foram então mapeadas contra os genomas de referência da planta *T. cacao* e do fungo *M. roreri* com a ferramenta Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) para remover sequências desses organismos. As sequências não mapeadas foram usadas para as análises subsequentes. Os genomas de referência de *Theobroma cacao* e *Moniliophthora roreri*, foram baixados do NCBI GenBank usando os códigos GCA_000403535 e gca_000488995.1_m_roreri_mca_2997_v1, respectivamente. Todas as análises foram feitas usando a plataforma Galaxy Bioinformatics (https://usegalaxy.eu/).

4.5. Análise Metagenômica com dados Metatranscriptomicos

As leituras pré-processadas foram utilizadas para a montagem de transcritos com a ferramenta Trinity (Trinity *de novo assembly* of RNA-Seq data (Galaxy versão 2.9.1) usando os parâmetros padrão da ferramenta (GRABHERR et al.,

2011). Os transcritos foram avaliados no Kaiju servidor web (https://kaiju.binf.ku.dk/server) com parâmetros padrão pesquisando o NCBI BLAST nr + euk - banco de dados de proteínas não redundantes. O arquivo de saída da ferramenta (Taxon.paths) foi salvo no bloco de notas e então foi criado um arquivo Excel para avaliar as informações taxonômicas e produzir gráficos de abundância das espécies classificadas para cada condição de cultivo (MENZEL; NG; KROGH, 2016). As análises de abundância dos reinos, gêneros e espécies, foi baseada nas espécies classificadas taxonomicamente pelo kaiju e que tiveram igual ou maior que 5 transcritos atribuídos por condição, também foram removidas dessas analises transcritos atribuídos para a espécie *M. roreri* e *M. perniciosa*. **Nas Tabelas Complementar 8, 9, 10 e 11** estão todas as espécies, gêneros sem restrições de número de transcritos atribuídos.

Bibliotecas que apresentaram transcritos com similaridade a sequências de origem víral foram submetidas à análise de similaridade com Diamond (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2015) que retornou vários fragmentos para cada biblioteca por condição (**Tabela Complementar 4**). Esses possíveis fragmentos virais foram posteriormente remontados com a ferramenta CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). Os transcritos resultantes do CAP3 foram então utilizados nas análises de caracterização viral e estão descritos nos próximos tópicos.

4.6. Análise filogenética

Um conjunto de dados contendo os transcritos virais montados em nosso estudo e sequências de proteínas públicas relacionadas a Mitovírus, Narnavírus e Ourmiavírus foi construído e alinhado usando o programa MAFFT (KATOH; ROZEWICKI; YAMADA, 2019). O melhor modelo evolutivo proteico foi selecionado usando ModelTest, considerando o critério de informação de Akaike (AKAIKE, 1998). A inferência de máxima verossimilhança foi construída no IqTree requerendo 1.000 réplicas de bootstrap (NGUYEN et al., 2015). A árvore foi enraizada considerando o vírus *Escherichia virus* como um grupo externo (número de acesso: NP_040755) e editada no Figtree (disponível em: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

4.7. Análise das bibliotecas públicas

Três bibliotecas disponíveis publicamente derivadas de amostras do fungo *M. roreri* foram baixadas do banco de dados SRA (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=Moniliophthora+roreri). Duas bibliotecas de RNA-seq utilizadas foram apresentadas pelo USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) contendo material vegetal infectado por patógenos mistos (*M. roreri* e *T. cacao*). Neste trabalho o clone de *M. roreri* (MCA2977) foi isolado do estado de Los Rios, Equador para análise de transcriptoma ou expressão gênica (MEINHARDT et al., 2014). A terceira biblioteca, localizada em Tabasco, México, é uma abordagem da natureza genômica de *M. roreri* CPMRT01 isolado de cacau (HIPÓLITO-ROMERO et al., 2020). Todas as três bibliotecas foram utilizadas para investigar a presença e abundância de contigs virais identificados em nossa biblioteca através da ferramenta Kallisto (BRAY et al., 2016).

5. RESULTADOS

5.1. Montagem de transcriptoma *de novo*

Para cada uma das cinco bibliotecas geradas, foi avaliada a qualidade após a etapa de pré-processamento. Todas as bibliotecas tiveram um número de leituras entre 12.384.924 - 25.840.512. Após o pré-processamento, mantivemos mais de 99% das seqüências, reforçando a qualidade de nosso sequenciamento. Após o pré-processamento, realizamos a montagem com trinity, que gerou um total de 169.074 transcritos. O número de transcritos variou de 20.879 a 65.605 por condição, com uma média de 508 a 780 e N50 variando de 604 a 1088. A biblioteca de esporos 48h apresentou o maior número de contigs montados enquanto a biblioteca de Micélio, a menor. Na **Tabela Complementar 3** pode ser visualizado o número de transcritos montados para cada biblioteca.

5.2. Classificação taxonômica das espécies presentes na microbiota associada à infecção por *M. roreri* em frutos de cacau

Dos 169.074 (100%) transcritos montados, 149.975 (88.17%) foram classificados enquanto 19.099 (11.24%) não apresentaram similaridade com nada presente nos bancos de dados de referência **(Figura 1)**. A biblioteca de esporos de 8h apresentou a maior porcentagem de contigs classificados e a biblioteca de esporos 48h, a maior fração de sequências sem designação taxonômica.

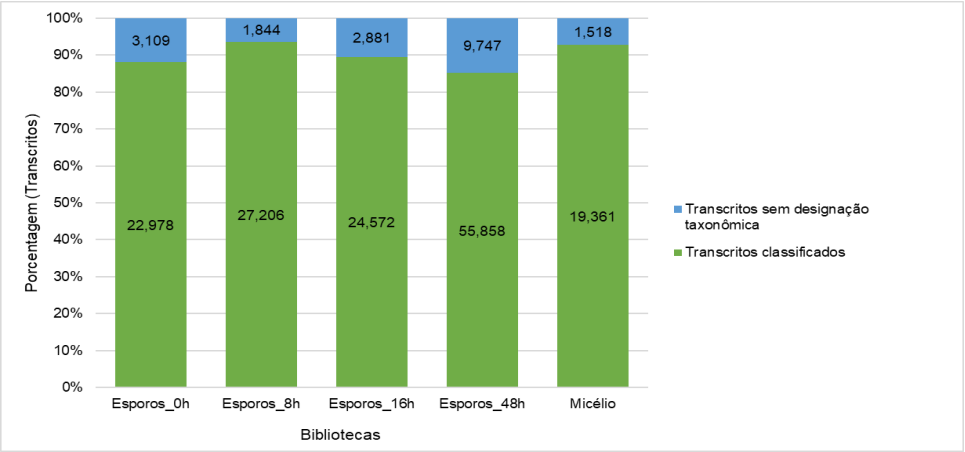


Figura 1. Resumo dos contigs classificados e não classificados para as 5 bibliotecas em estudo.

Como esperado, os transcritos montados foram classificados em diferentes reinos (Bacterias e Fungi). As espécies fúngicas foram identificadas no microbioma do cacau, apresentando 22.444 transcritos atribuídos, para as espécies como *Colletotrichum gloeosporioides* (18116) (Ascomycota), *Acremonium chrysogenum* (440) (Ascomycota), *Nectria haematococca* (334) (Ascomycota), *Neonectria ditíssima* (229) (Ascomycota), *Colletotrichum incanum* (142) (Ascomycota), *Colletotrichum orbiculare* (133), *Purpureocillium lilacinum* (129) (Ascomycota), *Colletotrichum chlorophyti* (128) (Ascomycota), *Fusarium avenaceum* (111) (Ascomycota) *Hirsutella minnesotensis* (89) (Ascomycota). As bactérias apresentaram 15.365 transcritos, atribuídos para as espécies *Pseudomonas parafulva* (2531), *Pantoea dispersa* (1761), *Pseudomonas sp. Bc-h* (1188), *Pseudomonas sp. NFR16* (1019), *Pseudomonas putida* (928). Na biblioteca Esporos_48h houve a presença de quatro transcritos atribuídos às espécies virais: *Ophiostoma mitovirus 5* (2), *Sanxia narna-like virus 1* (1) e *Pseudomonas phage PPpW-3* (1) **(Figura 2).**

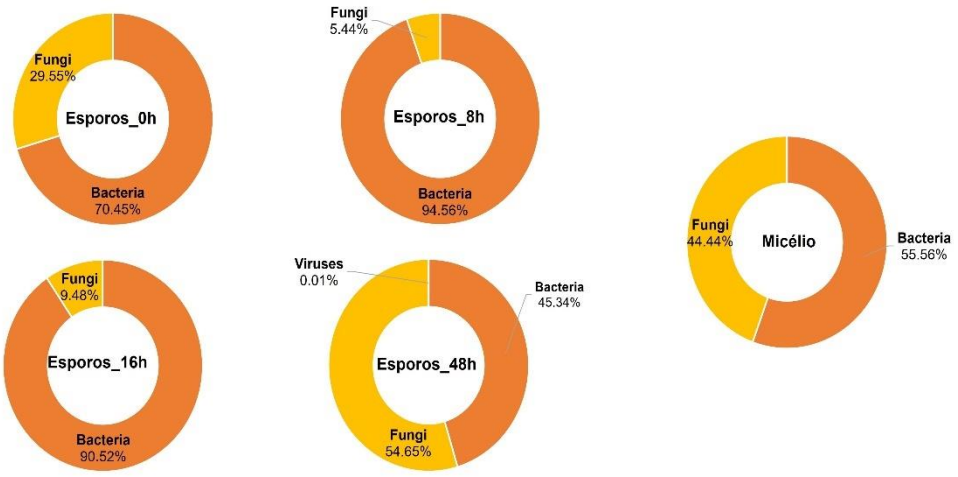


Figura 2. A abundância taxonômica de fungos e bactérias para as 5 bibliotecas em estudo.

A **Figura 3** mostra os 10 gêneros mais abundantes de espécies de fungos por condição. *Colletotrichum* (18.924), *Fusarium* (699), *Acremonium* (440), *Neonectria* (229), *Purpureocillium* (129), *Trichoderma* (129), *Metarhizium* (102), *Hirsutella* (89), *Cordyceps* (88), *Torrubiella* (86) são dominantes nas bibliotecas. A espécie fúngica mais abundante foi *Colletotrichum gloeosporioides* (Ascomycota) com 18.116 transcritos. *Colletotrichum* é um gênero de fungos

fitopatogênicos, e várias espécies foram formalmente descritas anteriormente, como *Colletorichum tropicale*, *Colletotrichum ignotum*, associada como assintomática ao cacaueiro, e *Colletotrichum theobromicola* que se associa a lesões na parte foliar e fruto do cacaueiro (ROJAS et al., 2010). Outro estudo anterior descreveu que espécies de *Colletotrichum* foram isoladas de diferentes partes da planta de soja, como pecíolos e caules. Análises filogenéticas, moleculares e morfológicas de 84 isolados revelaram que 40 isolados eram espécies de *Colletotrichum incanum* indicando que esta espécie pode ocorrer comumente. Em nossas bibliotecas, esse fungo possui 142 transcritos atribuídos (YANG; HAUDENSHIELD; HARTMAN, 2014).

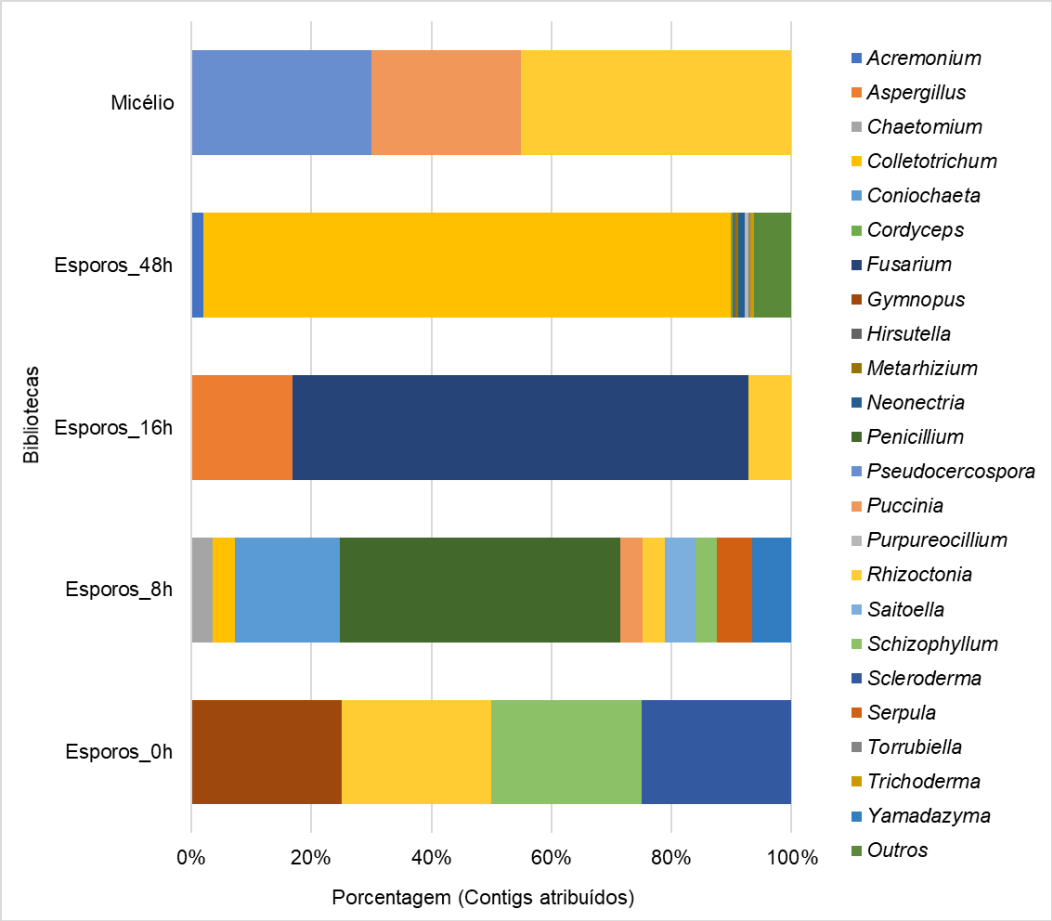


Figura 3. Os gêneros fúngicos mais abundantes para cada biblioteca.

O fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* ataca principalmente folhas jovens e macias de cacau causando lesões marrons cercadas por um halo amarelo claro característico (MAXIMOVA et al., 2006). A antracnose é uma doença causada por *Colletotrichum sp*. que leva à redução da produtividade em muitas culturas em todo o mundo (DA SILVA et al., 2020). A grande maioria das

espécies de Colletotrichum são classificadas em complexos. Inicialmente, nove complexos de Colletotrichum foram estabelecidos, juntamente com vários pequenos grupos e espécies monofiléticas. O gênero foi eleito o oitavo grupo mais importante de fungos fitopatogênicos do mundo, com base em conhecimentos científicos e econômicos (DEAN et al., 2012). Recentemente houve detecção de *C. gloeosporioides* em espécies nativas de cajueiro no Brasil, que foi identificado por características morfológicas e análise molecular (DOS SANTOS et al., 2019). Duas novas espécies foram descritas por (ROJAS et al., 2010) *C. tropicale* e *C. ignotum* consideradas assintomáticas frequentes em plantações de cacau. Em nosso trabalho tivemos 14 espécies associadas à microbiota para o gênero *Colletotrichum* sendo *Colletotrichum chlorophyti*, *Colletotrichum fioriniae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum higginsianum*, *Colletotrichum incanum*, *Colletotrichum nymphaeae*, *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum orchidophilum, Colletotrichum salicis, Colletotrichum siamense, Colletotrichum simmondsii, Colletotrichum sublineola, e Colletotrichum tofieldiae.*

A segunda espécie com maior número de transcritos atribuídos (440) foi o fungo filamentoso *Acremonium chrysogenum* (Ascomycota), uma espécie com importância industrial devido à capacidade de produzir cefalosporina C (CPC), é o principal recurso para a produção de 7 -ácido aminocefalosporânico (7-ACA), um intermediário para a fabricação de diferentes antibióticos na indústria (HU; ZHU, 2016).O fitopatógeno necrotrófico *Neonectria ditíssima* (Ascomycota) causador do cancro europeu (EC) foi identificado com 230 contigs atribuídos em nossas bibliotecas, é uma das doenças da macieira mais danosas em todo o mundo e foi registrada como presente nas culturas de macieira da América do Norte e do Sul resultando na perda de árvores (FLOREZ et al., 2020).

Em nossas bibliotecas também observamos a presença de muitas espécies do gênero Trichoderma (Ascomycota) **(Figura 4)**. A espécie *Trichoderma virens* esteve presente em cinco bibliotecas desde os esporos germinados de 0 horas até o micélio com 36 transcritos atribuídos, a biblioteca de esporos 48h teve o maior número de espécies do gênero Trichoderma como sendo *Trichoderma reesi*, *Trichoderma parareesei*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma guizhouense*, *Trichoderma gamsii* e *Trichoderma atroviride*. Espécies de

Trichoderma são comuns em ecossistemas de solo e raízes, são amplamente estudadas devido à sua grande capacidade de produzir metabólitos com potencial de inibir outros microrganismos e competir por recursos com outras espécies (HARMAN, 2006). Realmente, as espécies *T. virens* e *T. harzianum* mostraram-se promissoras para o controle de *M. roreri* (REYES-FIGUEROA et al., 2016). Uma cepa de biocontrole utilizando o fungo *T. reesei* (C2A), *in vitro*, exibiu atividade micoparasitária, reduzindo em 62% o crescimento micelial da espécie *Fusarium oxysporum* (GONZALEZ et al., 2020).

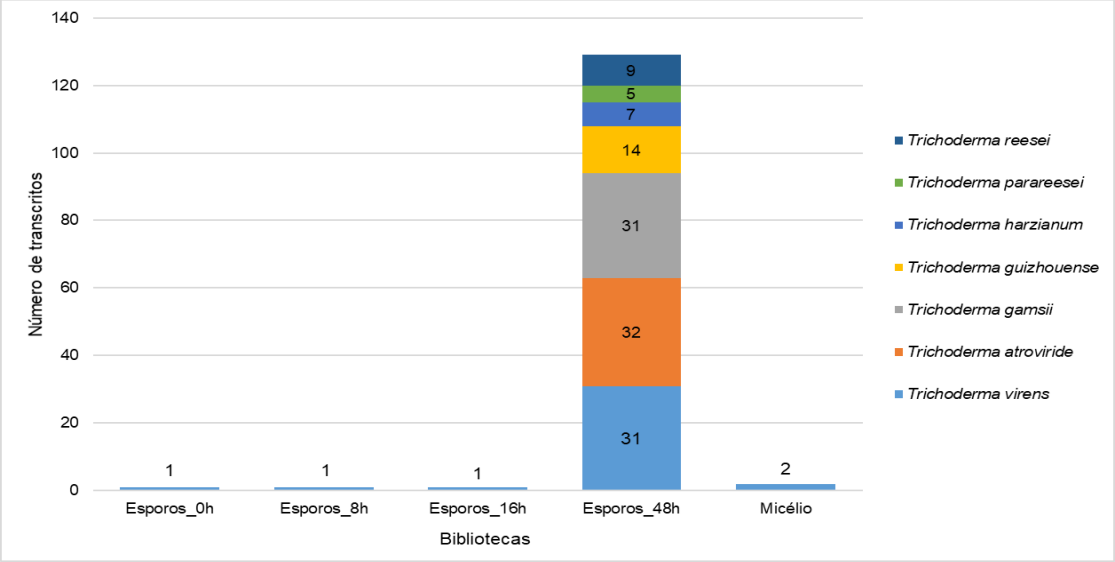


Figura 4. Espécies do gênero Trichoderma e sua abundancia nas diferentes condições.

Na biblioteca de esporos de 48 horas, foram identificados transcritos relacionados à espécie *Beauveria bassiana* (11 transcritos atribuídos). *B. bassiana* também foi considerada endofítica por natureza (AMOBONYE et al., 2020). Fungos endofíticos são espécies que desenvolveram a maior parte ou todo o seu ciclo de vida colonizando os tecidos da planta hospedeira, sem causar danos evidentes, e alguns apresentando benefícios contra o ataque de fitopatógenos (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013). Em geral, esses fungos endofíticos podem fornecer informações úteis para melhor compressão das interações planta-fungo e para conhecer melhor seu papel nos microbiomas associados ao hospedeiro (CHRISTIAN; WHITAKER; CLAY, 2015). Interessantemente, a espécie *B. bassiana* tem sido utilizada como fungo patogênico tóxico no controle de gafanhotos (TRALAMAZZA et al., 2019). Vale ressaltar que identificamos um grande número de espécies que foram agrupadas

como “outras”, a lista completa de fungos, bactérias (gêneros e espécies) e os transcritos atribuídos podem ser vistos nas **Tabelas Complementar 8, 9, 10 e 11.**

Para as bactérias, o gênero Pseudomonas apresentou o maior número de transcritos atribuídos em todas as bibliotecas sequenciadas **(Figura 5)**. O gênero Pseudomonas é um dos mais diversos gêneros bacterianos; amostras foram isoladas em todo o mundo de todos os tipos de ambientes, presentes em amostras clínicas, plantas, fungos e animais (PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VELÁZQUEZ, 2009). A espécie bacteriana *Pantoea dispersa* teve 1.761 transcritos atribuídos, quatro linhagens desta espécie foram descritas inibindo o crescimento do micélio do fungo *Ceratocytis fimbriata* como ser germinação de esporos, além de alterar a morfologia das hifas do fungo tendo assim potencial de controle biológico, esse fungo é o causador da podridão negra em batata-doce, (JIANG et al., 2019).

Em um estudo anterior, um total de 197 bactérias endofíticas foram obtidas do tecido interno de folhas e raízes de plantas de cacau em quatro diferentes sistemas de produção no estado do Pará, Amazônia brasileira, e o potencial antagônico dessas espécies em inibir o crescimento de espécies fitopatogênicas foram determinadas, sendo as mais promissoras TS R 2.19, OS R 1.4, OS L 2, TS R 2.8 e CS R 2.24 com taxas de inibição micelial entre 17,14% e 50,72% dos fungos fitopatogênicos em testes de antagonismo in vitro (ALVES-JÚNIOR et al., 2021).

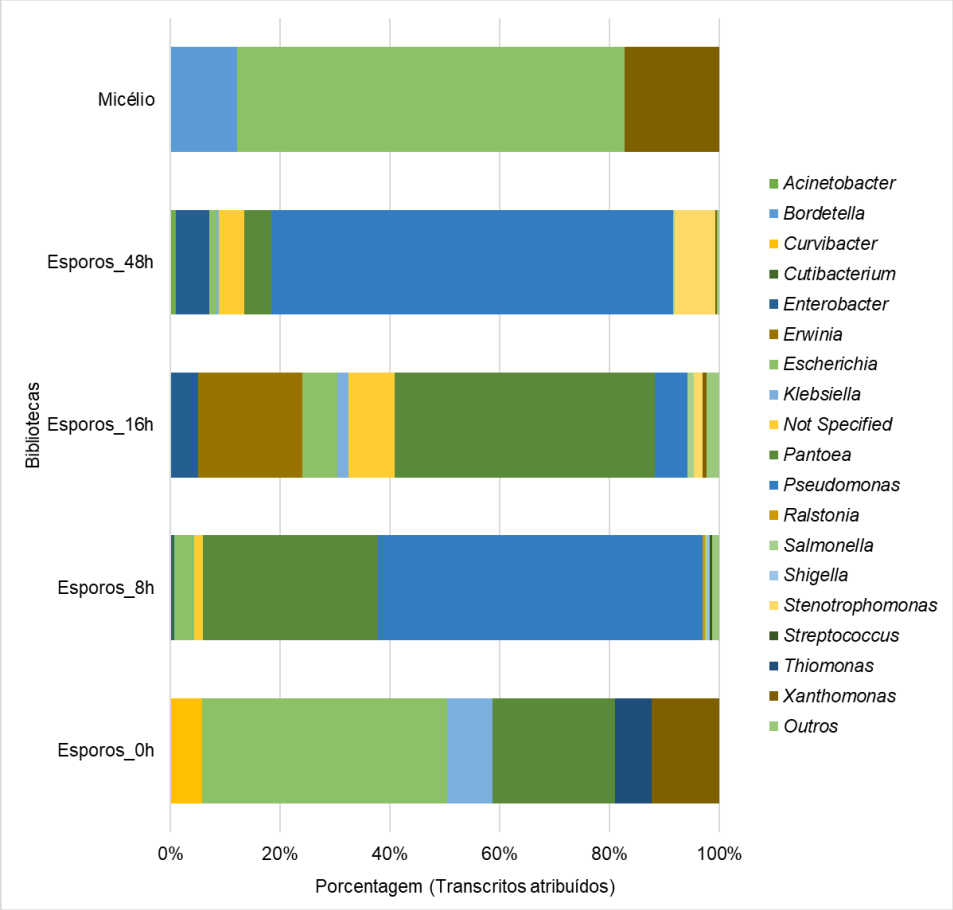


Figura 5. Gêneros bacterianos mais abundantes para cada condição em estudo.

5.3. Presença de sequências virais em *M. roreri*

Na biblioteca de esporos após germinação de 48 horas foram detectados quatro transcritos atribuídos a vírus. Dois transcritos foram atribuídos à espécie viral *Ophiostoma mitovirus 5, um contig para PPpW-3 de Pseudomonas e um contig para Sanxia narna-like virus 1*. De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) a espécie *Ophiostoma mitovirus 5* pertence ao gênero Mitovirus e família Mitoviridae (LEFKOWITZ et al., 2018). Recentemente, a sequência completa do genoma de um novo mitovírus do fungo fitopatogênico *Colletotrichum higginsianum*, e após análise de similaridade de sequência com membros do gênero Mitovirus e análise filogenética indicou que *Chigginsianum mitovirus 1 (ChMV1)* assim designado pertence ao gênero mitovirus e é o primeiro relato de um mitovírus em *C. higginsianum* (WANG; LIU; ZHOU, 2021).

No estudo desenvolvido por (LIU et al., 2021) foi descrito o primeiro relato de um novo micovírus (*Botryosphaeria dothidea mitovirus 1*) (BdMV1) para o gênero

Botryosphaeria que foi isolado do fungo fitopatogênico *Botryosphaeria dothidea*. O estudo do micoviroma do fungo fitopatogênico *Neofusicoccum parvum* revelou três contigs com semelhanças com os membros da família *Narnaviridae* e Mitoviridae, os contigs 1 (2885 nt) e 2 (2629 nt) foram relacionados a mitovírus, enquanto o contig 14 (2064 nt) foi mais intimamente relacionado às sequências de narnavírus (MARAIS et al., 2021). A espécie viral *Sanxia narna-like virus 1* teve um transcrito atribuído, de acordo com a taxonomia do National Center for Biotechnology Information (NCBI), a espécie viral *Sanxia narna-like virus 1* é um vírus de RNA não classificado ShiM-2016 (SCHOCH et al., 2020). Além disso, o fago *PPpW-3 de Pseudomonas* que também teve um transcrito atribuído e pertence à família *Myoviridae*.

5.4. Caracterização de sequências virais

A partir dos transcritos classificados como não atribuídos, usamos a ferramenta Diamond para tentar identificar outros transcritos virais (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2015) agora utilizando o banco de dados público de sequências do NCBI. No total, foram identificados 30 transcritos com semelhança ao gênero Narnavirus **(Tabela Complementar 4)** distribuídos nas bibliotecas de esporos (0, 8, 16 e 48 horas após a germinação). Após consolidação dos transcritos montados e remoção de redundância, chegamos a três sequências virais de tamanho 2.460 nt (Transcrito 1), 2.332 nt (Transcrito 2), 3.606 nt (Transcrito 3) que foram submetidas a curadoria manual utilizando o banco de dados mais recente do NCBI com as variantes do Blast, BlastN e BlastX (ALTSCHUL et al., 1997) **(Tabela Complementar 5, 6, 7)**. O transcrito 1, apresentou um quadro de leitura aberto com 788 aminoácidos, para o transcrito 2 o melhor resultado apresentou 754 aminoácidos, e para o transcrito 3 a ORF com o melhor potencial de codificação conteve 1.085 aminoácidos **(Figura complementar 3,4 ,5)**. A análise de domínios não mostrou nenhuma região altamente conservada para nenhum dos três transcritos. Os transcritos apresentaram similaridade para vírus da família *Narnaviridae*, como *Erysiphe necator associado narnavirus 4* (QHD64827.1), *Magnaporthe oryzae narnavirus 1* (BCH36655.1) e *Monilinia narnavirus H* (QED42934.1).

5.5. Análise filogenética com contigs virais

Os três transcritos montados foram utilizados na análise filogenética juntamente com diferentes espécies da família *Narnaviridae*, família mais relacionada aos transcritos virais montados segundo as análises de similaridade de sequência. O Transcrito 1 agrupou-se com a espécie *Erysiphe necator* narnavirus4 (QHD64827), enquanto o Transcrito 2 agrupou-se com a espécie *Oidiodendron maius* splipalmivirus 1 (QNN89180), ambos apresentando 100 % de réplicas de bootstrap. O Transcrito 3 formou um cluster com as espécies *Erysiphe necator* narnavirus 22 (QJT93754) e *Monilinia* narnavirus H (QED42934). De acordo com nossos resultados, os transcritos identificados em nosso estudo representam novas espécies virais relacionadas à família *Narnaviridae*, gênero narnavirus **(Figura 6)**. Eles foram nomeados *Moniliopthora roreri associated narnavirus 1* (Transcrito 2)*, Moniliopthora roreri associated narnavirus 2* (Transcrito 1) *e Moniliopthora roreri associated narnavirus 3* (Transcrito 3).

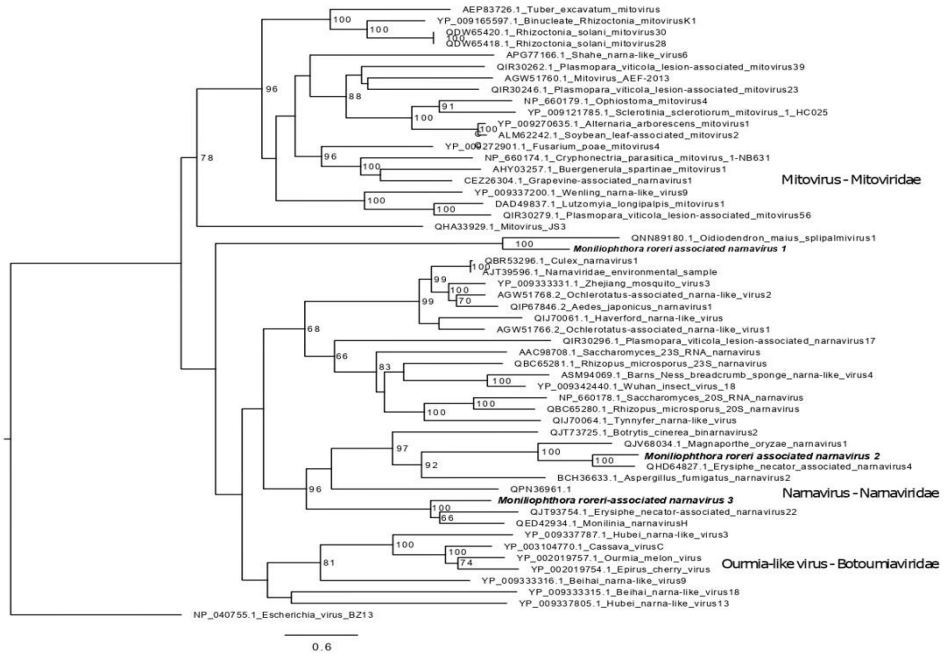


Figura 6. Árvore filogenética para as espécies virais identificados neste estudo.

5.6. Presença dos vírus associados a *M. roreri* em dados públicos

Para avaliar a presença dos vírus encontrados em *M. roreri* em nosso estudo, investigamos bibliotecas disponíveis publicamente derivadas a partir de amostras biológicas do fungo. No total utilizamos dados de dois trabalhos diferentes, totalizando 3 bibliotecas. Apenas as duas bibliotecas de Los Rios, Equador apresentadas pelo USDA, contendo material misto de 30 dias (30DMRI) e 60 dias (60DMRI) após a inoculação de frutos de *T. cacao* com o fungo *M. roreri*, apresentaram quantificação dos transcritos 1 *(Moniliophthora roreri associated narnavirus 2)* e 2 (*Moniliophthora roreri associated narnavirus 1)* **(Figura 7)**. O transcrito 3 não foi identificado. Avaliamos a presença dos transcritos virais também em bibliotecas públicas do táxon irmão *M. perniciosa*, utilizando 10 bibliotecas de plântulas sadias e plântulas 30 dias após a infecção por *M. perniciosa* (TEIXEIRA et al., 2014). Contudo, não houve identificação dos transcritos virais em nenhuma das bibliotecas analisadas.

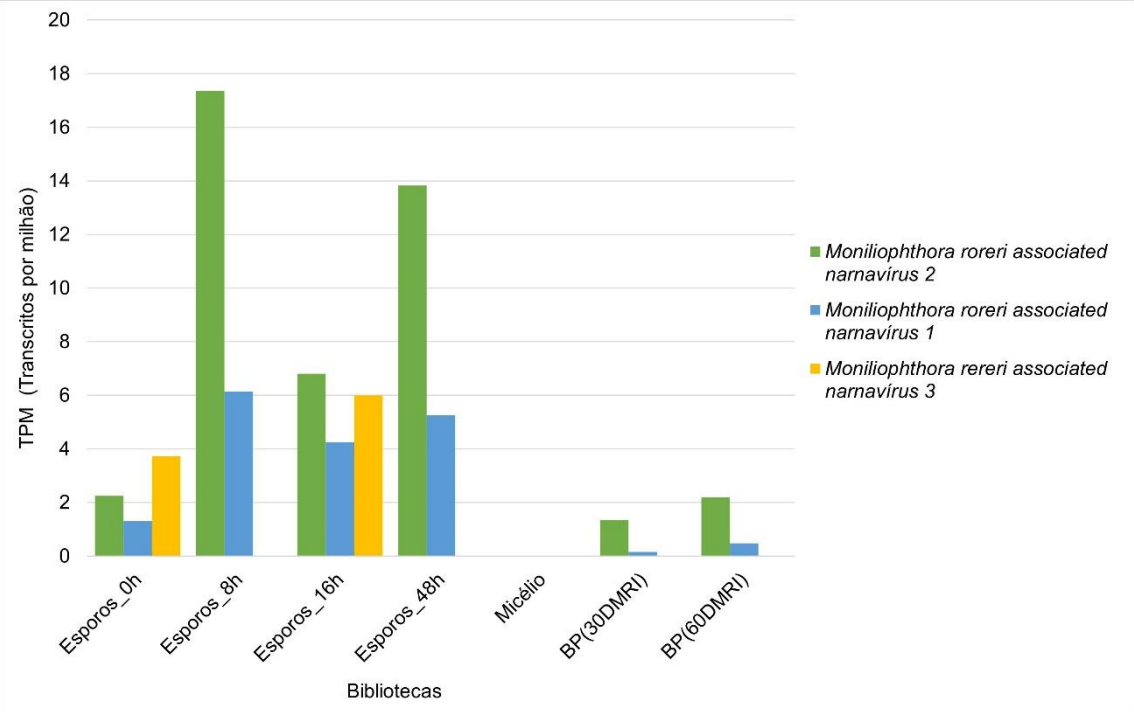


Figura 7. Quantificação de transcritos virais nas cinco bibliotecas desenvolvidas no presente trabalho (Esporos e Micélio) e duas bibliotecas públicas (BP) de *M. roreri.*

6. DISCUSSÃO

O cacau *(Theobroma cacao L.)* é uma cultura de importância econômica para diversos países do mundo, mas sua produção e fornecimento de amêndoas, principal fonte de fabricação do chocolate, tem sido prejudicado por condições climáticas desfavoráveis (WESSEL; QUIST-WESSEL, 2015) e ataque de patógenos levando a perdas econômicas e abandono de plantações. É necessário um esforço para abordar os problemas associados ao controle e manejo de diferentes doenças no cacau para garantir a sustentabilidade econômica dos produtores (ADENIYI, 2019), as perdas de colheita devido a patógenos no cacau especialmente aqueles que afetam os frutos têm um custo de £ 1500 milhões por ano (EVANS; PRIOR, 1987). As doenças fúngicas, e as espécies de Moniliophthora em particular, continuam sendo uma grande restrição à produção de cacau nas Américas e, se excederem sua faixa atual, ameaçam prejudicar seriamente a indústria de chocolate em todo o mundo (MCELROY et al., 2018).

Países como a Costa Rica, onde a monilíase está presente, com seu Centro Agropecuário Tropical de Pesquisa e Ensino (CATIE), iniciaram pesquisas para encontrar soluções para variedades resistentes e tolerantes à monilíase, resultando em clones em seus programas de melhoramento com propriedades desejáveis, como o CATIE - R1, CATIE - R4, CATIE - R6, CC - 137, ICS - 95 e PMCT - 58 (PHILLIPS-MORA et al., 2012). Esses clones estão atualmente disponíveis para mais de 6.000 agricultores no Panamá, Costa Rica, Nicarágua, Honduras, El Salvador, Guatemala e Belize por meio de jardins clonais, e foram recentemente introduzidos no México, Brasil e Estados Unidos para diferentes pesquisas (BAILEY et al., 2018).

Estudos exploratórios para conhecer como esses fungos se desenvolvem são importantes para propor estratégias de controle, neste sentido a patogenômica comparativa do genoma e efetoroma dos fungos *M. roreri e M. perniciosa* revelou enzimas envolvidas na degradação da parede celular o que promove a degradação de compostos vegetais e facilita a infecção (BARBOSA et al., 2018). O sequenciamento do genoma de *M. roreri* e o RNA-Seq revelou expressão gênica diferencial durante as fases biotrófica e necrotrófica, proteínas

secretadas na fase biotrófica tem ação na degradação da parede celular, na fase necrotrófica sugerem que o fungo continua a proteger seus micélios das defesas da planta, enquanto libera ativamente enzimas e toxinas e porem ter a morte celular nos tecidos infectados (MEINHARDT et al., 2014). Alternativas como o controle químico, com fungicida à base de cobre, são uma opção para o controle da monilíase e resultaram num rendimento ainda maior (Hidalgo et al., 2003). Espécies do género *Trichoderma sp*. e *Bacillus sp.* são agentes de controle biológico promissores para *M. roreri* (VERA LOOR et al., 2018). Práticas de controle cultural - por exemplo, poda regular de árvores, colheita frequente de frutos, remoção regular de frutos infestados, gestão de ervas daninhas, e um sistema agroflorestal de cacau não aumentou a incidência de pragas e doenças (ARMENGOT et al., 2020).

Em nosso trabalho, realizamos um estudo exploratório para investigar o microbioma do cacau infectado com *M. roreri* em diferentes condições. Nossos dados revelaram abundância e diversidade de muitos gêneros de fungos como, *Colletotrichum, Fusarium, Acremonium, Trichoderma, Neonectria, Metarhizium, Stachybotrys, Penicillium, Aspergillus* entre outros. Além disso, os gêneros bacterianos mais presentes em nosso estudo foram *Pseudomonas, Pantoea, Enterobacter, Acinetobacter, Stenotrophomonas, Escherichia, Erwinia, Klebsiella, Xanthomonas, Burkholderia* e outros. Os resultados encontrados em nosso estudo foram semelhantes a outros estudos metagênomicos publicados na literatura. No estudo realizado por (Carrera-Sánchez et al., 2016) foram coletados materiais vegetais infectados por *M. roreri* para analisar a microbiota associada à doença, com resultados mostrando a presença dos gêneros *Cylindrocladium, Dichobotrys, Moniliophthora, Colletotrichum e Phytophthora.* A análise da rizosfera do cacau por meio de metatranscriptômica revelou que as rizobactérias são promotoras de crescimento de plantas em condições de seca (TAMCHEK; LEE; ROSMIN, 2019). Uma análise metagenômica do microbioma de fermentação de grãos de cacau identificou uma alta porcentagem de bactérias, leveduras e bacteriófagos do microbioma de cacau. As espécies *Lactobacillus, Gluconacetobacter, Acetobacter e Gluconobacter* apresentaram maior dominância (AGYIRIFO et al., 2019). Outro sequenciamento metagenômico em frutos de cacau fermentados revelou 97 gêneros, com

Acetobacter, Komagataeibacter, Limosilactobacillus, Liquorilactobacillus, Lactiplantibacillus, Leuconostoc, Paucilactobacillus, Hanseniaspora e Saccharomyces dominando (VERCE et al., 2021). Isolados bacterianos endofíticos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Chryseobacterium proteolyticu*m foram obtidos de tecidos saudáveis de cacau, como folhas e frutos, além disso, ambas as espécies apresentaram redução da lesão da vagem na doença do cacau causada pelo patógeno *P. palmivora* (ALSULTAN et al., 2019).

Compreender a interação entre bactérias endofíticas e plantas de cacau é importante para entender como esses microrganismos interagem em diferentes sistemas de produção agrícola. Bactérias endofíticas colonizam as raízes das plantas de cacau de forma eficiente e essas espécies ainda apresentam resultados promissores na inibição do crescimento de fungos (ALVES-JÚNIOR et al., 2021). Em frutos sadios de cacau, 25 fungos endofíticos foram isolados e caracterizados morfologicamente e com suas estruturas reprodutivas, além de testados *in vitro* e *in vivo* contra o fungo *Phythophthora palmivora*, sendo Aspergillus, Fusarium e Ramichloridium os que apresentaram atividade máxima contra *P. palmivora* em cultivo duplo, ensaios de frutos e plântulas (SIMAMORA; HAHULY; HENUK, 2021). Em nosso estudo os gêneros Aspergillus e Fusarium estiveram entre os 10 gêneros mais abundantes, possuindo um grande número de espécies, possibilitando testar essas espécies como controladores biológicos. As plantas interagem com uma grande variedade de fungos endofíticos que residem em diferentes tecidos vegetais de seu hospedeiro, algumas vezes contribuindo para o crescimento da planta e/ou defesa contra estresse biótico e abiótico, além de interagir com patógenos fúngicos (GANGE et al., 2019).

Um dos 10 gêneros fúngicos mais abundantes na microbiota foi Trichoderma. Espécies como *T. theobromicola* e *T. paucisporum* foram isoladas do cacaueiro na América do Sul, ambas inibiram o desenvolvimento in vitro de *M. roreri* (SAMUELS et al., 2006). Vários isolados foram descritos como potenciais controles biológicos da monilíase, isolados de Trichoderma de diferentes regiões da Colômbia, demonstraram capacidade parasitária, competição por espaços, tendo potencial antagônico no crescimento micelial em substrato comum contra cepas do fungo *M. roreri* (Suárez & Cabrales, 2008) (SUÁREZ; CABRALES, 2008). Esses resultados reforçam o potencial de cepas

de Trichoderma para a elaboração de formulações biológicas para o controle da Moniliase (LEIVA et al., 2020). Isolado de *Trichoderma harzianum Rifai* de um fruto de cacau infectado e capaz de produzir ácido não anóico (pelargônico), causando uma alta porcentagem de inibição da germinação de esporos in vitro contra *M. roreri*) (ANEJA; GIANFAGNA; HEBBAR, 2005). A espécie *Trichoderma viride* com a produção dos metabólitos secundários viridina e gliovirina teve efeito sinérgico tanto para as inibições do crescimento micelial quanto para a germinação de conídios dos fungos do gênero Phythopthora, *P. palmivora e P. megakaria* (PAKORA et al., 2018). Na microbiota do fruto do cacaueiro infectado por *M. roreri* estudado em nosso trabalho foram identificadas as seguintes espécies do gênero Trichoderma, *T. virens, T. reesei, T. parareesei, T. harzianum, T. guizhouense, T. gamsii e T. atroviride*, algumas espécies encontradas em nosso trabalho têm potencial para controle biológico baseado na literatura, e outras têm a possibilidade de testar in vitro os efeitos que produzirão sobre o fungo *M. roreri*.

Além disso, identificamos três contigs virais que foram atribuídos a espécies virais da família *Narnaviridae*, gênero Narnavirus, tanto por similaridade contra bancos de dados de referência quanto por análises filogenéticas. De acordo com o ICTV, duas espécies são descritas para esta família, o *Saccharomyces 20S RNA narnavirus* e *Saccharomyces 23S RNA narnavirus*, a sua composição genômica é vírus de RNA de sentido positivo de cadeia única (ou ssRNA vírus (+)(LEFKOWITZ et al., 2018). Uma das características dos membros desta família é que eles contêm genomas mais simples do que qualquer vírus de RNA, variando de 2,3 a 3,6 kb e codificando apenas um único polipeptídeo que possui um domínio RNA polimerase dependente de RNA (HILLMAN; CAI, 2013). Membros desta família têm sido relatados como vírus fúngicos ou micovírus, sendo encontrados em uma variedade de espécies fúngicas associadas a infecções assintomáticas (GHABRIAL; SUZUKI, 2008).

As abordagens metagenômicas podem ser úteis para detectar e identificar novos micovírus (SON; YU; KIM, 2015). Esses métodos estão aumentando rapidamente a identificação viral e fornecendo evidências de sua alta abundância e complexidade taxonômica (GARCÍA-PEDRAJAS et al., 2019). As infecções por micovírus são geralmente crípticas (assintomáticas), mas as investigações

centram-se na hipovirulência potencial que pode causar no fungo hospedeiro, um processo que pode ser pesquisado no contexto de proporcionar um controlo biológico sustentável das doenças fúngicas (ABDOULAYE; FODA; KOTTA-LOIZOU, 2019). Por exemplo, o fungo *Colletotrichum sp*. é um dos fitopatógenos mais importantes economicamente, afetando uma grande variedade de culturas em várias regiões do mundo, é infectado por micovírus da família *Partiviridae*, através de alterações no desenvolvimento fúngico pode contribuir para uma agricultura sustentável (CASAS et al., 2021). Nossos três contigs seriam espécies novas da família *Narnaviridae*. Na nossa análise filogenética, o contig 1 ficou agrupado com o *Erysiphe necator narnavirus*, virus que foi associado ao fungo fitopatogênico *Erysiphe necator* (trabalho ainda não publicado). O Contig 1 também foi próximo da espécie *Magnaporthe Oryzae Narnavirus 1* que é um novo micovírus e foi descrito no fungo *Magnaporthe oryzae* (Ascomycota) causador da brusone no arroz (LIN et al., 2020). O Contig 2 foi agrupado com a espécie *Oidiodendron maius splipalmivirus 1*, identificados no estudo ¨O viroma de uma coleção de fungos endomicorrízicos revela novos táxons virais com organização genômica inédita, onde 2 contigs foram identificados para a espécie *Oidiodendron maius splipalmivirus 1 RNA1* (DN37559_c1_g1_i3) e *Oidiodendron maius splipalmivirus 1 RNA2* (DN43802_c0_g4_i1). Esse estudo destaca a importância de se identificar novos vírus em fungos que revelem os limites da diversidade de vírus de RNA caracterizados, bem como saber qual é o nicho ecológico que os vírus preferem na natureza (SUTELA et al., 2020). O Contig 3 formou um cluster com as espécies *Erysiphe necator-associated narnavirus 22* e *Monilinia narnavirus H*. Contudo, estas espécies estão entre a grande variedade de vírus que ainda não foram aceitos pelo ICTV, e suas informações são limitadas.

7. CONCLUSÃO

Existe uma vida microbiana que ocorre naturalmente nas lavouras, esses microrganismos teriam a capacidade de colonizar diferentes tecidos vegetais e sua abundância vai depender dos nutrientes disponíveis, do sistema de plantio, etc. Como esperado, confirmamos a existência de uma variada microbiota associada à infecção causada por *M. roreri* em cacau com uma grande diversidade de espécies fúngicas e bacterianas, algumas delas caracterizadas como endofíticas com potencial de controle biológico, como as espécies do gênero *Trichoderma*. Além disso, ainda encontramos sequências derivadas de vírus, os quais as nossas análises indicam ser novas espécies virais da família *Narnaviridea*, gênero Narnavirus, que até o momento são o primeiro relato de vírus infectando o fungo *M. roreri*. Para os virus identificados, testes ainda precisam ser feitos para saber os efeitos que teriam sobre o fungo, visto que a maioria das espécies aceitas pelo ICTV desta família são assintomáticos para o hospedeiro.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOULAYE, A. H.; FODA, M. F.; KOTTA-LOIZOU, I. Viruses Infecting the Plant Pathogenic Fungus Rhizoctonia solani. **Viruses**, v. 11, n. 12, p. 1113, 30 nov. 2019.

ABROKWAH, F. et al. Geographical Distribution of Cacao swollen shoot virus Molecular Variability in Ghana. **Plant Disease**, v. 100, n. 10, p. 2011–2017, 1 out. 2016.

ADENIYI, D. **Diversity of Cacao Pathogens and Impact on Yield and Global Production**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

AGROLINK. **Brasil detecta foco de praga do cacau e cupuaçu**. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/noticias/brasil-detecta-foco-de-praga-do-cacau-e-cupuacu_452707.html>. Acesso em: 18 nov. 2021.

AGUIAR-PULIDO, V. et al. Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 12, n. Suppl 1, p. 5–16, 12 maio 2016.

AGYIRIFO, D. S. et al. Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities. **Heliyon**, v. 5, n. 7, p. e02170, 1 jul. 2019.

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, Theobroma cacao) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, out. 2005a.

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, Theobroma cacao) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, out. 2005b.

AKAIKE, H. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. In: PARZEN, E.; TANABE, K.; KITAGAWA, G. (Eds.). . **Selected Papers of Hirotugu Akaike**. Springer Series in Statistics. New York, NY: Springer, 1998. p. 199–213.

ALSULTAN, W. et al. Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria antagonistic to Phytophthora palmivora causing black pod of cocoa in Malaysia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1077–1091, 1 dez. 2019.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997.

ALVES-JÚNIOR, M. et al. Functional and morphological analysis of isolates of phylloplane and rhizoplane endophytic bacteria interacting in different cocoa production systems in the Amazon. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100039, 1 dez. 2021.

AMEYAW, G. A. **Management of the Cacao Swollen Shoot Virus (CSSV) Menace in Ghana: The Past, Present and the Future**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

AMOBONYE, A. et al. Biotechnological potential of Beauveria bassiana as a source of novel biocatalysts and metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 1019–1034, 2 out. 2020.

Andrews, S. (2017). FastQC: **a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010.

ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. J.; HEBBAR, P. K. Trichoderma harzianum produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67, n. 6, p. 304–307, 1 dez. 2005.

ARMENGOT, L. et al. Cacao agroforestry systems do not increase pest and disease incidence compared with monocultures under good cultural management practices. **Crop Protection**, v. 130, p. 105047, 1 abr. 2020.

ASARE, E. et al. Colletotrichum gloeosporioides s.l. causes an outbreak of anthracnose of cacao in Ghana. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 38, n. 2, p. 107–115, 15 mar. 2021.

BAILEY, B. A. et al. Moniliophthora roreri, causal agent of cacao frosty pod rot. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 7, p. 1580–1594, 15 fev. 2018.

BAILEY, B. A.; STREM, M. D.; WOOD, D. Trichoderma species form endophytic associations within Theobroma cacao trichomes. **Mycological Research**, v. 113, n. 12, p. 1365–1376, dezembro 2009.

BARBOSA, C. S. et al. Genome sequence and effectorome of Moniliophthora perniciosa and Moniliophthora roreri subpopulations. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 509, 3 jul. 2018.

BARTLEY, B. G. D. Genetic diversity of cacao and its utilization. **Genetic Diversity of Cacao and Its Utilization**, p. 1–341, 15 abr. 2005.

BASTOS, C. **ISOLATE OF Trichoderma brevicompactum FOR THE CONTROL OF COCOA WITCHES' BROOM DISEASE: PRELIMINARY RESULTS**. 2012.

BHATTACHARJEE, R. R.; KUMAR, P.L. Cacao. In: KOLE, C. (Ed.), **Genome mapping and molecular breeding in plants**, v 6. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 2007. p. 127-142.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.

BRAY, N. L. et al. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 525–527, maio 2016.

Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 24–33, 1 fev. 2005.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 59–60, jan. 2015.

CABRERA, A. et al. Endophyte microorganisms associated to Theobroma cacao as biological control agents of Moniliophthora roreri. v. 45, p. 81–87, 1 set. 2018.

CARRERA-SÁNCHEZ, K. et al. Micobiota asociada a frutos de cacao con síntomas de moniliasis en la amazonía ecuatoriana. **Centro Agrícola**, v. 43, n. 1, p. 48–54, mar. 2016.

CASAS, L. L. et al. Mycoviruses infecting Colletotrichum spp.: A comprehensive review. **Brazilian Journal of Biology = Revista Brasleira De Biologia**, v. 83, p. e248975, 2021.

CHRISTIAN, N.; WHITAKER, B. K.; CLAY, K. Microbiomes: unifying animal and plant systems through the lens of community ecology theory. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 869, 7 set. 2015.

COLGAN, A. M.; CAMERON, A. D.; KRÖGER, C. If it transcribes, we can sequence it: mining the complexities of host–pathogen–environment interactions using RNA-seq. **Current Opinion in Microbiology**, Cell regulation. v. 36, p. 37–46, 1 abr. 2017.

CORTÉS-LÓPEZ, N. et al. Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos. **Revista Iberoamericana de Ciencias**, v. 1, p. 45–58, 31 dez. 2014.

DA SILVA, L. L. et al. Colletotrichum: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1891–1904, mar. 2020.

DANTAS NETO, A. et al. Caracterização de uma população de cacaueiro para mapeamento de genes de resistência à vassoura-de-bruxa e podridão-parda. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 380–386, ago. 2005.

DEAN, R. et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 414–430, 4 abr. 2012.

DOS SANTOS, F. N. et al. Major phytopathogens and strains from cocoa (Theobroma cacao L.) are differentiated by MALDI-MS lipid and/or peptide/protein profiles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 7, p. 1765–1777, mar. 2017.

DOS SANTOS, G. R. et al. Detection of Colletotrichum gloeosporioides in native cashew species in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 899–903, out. 2019.

DOSTERT, N. et al. **Hoja botánica: Cacao - *Theobroma cacao* L.** 2012

EVANS, H. C. Frosty Pod Rot (Moniliophthora roreri). In: BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W. (Eds.). . **Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 63–96.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, Theobroma gileri, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, v. 2, n. 2, p. 149–160, 1 maio 2003.

EVANS, H. C.; PRIOR, C. Cocoa Pod Diseases: Causal Agents and Control. **Outlook on Agriculture**, v. 16, n. 1, p. 35–41, 1 mar. 1987.

FLOREZ, L. M. et al. Reference genes for gene expression analysis in the fungal pathogen Neonectria ditissima and their use demonstrating expression up-regulation of candidate virulence genes. **PloS One**, v. 15, n. 11, p. e0238157, 2020.

FRANCO, R.; OÑATIBIA-ASTIBIA, A.; MARTÍNEZ-PINILLA, E. Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate. **Nutrients**, v. 5, n. 10, p. 4159–4173, 18 out. 2013.

GANGE, A. C. et al. Meta-analysis of the role of entomopathogenic and unspecialized fungal endophytes as plant bodyguards. **The New Phytologist**, v. 223, n. 4, p. 2002–2010, set. 2019.

GARCIA, C. et al. Somatic Embryogenesis in Theobroma cacao L. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). . **Plant Cell Culture Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2018. v. 1815p. 227–245.

GARCÍA-PEDRAJAS, M. D. et al. Mycoviruses in Biological Control: From Basic Research to Field Implementation. **Phytopathology®**, v. 109, n. 11, p. 1828–1839, 1 nov. 2019.

GAUTAM, A. K. Colletotrichum gloeosporioides: Biology, Pathogenicity and Management in India. **Journal of Plant Physiology & Pathology**, v. 02, n. 02, 2014.

GHABRIAL, S. A.; SUZUKI, N. Fungal Viruses. In: MAHY, B. W. J.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. (Eds.). . **Encyclopedia of Virology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2008. p. 284–291.

GONZALEZ, M. F. et al. Evaluation of the sensitivity and synergistic effect of Trichoderma reesei and mancozeb to inhibit under in vitro conditions the growth of Fusarium oxysporum. **Communicative & Integrative Biology**, v. 13, n. 1, p. 160–169, 20 out. 2020.

GRABHERR, M. G. et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 15 maio 2011.

HARMAN, G. E. Overview of Mechanisms and Uses of Trichoderma spp. **Phytopathology®**, v. 96, n. 2, p. 190–194, 1 fev. 2006.

HIDALGO, E. et al. A Field Investigation into Delivery Systems for Agents to Control *Moniliophthora roreri*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 9, p. 953–961, nov. 2003.

HILLMAN, B. I.; CAI, G. The family narnaviridae: simplest of RNA viruses. **Advances in Virus Research**, v. 86, p. 149–176, 2013.

HIPÓLITO-ROMERO, E. et al. Breve aproximación a la naturaleza genómica de Moniliophthora roreri CPMRT01 aislado de cacao en Tabasco, México//Brief approach to the genomic nature of Moniliophthora roreri CPMRT01 isolated from cocoa in Tabasco, Mexico. **Biotecnia**, v. 22, n. 2, p. 39–49, 21 mar. 2020.

HU, Y.; ZHU, B. Study on genetic engineering of Acremonium chrysogenum, the cephalosporin C producer. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 143–149, 25 set. 2016.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868–877, set. 1999.

JIANG, L. et al. Potential of Pantoea dispersa as an effective biocontrol agent for black rot in sweet potato. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 16354, 8 nov. 2019.

JOHNSON, E. S. et al. First report of Moniliophthora roreri causing frosty pod rot on Theobroma cacao in Jamaica. **New Disease Reports**, v. 36, n. 1, p. 2–2, 2017.

JOHNSON, J. M. et al. **Manual De Manejo Y Produccion Del Cacaotero**. p. 40, 2008.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 19 jul. 2019.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 4 mar. 2012.

LEFKOWITZ, E. J. et al. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D708–D717, 4 jan. 2018.

LEIVA, S. et al. Assessment of the Potential of Trichoderma spp. Strains Native to Bagua (Amazonas, Peru) in the Biocontrol of Frosty Pod Rot (Moniliophthora roreri). **Agronomy**, v. 10, n. 9, p. 1376, set. 2020.

LIMA, L. J. R. et al. *Theobroma cacao* L., “The Food of the Gods”: Quality Determinants of Commercial Cocoa Beans, with Particular Reference to the Impact of Fermentation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 8, p. 731–761, set. 2011.

LIN, Y. et al. A novel narnavirus from the plant-pathogenic fungus Magnaporthe oryzae. **Archives of Virology**, v. 165, n. 5, p. 1235–1240, maio 2020.

LIU, H. et al. Molecular characterization of a novel mitovirus from the plant-pathogenic fungus Botryosphaeria dothidea. **Archives of Virology**, v. 166, n. 2, p. 633–637, fev. 2021.

MARAIS, A. et al. Characterization of the Mycovirome of the Phytopathogenic Fungus, Neofusicoccum parvum. **Viruses**, v. 13, n. 3, p. 375, 27 fev. 2021.

MARCELINO, V. R. et al. Metatranscriptomics as a tool to identify fungal species and subspecies in mixed communities – a proof of concept under laboratory conditions. **IMA Fungus**, v. 10, n. 1, p. 12, 8 ago. 2019.

MARELLI, J.-P. et al. Chocolate Under Threat from Old and New Cacao Diseases. **Phytopathology®**, v. 109, n. 8, p. 1331–1343, ago. 2019.

MAXIMOVA, S. N. et al. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in Theobroma cacao L. enhances resistance against the pathogen, Colletotrichum gloeosporioides. **Planta**, v. 224, n. 4, p. 740–749, set. 2006.

MCELROY, M. S. et al. Prediction of Cacao (Theobroma cacao) Resistance to Moniliophthora spp. Diseases via Genome-Wide Association Analysis and Genomic Selection. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 343, 2018.

MEINHARDT, L. W. et al. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, Moniliophthora roreri, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. **BMC genomics**, v. 15, p. 164, 27 fev. 2014.

MEINHARDT, L. W. et al. Moniliophthora perniciosa, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 577–588, 11 jul. 2008.

MENZEL, P.; NG, K. L.; KROGH, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11257, set. 2016.

MONTAGNA, M. T. et al. Chocolate, "Food of the Gods": History, Science, and Human Health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 24, p. 4960, dez. 2019.

MORA-OCAMPO, I. Y. et al. Ceratocystis cacaofunesta differentially modulates the proteome in xylem-enriched tissue of cocoa genotypes with contrasting resistance to Ceratocystis wilt. **Planta**, v. 254, n. 5, p. 94, 13 out. 2021.

MOROZOVA, O.; HIRST, M.; MARRA, M. A. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, p. 135–151, 2009.

MOTAMAYOR, J. C. et al. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, v. 89, n. 5, p. 380–386, nov. 2002.

NASCIMENTO, A. D. et al. First Report of Colletotrichum aeschynomenes Causing Anthracnose in Cacao (Theobroma cacao) in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3284–3284, 1 dez. 2019.

NGUYEN, L.-T. et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, jan. 2015.

OSORIO-GUARÍN, J. A. et al. Genome-Wide Association Study Reveals Novel Candidate Genes Associated with Productivity and Disease Resistance to Moniliophthora spp. in Cacao (Theobroma cacao L.). **G3: Genes|Genomes|Genetics**, v. 10, n. 5, p. 1713–1725, 11 mar. 2020.

PAKORA, G.-A. et al. Inhibition of Phytophthora species, agents of cocoa black pod disease, by secondary metabolites of Trichoderma species. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 30, p. 29901–29909, out. 2018.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.-H.; VELÁZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus Pseudomonas. **Infection, Genetics and Evolution**, Includes papers from the Special Issue “Parasitology in Mexico”. v. 9, n. 6, p. 1132–1147, 1 dez. 2009.

PHILLIPS-MORA, W. et al. Catálogo. 1 jan. 2012.

PHILLIPS-MORA, W.; AIME, M.; WILKINSON, M. Biodiversity and biogeography of the cacao (Theobroma cacao) pathogen Moniliophthora roreri in tropical America. **Plant Pathology**, v. 56, p. 911–922, 1 dez. 2007.

POSADA, F.; VEGA, F. E. Establishment of the fungal entomopathogen Beauveria bassiana (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (Theobroma cacao). **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1195–1200, 1 nov. 2005.

PRIYA, P.; ANEESH, B.; HARIKRISHNAN, K. Genomics as a potential tool to unravel the rhizosphere microbiome interactions on plant health. **Journal of Microbiological Methods**, v. 185, p. 106215, 1 jun. 2021.

REYES-FIGUEROA, O. et al. Trichoderma species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of Moniliophthora roreri. **Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente**, v. 22, n. 2, p. 149–163, ago. 2016.

ROJAS, E. I. et al. Colletotrichum gloeosporioides s.l. associated with Theobroma cacao and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, v. 102, n. 6, p. 1318–1338, dez. 2010.

RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (Theobroma cacao L.) and biological control of Crinipellis perniciosa, causal agent of Witches'

SAMUELS, G. J. et al. Trichoderma theobromicola and T. paucisporum: two new species isolated from cacao in South America. **Mycological Research**, v. 110, n. Pt 4, p. 381–392, abr. 2006.

SÁNCHEZ, M. Á. A. et al. **Manual Técnico del Cultivo de Cacao Prácticas Latinoamericanas**. p. 143, 2017.

SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R. E. et al. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. **TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas**, v. 16, n. 2, p. 132–146, dez. 2013.

SCHOCH, C. L. et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2020, p. baaa062, 1 jan. 2020.

SHAKYA, M.; LO, C.-C.; CHAIN, P. S. G. Advances and Challenges in Metatranscriptomic Analysis. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 2019.

SIMAMORA, A. V.; HAHULY, M. V.; HENUK, J. B. Endophytic fungi as potential biocontrol agents of Phytophthora palmivora in the cocoa plant. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 22, n. 5, 28 abr. 2021.

SON, M.; YU, J.; KIM, K.-H. Five Questions about Mycoviruses. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 11, p. e1005172, 5 nov. 2015.

SUÁREZ, L. Y.; CABRALES, C. P. Identificación de especies de cepas nativas de Trichoderma sp. y Bacillus sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo Moniliophthora roreri en el departamento de Norte de Santander. **Respuestas**, v. 13, n. 1, p. 45–56, 2008.

SUTELA, S. et al. The virome from a collection of endomycorrhizal fungi reveals new viral taxa with unprecedented genome organization. **Virus Evolution**, v. 6, n. 2, p. veaa076, 1 jul. 2020.

TAMCHEK, N.; LEE, P.-C.; ROSMIN, K. METATRANSCRIPTOMIC SEQUENCING AND ANALYSIS OF CACAO RHIZOSPHERE. v. 11, p. 108–115, 1 nov. 2019.

TEIXEIRA, P. J. P. L. et al. High-Resolution Transcript Profiling of the Atypical Biotrophic Interaction between Theobroma cacao and the Fungal Pathogen Moniliophthora perniciosa[C][W][OPEN]. **The Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245–4269, nov. 2014.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, p. 3, 9 fev. 2012.

TRALAMAZZA, S. M. et al. Complex Evolutionary Origins of Specialized Metabolite Gene Cluster Diversity among the Plant Pathogenic Fungi of the Fusarium graminearum Species Complex. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 11, p. 3106–3122, 1 nov. 2019.

URICH, T. et al. Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome. **PLOS ONE**, v. 3, n. 6, p. e2527, 25 jun. 2008.

VERA LOOR, M. A. et al. Microorganismos endófitos asociados a Theobroma cacao como agentes de control biológico de Moniliophthora roreri. **Centro Agrícola**, v. 45, n. 3, p. 81–87, set. 2018.

VERCE, M. et al. A Combined Metagenomics and Metatranscriptomics Approach to Unravel Costa Rican Cocoa Box Fermentation Processes Reveals Yet Unreported Microbial Species and Functionalities. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 245, 2021.

VERNA, R. The history and science of chocolate. p. 11, 2013.

WANG, H.; LIU, H.; ZHOU, Q. The complete genome sequence of a new mitovirus from the phytopathogenic fungus Colletotrichum higginsianum. **Archives of Virology**, v. 166, n. 5, p. 1481–1484, 1 maio 2021.

WESSEL, M.; QUIST-WESSEL, P. M. F. Cocoa production in West Africa, a review and analysis of recent developments. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 74–75, p. 1–7, 1 dez. 2015.

YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. Colletotrichum incanum sp. nov., a curved-conidial species causing soybean anthracnose in USA. **Mycologia**, v. 106, n. 1, p. 32–42, fev. 2014.

ZARRILLO, S. et al. The use and domestication of Theobroma cacao during the mid-Holocene in the upper Amazon. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, n. 12, p. 1879–1888, dez

9. MATERIAL SUPLEMENTAR

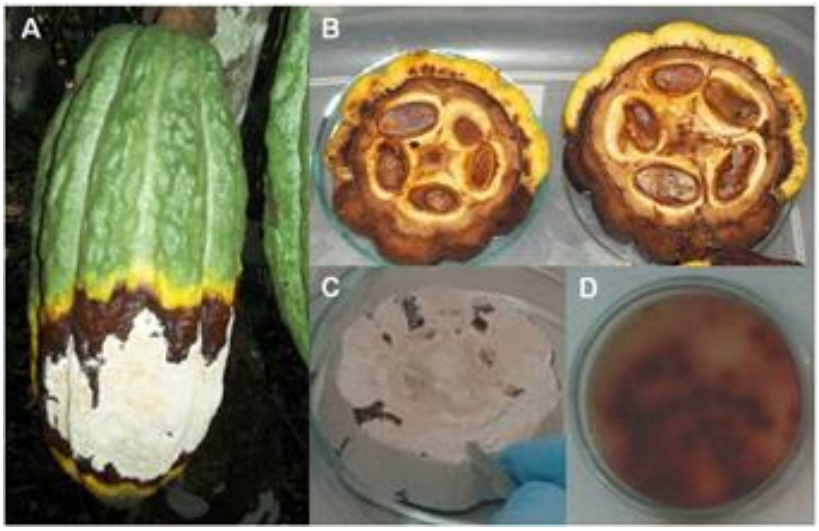


Figura complementar 1. Etapas para obtenção dos esporos e micélio do fungo *M. roreri* no ICT - Tarapoto/Peru. **A**. Frutos naturalmente infectados com *M. roreri*; **B**. Fatias em câmara úmida por 3 a 4 dias em temperatura ambiente; **C**. Crescimento do micélio vegetativo; **D**. Cultura de esporos.

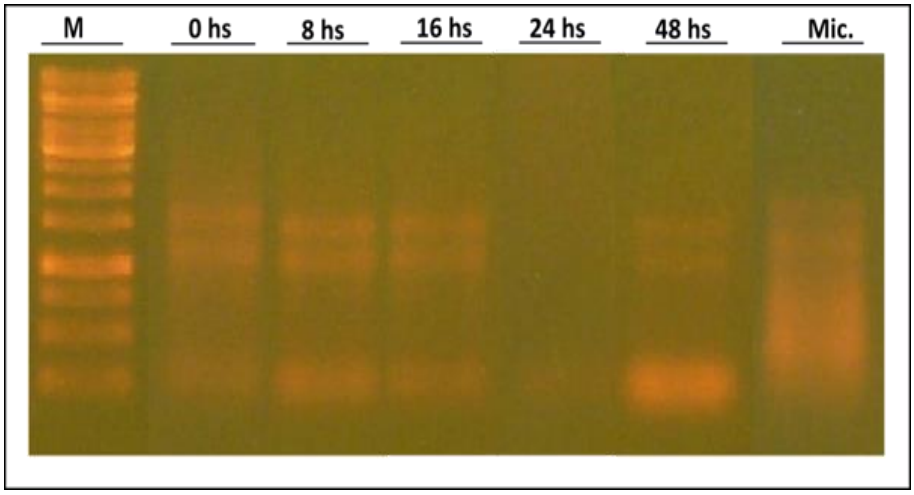


Figura complementar 2. Gel de agarose a 1% com RNA total extraído de amostras de micélio saprofítico e esporos em diferentes tempos de germinação (0, 8, 24, 16, 48hs). Houve degradação da amostra de esporos após 24 horas de germinação, portanto, esse tempo foi descartado.

Figura complementar 3. Análise das ORFs para o contig 1.

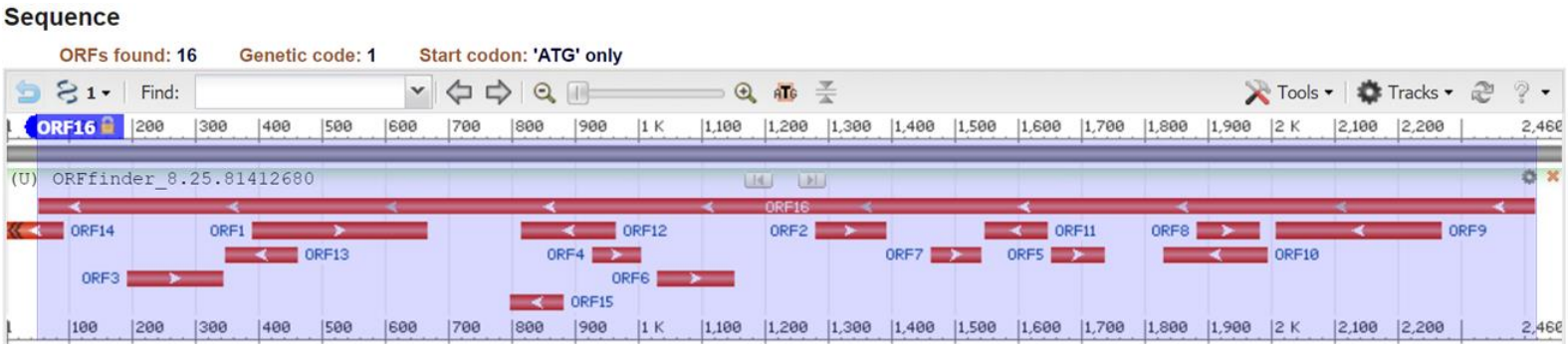


Figura complementar 4. Análise das ORFs para o contig 2.

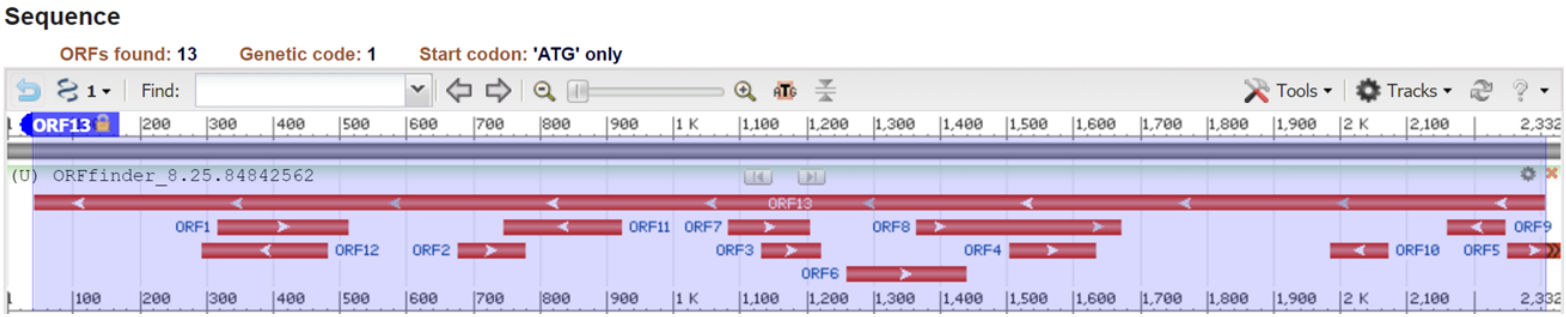
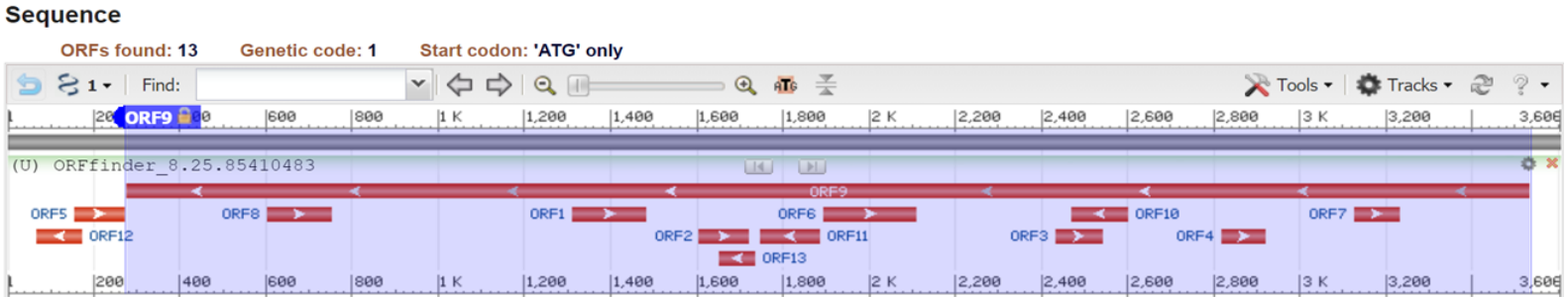


Figura complementar 5. Análise das ORFs para o contig 3.



Amostras	[ng/µl]	Razão (260/280nm)	Razão (260/230nm)	Concentração inicial [nM]
Micélio	692	2,16	2,41	320
Esporo 0	27,4	2,17	2,06	392
Esporo 8 hs	21	1,92	1,27	87,7
Esporo 16 hs	40	2,03	1,33	120,7
Esporo 48 hs	38,8	1,96	1,41	31,6

Tabela complementar 1. Concentrações obtidas após extração de RNA total de amostras de esporos em diferentes tempos (0, 8, 16, 48 hs) de germinação e micélio, bem como o valor de suas proporções em Qubit e Nanodrop, respectivamente.

Amostras	[nM]
Micélio	184,7
Esporo 0	270
Esporo 8 hs	33
Esporo 16 hs	88,6
Esporo 48 hs	9,6

Tabela complementar 2. Concentrações das bibliotecas após quantificação por RT-PCR.

Trimmagem	Esporos_0h	Esporos_8h	Esporos_ 16h	Esporos_48h	Micélio
Free	25.840.512	17.590.721	13.700.034	16.678.051	12.384.924
Quality 20	25.826.631	17.573.229	13.686.514	16.674.800	12.381.586
Quality 30	25.619.553	17.423.068	13.542.853	16.545.502	12.315.054
Montagem Trinity	26.087	29.050	27.453	65.605	20.879

Tabela complementar 3. Informações sobre o número de sequências e contigs gerados em cada biblioteca analisada.

Tabela complementar 4. Resultados de alinhamento de proteínas para nossas bibliotecas.

Bibliotecas	Query ID	Bit score	Subject title
Esporos_0h	TRINITY_DN11667_c0_g1_i1	806	QHD64827.1 RdRp [Erysiphe necator associated narnavirus 4]
	TRINITY_DN11667_c0_g1_i1	398	QJV68034.1 putative RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN11667_c0_g1_i1	398	BCH36656.1 RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN11667_c0_g1_i1	372	QIR30299.1 RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 20]
	TRINITY_DN11453_c0_g1_i1	671	QED42934.1 putative RdRp [Monilinia narnavirus H]
	TRINITY_DN11453_c0_g1_i1	477	QIR30307.1 RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 28]
	TRINITY_DN11453_c0_g1_i1	193	QIR30306.1 RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 27]
	TRINITY_DN4781_c0_g1_i1	202	BCH36655.1 hypothetical protein [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN4781_c0_g2_i1	133	BCH36655.1 hypothetical protein [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
Esporos_8h	TRINITY_DN5828_c0_g1_i1	84.3	BCH36655.1 hypothetical protein [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN15040_c0_g1_i1	806	QHD64827.1 RdRp [Erysiphe necator associated narnavirus 4]
	TRINITY_DN15040_c0_g1_i1	398	QJV68034.1 putative RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN15040_c0_g1_i1	397	BCH36656.1 RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN15040_c0_g1_i1	372	QIR30299.1 RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 20]
	TRINITY_DN8478_c0_g1_i1	201	BCH36655.1 hypothetical protein [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
Esporos_16h	TRINITY_DN5928_c0_g1_i1	807	QHD64827.1 RdRp [Erysiphe necator associated narnavirus 4]
	TRINITY_DN5928_c0_g1_i1	398	QJV68034.1 putative RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN5928_c0_g1_i1	398	BCH36656.1 RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN5928_c0_g1_i1	372	QIR30299.1 RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 20]
	TRINITY_DN18983_c0_g1_i1	671	QED42934.1 putative RdRp [Monilinia narnavirus H]

	TRINITY_DN18983_c0_g1_i1	477	QIR30307.1 RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 28]
	TRINITY_DN18983_c0_g1_i1	193	QIR30306.1 RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 27]
	TRINITY_DN19217_c0_g1_i1	79.3	BCH36655.1 hypothetical protein [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN2324_c0_g1_i1	236	BCH36655.1 hypothetical protein [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
Esporos_48h	TRINITY_DN3790_c0_g1_i1	550	QHD64827.1 RdRp [Erysiphe necator associated narnavirus 4]
	TRINITY_DN3790_c0_g1_i1	322	QIR30299.1 RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 20]
	TRINITY_DN3790_c0_g1_i1	313	QJV68034.1 putative RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN3790_c0_g1_i1	313	BCH36656.1 RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]
	TRINITY_DN40268_c0_g1_i1	204	QHD64827.1 RdRp [Erysiphe necator associated narnavirus 4]
	TRINITY_DN40729_c0_g1_i1	76.3	QHD64827.1 RdRp [Erysiphe necator associated narnavirus 4]

Tabela suplementar 5. Blastx para o contig 1.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len	Accession
RdRp [Erysiphe necator associated narnavirus 4]	Erysiphe necator associated narnavirus 4	810	810	92%	0	52.7	775	QHD64827.1
RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]	Magnaporthe oryzae narnavirus 1	402	402	90%	4.00E-124	35.86	786	QVU39992.1
putative RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]	Magnaporthe oryzae narnavirus 1	397	397	90%	3.00E-122	35.9	783	QJV68034.1
RNA-dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]	Magnaporthe oryzae narnavirus 1	396	396	90%	5.00E-122	35.91	783	BCH36656.1
putative RNA dependent RNA polymerase [Oidiodendron maius splipalmivirus 1]	Oidiodendron maius splipalmivirus 1	391	391	88%	4.00E-120	35.11	768	QNN89179.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated narnavirus 46]	Erysiphe necator associated narnavirus 46	372	372	91%	3.00E-113	33.33	760	QJT93778.1
RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 20]	Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 20	371	371	91%	2.00E-112	33.2	760	QIR30299.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated narnavirus 35]	Erysiphe necator associated narnavirus 35	83.2	83.2	70%	4.00E-12	21.64	776	QJT93767.1
RNA-dependent RNA polymerase [Botrytis cinerea binarnavirus 2]	Botrytis cinerea binarnavirus 2	82.8	82.8	64%	5.00E-12	23.23	813	QJT73725.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated narnavirus 13]	Erysiphe necator associated narnavirus 13	75.9	75.9	43%	8.00E-10	23.66	810	QJT93745.1
RNA-dependent RNA polymerase [Aspergillus fumigatus narnavirus 2]	Aspergillus fumigatus narnavirus 2	73.9	73.9	70%	2.00E-09	21.72	626	BCH36633.1
RNA-dependent RNA polymerase [Aspergillus fumigatus narnavirus 2]	Aspergillus fumigatus narnavirus 2	72	72	61%	1.00E-08	21.81	626	AXE72934.1
RNA-dependent RNA polymerase [Botrytis cinerea binarnavirus 1]	Botrytis cinerea binarnavirus 1	72	72	45%	1.00E-08	23.6	825	QJT73724.1
RNA-dependent RNA polymerase [Neofusicoccum parvum narnavirus 2]	Neofusicoccum parvum narnavirus 2	70.9	70.9	60%	2.00E-08	22.95	611	QDB74995.1
RNA-dependent RNA polymerase [Aspergillus fumigatus narnavirus 2]	Aspergillus fumigatus narnavirus 2	70.1	70.1	61%	4.00E-08	21.79	626	BCH36627.1
RNA-dependent RNA polymerase [Aspergillus fumigatus narnavirus 2]	Aspergillus fumigatus narnavirus 2	69.7	69.7	61%	5.00E-08	21.79	626	BCH36622.1
RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 6]	Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 6	67.8	67.8	39%	2.00E-07	22.77	621	QIR30285.1
RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 19]	Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 19	67.4	67.4	45%	3.00E-07	23.65	807	QIR30298.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated narnavirus 12]	Erysiphe necator associated narnavirus 12	65.9	65.9	45%	9.00E-07	22.84	825	QJT93744.1
RNA-dependent RNA polymerase [Cladosporium tenuissimum narnavirus 1]	Cladosporium tenuissimum narnavirus 1	64.7	64.7	68%	2.00E-06	21.57	754	QDB74996.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated narnavirus 49]	Erysiphe necator associated narnavirus 49	64.3	64.3	61%	3.00E-06	20.57	697	QJT93781.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated narnavirus 50]	Erysiphe necator associated narnavirus 50	63.5	63.5	45%	4.00E-06	23.94	824	QJT93782.1
RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 1]	Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 1	63.5	63.5	45%	5.00E-06	23.94	824	QIR30280.1
RNA-dependent RNA polymerase [Aspergillus fumigatus narnavirus 1]	Aspergillus fumigatus narnavirus 1	62	62	45%	1.00E-05	20.91	618	AXE72933.1

RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated narnavirus 24]	Erysiphe necator associated narnavirus 24	58.5	58.5	68%	2.00E-04	22.06	751	QJT93756.1
RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 5]	Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 5	57.8	57.8	36%	3.00E-04	22.59	650	QIR30284.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated narnavirus 30]	Erysiphe necator associated narnavirus 30	55.1	55.1	59%	0.002	22.13	641	QJT93762.1
RdRp [Erysiphe necator associated narnavirus 5]	Erysiphe necator associated narnavirus 5	53.9	53.9	61%	0.004	22.05	640	QHD64828.1

Tabela suplementar 6. Blastx para o contig 2.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len	Accession
hypothetical protein [Magnaporthe oryzae narnavirus 1]	Magnaporthe oryzae narnavirus 1	322	322	85%	3.00E-94	30.56	795	BCH36655.1
putative RNA dependent RNA polymerase [Oidiodendron maius splipalmivirus 1]	Oidiodendron maius splipalmivirus 1	288	288	63%	2.00E-81	35.25	786	QNN89180.1

Tabela suplementar 7. Blastx para o contig 3.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len	Accession
putative RdRp [Monilinia narnavirus H]	Monilinia narnavirus H	640	640	85%	0	37.32	1086	QED42934.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated narnavirus 22]	Erysiphe necator associated narnavirus 22	612	612	83%	0	38.6	1062	QJT93754.1
RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 28]	Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 28	466	466	81%	2.00E-141	32.64	1043	QIR30307.1
RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 27]	Plasmopara viticola lesion associated narnavirus 27	171	171	64%	8.00E-39	26.24	1101	QIR30306.1
RNA-dependent RNA polymerase [Wenling narna-like virus 6]	Wenling narna-like virus 6	164	237	66%	1.00E-36	27.47	1069	APG77272.1
RNA-dependent RNA polymerase [Erysiphe necator associated narnavirus 34]	Erysiphe necator associated narnavirus 34	140	229	46%	2.00E-29	30.39	1100	QJT93766.1
RNA-dependent RNA polymerase [Grapevine-associated narna-like virus 14]	Grapevine-associated narna-like virus 14	101	101	33%	4.00E-18	25.17	472	QXN75398.1
hypothetical protein [Praha narna-like virus 4]	Praha narna-like virus 4	57.4	57.4	41%	7.00E-04	21.22	1015	QPN36961.1
RNA-dependent RNA polymerase [Beihai narna-like virus 22]	Beihai narna-like virus 22	57	57	23%	9.00E-04	24.43	1027	YP_009333139.1

Tabela suplementar 8. Gêneros fúngicos e contigs atribuídos em nossas bibliotecas.

Gêneros	N° Contigs	Gêneros	N° Contigs	Gêneros	N° Contigs
Absidia	1	*Gelatoporia*	3	*Phialophora*	5
Acidomyces	1	*Geotrichum*	1	*Phlebiopsis*	5
Acremonium	440	*Glarea*	7	*Pisolithus*	4
Agaricus	3	*Gloeophyllum*	5	*Pleurotus*	9
Alternaria	3	*Glonium*	3	*Plicaturopsis*	6
Amanita	5	*Gonapodya*	1	*Pneumocystis*	1
Anaeromyces	1	*Grifola*	2	*Pochonia*	52
Arthrobotrys	2	*Grosmannia*	11	*Podospora*	14
Ascochyta	3	*Gymnopus*	19	*Postia*	1
Ascoidea	1	*Hebeloma*	4	*Pseudocercospora*	8
Ascosphaera	5	*Hirsutella*	90	*Pseudogymnoascus*	29
Aspergillus	127	*Histoplasma*	2	*Pseudomassariella*	29
Aureobasidium	7	*Hortaea*	5	*Puccinia*	13
Auricularia	1	*Hypholoma*	1	*Punctularia*	3
Basidiobolus	2	*Hyphopichia*	1	*Purpureocillium*	129
Batrachochytrium	1	*Hypocrella*	4	*Pycnoporus*	3
Baudoinia	3	*Hypoxylon*	42	*Pyrenochaeta*	5
Beauveria	11	*Hypsizygus*	12	*Pyrenophora*	4
Bipolaris	10	*Isaria*	43	*Pyronema*	3
Blastomyces	1	*Jaapia*	5	*Rachicladosporium*	10
Blumeria	6	*Kazachstania*	1	*Rasamsonia*	3
Botryobasidium	2	*Komagataella*	1	*Rhinocladiella*	3
Botrytis	7	*Kuraishia*	1	*Rhizoctonia*	33
Byssochlamys	3	*Laccaria*	2	*Rhizophagus*	1
Cadophora	1	*Lachancea*	2	*Rhizopogon*	8
Candida	82	*Lentinula*	10	*Rhynchosporium*	7
Capronia	6	*Leptosphaeria*	1	*Rosellinia*	14
Cenococcum	4	*Leucoagaricus*	3	*Saitoella*	8
Ceratocystis	8	*Leucosporidium*	1	*Sanghuangporus*	2
Chaetomium	24	*Macrophomina*	1	*Scedosporium*	34
Choanephora	5	*Madurella*	12	*Schizophyllum*	16
Claviceps	50	*Magnaporthe*	17	*Schizopora*	1
Clavispora	2	*Magnaporthiopsis*	5	*Scleroderma*	11
Clohesyomyces	2	*Malassezia*	1	*Sclerotinia*	8

Clonostachys	20	*Marssonina*	7	*Serendipita*	1
Coccidioides	3	*Melampsora*	1	*Serpula*	19
Colletotrichum	19863	*Melanopsichium*	3	*Setosphaeria*	3
Coniochaeta	47	*Metarhizium*	177	*Sistotremastrum*	2
Coniosporium	1	*Metschnikowia*	2	*Sordaria*	7
Coprinopsis	3	*Meyerozyma*	1	*Spathaspora*	1
Cordyceps	95	*Microdochium*	22	*Sphaerulina*	6
Cryptococcus	3	*Microsporum*	1	*Sporothrix*	23
Cylindrobasidium	8	*Mitosporidium*	1	*Stachybotrys*	160
Dactylellina	4	*Mixia*	6	*Stagonospora*	5
Daldinia	22	*Moelleriella*	54	*Stemphylium*	3
Debaryomyces	2	*Moesziomyces*	1	*Stereum*	2
Diaporthe	38	*Mycena*	2	*Suillus*	1
Dichomitus	3	*Mycosphaerella*	2	*Talaromyces*	16
Diplodia	9	*Nannizzia*	1	*Tetrapisispora*	1
Dothistroma	3	*Naumovozyma*	2	*Thermothelomyces*	13
Drechmeria	64	*Neofusicoccum*	3	*Thielavia*	14
Drechslerella	2	*Neolentinus*	5	*Thielaviopsis*	12
Emergomyces	2	*Neonectria*	229	*Tolypocladium*	84
Emmonsia	1	*Neurospora*	25	*Torrubiella*	86
Endocarpon	1	*Ogataea*	1	*Trametes*	3
Epichloe	1	*Oidiodendron*	17	*Tremella*	1
Epicoccum	5	*Ophiocordyceps*	86	*Trichoderma*	285
Eremothecium	1	*Ophiostoma*	20	*Trichophyton*	5
Erysiphe	2	*Paraphaeosphaeria*	6	*Tuber*	2
Escovopsis	59	*Parastagonospora*	6	*Umbilicaria*	2
Eutypa	29	*Paxillus*	1	*Uncinocarpus*	1
Exidia	9	*Penicilliopsis*	4	*Ustilaginoidea*	52
Exophiala	15	*Penicillium*	149	*Ustilago*	9
Fibroporia	9	*Peniophora*	2	*Valsa*	21
Fibulorhizoctonia	10	*Pestalotiopsis*	43	*Verruconis*	3
Fomitopsis	1	*Phaeoacremonium*	35	*Verticillium*	63
Fonsecaea	8	*Phaeomoniella*	3	*Volvariella*	1
Fusarium	1062	*Phanerochaete*	3	*Wickerhamomyces*	3
Galerina	6	*Phialocephala*	17	*Xylona*	2
				Yamadazyma	10
				Zymoseptoria	5

Tabela suplementar 9. Espécies fúngicas e contigs atribuídos.

Espécies	N° Contigs	Espécies	N° Contigs	Espécies	N° Contigs	Espécies	N° Contigs
[Candida] duobushaemulonii	1	*Coniosporium apollinis*	1	*Jaapia argillacea*	5	*Pochonia chlamydosporia*	52
[Candida] tenuis	10	*Coprinopsis cinerea*	3	*Kazachstania saulgeensis*	1	*Podospora anserina*	14
Absidia repens	1	*Cordyceps brongniartii*	10	*Komagataella phaffii*	1	*Postia placenta*	1
Acidomyces richmondensis	1	*Cordyceps confragosa*	50	*Kuraishia capsulata*	1	*Pseudocercospora fijiensis*	7
Acremonium chrysogenum	440	*Cordyceps militaris*	28	*Laccaria amethystina*	2	*Pseudogymnoascus destructans*	1
Agaricus bisporus	3	*Cryptococcus amylolentus*	2	*Lachancea thermotolerans*	2	*Pseudogymnoascus sp. 03VT05*	2
Alternaria alternata	3	*Cylindrobasidium torrendii*	8	*Lentinula edodes*	10	*Pseudogymnoascus sp. 23342-1-I1*	2
Amanita muscaria	5	*Dactylellina haptotyla*	4	*Leptosphaeria maculans*	1	*Pseudogymnoascus sp. VKM F-3775*	4
Anaeromyces robustus	1	*Daldinia sp. EC12*	22	*Leucoagaricus sp. SymC.cos*	3	*Pseudogymnoascus sp. VKM F-4246*	1
Arthrobotrys oligospora	2	*Debaryomyces fabryi*	1	*Leucosporidium creatinivorum*	1	*Pseudogymnoascus sp. VKM F-4281 (FW-2241)*	2
Ascochyta rabiei	3	*Debaryomyces hansenii*	1	*Macrophomina phaseolina*	1	*Pseudogymnoascus sp. VKM F-4518 (FW-2643)*	4
Ascoidea rubescens	1	*Diaporthe ampelina*	11	*Madurella mycetomatis*	12	*Pseudogymnoascus sp. VKM F-4520 (FW-2644)*	3
Ascosphaera apis	3	*Diaporthe helianthi*	17	*Magnaporthe oryzae*	16	*Pseudomassariella vexata*	29
Ascosphaera flava	2	*Dichomitus squalens*	3	*Magnaporthiopsis poae*	5	*Puccinia striiformis*	13
Aspergillus aculeatus	7	*Diplodia corticola*	2	*Malassezia globosa*	1	*Punctularia strigosozonata*	3
Aspergillus bombycis	1	*Diplodia seriata*	5	*Marssonina brunnea*	7	*Purpureocillium lilacinum*	129
Aspergillus brasiliensis	4	*Dothistroma septosporum*	3	*Melampsora larici-populina*	1	*Pycnoporus coccineus*	3
Aspergillus calidoustus	5	*Drechmeria coniospora*	64	*Melanopsichium pennsylvanicum*	3	*Pyrenochaeta sp. DS3sAY3a*	5
Aspergillus carbonarius	1	*Drechslerella stenobrocha*	2	*Metarhizium acridum*	24	*Pyrenophora teres*	4

Aspergillus clavatus	5	*Emergomyces pasteurianus*	2	*Metarhizium album*	37	*Pyronema omphalodes*	3
Aspergillus cristatus	1	*Emmonsia crescens*	1	*Metarhizium anisopliae*	6	*Rachicladosporium antarcticum*	2
Aspergillus fischeri	2	*Endocarpon pusillum*	1	*Metarhizium brunneum*	6	*Rasamsonia emersonii*	3
Aspergillus flavus	12	*Epichloe festucae*	1	*Metarhizium guizhouense*	3	*Rhinocladiella mackenziei*	3
Aspergillus fumigatus	1	*Epicoccum nigrum*	5	*Metarhizium majus*	3	*Rhizoctonia solani*	33
Aspergillus glaucus	1	*Eremothecium cymbalariae*	1	*Metarhizium rileyi*	29	*Rhizophagus irregularis*	1
Aspergillus lentulus	4	*Erysiphe necator*	2	*Metarhizium robertsii*	3	*Rhizopogon vesiculosus*	1
Aspergillus luchuensis	1	*Escovopsis weberi*	59	*Metschnikowia bicuspidata*	2	*Rhizopogon vinicolor*	7
Aspergillus nidulans	1	*Eutypa lata*	29	*Meyerozyma guilliermondii*	1	*Rosellinia necatrix*	14
Aspergillus niger	2	*Exidia glandulosa*	9	*Microdochium bolleyi*	22	*Saitoella complicata*	8
Aspergillus nomius	2	*Exophiala aquamarina*	2	*Microsporum canis*	1	*Sanghuangporus baumii*	2
Aspergillus ochraceoroseus	1	*Exophiala dermatitidis*	2	*Mitosporidium daphniae*	1	*Scedosporium apiospermum*	34
Aspergillus oryzae	5	*Exophiala mesophila*	3	*Mixia osmundae*	6	*Schizophyllum commune*	16
Aspergillus parasiticus	2	*Exophiala oligosperma*	1	*Moelleriella libera*	54	*Schizopora paradoxa*	1
Aspergillus ruber	1	*Exophiala spinifera*	4	*Moesziomyces antarcticus*	1	*Scleroderma citrinum*	11
Aspergillus sydowii	3	*Exophiala xenobiotica*	2	*Mycena chlorophos*	2	*Sclerotinia sclerotiorum*	7
Aspergillus terreus	6	*Fibroporia radiculosa*	9	*Mycosphaerella eumusae*	2	*Serendipita indica*	1
Aspergillus udagawae	1	*Fibulorhizoctonia sp. CBS 109695*	10	*Nannizzia gypsea*	1	*Serpula lacrymans*	19
Aspergillus versicolor	2	*Fomitopsis pinicola*	1	*Naumovozyma castellii*	1	*Setosphaeria turcica*	3
Aspergillus wentii	4	*Fonsecaea erecta*	5	*Naumovozyma dairenensis*	1	*Sistotremastrum niveocremeum*	1
Aureobasidium melanogenum	1	*Fonsecaea multimorphosa*	1	*Nectria haematococca*	337	*Sordaria macrospora*	7
Aureobasidium pullulans	4	*fungal sp. No.11243*	2	*Neofusicoccum parvum*	3	*Spathaspora passalidarum*	1
Aureobasidium subglaciale	1	*fungal sp. No.14919*	21	*Neolentinus lepideus*	5	*Sphaerulina musiva*	6
Auricularia auricula-judae	1	*Fusarium acuminatum*	2	*Neonectria ditissima*	229	*Sporothrix brasiliensis*	1
Basidiobolus meristosporus	2	*Fusarium avenaceum*	111	*Neurospora crassa*	4	*Sporothrix insectorum*	6

Batrachochytrium dendrobatidis	1	*Fusarium aywerte*	1	*Neurospora tetrasperma*	10	*Sporothrix schenckii*	3
Baudoinia panamericana	3	*Fusarium cyanostomum*	2	*Nilaparvata lugens yeast-like symbiont*	1	*Stachybotrys chartarum*	36
Beauveria bassiana	11	*Fusarium foetens*	1	*Ogataea polymorpha*	1	*Stachybotrys chlorohalonata*	14
Bionectriaceae sp. MOS822	1	*Fusarium fujikuroi*	8	*Oidiodendron maius*	17	*Stagonospora sp. SRC1lsM3a*	5
Bipolaris maydis	7	*Fusarium graminearum*	16	*Ophiocordyceps nutans*	1	*Stemphylium lycopersici*	3
Bipolaris oryzae	1	*Fusarium langsethiae*	31	*Ophiocordyceps sinensis*	40	*Stereum hirsutum*	2
Blumeria graminis	6	*Fusarium lichenicola*	1	*Ophiocordyceps unilateralis*	45	*Suillus luteus*	1
Botryobasidium botryosum	2	*Fusarium mangiferae*	17	*Ophiostoma piceae*	20	*Talaromyces atroroseus*	6
Botrytis cinerea	7	*Fusarium oxysporum*	64	*Paraphaeosphaeria sporulosa*	6	*Talaromyces islandicus*	2
Byssochlamys spectabilis	3	*Fusarium poae*	60	*Parastagonospora nodorum*	6	*Talaromyces marneffei*	4
Cadophora finlandica	1	*Fusarium proliferatum*	5	*Paxillus rubicundulus*	1	*Talaromyces stipitatus*	4
Candida albicans	1	*Fusarium pseudograminearum*	22	*Penicilliopsis zonata*	4	*Tetrapisispora blattae*	1
Candida parapsilosis	64	*Fusarium sambucinum*	1	*Penicillium antarcticum*	1	*Thermothelomyces thermophila*	13
Candida tropicalis	3	*Fusarium sp. FIESC_5*	10	*Penicillium arizonense*	2	*Thielavia terrestris*	14
Capronia coronata	3	*Fusarium sp. FN080326*	1	*Penicillium brasilianum*	18	*Thielaviopsis punctulata*	12
Capronia epimyces	3	*Fusarium ventricosum*	1	*Penicillium camemberti*	1	*Tolypocladium inflatum*	2
Cenococcum geophilum	4	*Fusarium verticillioides*	25	*Penicillium coprophilum*	3	*Tolypocladium ophioglossoides*	82
Ceratocystis platani	8	*Gaeumannomyces tritici*	15	*Penicillium decumbens*	2	*Torrubiella hemipterigena*	86
Chaetomium globosum	13	*Galerina marginata*	8	*Penicillium digitatum*	1	*Trametes pubescens*	1
Chaetomium thermophilum	11	*Gelatoporia subvermispora*	4	*Penicillium expansum*	3	*Tremella mesenterica*	1
Choanephora cucurbitarum	5	*Geotrichum candidum*	1	*Penicillium griseofulvum*	2	*Trichoderma atroviride*	32
Claviceps purpurea	50	*Glarea lozoyensis*	7	*Penicillium italicum*	4	*Trichoderma gamsii*	31
Clavispora lusitaniae	1	*Gloeophyllum trabeum*	5	*Penicillium nordicum*	1	*Trichoderma guizhouense*	14
Clohesyomyces aquaticus	2	*Glonium stellatum*	3	*Penicillium oxalicum*	8	*Trichoderma harzianum*	7

Clonostachys rosea	20	*Gonapodya prolifera*	1	*Penicillium roqueforti*	2	*Trichoderma parareesei*	5
Coccidioides immitis	3	*Grifola frondosa*	2	*Penicillium steckii*	4	*Trichoderma reesei*	9
Colletotrichum chlorophyti	128	*Grosmannia clavigera*	11	*Penicillium subrubescens*	44	*Trichoderma virens*	35
Colletotrichum fioriniae	26	*Gymnopus luxurians*	19	*Penicillium vulpinum*	1	*Trichosporon asahii*	1
Colletotrichum gloeosporioides	18121	*Hebeloma cylindrosporum*	4	*Peniophora sp. CONT*	2	*Tuber melanosporum*	2
Colletotrichum graminicola	44	*Hirsutella minnesotensis*	90	*Pestalotiopsis fici*	43	*Umbilicaria pustulata*	2
Colletotrichum higginsianum	89	*Histoplasma capsulatum*	2	*Phaeoacremonium minimum*	35	*Uncinocarpus reesii*	1
Colletotrichum incanum	142	*Hortaea werneckii*	5	*Phaeomoniella chlamydospora*	3	*Ustilaginoidea virens*	52
Colletotrichum nymphaeae	24	*Hypholoma sublateritium*	1	*Phanerochaete carnosa*	3	*Ustilago maydis*	9
Colletotrichum orbiculare	134	*Hyphopichia burtonii*	1	*Phialocephala scopiformis*	4	*Valsa mali*	21
Colletotrichum orchidophilum	67	*Hypocrella siamensis*	4	*Phialocephala subalpina*	12	*Verruconis gallopava*	3
Colletotrichum salicis	32	*Hypoxylon sp. CI-4A*	16	*Phialophora americana*	2	*Verticillium alfalfae*	4
Colletotrichum siamense	1	*Hypoxylon sp. CO27-5*	3	*Phialophora attae*	3	*Verticillium dahliae*	5
Colletotrichum simmondsii	13	*Hypoxylon sp. EC38*	9	*Phlebiopsis gigantea*	5	*Verticillium longisporum*	11
Colletotrichum sublineola	57	*Hypsizygus marmoreus*	12	*Pisolithus microcarpus*	1	*Volvariella volvacea*	1
Colletotrichum tofieldiae	54	*Isaria fumosorosea*	42	*Pleurotus ostreatus*	9	*Wickerhamomyces ciferrii*	1
Coniochaeta ligniaria	47	*Isaria javanica*	1	*Plicaturopsis crispa*	6	*Xylona heveae*	2
						Zymoseptoria tritici	3

Tabela suplementar 10. Gêneros bacterianos e seus contigs atribuídos.

Gêneros	Contigs	Gêneros	Contigs	Gêneros	Contigs
Acetobacter	2	*Hafnia*	4	*Pseudoflavonifractor*	4
Achromobacter	4	*Halomonas*	12	*Pseudogulbenkiania*	4
Acidiphilium	1	*Halotalea*	7	*Pseudomonas*	18801
Acidomonas	1	*Herbaspirillum*	4	*Pseudoxanthomonas*	10
Acidovorax	3	*Hydrogenobaculum*	1	*Psychrobacter*	2
Acinetobacter	495	*Hylemonella*	1	*Rahnella*	7
Actinokineospora	1	*Hymenobacter*	4	*Ralstonia*	44
Actinomyces	7	*Izhakiella*	8	*Ramlibacter*	1
Actinoplanes	1	*Jannaschia*	1	*Raoultella*	11
Actinopolyspora	1	*Janthinobacterium*	3	*Rheinheimera*	2
Advenella	2	*Kaistia*	3	*Rhizobacter*	1
Aeromonas	7	*Klebsiella*	194	*Rhizobium*	14
Agarivorans	1	*Kluyvera*	4	*Rhodanobacter*	2
Aggregatibacter	3	*Kocuria*	1	*Rhodococcus*	5
Agrobacterium	7	*Komagataeibacter*	4	*Rhodomicrobium*	1
Aliiglaciecola	2	*Kosakonia*	4	*Rhodoplanes*	1
Aliihoeflea	1	*Kushneria*	1	*Rhodopseudomonas*	1
Aliivibrio	1	*Lachnoclostridium*	1	*Rickettsieae*	2
Asticcacaulis	1	*Lactobacillus*	7	*Riemerella*	3
Aurantimonas	1	*Lautropia*	1	*Roseibium*	10
Azoarcus	2	*Leclercia*	2	*Rosenbergiella*	1
Azospirillum	7	*Legionella*	21	*Roseobacter*	3
Azotobacter	6	*Lelliottia*	2	*Roseomonas*	1
Bacillus	7	*Leptolyngbya*	1	*Rothia*	6
Bacteroides	1	*Leptospira*	1	*Rouxiella*	6
Balneatrix	1	*Liberibacter*	1	*Rubrivivax*	1
Basfia	2	*Limnohabitans*	2	*Rudanella*	1
Bifidobacterium	2	*Luteibacter*	3	*Ruegeria*	1
Bordetella	16	*Luteimonas*	1	*Ruminiclostridium*	2

Bradyrhizobium	7	*Lysobacter*	3	*Saccharomonospora*	1
Brenneria	1	*Magnetospirillum*	8	*Salinihabitans*	1
Brucella	25	*Mangrovibacter*	1	*Salinivibrio*	1
Burkholderia	71	*Mannheimia*	5	*Salmonella*	59
Buttiauxella	2	*Marinobacter*	7	*Sanguibacteroides*	1
Campylobacter	1	*Marinobacterium*	1	*Serratia*	30
Candidimonas	1	*Marinospirillum*	1	*Shewanella*	1
Carnobacterium	1	*Massilia*	4	*Shigella*	42
Catenulispora	2	*Mastigocoleus*	1	*Shimwellia*	3
Caulobacter	3	*Mesorhizobium*	2	*Siccibacter*	1
Cedecea	7	*Metallibacterium*	1	*Skermanella*	3
Cellvibrio	2	*Methylibium*	1	*Sodalis*	3
Chitinophaga	1	*Methylobacterium*	8	*Solirubrum*	1
Chlamydia	4	*Methylocella*	2	*Sphingobacterium*	1
Chlorobium	1	*Microbacterium*	1	*Sphingobium*	3
Chromobacterium	1	*Microcystis*	1	*Sphingomonas*	4
Chromohalobacter	1	*Microvirgula*	1	*Sphingopyxis*	1
Citrobacter	11	*Morganella*	2	*Sporocytophaga*	6
Clostridioides	1	*Mucilaginibacter*	1	*Staphylococcus*	19
Clostridium	5	*Mycobacterium*	21	*Stenotrophomonas*	490
Collimonas	2	*Neisseria*	3	*Streptococcus*	52
Collinsella	2	*Neorhizobium*	1	*Streptomyces*	16
Comamonas	1	*Nevskia*	1	*Sulfurospirillum*	1
Commensalibacter	1	*Nissabacter*	2	*Sutterella*	1
Confluentimicrobium	1	*Nitrosomonas*	1	*Synechococcus*	1
Corynebacterium	2	*Nitrospira*	1	*Tatlockia*	3
Cronobacter	19	*Nocardia*	2	*Tatumella*	10
Cupriavidus	9	*Nocardiopsis*	1	*Taylorella*	4
Curvibacter	24	*Nonomuraea*	1	*Teredinibacter*	1
Cutibacterium	28	*Novosphingobium*	7	*Tetrasphaera*	1
Dechloromonas	1	*Oblitimonas*	2	*Thalassobacter*	1
Desulfobacterium	1	*Oceanisphaera*	1	*Thalassospira*	2

Desulfotomaculum	1	*Ochrobactrum*	1	*Thauera*	1
Desulfovibrio	1	*Opitutus*	1	*Thioalkalivibrio*	2
Devosia	1	*Paenarthrobacter*	2	*Thiobacillus*	1
Dickeya	5	*Paenibacillus*	16	*Thiocapsa*	6
Donghicola	5	*Paenisporosarcina*	1	*Thiohalospira*	1
Duganella	2	*Pandoraea*	1	*Thiolapillus*	1
Dyella	2	*Pantoea*	3109	*Thiomonas*	14
Edwardsiella	22	*Paraburkholderia*	24	*Thiorhodococcus*	1
Enterobacter	700	*Pararhizobium*	1	*Thiothrix*	1
Enterococcus	2	*Pararhodospirillum*	4	*Tistrella*	1
Erwinia	283	*Parasutterella*	1	*Trabulsiella*	1
Escherichia	470	*Pectobacterium*	7	*Varibaculum*	1
Eubacterium	1	*Perlucidibaca*	1	*Variovorax*	3
Ewingella	2	*Phaseolibacter*	1	*Vibrio*	37
Franconibacter	3	*Phenylobacterium*	5	*Vitreoscilla*	1
Fulvimarina	1	*Photorhabdus*	11	*Vogesella*	1
Gallaecimonas	1	*Pluralibacter*	3	*Williamsia*	1
Gardnerella	2	*Propionibacterium*	5	*Xanthobacter*	2
Gemella	1	*Propionivibrio*	1	*Xanthomonas*	87
Geomicrobium	1	*Proteus*	2	*Xenophilus*	1
Gilliamella	1	*Providencia*	5	*Xenorhabdus*	10
Gillisia	1	*Pseudaminobacter*	2	*Xylella*	1
Gluconobacter	2	*Pseudoalteromonas*	2	*Yersinia*	23
Haemophilus	33	*Pseudoclavibacter*	1	*Yokenella*	1

Tabela suplementar 11. Espécies bacterianas encontradas em nossas bibliotecas e seus contigs atribuídos.

Espécies	Contigs	Espécies	Contigs	Espécies	Contigs	Espécies	Contigs
[Clostridium] asparagiforme	1	*Hydrogenobaculum sp. Y04AAS1*	1	*Pseudomonas graminis*	408	*Pseudomonas sp. URMO17WK12:I5*	1
[Clostridium] cellulosi	1	*Hylemonella gracilis*	1	*Pseudomonas granadensis*	1	*Pseudomonas sp. UW4*	2
[Clostridium] leptum	1	*Hymenobacter sp. CCM 8649*	4	*Pseudomonas grimontii*	3	*Pseudomonas sp. VI4.1*	2
[Haemophilus] parasuis	2	*Izhakiella capsodis*	3	*Pseudomonas guangdongensis*	6	*Pseudomonas sp. VLB120*	12
[Mannheimia] succiniciproducens	2	*Izhakiella sp. D4N98*	1	*Pseudomonas guariconensis*	4	*Pseudomonas sp. W15Feb9B*	2
Acetobacter nitrogenifigens	1	*Jannaschia aquimarina*	1	*Pseudomonas guineae*	1	*Pseudomonas sp. WCHP16*	26
Acetobacteraceae bacterium AT-5844	1	*Janthinobacterium lividum*	1	*Pseudomonas helleri*	19	*Pseudomonas sp. Z003-0.4C(8344-21)*	3
Achromobacter xylosoxidans	1	*Janthinobacterium sp. CG3*	1	*Pseudomonas hussainii*	4	*Pseudomonas straminea*	6
Acidiphilium multivorum	1	*Janthinobacterium sp. HH01*	1	*Pseudomonas indica*	7	*Pseudomonas stutzeri*	23
Acidobacteria bacterium 13_1_20CM_3_53_8	1	*Kaistia granuli*	3	*Pseudomonas japonica*	26	*Pseudomonas synxantha*	1
Acidomonas methanolica	1	*Klebsiella aerogenes*	7	*Pseudomonas jinjuensis*	3	*Pseudomonas syringae*	287
Acidovorax sp. CF316	1	*Klebsiella michiganensis*	1	*Pseudomonas knackmussii*	3	*Pseudomonas taeanensis*	1
Acidovorax sp. Root217	1	*Klebsiella oxytoca*	3	*Pseudomonas koreensis*	2	*Pseudomonas taetrolens*	10
Acinetobacter baumannii	58	*Klebsiella pneumoniae*	82	*Pseudomonas kuykendallii*	10	*Pseudomonas taiwanensis*	8
Acinetobacter beijerinckii	1	*Klebsiella quasipneumoniae*	1	*Pseudomonas libanensis*	1	*Pseudomonas thermotolerans*	7
Acinetobacter bouvetii	2	*Klebsiella sp. 1_1_55*	1	*Pseudomonas lundensis*	1	*Pseudomonas thivervalensis*	2
Acinetobacter calcoaceticus	5	*Klebsiella sp. LTGPAF-6F*	1	*Pseudomonas lutea*	271	*Pseudomonas tolaasii*	10
Acinetobacter lwoffii	1	*Klebsiella sp. MS 92-3*	1	*Pseudomonas luteola*	1	*Pseudomonas trivialis*	6
Acinetobacter nectaris	1	*Klebsiella sp. OBRC7*	1	*Pseudomonas mandelii*	8	*Pseudomonas umsongensis*	6
Acinetobacter pittii	45	*Klebsiella variicola*	7	*Pseudomonas marginalis*	15	*Pseudomonas vancouverensis*	10
Acinetobacter radioresistens	1	*Klebsiella variicola CAG:634*	2	*Pseudomonas marincola*	3	*Pseudomonas veronii*	9

Acinetobacter seohaensis	1	*Kluyvera cryocrescens*	2	*Pseudomonas mediterranea*	7	*Pseudomonas versuta*	3
Acinetobacter sp. 25977_3	1	*Kluyvera intermedia*	2	*Pseudomonas mendocina*	5	*Pseudomonas viridiflava*	13
Acinetobacter sp. 72431	1	*Kocuria kristinae*	1	*Pseudomonas migulae*	2	*Pseudomonas vranovensis*	23
Acinetobacter sp. C15	1	*Komagataeibacter nataicola*	4	*Pseudomonas mohnii*	2	*Pseudomonas xanthomarina*	31
Acinetobacter towneri	3	*Kosakonia oryzendophytica*	1	*Pseudomonas monteilii*	141	*Pseudomonas xinjiangensis*	3
Acinetobacter ursingii	1	*Kosakonia oryziphila*	2	*Pseudomonas moorei*	2	*Pseudomonas yamanorum*	1
Actinobacteria bacterium OV320	1	*Kosakonia radicincitans*	1	*Pseudomonas moraviensis*	1	*Pseudomonas yangmingensis*	2
Actinokineospora enzanensis	1	*Kushneria avicenniae*	1	*Pseudomonas mosselii*	51	*Pseudomonas zeshuii*	2
Actinomyces nasicola	1	*Lactobacillus fermentum*	1	*Pseudomonas mucidolens*	8	*Pseudoxanthomonas mexicana*	1
Actinomyces odontolyticus	2	*Lactobacillus plantarum*	2	*Pseudomonas nitroreducens*	7	*Pseudoxanthomonas sp. CF125*	1
Actinomyces turicensis	4	*Lactobacillus rhamnosus*	4	*Pseudomonas oleovorans*	3	*Pseudoxanthomonas sp. CF385*	1
Actinoplanes philippinensis	1	*Lautropia sp. SCN 69-89*	1	*Pseudomonas orientalis*	1	*Pseudoxanthomonas sp. GM95*	3
Actinopolyspora alba	1	*Leclercia adecarboxylata*	2	*Pseudomonas oryzae*	4	*Pseudoxanthomonas sp. GW2*	1
Advenella kashmirensis	1	*Legionella feeleii*	2	*Pseudomonas oryzihabitans*	5	*Pseudoxanthomonas sp. Root630*	1
Advenella mimigardefordensis	1	*Legionella lansingensis*	8	*Pseudomonas otitidis*	5	*Pseudoxanthomonas sp. Root65*	1
Aeromonas hydrophila	3	*Legionella londiniensis*	2	*Pseudomonas pachastrellae*	1	*Pseudoxanthomonas suwonensis*	1
Aeromonas sp. ANNP30	1	*Legionella oakridgensis*	1	*Pseudomonas palleroniana*	3	*Psychrobacter sp. AntiMn-1*	1
Aeromonas sp. DNP9	1	*Legionella pneumophila*	3	*Pseudomonas panipatensis*	7	*Psychrobacter sp. CIP 110854*	1
Agarivorans gilvus	1	*Legionella shakespearei*	1	*Pseudomonas parafulva*	2531	*Rahnella aquatilis*	2
Aggregatibacter aphrophilus	3	*Lelliottia amnigena*	2	*Pseudomonas plecoglossicida*	63	*Rahnella sp. J11-6*	1
Agrobacterium genomosp. 2	3	*Leptolyngbya boryana*	1	*Pseudomonas pohangensis*	2	*Ralstonia mannitolilytica*	1
Agrobacterium rhizogenes	1	*Leptospira sp. B5-022*	1	*Pseudomonas prosekii*	7	*Ralstonia pickettii*	6
Agrobacterium tumefaciens	1	*Limnohabitans sp. Rim47*	2	*Pseudomonas protegens*	5	*Ralstonia solanacearum*	3

Aliiglaciecola lipolytica	2	*Luteibacter sp. 329MFSha*	1	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	7	*Ralstonia sp. 25mfcol4.1*	1
Aliihoeflea sp. 2WW	1	*Luteibacter sp. 9135*	2	*Pseudomonas psychrophila*	6	*Ralstonia sp. NFACC01*	1
Aliivibrio fischeri	1	*Luteimonas abyssi*	1	*Pseudomonas psychrotolerans*	4	*Ralstonia sp. NT80*	23
alpha proteobacterium AAP38	1	*Lysobacter antibioticus*	1	*Pseudomonas punonensis*	2	*Ralstonia sp. UNCCL144*	1
Aurantimonas manganoxydans	1	*Lysobacter sp. A03*	1	*Pseudomonas putida*	928	*Ramlibacter sp. Leaf400*	1
Azospirillum brasilense	5	*Magnetospirillum gryphiswaldense*	8	*Pseudomonas reinekei*	3	*Raoultella ornithinolytica*	2
Azospirillum lipoferum	2	*Mangrovibacter phragmitis*	1	*Pseudomonas reptilivorous*	1	*Raoultella planticola*	4
Azotobacter beijerinckii	4	*Mannheimia haemolytica*	5	*Pseudomonas resinovorans*	11	*Raoultella terrigena*	1
Azotobacter vinelandii	2	*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*	2	*Pseudomonas rhizosphaerae*	14	*Rheinheimera nanhaiensis*	2
Bacillus acidicola	1	*Marinobacter sp. T13-3*	4	*Pseudomonas rhodesiae*	8	*Rhizobacter gummiphilus*	1
Bacillus cereus group	1	*Marinobacter sp. X15-166B*	1	*Pseudomonas sagittaria*	2	*Rhizobium lusitanum*	1
Bacillus pumilus	4	*Marinobacterium sp. ST58-10*	1	*Pseudomonas saponiphila*	4	*Rhizobium oryzae*	1
Bacillus sp. JCM 19047	1	*Marinospirillum alkaliphilum*	1	*Pseudomonas saudimassiliensis*	1	*Rhizobium sp. 2MFCol3.1*	1
bacteria symbiont BFo1 of Frankliniella occidentalis	42	*Massilia alkalitolerans*	1	*Pseudomonas saudiphocaensis*	5	*Rhizobium sp. Leaf262*	2
bacterium endosymbiont of Mortierella elongata FMR23-6	1	*Massilia sp. 9096*	1	*Pseudomonas savastanoi*	17	*Rhizobium sp. Leaf371*	1
bacterium F082	1	*Massilia sp. BSC265*	1	*Pseudomonas simiae*	3	*Rhizobium sp. NFR07*	1
bacterium P201	1	*Mastigocoleus testarum*	1	*Pseudomonas soli*	4	*Rhizobium sp. NT-26*	4
Bacteroides fragilis	1	*Mesorhizobium loti*	1	*Pseudomonas sp. 10-1B*	29	*Rhizobium sp. YS-1r*	1
Balneatrix alpica	1	*Mesorhizobium sp. LSHC422A00*	1	*Pseudomonas sp. 11/12A*	3	*Rhizobium sullae*	1
beta proteobacterium CB	1	*Metallibacterium scheffleri*	1	*Pseudomonas sp. 2(2015)*	2	*Rhodanobacter sp. OK091*	1
Betaproteobacteria bacterium MOLA814	1	*methanotrophic bacterial endosymbiont of Bathymodiolus sp.*	12	*Pseudomonas sp. 2_1_26*	1	*Rhodococcus rhodochrous*	1
Bifidobacterium adolescentis	1	*Methylibium sp. T29-B*	1	*Pseudomonas sp. 22 E 5*	4	*Rhodococcus ruber*	1
Bifidobacterium longum	1	*Methylobacterium mesophilicum*	4	*Pseudomonas sp. 24 R 17*	1	*Rhodococcus sp. MTM3W5.2*	1

Bordetella ansorpii	3	*Methylobacterium populi*	2	*Pseudomonas sp. 25 E 4*	1	*Rhodococcus sp. RD6.2*	2
Bordetella bronchiseptica	1	*Methylocella silvestris*	2	*Pseudomonas sp. 25 R 14*	1	*Rhodoplanes sp. Z2-YC6860*	1
Bordetella genomosp. 13	1	*Microbacterium sp. HM58-2*	1	*Pseudomonas sp. 250J*	67	*Rhodopseudomonas palustris*	1
Bordetella pertussis	9	*Microcystis aeruginosa*	1	*Pseudomonas sp. 28 E 9*	1	*Rickettsia bellii*	2
Bordetella petrii	1	*Microvirgula aerodenitrificans*	1	*Pseudomonas sp. 31 R 17*	1	*Riemerella anatipestifer*	3
Bradyrhizobium sp. DOA1	1	*Morganella morganii*	2	*Pseudomonas sp. 313*	1	*Roseibium sp. TrichSKD4*	10
Bradyrhizobium sp. S23321	1	*Mucilaginibacter mallensis*	1	*Pseudomonas sp. 5*	18	*Rosenbergiella nectarea*	1
Bradyrhizobium sp. STM 3809	2	*Mycobacterium abscessus*	11	*Pseudomonas sp. 58 R 3*	2	*Roseobacter sp. AzwK-3b*	2
Bradyrhizobium sp. STM 3843	1	*Mycobacterium tuberculosis*	8	*Pseudomonas sp. 63_8*	1	*Roseobacter sp. GAI101*	1
Brenneria goodwinii	1	*Neorhizobium galegae*	1	*Pseudomonas sp. 655*	1	*Roseomonas sp. M3*	1
Brucella pinnipedialis	5	*Nevskia soli*	1	*Pseudomonas sp. A3(2016)*	4	*Rothia dentocariosa*	3
Brucella suis	4	*Nissabacter archeti*	2	*Pseudomonas sp. ABAC61*	11	*Rothia mucilaginosa*	1
Burkholderia arvi	1	*Nitrosomonas mobilis*	1	*Pseudomonas sp. ABFPK*	4	*Rouxiella badensis*	4
Burkholderia cenocepacia	1	*Nitrospirae bacterium RBG_19FT_COMBO_55_12*	1	*Pseudomonas sp. Ant30-3*	8	*Rouxiella chamberiensis*	2
Burkholderia gladioli	1	*Nocardia jiangxiensis*	1	*Pseudomonas sp. AP19*	1	*Rubrivivax gelatinosus*	1
Burkholderia mallei	9	*Nocardia terpenica*	1	*Pseudomonas sp. ATCC PTA-122608*	2	*Rudanella lutea*	1
Burkholderia multivorans	5	*Nocardiopsis trehalosi*	1	*Pseudomonas sp. B10*	4	*Ruegeria atlantica*	1
Burkholderia pseudomallei	5	*Novosphingobium sp. MD-1*	1	*Pseudomonas sp. B11(2017)*	1	*Saccharomonospora glauca*	1
Burkholderia sp. JS23	3	*Novosphingobium sp. PP1Y*	4	*Pseudomonas sp. B14(2017)*	1	*Salinihabitans flavidus*	1
Burkholderia sp. KJ006	3	*Oblitimonas alkaliphila*	2	*Pseudomonas sp. B28(2017)*	3	*Salinivibrio sp. PR5*	1
Burkholderia sp. lig30	1	*Oceanisphaera psychrotolerans*	1	*Pseudomonas sp. B5(2017)*	2	*Salmonella enterica*	58
Burkholderia sp. MSHR3999	1	*Ochrobactrum intermedium*	1	*Pseudomonas sp. B8(2017)*	1	*Sanguibacteroides justesenii*	1

Burkholderia sp. RPE67	3	*Opitutus sp. GAS368*	1	*Pseudomonas sp. BAY1663*	2	*Serratia liquefaciens*	5
Burkholderia sp. TSV86	1	*Paenarthrobacter nicotinovorans*	2	*Pseudomonas sp. Bc-h*	1189	*Serratia marcescens*	11
Burkholderia stabilis	1	*Paenibacillus odorifer*	5	*Pseudomonas sp. BMS12*	7	*Serratia odorifera*	2
Burkholderia thailandensis	1	*Paenibacillus selenitireducens*	1	*Pseudomonas sp. BRG-100*	1	*Serratia plymuthica*	2
Burkholderiaceae bacterium 16	1	*Paenibacillus sp. FF9*	5	*Pseudomonas sp. BTN1*	1	*Serratia sp. 14-2641*	1
Burkholderiales bacterium RIFCSPHIGHO2_01_FULL_63_240	1	*Paenibacillus sp. HW567*	1	*Pseudomonas sp. C5pp*	3	*Serratia sp. ATCC 39006*	1
Buttiauxella agrestis	1	*Paenibacillus sp. IHB B 3415*	2	*Pseudomonas sp. C9*	1	*Serratia symbiotica*	4
Buttiauxella brennerae	1	*Paenibacillus sp. P22*	1	*Pseudomonas sp. CB1*	38	*Shewanella violacea*	1
Campylobacter jejuni	1	*Paenibacillus sp. Soil787*	1	*Pseudomonas sp. CBZ-4*	3	*Shigella flexneri*	6
Candidatus Accumulibacter aalborgensis	1	*Paenisporosarcina sp. HGH0030*	1	*Pseudomonas sp. CC6-YY-74*	1	*Shigella sonnei*	31
Candidatus Erwinia dacicola	6	*Pandoraea oxalativorans*	1	*Pseudomonas sp. CCOS 191*	29	*Shigella sp. SF-2015*	1
Candidatus Hamiltonella	6	*Pantoea agglomerans*	11	*Pseudomonas sp. CF161*	8	*Shimwellia blattae*	3
Candidatus Liberibacter solanacearum	1	*Pantoea alhagi*	4	*Pseudomonas sp. CFII64*	6	*Siccibacter colletis*	1
Candidatus Nitrospira nitrosa	1	*Pantoea ananatis*	180	*Pseudomonas sp. CHM02*	3	*Skermanella stibiiresistens*	3
Candidatus Paraburkholderia schumannianae	6	*Pantoea anthophila*	1	*Pseudomonas sp. Chol1*	2	*Sodalis praecaptivus*	1
Candidatus Pelagibacter	3	*Pantoea brenneri*	2	*Pseudomonas sp. CMAA1215*	1	*Sodalis-like endosymbiont of Proechinophthirus fluctus*	1
Candidatus Providencia siddallii	1	*Pantoea calida*	1	*Pseudomonas sp. CMR5c*	1	*Solirubrum puertoriconensis*	1
Candidatus Sodalis sp. SoCistrobi	1	*Pantoea cypripedii*	15	*Pseudomonas sp. DR 5-09*	1	*Sphingobacterium sp. IITKGP-BTPF85*	1
Candidatus Uhrbacteria	1	*Pantoea deleyi*	1	*Pseudomonas sp. DRA525*	7	*Sphingobium sp. YR657*	1
Candidimonas bauzanensis	1	*Pantoea dispersa*	1761	*Pseudomonas sp. DSM 29164*	1	*Sphingobium yanoikuyae*	2
Carnobacterium maltaromaticum	1	*Pantoea eucrina*	7	*Pseudomonas sp. EGD-AKN5*	1	*Sphingomonas paucimobilis*	1
Catenulispora acidiphila	2	*Pantoea gaviniae*	2	*Pseudomonas sp. ENNP23*	1	*Sphingomonas sp. CCH5-D11*	1
Caulobacter sp. K31	1	*Pantoea rodasii*	146	*Pseudomonas sp. EpS/L25*	5	*Sphingomonas sp. MEA3-1*	1

Caulobacter sp. UNC358MFTsu5.1	1	*Pantoea rwandensis*	137	*Pseudomonas sp. ES3-33*	7	*Sphingomonas sp. PAMC 26605*	1
Caulobacter vibrioides	1	*Pantoea septica*	4	*Pseudomonas sp. FeS53a*	3	*Sporocytophaga myxococcoides*	6
Caulobacteraceae bacterium PMMR1	1	*Pantoea sp. 1.19*	8	*Pseudomonas sp. FGI182*	4	*Staphylococcus aureus*	8
Caulobacterales bacterium 68-7	1	*Pantoea sp. A4*	11	*Pseudomonas sp. FSL W5-0299*	1	*Staphylococcus hominis*	9
Cedecea davisae	5	*Pantoea sp. AS1*	7	*Pseudomonas sp. GEV388*	22	*Staphylococcus saprophyticus*	1
Cedecea neteri	1	*Pantoea sp. AS-PWVM4*	15	*Pseudomonas sp. GM102*	1	*Stenotrophomonas acidaminiphila*	1
Cedecea sp. NFIX57	1	*Pantoea sp. At-9b*	28	*Pseudomonas sp. GM17*	3	*Stenotrophomonas chelatiphaga*	6
Cellvibrio japonicus	2	*Pantoea sp. BL1*	58	*Pseudomonas sp. GM18*	4	*Stenotrophomonas ginsengisoli*	3
Chitinophaga pinensis	1	*Pantoea sp. GM01*	8	*Pseudomonas sp. GM21*	3	*Stenotrophomonas humi*	3
Chlamydia muridarum	2	*Pantoea sp. IMH*	12	*Pseudomonas sp. GM25*	2	*Stenotrophomonas koreensis*	2
Chlamydia trachomatis	2	*Pantoea sp. NGS-ED-1003*	1	*Pseudomonas sp. GM30*	5	*Stenotrophomonas maltophilia*	675
Chlorobium chlorochromatii	1	*Pantoea sp. OV426*	4	*Pseudomonas sp. GM33*	3	*Stenotrophomonas panacihumi*	1
Chromobacterium piscinae	1	*Pantoea sp. PSNIH1*	3	*Pseudomonas sp. GM41(2012)*	1	*Stenotrophomonas pavanii*	5
Chromohalobacter japonicus	1	*Pantoea sp. RIT-PI-b*	9	*Pseudomonas sp. GM48*	1	*Stenotrophomonas rhizophila*	34
Citrobacter amalonaticus	1	*Pantoea sp. SM3*	51	*Pseudomonas sp. GM49*	1	*Stenotrophomonas sp. 92mfcol6.1*	5
Citrobacter freundii	3	*Pantoea sp. YR343*	1	*Pseudomonas sp. GM50*	2	*Stenotrophomonas sp. BIIR7*	6
Citrobacter koseri	2	*Pantoea stewartii*	10	*Pseudomonas sp. GM55*	1	*Stenotrophomonas sp. DDT-1*	2
Citrobacter sp. MGH109	3	*Pantoea vagans*	8	*Pseudomonas sp. GM67*	3	*Stenotrophomonas sp. RIT309*	2
Clostridioides difficile	1	*Pantoea wallisii*	31	*Pseudomonas sp. GM74*	2	*Stenotrophomonas sp. SC-N050*	13
Clostridium sp. DMHC 10	1	*Paraburkholderia andropogonis*	1	*Pseudomonas sp. GM78*	1	*Stenotrophomonas sp. SKA14*	7
Clostridium sp. W14A	2	*Paraburkholderia aspalathi*	2	*Pseudomonas sp. GM80*	1	*Stenotrophomonas sp. TD3*	3
Collimonas arenae	1	*Paraburkholderia bryophila*	1	*Pseudomonas sp. GM84*	33	*Streptococcus agalactiae*	2
Collimonas fungivorans	1	*Paraburkholderia ferrariae*	2	*Pseudomonas sp. H1h*	3	*Streptococcus anginosus*	4

Collinsella aerofaciens	2	*Paraburkholderia graminis*	2	*Pseudomonas sp. H2*	5	*Streptococcus dysgalactiae*	2
Comamonadaceae bacterium B1	1	*Paraburkholderia kururiensis*	1	*Pseudomonas sp. HMSC08G10*	8	*Streptococcus equi*	2
Comamonas thiooxydans	1	*Paraburkholderia mimosarum*	1	*Pseudomonas sp. ICMP 19500*	1	*Streptococcus mutans*	2
Commensalibacter intestini	1	*Paraburkholderia phymatum*	1	*Pseudomonas sp. In5*	2	*Streptococcus pneumoniae*	25
Confluentimicrobium sp. EMB200-NS6	1	*Paraburkholderia piptadeniae*	1	*Pseudomonas sp. JY-Q*	1	*Streptococcus pyogenes*	5
Corynebacterium diphtheriae	1	*Paraburkholderia sacchari*	1	*Pseudomonas sp. KG01*	5	*Streptococcus salivarius*	3
Corynebacterium efficiens	1	*Paraburkholderia sartisoli*	1	*Pseudomonas sp. KK4*	14	*Streptococcus suis*	1
Cronobacter condimenti	1	*Paraburkholderia susongensis*	1	*Pseudomonas sp. LAB-08*	5	*Streptomyces ghanaensis*	2
Cronobacter malonaticus	1	*Paraburkholderia tropica*	2	*Pseudomonas sp. LAIL14HWK12:I11*	11	*Streptomyces himastatinicus*	1
Cronobacter muytjensii	1	*Pararhizobium polonicum*	1	*Pseudomonas sp. LAIL14HWK12:I7*	2	*Streptomyces pristinaespiralis*	2
Cronobacter sakazakii	9	*Pararhodospirillum photometricum*	4	*Pseudomonas sp. Leaf127*	44	*Streptomyces rubellomurinus*	1
Cronobacter turicensis	3	*Parasutterella excrementihominis*	1	*Pseudomonas sp. Leaf129*	2	*Streptomyces sp. Amel2xC10*	1
Cronobacter universalis	2	*Pectobacterium atrosepticum*	1	*Pseudomonas sp. Leaf15*	2	*Streptomyces sp. C*	1
Cupriavidus metallidurans	4	*Pectobacterium carotovorum*	4	*Pseudomonas sp. Leaf434*	3	*Streptomyces sp. DvalAA-14*	1
Cupriavidus necator	1	*Perlucidibaca sp. BK296*	1	*Pseudomonas sp. Leaf48*	5	*Streptomyces sp. e14*	1
Cupriavidus pauculus	1	*Phaseolibacter flectens*	1	*Pseudomonas sp. Leaf58*	23	*Streptomyces sp. H-KF8*	1
Cupriavidus sp. BIS7	1	*Phenylobacterium sp. RIFCSPHIGHO2_01_FULL_69_31*	1	*Pseudomonas sp. LFM046*	3	*Streptomyces sp. IMTB 2501*	1
Curvibacter putative symbiont of Hydra magnipapillata	24	*Phenylobacterium sp. RIFCSPHIGHO2_01_FULL_70_10*	1	*Pseudomonas sp. LPH1*	1	*Streptomyces sp. yr375*	1
Cutibacterium acnes	28	*Phenylobacterium sp. Root700*	2	*Pseudomonas sp. M47T1*	31	*Streptomyces zinciresistens*	1
Dechloromonas aromatica	1	*Phenylobacterium sp. SCN 70-31*	1	*Pseudomonas sp. MF4836*	3	*Sulfurospirillum arcachonense*	1
Desulfotomaculum geothermicum	1	*Photorhabdus asymbiotica*	3	*Pseudomonas sp. MF6394*	1	*sulfur-oxidizing symbionts*	1
Desulfovibrio indicus	1	*Photorhabdus luminescens*	5	*Pseudomonas sp. MF6396*	2	*Sutterella wadsworthensis CAG:135*	1
Devosia sp. H5989	1	*Photorhabdus temperata*	2	*Pseudomonas sp. MIACH*	3	*Tatumella morbirosei*	6

Dickeya chrysanthemi	1	*Plautia stali symbiont*	38	*Pseudomonas sp. ML96*	5	*Tatumella saanichensis*	2
Dickeya dianthicola	1	*Pluralibacter gergoviae*	3	*Pseudomonas sp. MOIL14HWK12:I2*	1	*Taylorella asinigenitalis*	4
Dickeya paradisiaca	1	*Propionibacterium freudenreichii*	4	*Pseudomonas sp. MRSN12121*	1	*Teredinibacter turnerae*	1
Dickeya sp. NCPPB 3274	1	*Propionibacterium sp. HMSC067A02*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111117*	1	*Tetrasphaera japonica*	1
Donghicola sp. KarMa	5	*Propionivibrio dicarboxylicus*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111118*	1	*Thalassospira lucentensis*	1
Duganella sp. CF458	1	*Providencia heimbachae*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111119*	16	*Thalassospira xiamenensis*	1
Duganella sp. Root1480D1	1	*Providencia stuartii*	3	*Pseudomonas sp. NBRC 111121*	1	*Thioalkalivibrio sp. ALgr1*	2
Dyella jiangningensis	1	*Pseudaminobacter manganicus*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111124*	31	*Thiocapsa sp. KS1*	6
Edwardsiella piscicida	18	*Pseudaminobacter salicylatoxidans*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111127*	8	*Thiohalospira halophila*	1
Edwardsiella tarda	3	*Pseudoalteromonas luteoviolacea*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111129*	1	*Thiolapillus brandeum*	1
Enterobacter cancerogenus	629	*Pseudoalteromonas sp. TB64*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111130*	30	*Thiomonas sp. CB2*	14
Enterobacter cloacae	22	*Pseudoclavibacter helvolus*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111131*	57	*Thiorhodococcus sp. AK35*	1
Enterobacter cloacae complex 'Hoffmann cluster IV'	5	*Pseudoflavonifractor capillosus*	4	*Pseudomonas sp. NBRC 111132*	4	*Thiothrix caldifontis*	1
Enterobacter hormaechei	4	*Pseudogulbenkiania sp. MAI-1*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111133*	7	*Tistrella mobilis*	1
Enterobacter kobei	2	*Pseudogulbenkiania sp. NH8B*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111134*	1	*Trabulsiella odontotermitis*	1
Enterobacter ludwigii	11	*Pseudomonadales bacterium RIFCSPHIGHO2_02_FULL_60_43*	1	*Pseudomonas sp. NBRC 111136*	4	*Type-C symbiont of Plautia stali*	33
Enterobacter mori	7	*Pseudomonadales bacterium RIFCSPLOWO2_02_FULL_63_210*	2	*Pseudomonas sp. NBRC 111138*	1	*Type-D symbiont of Plautia stali*	17
Enterobacter sp. BIDMC100	1	*Pseudomonadales bacterium RIFCSPLOWO2_12_59_9*	2	*Pseudomonas sp. NBRC 111139*	8	*Type-E symbiont of Plautia stali*	432
Enterobacter sp. EGD-HP1	1	*Pseudomonas abietaniphila*	879	*Pseudomonas sp. NBRC 111142*	1	*unclassified Betaproteobacteria (miscellaneous)*	1
Enterobacter sp. FY-07	3	*Pseudomonas aeruginosa*	61	*Pseudomonas sp. NBRC 111144*	2	*unclassified Comamonadaceae*	2
Enterobacter sp. kpr-6	2	*Pseudomonas agarici*	13	*Pseudomonas sp. NFACC02*	116	*unclassified Enterobacteriaceae (miscellaneous)*	3
Enterobacter timonensis	1	*Pseudomonas alcaligenes*	16	*Pseudomonas sp. NFACC13-1*	1	*uncultured Acidobacteria bacterium HF4000_26D02*	1

Enterobacter xiangfangensis	1	*Pseudomonas alcaliphila*	4	*Pseudomonas sp. NFACC19-2*	1	*uncultured alpha proteobacterium HF0070_14E07*	1
Enterobacteriaceae bacterium B14	1	*Pseudomonas alkylphenolica*	15	*Pseudomonas sp. NFACC25*	2	*uncultured alpha proteobacterium HF0130_06E21*	1
Enterobacteriaceae bacterium strain FGI 57	1	*Pseudomonas amygdali*	19	*Pseudomonas sp. NFACC45*	1	*uncultured bacterium*	29
Enterococcus faecalis	2	*Pseudomonas anguilliseptica*	1	*Pseudomonas sp. NFIX28*	2	*uncultured bacterium 125003-E23*	1
Entomoplasmatales bacterium EntAcro1	2	*Pseudomonas antarctica*	3	*Pseudomonas sp. NFPP07*	3	*uncultured bacterium 5G12*	1
Erwinia amylovora	28	*Pseudomonas argentinensis*	6	*Pseudomonas sp. NFPP28*	1	*uncultured bacterium 5H7*	6
Erwinia billingiae	15	*Pseudomonas arsenicoxydans*	2	*Pseudomonas sp. NFR09*	1	*uncultured bacterium A1Q1_fos_4*	7
Erwinia gerundensis	9	*Pseudomonas asplenii*	3	*Pseudomonas sp. NFR16*	1022	*uncultured beta proteobacterium CBNPD1 BAC clone 578*	10
Erwinia iniecta	19	*Pseudomonas asturiensis*	10	*Pseudomonas sp. Os17*	3	*uncultured beta proteobacterium HF0010_04H24*	3
Erwinia mallotivora	16	*Pseudomonas azotifigens*	8	*Pseudomonas sp. OV546*	1	*uncultured beta proteobacterium HF0130_04F21*	1
Erwinia oleae	1	*Pseudomonas azotoformans*	1	*Pseudomonas sp. P1.31*	6	*uncultured Clostridium sp.*	1
Erwinia persicina	51	*Pseudomonas balearica*	1	*Pseudomonas sp. P1.8*	2	*uncultured Desulfobacterium sp.*	1
Erwinia piriflorinigrans	9	*Pseudomonas batumici*	29	*Pseudomonas sp. p21*	4	*uncultured gamma proteobacterium HF0010_05D02*	2
Erwinia psidii	1	*Pseudomonas benzenivorans*	4	*Pseudomonas sp. P482*	7	*uncultured Pseudomonadales bacterium HF0010_05E14*	1
Erwinia pyrifoliae	3	*Pseudomonas borbori*	2	*Pseudomonas sp. P818*	1	*uncultured Rhodospirillales bacterium HF4000_24M03*	1
Erwinia sp. 9145	5	*Pseudomonas brassicacearum*	11	*Pseudomonas sp. PA1(2017)*	1	*Varibaculum cambriense*	1
Erwinia sp. Ejp617	2	*Pseudomonas brenneri*	2	*Pseudomonas sp. PA15(2017)*	6	*Variovorax sp. Root318D1*	1
Erwinia sp. ErVv1	8	*Pseudomonas caeni*	1	*Pseudomonas sp. PA27(2017)*	3	*Variovorax sp. YR216*	1
Erwinia sp. Leaf53	63	*Pseudomonas cannabina*	4	*Pseudomonas sp. PAMC 25886*	3	*Vibrio alginolyticus*	6
Erwinia tasmaniensis	9	*Pseudomonas capeferrum*	2	*Pseudomonas sp. Pf153*	5	*Vibrio campbellii*	6

Erwinia teleogrylli	3	*Pseudomonas caricapapayae*	6	*Pseudomonas sp. PH1b*	13	*Vibrio cholerae*	2
Erwinia toletana	12	*Pseudomonas cedrina*	6	*Pseudomonas sp. PI1*	1	*Vibrio nigripulchritudo*	1
Erwinia tracheiphila	8	*Pseudomonas cerasi*	1	*Pseudomonas sp. R37(2017)*	1	*Vibrio parahaemolyticus*	11
Erwinia typographi	12	*Pseudomonas chlororaphis*	50	*Pseudomonas sp. R45(2017)*	1	*Vibrio sp. HENC-02*	1
Escherichia coli	456	*Pseudomonas cichorii*	74	*Pseudomonas sp. R62*	1	*Vitreoscilla stercoraria*	1
Escherichia vulneris	7	*Pseudomonas cichorii JBC1*	1	*Pseudomonas sp. R81*	1	*Vogesella sp. EB*	1
Eubacterium ventriosum	1	*Pseudomonas citronellolis*	5	*Pseudomonas sp. RIT357*	2	*Williamsia herbipolensis*	1
Ewingella americana	2	*Pseudomonas coleopterorum*	2	*Pseudomonas sp. RIT-PI-a*	8	*Xanthobacter autotrophicus*	1
Franconibacter helveticus	1	*Pseudomonas composti*	1	*Pseudomonas sp. RIT-PI-q*	6	*Xanthobacter sp. 126*	1
Franconibacter pulveris	1	*Pseudomonas congelans*	4	*Pseudomonas sp. RIT-PI-r*	3	*Xanthomonadales bacterium RIFOXYA1_FULL_68_6*	1
Fulvimarina pelagi	1	*Pseudomonas coronafaciens*	3	*Pseudomonas sp. Root329*	1	*Xanthomonas arboricola*	4
Gallaecimonas pentaromativorans	1	*Pseudomonas corrugata*	4	*Pseudomonas sp. Root401*	3	*Xanthomonas axonopodis*	1
gamma proteobacterium L18	35	*Pseudomonas costantinii*	7	*Pseudomonas sp. Root562*	5	*Xanthomonas cannabis*	1
Gammaproteobacteria bacterium MFB021	2	*Pseudomonas cremoricolorata*	140	*Pseudomonas sp. S1E40*	2	*Xanthomonas citri*	63
Gammaproteobacteria bacterium RIFCSPLOWO2_02_FULL_57_10	1	*Pseudomonas deceptionensis*	4	*Pseudomonas sp. S3E12*	1	*Xanthomonas fuscans*	7
Gardnerella vaginalis	2	*Pseudomonas delhiensis*	2	*Pseudomonas sp. S-6-2*	2	*Xanthomonas hyacinthi*	3
Gemella morbillorum	1	*Pseudomonas denitrificans*	2	*Pseudomonas sp. S9*	13	*Xanthomonas sacchari*	1
Geomicrobium sp. JCM 19038	1	*Pseudomonas donghuensis*	3	*Pseudomonas sp. SHC52*	5	*Xanthomonas sp. Mitacek01*	1
Gilliamella apicola	1	*Pseudomonas endophytica*	17	*Pseudomonas sp. St29*	2	*Xanthomonas translucens*	1
Gillisia sp. CAL575	1	*Pseudomonas entomophila*	100	*Pseudomonas sp. StFLB209*	68	*Xenophilus azovorans*	1
Gluconobacter frateurii	2	*Pseudomonas extremaustralis*	8	*Pseudomonas sp. T*	2	*Xenorhabdus bovienii*	3
Haemophilus influenzae	16	*Pseudomonas extremorientalis*	1	*Pseudomonas sp. TCU-HL1*	2	*Xenorhabdus cabanillasii*	1
Hafnia alvei	3	*Pseudomonas ficuserectae*	1	*Pseudomonas sp. TJI-51*	1	*Xenorhabdus doucetiae*	1

Hafnia paralvei	1	*Pseudomonas flavescens*	2	*Pseudomonas sp. TTU2014-066ASC*	1	*Xenorhabdus khoisanae*	2
Halomonas arcis	1	*Pseudomonas flexibilis*	2	*Pseudomonas sp. TTU2014-080ASC*	4	*Xenorhabdus nematophila*	1
Halomonas sp. ALS9	1	*Pseudomonas fluorescens*	145	*Pseudomonas sp. TTU2014-096BSC*	1	*Xenorhabdus poinarii*	2
Halomonas sp. G11	1	*Pseudomonas formosensis*	1	*Pseudomonas sp. UC 17F4*	5	*Xylella fastidiosa*	1
Halomonas sp. 'Soap Lake #7'	1	*Pseudomonas fragi*	8	*Pseudomonas sp. URHB0015*	6	*Yersinia enterocolitica*	6
Halomonas titanicae	6	*Pseudomonas frederiksbergensis*	13	*Pseudomonas sp. URIL14HWK12:I4*	4	*Yersinia intermedia*	1
Halotalea alkalilenta	7	*Pseudomonas fulva*	3	*Pseudomonas sp. URIL14HWK12:I5*	4	*Yersinia mollaretii*	1
Herbaspirillum chlorophenolicum	1	*Pseudomonas fuscovaginae*	73	*Pseudomonas sp. URIL14HWK12:I6*	2	*Yersinia nurmii*	1
Herbaspirillum frisingense	1	*Pseudomonas gessardii*	6	*Pseudomonas sp. URMO17WK12:I11*	8	*Yersinia pestis*	9
Herbaspirillum lusitanum	1	*Pseudomonas gingeri*	22	*Pseudomonas sp. URMO17WK12:I12*	1	*Yersinia ruckeri*	1