



**ISRAEL FELIPE GONÇALVES SOARES**

**ANÁLISE DE MICOVIROSES EM *Pseudocercospora griseola*,  
AGENTE CAUSAL DA MANCHA ANGULAR DO FEIJOEIRO**

**LAVRAS – MG  
2024**

**ISRAEL FELIPE GONÇALVES SOARES**

**ANÁLISE DE MICOVIROSES EM *Pseudocercospora griseola*, AGENTE CAUSAL DA  
MANCHA ANGULAR DO FEIJOEIRO**

**ANALYSIS OF MYCOVIROSIS IN *Pseudocercospora griseola*, CAUSAL AGENT OF  
BEAN ANGULAR SPOT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. (a) Dra. Elaine Aparecida de Souza  
Orientadora

Prof. (a) Dra. Claudine Marcia Carvalho  
Coorientadora

**LAVRAS- MG  
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Soares, Israel Felipe Gonçalves.

ANÁLISE DE MICOVIROSES EM *Pseudocercospora  
griseola*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA ANGULAR DO  
FEIJOEIRO / Israel Felipe Gonçalves Soares. - 2024.

62 p. : il.

Orientador(a): Elaine Aparecida de Souza.

Coorientador(a): Claudine Marcia Carvalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. dsRNA. 2. micovírus. 3. hipovirulência. I. Souza, Elaine  
Aparecida de. II. Carvalho, Claudine Marcia. III. Título.

**ISRAEL FELIPE GONÇALVES SOARES**

**ANÁLISE DE MICOVIROSES EM *Pseudocercospora griseola*, AGENTE CAUSAL DA  
MANCHA ANGULAR DO FEIJOEIRO**

**ANALYSIS OF MYCOVIROSIS IN *Pseudocercospora griseola*, CAUSAL AGENT OF  
BEAN ANGULAR SPOT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 20 de fevereiro de 2024.

Dra. Fernanda Aparecida Castro Pereira

ESALQ-USP

Dr. Rafael Pereira

UFLA

Prof. (a) Dra. Elaine Aparecida de Souza  
Orientadora

Prof. (a) Dra. Claudine Márcia Carvalho  
Coorientadora

**LAVRAS- MG  
2024**

*A Deus, que sempre esteve comigo.*

**OFEREÇO**

*A minha família pelo apoio e carinho, a minha avó Maria Silene pelo exemplo de amor.  
A minha mãe Maria Bernadete, por ser meu maior apoio e exemplo de vida.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permanecer constantemente ao meu lado, irradiando luz sobre meu caminho e proporcionando auxílio para superar os desafios.

Agradeço profundamente aos meus familiares, em especial, minha mãe, Maria Bernadete, pela constante presença e apoio. À minha avó, Maria Silene, e às minhas tias, Ana Aparecida e Ana Paula, pelo suporte valioso que sempre ofereceram. Aos meus irmãos, Tereza, Maria e Caio, pelo acolhimento caloroso e pela torcida incansável em meu favor.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas (PPGM), pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Dra. Elaine Aparecida de Souza pela orientação ao longo do curso, me guiando na realização deste trabalho, mas também esteve presente em todos os projetos que realizei durante minha trajetória acadêmica. Agradeço pela sua dedicada orientação e apoio constante.

À professora Dra. Claudine Marcia Carvalho, expresse minha profunda gratidão por toda a orientação, empenho e carinho dispensados a mim.

À Dra. e amiga Fernanda Castro Pereira, por todo o carinho que teve comigo desde o início do mestrado. Agradeço também por ter aceitado fazer parte da banca examinadora, demonstrando seu apoio contínuo e comprometimento com meu desenvolvimento acadêmico. Estou verdadeiramente agradecido por ter você como mentora e amiga.

Ao Dr. Rafael Pereira, por toda ajuda nos processos de extração de RNA e por ter aceitado fazer parte da banca examinadora.

Aos professores do programa de pós-graduação e melhoramento da UFLA, em especial aos professores, Vinicius, Evandro Novaes, Lucimara e Flavia pelos ensinamentos.

Quero expressar minha profunda gratidão aos colegas do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças da UFLA, Alex, Ednilson, Rafael, Maria Clara, Gleice, Akemi pelo apoio inestimável durante a realização das pesquisas desenvolvidas. Um agradecimento especial vai para Mariana, pela assistência tanto na condução molecular quanto pessoal. Agradeço também à Jussara por sua colaboração no manuseio do patógeno e pela amizade. Dedico meu reconhecimento ao Reberth, não apenas pela amizade, mas também por seus incansáveis esforços em auxiliar no projeto de recombinação. Não posso deixar de mencionar a colaboração valiosa das alunas de Iniciação Científica Marcelly e Maria Luiza, pela amizade

e apoio nas atividades de pesquisa. Um agradecimento especial também ao técnico Miller, cuja prontidão em socorrer e ajudar nos problemas enfrentados foi fundamental. A professora Dra. Maria Cristina, pela incansável ajuda na realização da busca por isolados isogênicos. Cada um de vocês desempenhou um papel crucial e tornou esta jornada de pesquisa mais enriquecedora e gratificante.

Expresso meu sincero agradecimento à Dra. Larissa e ao Dr. Oscar por dedicarem esforços e recursos significativos para a realização do sequenciamento das amostras de dsRNA. Sua contribuição foi essencial para o avanço deste projeto.

Às colegas e amigas do laboratório de Virologia Molecular, em particular a Layla, pela amizade e companheirismo notáveis. Um agradecimento especial à Dra. Thalyta, cuja ajuda pessoal e profissional foi essencial para a detecção dos Micovírus. Sua expertise e generosidade contribuíram significativamente para o sucesso desta pesquisa, e estou verdadeiramente grato por contar com sua colaboração e amizade.

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Genética (GEN), Ana, Lorena, Leonardo, Katia, Gabriela, Luciana, Henrique, Lenin e Brena, pela amizade e pela valiosa ajuda na rotina da pós-graduação. Aprendi muito com cada um de vocês, e a colaboração e companheirismo que compartilhamos enriqueceram minha experiência acadêmica.

Aos amigos que o mestrado me proporcionou: Cícero, Karla e Ricardo. Sem a presença de vocês, todo o meu percurso na pós-graduação teria sido muito mais difícil. Amados, agradeço por cada momento compartilhado e guardarei lembranças carinhosas de nossa jornada juntos. A gratidão que sinto por cada um de vocês é imensa, e levarei a saudade e os aprendizados vividos para sempre.

Ao meu irmão que Lavras me proporcionou, Gustavo. Agradeço por todos os momentos de companheirismo e pela paciência demonstrada ao longo desse período. Guardarei lembranças afetuosas desse tempo precioso que passamos juntos.

Aos meus amigos que sempre estiveram do meu lado torcendo pela minha vitória, Felipe, Daphne, Amanda e Barbara. Vocês são muitos especiais em minha vida.

Aos amigos e companheiros de casa, Lara e Geovane, pelo carinho, amizade e paciência durante estes dois anos que compartilhamos morando juntos em Minas Gerais.

**OBRIGADO!**

*"A coragem não é a ausência do medo, mas o triunfo sobre ele."*

*(Albus Dumbledore)*

## **INDICADORES DE IMPACTO**

A análise de micoviroses em *Pseudocercospora griseola*, agente causal da mancha angular do feijoeiro, representa um avanço nesta área do conhecimento. As informações geradas neste trabalho poderão ser utilizadas em estudos futuros na utilização desses micovírus no controle biológico da mancha-angular, que poderá promover impacto tecnológico e econômico na cultura do feijoeiro. Além disso, a utilização de técnicas de manejo no controle de doenças de baixo impacto ambiental contribui sobremaneira para uma agricultura sustentável.

## RESUMO

A mancha angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, é uma das doenças mais importantes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). A presença de micovírus de RNA de fita dupla (dsRNA) tem sido observada neste patógeno. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar diferentes isolados armazenados em micoteca, e também, isolados recém coletados de *P. griseola* quanto à esporulação, detecção de micovírus de RNA de fita dupla e seus efeitos na morfologia da colônia, esporulação e virulência do patógeno. Além disso, foi realizada a cura de quatro isolados, isto é, foram obtidos isolados isogênicos sem a presença do vírus. Foram utilizados 29 isolados de *P. griseola*, sendo nove armazenados em micoteca e 20 coletados em campo experimental de feijoeiro. Os isolados foram cultivados em meio BDA e posteriormente, em meio líquido GPYE para obter a massa micelial. A extração de RNA total seguiu conforme o protocolo do TRIzol Reagent, e posteriormente seguida pelo tratamento com a enzima endonuclease S1 para obtenção dos dsRNA e submetidos à eletroforese em gel de agarose para identificar a presença ou ausência dos dsRNA. Os isolados isogênicos, isentos de vírus, foram obtidos por meio de cultura monospórica crescida em meio de cultura BDA com cicloheximida. Os isolados apresentaram diferentes níveis de capacidade de esporulação nas épocas avaliadas e de virulência quando inoculados nas cultivares de feijoeiro Rosinha, BRS Horizonte e na linhagem MAIII-16159. Foi observada a presença de dsRNA em 69% dos isolados avaliados. A aplicação de cicloheximida para a limpeza viral foi bem-sucedida em 75% dos isolados, resultando na eliminação dsRNA de baixo peso molecular. Os isolados isogênicos não apresentaram diferenças na pigmentação da colônia, mas apresentaram menor densidade micelial quando comparados com os isolados selvagens. Na ausência de fragmentos de dsRNA após a limpeza viral, o isolado 9 (raça 63.63) apresentou menor esporulação. Os dsRNA apresentaram efeito negativo na virulência dos isolados de *P. griseola*, sendo este, o primeiro relato de hipovirulência neste patógeno.

**Palavras-chave:** dsRNA; micovírus; esporulação; hipovirulência; *Phaseolus vulgaris*.

## ABSTRACT

Angular spot, caused by the fungus *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, is one of the most important diseases of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The presence of double-stranded RNA (dsRNA) mycoviruses has been observed in this pathogen. Therefore, the objective of this work was to analyze different isolates stored in mycotheca, and also, recently collected isolates of *P. griseola* regarding sporulation, detection of double-stranded RNA mycoviruses and their effects on colony morphology, sporulation and virulence of the pathogen. Furthermore, four isolates were cured, that is, isogenic isolates without the presence of the virus were obtained. 29 isolates of *P. griseola* were used, nine of which were stored in a library and 20 were collected in an experimental bean field. The isolates were cultivated in PDA medium and later in GPYE liquid medium to obtain the mycelial mass. Total RNA extraction followed the TRIzol Reagent protocol, and was subsequently followed by treatment with the S1 endonuclease enzyme to obtain dsRNA and subjected to agarose gel electrophoresis to identify the presence or absence of dsRNA. Isogenic, virus-free isolates were obtained through monosporic culture grown in PDA culture medium with cycloheximide. The isolates showed different levels of sporulation capacity at the times evaluated and of virulence when inoculated in the bean cultivars Rosinha, BRS Horizonte and the MAIII-16159 lineage. The presence of dsRNA was observed in 69% of the isolates evaluated. Application of cycloheximide for viral clearance was successful in 75% of isolates, resulting in the elimination of low molecular weight dsRNA. Isogenic isolates did not show differences in colony pigmentation, but showed lower mycelial density when compared to wild-type isolates. In the absence of dsRNA fragments after viral clearance, isolate 9 (race 63.63) showed less sporulation. dsRNA had a negative effect on the virulence of *P. griseola* isolates, this being the first report of hypovirulence in this pathogen.

**Keywords:** dsRNA; mycovirus; sporulation; hypovirulence; *Phaseolus vulgaris*.



## SUMÁRIO

<b><u>1 INTRODUÇÃO</u></b>	<b>13</b>
<b><u>2 REFERENCIAL TEÓRICO</u></b>	<b>15</b>
<u>2.1 Mancha Angular do feijoeiro</u>	15
<u>2.2 <i>Pseudocercospora griseola</i></u>	16
<u>2.3 Micovírus</u>	18
<u>2.4 RNA de fita dupla (dsRNA)</u>	20
<b><u>3 MATERIAL E MÉTODOS</u></b>	<b>23</b>
<u>3.1 Isolados de <i>Pseudocercospora griseola</i></u>	23
<u>3.2 Caracterização da esporulação dos isolados</u>	24
<u>3.3 Avaliação da virulência dos isolados</u>	24
<u>3.3.1 Semeadura dos genótipos de feijoeiro</u>	24
<u>3.3.1 Preparo e inoculação dos isolados de <i>P. griseola</i></u>	25
<u>3.3.2 Avaliação da severidade da mancha angular</u>	25
<u>3.4 Análise de micovírus nos isolados de <i>P. griseola</i></u>	27
<u>3.4.1 Obtenção da massa micelial</u>	27
<u>3.4.2 Extração do RNA total</u>	27
<u>3.4.3 Extração de dsRNA</u>	28
<u>3.4.4 Identificação da presença de dsRNA</u>	28
<u>3.4.5 Microscopia eletrônica de transmissão</u>	28
<u>3.5 Análise de limpeza viral dos isolados de <i>P. griseola</i></u>	29
<u>3.5.1 Obtenção de isolados isogênicos</u>	29
<u>3.5.2 Efeito de dsRNA em <i>P. griseola</i></u>	29
<u>3.9 Análises dos dados</u>	29
<b><u>4 RESULTADOS</u></b>	<b>30</b>
<u>4.1 Caracterização da capacidade de esporulação</u>	30
<u>4.2 Avaliação da virulência dos isolados</u>	30
<u>4.3 Análise de dsRNA nos isolados de <i>P. griseola</i></u>	31
<u>4.4 Obtenção de isolados isogênicos</u>	32
<u>4.5 Efeito do dsRNA em isolados de <i>P. griseola</i></u>	33
<u>4.5.1 Morfologia da colônia</u>	33
<u>4.5.2 Efeito do dsRNA na capacidade de esporulação dos isolados</u>	34
<u>4.5.3 Efeito do dsRNA na virulência dos isolados</u>	35
<b><u>5 DISCUSSÃO</u></b>	<b>37</b>

<b><u>6 CONCLUSÃO</u></b>	<b>43</b>
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b>	<b>44</b>
<b><u>APÊNDICES</u></b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa importante e amplamente cultivada em países tropicais e subtropicais do mundo, devidamente relacionado aos seus nutrientes presentes nos grãos, trazendo diversos benefícios para a saúde humana (Beebe et al., 2001; Reynoso Camacho et al., 2007; Lovato et al., 2018). O Brasil é o maior produtor e consumidor de *P. vulgaris* no mundo (CONAB, 2023; FAO, 2023). No entanto, vários fitopatógenos acometem o feijoeiro, causando grandes prejuízos às lavouras de produção (Singh; Schwartz, 2010).

A mancha angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun, é uma das doenças mais importantes do feijoeiro comum, capaz de causar danos de 80% na produtividade de grãos sob condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo (Nay et al., 2019). E os sintomas podem ser observados nas folhas, hastes, no caule e nas vagens (Crous, et al., 2006; Singh; Schwartz, 2010). O fungo pode ser disseminado por meio de sementes contaminadas, fazendo com que haja introdução e dispersão do patógeno em novas áreas de cultivo, ou mediante as condições naturais quando há resíduos vegetativos, oferecendo um ambiente propício para o desenvolvimento e proliferação do fungo. Nesse contexto, a liberação dos conídios, são prontamente disseminados por meio da ação do vento e/ou de água (Crous et al., 2006; Demant; Maringoni, 2012).

O fungo *P. griseola* possui ampla variabilidade genética quanto à virulência (Damasceno-Silva et al., 2008), sendo que a resistência do feijoeiro à mancha angular é predominantemente quantitativa (Pereira et al., 2015). Pereira et al. (2015) avaliaram a agressividade de isolados da raça 63.63 do patógeno em diferentes linhagens de feijão-comum, revelando variabilidade entre isolados desta raça. Librelon et al. (2022) constataram que existe ampla variabilidade genética entre 125 isolados de *P. griseola* avaliados para a esporulação e germinação dos conídios.

Alguns vírus são conhecidos por se associarem às células de fungos fitopatogênicos, estes são conhecidos como micovírus (Picarelli et al., 2017). Os micovírus podem apresentar ácidos nucleicos de RNA e DNA (Yu et al., 2010; Huang et al. 2023). Sua transmissão pode ocorrer de forma horizontal ou vertical, podem ou não alterar a biologia de seu hospedeiro, provocando mudanças na morfologia, como a variação na pigmentação da colônia, e em características fisiológicas, como a taxa de esporulação, ou até mesmo influenciar de forma negativa (hipovirulência) ou positiva (hipervirulência) na virulência do patógeno (Yu et al.,

2013; Guo et al., 2022; Liang et al., 2022). A presença de micovírus em *P. griseola* foi identificada por Lima et al. (2010).

Lima et al. (2010) detectaram a presença de micovírus de múltiplos fragmentos de RNA fita dupla (*double strain* RNA - dsRNA) em 63% dos isolados de *P. griseola* avaliados, evidenciando que a presença de micovírus é comum neste patógeno. Isolados isogênicos sem fragmentos de dsRNA foram obtidas a partir do cultivo em meio de cultura com cicloheximida ao longo de várias gerações e observaram que ocorre 100% de transmissão vertical. No entanto, não há informação na literatura sobre o efeito de micovírus de dsRNA para virulência e esporulação deste patógeno. Além disso, os micovírus, devido à sua capacidade de estarem associados ao fenômeno de hipovirulência, oferecem uma promissora perspectiva no âmbito do controle biológico de fungos fitopatogênicos (Bocos-Asenjo et al., 2022).

Diante do exposto, no presente estudo, objetivou-se analisar diferentes isolados armazenados em micoteca, e também, isolados recém coletados de *P. griseola* quanto à esporulação, detecção de micovírus de RNA de fita dupla e seus efeitos na morfologia da colônia, esporulação e virulência do patógeno.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Mancha Angular do feijoeiro

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de importância mundial, sendo os maiores produtores, Brasil, Índia, Mianmar, Estados Unidos, China, Tanzânia, México, Quênia, Argentina e Uganda. O Brasil encontra-se classificado em primeiro lugar na produção e consumo de feijão (FAO 2023). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, na safra 2022/2023, foram colhidas 319,8 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2023). O feijão, é um dos alimentos mais importantes da culinária brasileira, consumido e produzido em todas as regiões do país (Ramalho et al., 2005; Nakayama; Pinheiro; Zerbini, 2013). A importância do grão de feijão está relacionada aos seus nutrientes, apresentando fontes de minerais, proteínas e carboidratos essenciais para a saúde humana (Reynoso Camacho, 2007; Silva; Wander, 2013; Lovato et al., 2018).

No entanto, além das condições climáticas, a ocorrência de doenças vem contribuindo para a baixa produtividade e instabilidade na produção da cultura do feijão. Entre as doenças que causam grandes prejuízos, a mancha angular se destaca, sendo considerada uma das mais importantes da cultura. (Vieira, 1974; Almeida; et al., 2008; Figueirêdo et al., 2010; Nay et al., 2019; Carneiro; Romano; Cassio, 2022).

A mancha angular, ocasionada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous e U. Braun (Crous et al., 2006), quando presente em lavouras de feijão, podem resultar grandes reduções de produtividade de até 80%, quando as condições são favoráveis para o desenvolvimento do fungo (Nay et al., 2019). A intensificação da doença no Brasil ocorreu devido ao sistema de cultivo em algumas regiões, onde são conduzidas três safras anuais, a safra das águas, semeada entre outubro e novembro; a safra da seca, semeada entre janeiro e abril; a safra de inverno, semeada a partir de abril e colhida entre agosto e outubro, facilitando a produção e dispersão dos conídios (Jesus Junior et al., 2001; Barbosa; Gonzaga, 2012).

Os sintomas da mancha angular podem ocorrer nas folhas, hastes, no caule e nas vagens. Nas folhas primárias as lesões são geralmente circulares com coloração castanha ou marrom avermelhada, presentes nas duas faces foliar. Nas folhas trifolioladas, as lesões são necróticas com cor acinzentada a marrom-escura com formato irregular. Nos ramos e pecíolos os sintomas são escuros e geralmente alongados. Nas vagens, as manchas são arredondadas e castanho-escuras, apresentando tamanho variável (Kimati et al., 1997; Monda; Senders; Hick, 2001; Moda-Cirino et al., 2012).

As estratégias de manejo utilizadas para controlar a doença são: rotação de culturas, época adequada de semeadura, uso de sementes sadias, controle químico e genético (Celetti; Melzer; Boland, 2005). Entretanto, a utilização inadequada de defensivos agrícolas pode causar danos ambientais, além de proporcionar uma seleção na população do patógeno (Sartorato, 2006). Nesse sentido, o melhoramento genético visando resistência à mancha angular é a alternativa mais viável para o manejo da doença, por meio do lançamento de novas cultivares com alelos de resistência a diferentes raças patogênicas (Amaro et al., 2007; Pereira et al., 2015; Librelon et al., 2020; Pádua et al., 2021; Pádua et al., 2022).

A resistência genética do *P. vulgaris* à mancha angular apresenta herança predominantemente quantitativa (poligênica), no entanto, também tem sido observada a qualitativa (monogênica). Dessa forma, os programas de melhoramento genético têm dispensado esforços na busca de linhagens com maior número de alelos de resistência à mancha angular (Pereira et al., 2015; Librelon et al., 2020; Pádua et al., 2021; Pádua et al., 2022). O programa de seleção recorrente da Universidade Federal de Lavras conduzido juntamente com a Embrapa tem logrado sucesso na obtenção de linhagens que conferem resistência a este patógeno (Amaro et al., 2007; Pereira et al., 2015; Pádua et al., 2021, Abreu et al. 2023).

No estudo conduzido por Amaro et al. (2007), que abordou a seleção fenotípica recorrente em feijoeiros do tipo carioca visando a resistência à mancha angular, observou-se uma variação nos sintomas entre linhagens consideradas resistentes, proporcionando ganhos significativos na resistência ao patógeno. Em outro contexto, as pesquisas de Pereira et al. (2015), avaliando a resistência de genótipos de feijoeiro e a agressividade de isolados de *P. griseola* da raça 63.63, identificaram a presença tanto de resistência vertical (qualitativa) quanto horizontal (quantitativa). A ampla variabilidade do patógeno tem sido relatada para caracteres morfológicos, fisiológicos e de virulência (Damasceno-Silva et al., 2008; Pereira et al., 2019; Librelon et al., 2022) com a identificação de várias raças, contribuindo para a complexidade associada à resistência genética (Aytenfsu; Terefe, 2023). Portanto, é importante conhecer e monitorar a variabilidade desse patógeno (Rodríguez et al., 2017).

## 2.2 *Pseudocercospora griseola*

O agente etiológico da mancha angular do feijoeiro é o fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous e U. Braun (Crous et al., 2006). É um fungo Deuteromycotina imperfeito, da Classe Hyphomycete, Ordem Moniliales, Família Stilbelaceae (Stenglein; Balatti, 2006). No passado, o fungo apresentava diversas nomenclaturas, como *Isariopsis*

*griseola* Sacc (Saccardo, 1778) e *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris (Stenglein et al., 2003). Este patógeno produz sinêmios com cerca de 250 µm de comprimento e 20 a 40 µm de largura na face inferior da folha de seu hospedeiro. Os conidióforos paralelos apresentam coloração escura formando tufos, a morfologia dos conídios pode ser cilíndrica ou fusiforme, com cor cinza, podem apresentar de dois a seis septos, com comprimento de 35 a 70 µm, largura no centro entre 5 a 7,5 e largura da base variando de 1,5 a 2 µm (Crous et al., 2006).

O fungo pode sobreviver em sementes e em restos culturais. Uma vez presente nas lavouras, os conídios germinam em temperatura entre 8 a 32 °C, preferencialmente entre 20 a 28 °C. A esporulação ocorre durante períodos de alta umidade, sendo disseminados pelo vento e chuva. Quando entram em contato com o tecido do hospedeiro, penetram a cavidade estomática e os sintomas da doença começam a aparecer entre 8 a 12 dias após a inoculação, sob temperatura favorável de 16 a 28 °C (Bianchini et al., 2005). Em programas de melhoramento, onde realizam a inoculação artificial no estágio V2 do feijoeiro (abertura completa das folhas primárias) por meio de uma solução de esporos, a avaliação da severidade da doença é realizada 15 dias após a inoculação (Librelon et al., 2015).

O patógeno *P. griseola* possui uma alta variabilidade genética. Brock, (1951) foi o primeiro a observar diferentes padrões de virulência de isolados quando inoculados no feijoeiro. Habgood, (1970) propôs a utilização do método binário utilizando um conjunto de cultivares diferenciadoras, a partir deste método, Pastor-Corrales, Jar e Singh, (1998) propuseram um conjunto de 12 cultivares diferenciadoras na identificação dos isolados de *P. griseola*, a partir de então, foram realizados diversos estudos de identificação das raças. No Brasil, já foram descritas cerca de 54 raças de *P. griseola*, 80 diferentes raças nas Américas e cerca 134 já foram descritas no mundo (Sartorato; Alzate-Marin et al., 2004; Damasceno-Silva et al., 2008; Jara et al., 2015).

Damasceno-Silva et al. (2008) utilizaram o conjunto de 12 cultivares diferenciadoras para averiguar a variabilidade genética de isolados de *P. griseola* coletados no estado de Minas Gerais, evidenciando resultados significativos sobre a variabilidade virulência deste fungo, relatando raças que previamente não descritas no estado e destacando a raça 63.63 como a mais frequente. Posteriormente, Pereira et al. (2015) relatou a existência de variabilidade genética entre isolados de uma mesma raça de isolados da raça 63.63. Essa alta variabilidade genética de *P. griseola* pode estar relacionada ao mecanismo de troca de material genético sem ocorrência da meiose. A parassexualidade é um mecanismo muito comum em fitopatógenos, utilizado por fungos assexuados para aumentar a variação através da fusão das hifas em isolados que apresentam compatibilidade. Damasceno-Silva et al.

(2015) foram os primeiros a observar a ocorrência de anastomose entre isolados de *P. griseola*.

Librelon et al. (2022) identificaram variações nas características morfofisiológicas em 125 culturas monospóricas provenientes de três municípios de Minas Gerais. O estudo revelou uma expressiva diversidade genética entre os isolados do patógeno, evidenciando que a capacidade de esporulação apresentou uma amplitude de 0,88 a  $27,67 \times 10^4$  conídios/mL, enquanto a taxa de germinação variou entre 39% e 72%. Além disso, a pesquisa apontou distintos níveis de sensibilidade dos isolados a diferentes fungicidas.

Lima et al. (2010) identificaram a presença de micovírus de RNA de fita dupla entre os isolados desse fungo. No entanto, não há relatos sobre o efeito de dsRNA neste patógeno. Uma vez que os micovírus podem apresentar interações complexas com seus hospedeiros, destacando a importância de investigações mais aprofundadas para compreender a natureza dessas relações e seus efeitos em *P. griseola* (Longkumer et al., 2020; Casas et al., 2021; Zhou et al., 2021).

### 2.3 Micovírus

Nos fungos fitopatogênicos são encontrados vírus que podem causar pequenas a grandes alterações no hospedeiro. São vírus que se replicam em células de fungos e que não possuem fase extracelular nem vetores conhecidos. Denominados micovírus, foi relatado pela primeira vez em cogumelos (*Agaricus bisporus*) por Hollings (1962). A partir desse momento, diversas espécies de micovírus vêm sendo descritas em diferentes espécies fúngicas. Segundo Pearson et al. (2009), existem duas possíveis explicações para a origem dos micovírus, a primeira seria que os micovírus e seus hospedeiros evoluíram em conjunto ao longo do tempo, a segunda aponta para uma origem mais recente, baseada na observação de que certas famílias de vírus possuem membros com similaridades genômica entre si, com a possibilidade de ocorrência de transmissão horizontal.

Os micovírus são latentes, possuem uma ampla diversidade de espécies, podendo alterar a biologia do seu hospedeiro (Xie et al., 2006; Picarelli et al., 2017). Eles possuem um ciclo de vida dividido em quatro etapas: (1) propagação na célula fúngica de seu hospedeiro; (2) desenvolvimento das células na direção da extensão da hifa após a divisão celular; (3) ramificações laterais entre hifas fundidas em uma rede micelial interconectada; e (4) anastomose entre hifas pela transmissão horizontal (Yaegashi et al., 2013).

A natureza da transmissão dos micovírus pode ser realizada por meio da divisão de células na produção de esporos sexuais e assexuais (vertical), ou por meio de anastomoses de

hifas, onde a fusão de hifas com compatibilidade vegetativa irá permitir a troca de material citoplasmático (horizontal) (Ikeda et al., 2013; Lemus-Minor et al., 2019). Em *Pseudocercospora griseola*, os micovírus presentes neste fungo são transmitidos para colônias monospórica por meio dos conídios, demonstrando uma transmissão vertical com uma eficiência de 100% para isolados de *P. griseola*, o que dificulta a obtenção de isolados isogênicos (Lima et al., 2010).

Os micovírus estão presentes em diversos fitopatógenos e entomopatogênicos, bem como as interações ecológicas que existem entre alguns deles. Essas interações podem ocasionar aumento ou redução da virulência fúngica (Longkumer et al., 2020; Casas et al., 2021). A hipovirulência, é o termo utilizado para descrever a capacidade de um micovírus hospedeiro de um fungo fitopatógeno reduzir a virulência da doença fúngica em questão (Yu et al., 2010; Gupta et al. 2019). Zhou et al. (2021) caracterizaram um micovírus da família Chrysoviridae, *Pestalotiopsis theae chrysovirus-1* (PtCV1), presente em uma cepa endofítica do fungo *P. theae*, patógeno do chá (*Camellia sinensis*), este micovírus causa a hipovirulência no hospedeiro, conseguindo modificar a sua patogenicidade (Khan; Baig; Bhatti, 2023).

A hipervirulência, é a capacidade de um micovírus causar o aumento da doença na cultura infectada. Este fator de virulência é benéfico ao fungo, sendo uma estratégia que contribui para aumentar sua capacidade em causar infecção. Esse fato pode ser explicado por vários fatores, como o aumento da atividade metabólica que ocorre no desenvolvimento inicial, alterações na expressão gênica, entre outros (Mathe; Van Dijck, 2013; Picarelli et al., 2017). Jian; Lakshman e Tavantzis (1998) identificaram em seus estudos que um RNA de fita dupla proveniente de anastomoses de hifas está associado à maior virulência do fitopatógeno *Rhizoctonia solani* e quando não há presença do micovírus a virulência é diminuída.

O estudo realizado por Tapia et al. (2012) constatou que o crescimento micelial dos isolados com micovírus foi superior ao crescimento dos isolados sem micovírus, fornecendo informações sobre o impacto da presença de micovírus no crescimento micelial de isolados de *Gremmeniella abietina*. Dessa forma, os micovírus também podem ocasionar diferenças físicas em seu hospedeiro, como crescimento anormal no seu hospedeiro, crescimento micelial lento, margem de colônia irregular, redução de pigmentos e presença de anéis de hifas (Sasaki et al. 2006; Jia et al., 2017; Jiang et al., 2019). Deste modo, o controle biológico de fungos fitopatogênicos pela aplicação de micovírus hipovirulentos pode ser uma alternativa viável para controlar o crescimento de doenças em plantas (Boland, 2004; Barros, 2016; Gupta et al. 2019; Wang et al., 2019; Guo et al., 2022).

Os micovírus que apresentam efeito de hipovirulência em seus hospedeiros são de interesses para o controle biológico, sendo fundamental que esses micovírus atendam aos seguintes critérios: (1) serem capazes de causar hipovirulência no hospedeiro; (2) exibirem uma alta taxa de transmissão vertical por meio de esporos; (3) contornarem os mecanismos do hospedeiro que visam controlar a propagação e a infecção viral (Bocos-Asenjo et al., 2022).

#### 2.4 RNA de fita dupla (dsRNA)

Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (2023), os micovírus podem apresentar genoma de DNA fita simples (ssDNA) (Malathi; Renuka Devi, 2019), RNA fita simples (ssRNA) (Weissenhorn et al., 2013), RNA fita simples que ocorre por transcrição reversa (ssRNA-RT) (Picarelli et al., 2017), RNA fita simples sentido negativo (-ssRNA) e sentido positivo (+ssRNA) (Mahajan et al., 2021; Jiāng et al., 2022), e os RNA fita dupla (dsRNA) (Axtell et al., 2013). Os micovírus de dsRNA são divididos em oito famílias.

A família Totiviridae inclui dois gêneros que infectam fungos, *Totivirus* e *Victorivirus*. Estes, apresentam características morfológicas semelhantes, apresentando simetria icosaédrica e não envelopados com 30 a 40 nm de diâmetro. O seu genoma apresenta segmentos lineares de dsRNA, com tamanho entre 4 a 7 Kbp (Li et al., 2011; Picarelli et al., 2017). No momento, há diversos relatos de membros da família Totiviridae em fitopatógenos, alguns deles são: *Chalara elegans* RNA virus 1 (CerV1) da podridão negra da cenoura (*Chalara elegans*) (Park; James; Punja, 2005), *Ustilago maydis* virus H1 (UmV-H1) do carvão-dormido (*Ustilago maydis*) (VOTH et al., 2006), *Magnaporthe oryzae* virus 1 (MoV1) da brusone do arroz (*Magnaporthe oryzae*) (Yokoi; Yamashita; Hibi, 2007).

Os endornavírus são vírus lineares de ssRNA ou dsRNA, a Família Endornaviridae inclui dois gêneros, *Alphaendornavirus* e *Betaendornavirus*. São comumente esféricos, apresentando 50 nm de diâmetro (Picarelli et al., 2017; Luo et al., 2022). Na atualidade, existem espécies de micovírus dessa família associados a diversos fungos, como *Phytophthora alphaendornavirus* 1 (PEV1) presente em *P. cactorum*, agente causal da podridão da raiz ou podridão do colo do morangueiro (Poimala et al., 2021), *Sclerotinia sclerotiorum* betaendornavirus 1 (SsEV1/11691) podem ser encontrados no fungo *S. sclerotiorum*, patógeno cosmopolita que pode atacar mais de 700 espécies de plantas, entre elas o feijoeiro (Luo et al., 2022), o *Rhizoctonia cerealis* alphaendornavirus 1 (RcEV1), foi descrito associado ao patógeno da mancha ocular aguda do trigo *R. cerealis* (Li et al., 2021).

A família Partitiviridae possui três gêneros, *Alphapartitivirus*, *Betapartitivirus* e *Gammapartitivirus*, e também, apresenta espécies não classificadas ao nível de gênero. No

geral, seus afiliados possuem virions isométricos com 30 a 40 nm de diâmetro, apresentando genomas lineares de dsRNA com tamanho de 1,4 a 2,4 Kbp (Picarelli et al., 2017; Casas et al., 2021). Alguns representantes destes gêneros são: o *Rhizoctonia solani* virus 717 (RsV717) descrito no fungo *R. solani*, é um patógeno cosmopolita, causando perdas econômicas em diversas culturas de importância econômica, incluindo o feijoeiro, causando a podridão-radicular (Strauss; Lakshman; Tavantzis, 2000; Abdoulaye; Foda; Kotta-Loizou, 2019); *Gremmeniella abietina* RNA virus MS1 (GaRVMS1) do patógeno *G. abietina* (GaRVMS1) (Tuomivirta; Hantula, 2003); *Chondrostereum purpureum* cryptic virus 1 (CPCV) do hospedeiro *C. purpureum* (Magae; Sunagawa, 2010).

O *Chrysovirus* é o gênero de micovírus da Família Chrysoviridae. São isométricos com 30 a 35 nm de diâmetro, não apresentam envelope, possuem genomas lineares de dsRNA com tamanho de 2,9 a 3,6 Kbp (King et al., 2011; Kotta-Loizou et al., 2020). Entre as espécies de micovírus desse gênero, encontra-se *Fusarium oxysporum* chrysovirus 1 (FoCV1) descrito no fungo *F. oxysporum*, é o patógeno que causa murcha em uma grande variedade de culturas (Lemus-Minor et al., 2015), *Colletotrichum gloeosporioides* chrysovirus 1 (CgCV1) parasita do fungo *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose (Zhong et al., 2016), *Helminthosporium victoriae* 145S virus (HvV145S) do fungo *H. victoriae* (Ghabrial et al., 2013).

A Família Reoviridae é constituída pelo gênero *Mycovirus*, as espécies são isométricas, possuem capsídeo duplo, apresentam 80 nm de comprimento, possuem 10 a 12 segmentos genômicos de RNA de fita dupla apresentando 19 a 32 kbp (Suzuki et al., 2004; King et al., 2011; Picarelli et al., 2017). Os reovírus inclui espécies como, *Cryphonectria parasitica* mycoreovirus-1 e 2 (CpMYRV-1) e (CpMYRV-2), encontrados no micélio do fungo filamentoso causador da ferrugem da castanheira (*C. parasitica*) (Supyani 2009; King et al., 2012), *Rosellinia necatrix* mycoreovirus-3 (RnMYRV-3) é o fator de hipovirulência do fungo da podridão branca da raiz, *Rosellinia necatrix* em roseiras (Sasaki et al., 2007; King et al., 2012).

Os quadrivírus apresentam partículas esféricas rígidas de 45 nm de diâmetro, possuem genomas dsRNA 3,5 a 5 segmentos com 16,8 a 17,1 Kpb (Picarelli et al., 2017; Chiba et al., 2018; Lutz; Langer; Heinze, 2022). A taxonomia da família Quadriviridae é recente, a família incluía um único gênero *Quadrivirus* com uma única espécie *Rosellinia necatrix quadrivirus* 1 (Adams; King; Carstens, 2013; Chiba et al., 2018). Atualmente, novos estudos identificaram novas espécies de *Quadrivirus*. Lutz; Langer; Heinze, (2022), descobriram associada à necrose do colo do caule de *Fraxinus excelsior* L. o *Thelonectria quadrivirus* 1(TQV1) como

uma nova espécie proposta para o gênero *Quadrivirus*. Recentemente, Pielhop et al. (2022), encontram uma nova espécie de *Quadrivirus*, *O rugonectria rugulosa quadrivirus 1* (RrQV1) co-infectando o endófito de raiz *Rugonectria rugulosa* associado à doença de replantio de maçã.

Os megabirnavírus, são vírus esféricos não envelopados com 50 nm de diâmetro, apresentam genomas de RNA fita dupla com dois segmentos lineares, com 7,2 a 8,9 kbp. A família Megabirnaviridae inclui o gênero *Megabirnavirus* com a espécie *Rosellinia necatrix megabirnavirus 1* (RnMBV1), descoberto em isolados fúngicos da podridão branca da raiz (*Rosellinia necatrix*) conferindo hipovirulência (Picarelli et al., 2017; Sati et al., 2019; Casas et al., 2021).

A família Botybirnaviridae inclui o gênero *Botybirnavirus*, que acomoda vírus isométricos com 35 nm de diâmetro, apresentando genomas de dsRNA com dois segmentos de 5,5 a 6,5 kbp. O *Botybirnavirus* inclui a espécie *Alternaria botybirnavirus 1* (ABRV1) que foi descoberta em isolados de *Alternaria* spp., o *Botrytis cinerea botybirnavirus 1* encontrado em cepas fúngicas selvagem de *Botrytis cinerea* (Picarelli, et al., 2017; Xiang et al., 2017; Cottet et al., 2019; Casas et al., 2021).

Já foram identificados diversos micovírus em fungos causadores de doenças em feijoeiro, como, por exemplo, em *P. griseola* (Lima et al., 2010), *Sclerotinia sclerotiorum* (Luo et al., 2022), *Colletotrichum lindemuthianum* (Casas et al., 2021) entre outros. No estudo conduzido por Lima et al. (2010), múltiplos fragmentos de dsRNA, variando de zero a 10 segmentos, foram obtidos por meio da extração de ácidos nucleicos totais, seguida de dsRNA e subsequente separação via eletroforese em gel de agarose. Esses fragmentos, com tamanhos estimados entre 0,8 a 4,8 kb, foram observados molecularmente, estes dsRNA podem ser pertencentes às famílias Partitiviridae, Totiviridae e Chrysoviridae. No entanto, para realizar uma identificação mais precisa é necessário fazer o sequenciamento do genoma dos micovírus (King et al., 2011; Li et al., 2011; Kotta-Loizou et al., 2020; Casas et al., 2021).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Resistência de Plantas a Doenças, Genética Molecular e em casa de vegetação do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Naturais e nos laboratórios de Virologia Molecular e de Microscopia do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura de Lavras da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

#### 3.1 Isolados de *Pseudocercospora griseola*

Foram utilizados 29 isolados de *P. griseola*, dos quais nove são isolados coletados em 2013 e 2017 e estão armazenados na micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças da UFLA. Em 2023, 20 isolados foram obtidos de lesões de mancha angular presentes em folhas de plantas de feijoeiro cultivadas em campo experimental da UFLA (Tabela 1) e (Apêndice A).

Tabela 1- Isolados do fungo *P. griseola* da micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças da UFLA e coletados de linhagens de feijão que apresentavam sintomas de mancha angular.

<b>Número de identificação dos isolados</b>	<b>Nome dos isolados</b>	<b>Local de origem</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>Procedência</b>
1	LB6	Lambari	2017	Micoteca
2	LB10	Lambari	2017	Micoteca
3	LB13	Lambari	2017	Micoteca
4	LB19	Lambari	2017	Micoteca
5	LV2	Lavras	2017	Micoteca
6	LV16	Lavras	2017	Micoteca
7	LV18	Lavras	2017	Micoteca
8	LV19	Lavras	2017	Micoteca
9	63.63	Lavras	2013	Micoteca
10	GWAS22	Lavras	2023	VC 17
11	GWAS35	Lavras	2023	VC36
12	GWAS38	Lavras	2023	BRS Bentivi
13	GWAS39	Lavras	2023	VC38
14	GWAS41	Lavras	2023	BRS Horizonte
15	GWAS44	Lavras	2023	BRS Pitanga
16	GWAS50	Lavras	2023	RADIANTE
17	GWAS57	Lavras	2023	ESAL535

18	RIL85	Lavras	2023	RIL5
19	RIL60	Lavras	2023	RIL63
20	RIL71	Lavras	2023	RIL134
21	RIL136	Lavras	2023	RIL111
22	RIL148	Lavras	2023	RIL158
23	RIL199	Lavras	2023	RIL137
24	RIL207	Lavras	2023	RIL96
25	RIL229	Lavras	2023	RIL134
26	RIL294	Lavras	2023	RIL20
27	RIL313	Lavras	2023	RIL185
28	RIL329	Lavras	2023	RIL115
29	GWAS36	Lavras	2023	CXI 18

### 3.2 Caracterização da esporulação dos isolados

Os isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de esporulação. Para isso, um experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso (DIC) com três repetições. A parcela constituída de um tubo de ensaio contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar) mantidos a temperatura constante de 24 °C em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), em condições de ausência de luz (Pereira et al., 2011). A contagem dos conídios foi efetuada em três tempos, correspondentes aos dias 6, 8 e 11 após a instalação do experimento. Para cada avaliação, foi adicionado 1 mL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), devidamente esterilizada, em cada tubo. A raspagem da superfície da cultura foi realizada para promover a liberação dos conídios. Posteriormente, uma alíquota da suspensão de conídios foi transferida para uma câmara de Neubauer, e no microscópio óptico, procedeu-se à contagem de conídios (Librelon et al., 2022).

### 3.3 Avaliação da virulência dos isolados

Para avaliar a virulência dos isolados, um experimento de inoculação artificial de *P. griseola* foi realizado. Esse experimento foi conduzido no delineamento de blocos casualizados (DBC) no esquema fatorial duplo (29 isolados x 3 genótipos de feijoeiro), com três repetições e oito plantas por parcela.

#### 3.3.1 Semeadura dos genótipos de feijoeiro

Sementes de duas cultivares (BRS Horizonte e Rosinha) e uma linhagem MAIII-16159 de feijoeiro (*P. vulgaris*) foram semeadas em bandejas de poliestireno com 64 células

contendo substrato comercial Tropstrato® HA. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura (24 °C) e umidade (70%) controladas.

### 3.3.1 Preparo e inoculação dos isolados de *P. griseola*

Os isolados de *P. griseola* foram cultivados em BOD por um período de 7 a 10 dias de acordo com a metodologia descrita no item 3.2. Subsequentemente, foram adicionados aproximadamente 5-10 mL de água tratada com DEPC, previamente esterilizada, em cada tubo. A raspagem da superfície da cultura foi realizada para promover a liberação dos conídios. A suspensão de conídios foi obtida por meio de filtragem, utilizando uma camada de gaze, com o intuito de remover os fragmentos miceliais. Posteriormente, procedeu-se à contagem de conídios em uma câmara de Neubauer, e as soluções de inóculo foram padronizadas para uma concentração de  $2 \times 10^4$  conídios/mL, conforme descrito por Pereira et al. (2011).

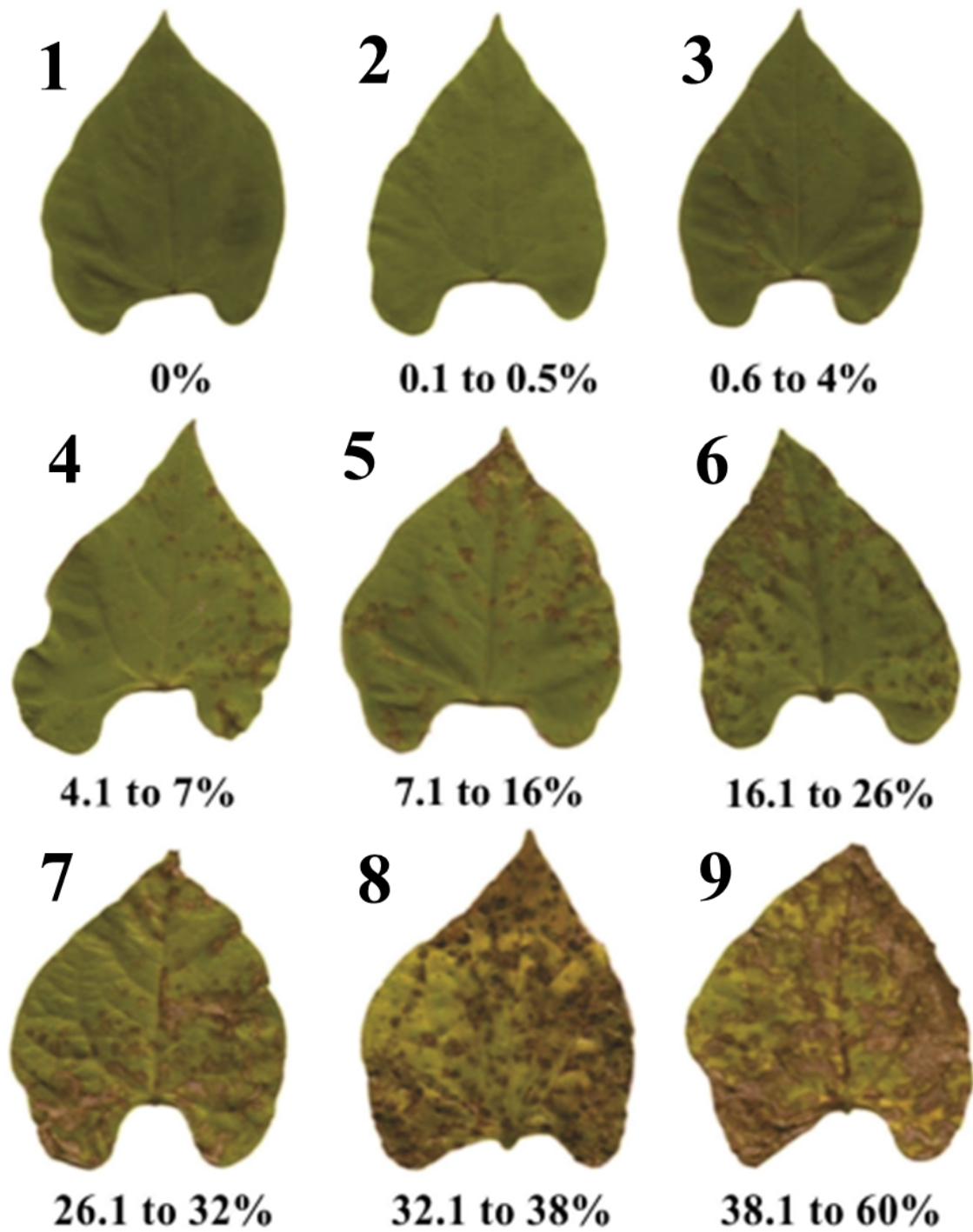
As plantas no estágio V2, folhas primárias completamente expandidas, foram inoculadas com os diferentes isolados do patógeno pulverizando com pulverizador manual as soluções de inóculo em ambas as faces das folhas até o ponto de escorrimento.

### 3.3.2 Avaliação da severidade da mancha angular

Após 15 dias da inoculação, as plantas das parcelas foram avaliadas para sua reação à *P. griseola* de acordo com a escala diagramática com notas de 1 a 9 proposta por Librelon et al. (2015): nota 1 - plantas sem sintomas da doença; nota 2 - presença de até 2% de lesões foliares; nota 3 - presença de até 4% de lesões foliares; nota 4 - presença de lesões tardias, cobrindo 7% da área foliar; nota 5 - presença de várias lesões foliares cobrindo 7,1-16% da área foliar; nota 6 - lesões cobrindo entre 16,1 e 26% da área foliar; nota 7 - lesões cobrindo entre 26,1 – 32% da área foliar; nota 8 - lesões cobrindo 32,1 - 38% da área foliar; e nota 9 - sintomas graves da doença com lesões cobrindo 38,1 - 60% da área foliar (Figura 1).

Figura 1 - Escala diagramática para a severidade da mancha angular no estágio de folhas

primárias (V2) de feijão comum.



Fonte: Librelon et al. (2015).

### 3.4 Análise de micovírus nos isolados de *P. griseola*

#### 3.4.1 Obtenção da massa micelial

Foram obtidas colônias monospóricas dos 29 isolados. Os isolados foram submetidos a cultivo de acordo com a metodologia descrita no item 3.2 por um período de 15 dias (Pádua et al., 2017). Subsequentemente, foram acrescentados 5 mL de água ultra purificada, seguido por raspagem utilizando uma alça estéril para promover a liberação da massa micelial do substrato de cultura. A solução resultante, contendo micélio e conídios, foi então transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio líquido GPYECH (composto por glicose 20 g, bactopectona 5 g, extrato de levedura 1 g e 1 g de caseína hidrolisada/L) conforme descrito por Ansari et al. (2004). Estes frascos foram mantidos em uma incubadora tipo "Shaker" a 120 rpm, a uma temperatura de 24 °C, por um período de 7 dias. Após a obtenção da massa micelial, procedeu-se à remoção da umidade residual através de filtração com o auxílio de uma bomba a vácuo. O micélio desidratado foi então acondicionado em tubos de 2 mL e armazenado a uma temperatura de -80 °C até o momento da extração de RNA.

#### 3.4.2 Extração do RNA total

A extração do RNA total foi conduzida conforme o protocolo empregando o reagente Trizol (TRIzol®) (Hummon et al., 2007). Um tubo de 2 mL contendo o micélio desidratado foi transferido para um almofariz e pistilo, onde a maceração manual foi realizada empregando nitrogênio líquido. Subsequentemente, 5 mL de tampão de Trizol foram adicionados para promover a quebra da parede celular. O extrato resultante foi transferido para um tubo de 2 mL e incubado a 60 °C por 5 minutos, seguido por uma agitação em vortex por 15 segundos e centrifugação a 12.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 300 µL de clorofórmio. Após agitação vigorosa por 15 segundos, a mistura foi deixada em repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação a 10.000 rpm a 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo, contendo um ¼ do volume de isopropanol gelado, ¼ de citrato de sódio (0,8M) com cloreto de sódio (1,2 M). A solução foi delicadamente misturada por inversão e mantida em repouso por 10 minutos, seguida por centrifugação a 10.000 rpm a 4 °C por 15 minutos para formação do pellet. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado com álcool a 75%, sendo novamente centrifugado a 10.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Posteriormente, o etanol foi descartado e o pellet foi secado ao ar livre. Após a completa secagem, 40 µL de água tratada

com DEPC foram adicionados e o material foi armazenado a -80 °C até o momento da extração do dsRNA.

### 3.4.3 Extração de dsRNA

Para a extração do dsRNA, o RNA total foi submetido ao tratamento com a enzima endonuclease S1 da Promega Biotecnologia. Aproximadamente 25 µL de RNA total foram transferidos para um novo tubo, ao qual foram adicionados 5 µL de tampão da enzima, 1 µL da própria enzima e 19 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), totalizando um volume final de 50 µL. Em seguida, foram acrescentados 50 µL de PCI (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1). A mistura resultante foi levemente agitada por inversão e centrifugada a 10.000 rpm por 7 minutos a 4 °C. Posteriormente, foram retirados 40 µL do sobrenadante e transferidos para um novo tubo contendo 100 µL de álcool absoluto e 4 µL de acetato de sódio (3 M). A incubação a -20 °C foi realizada por 12 horas para promover a precipitação do pellet, seguida por centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O pellet resultante foi ressuspensão suavemente por pipetagem utilizando 10 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Posteriormente, os tubos foram armazenados a -80 °C até o momento da identificação da presença de dsRNA.

### 3.4.4 Identificação da presença de dsRNA

Os dsRNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,7%, corados com Brometo de Etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Para a preparação do gel, foram adicionados 2,5 µL de dsRNA com 1,5 µL de corante, sendo a corrida realizada por 40 minutos a 90 volts. Os fragmentos gerados foram posteriormente analisados, utilizando como referência o marcador de tamanho 1 kb.

### 3.4.5 Microscopia eletrônica de transmissão

A identificação de partículas virais foi realizada conforme metodologia descrita por Lima et al. (2010). Dois isolados foram selecionados, 9 e 24, para a realização desta análise. Alíquotas de frações obtidas foram transferidas para grades (carbono-Formvar 200 mesh), deixadas por cerca de 5 min, lavadas com água destilada e tratados com acetato de uranila 1% para contraste negativo para visualizar partículas de micovírus. Posteriormente, foram examinadas sob microscopia eletrônica de transmissão (Lima et al., 2010).

### **3.5 Análise de limpeza viral dos isolados de *P. griseola***

#### **3.5.1 Obtenção de isolados isogênicos**

Após a identificação dos isolados que apresentaram fragmentos de dsRNA, foram selecionados os isolados 9, 23, 24 e 25. A partir de micromanipulação com o auxílio de uma agulha de vidro acoplada microscópio de luz, foi obtido um único conídio de cada isolado, que foram transferidos para placas de Petri esterilizadas contendo meio BDA com 300 µL de antibiótico (cloranfenicol) e 20 µg/mL de cicloheximida e incubadas por 25 dias a 24 °C no escuro (Lima et al. 2010; Ke; Su; Lei, 2013). Posteriormente, foram realizados os procedimentos descritos no tópico 3.4, para analisar a ausência de dsRNA.

#### **3.5.2 Efeito de dsRNA em *P. griseola***

Após a obtenção dos isolados isogênicos, eles foram avaliados quanto à morfologia da colônia, capacidade de esporulação e virulência dos isolados na presença e ausência de dsRNA (submetidos à cicloheximida):

- a) Morfologia da colônia - uma alíquota de 1 mL de suspensão de conídios foi adicionada três placas com meio BDA por isolados, e incubada por 15 dias a 24 °C em no escuro. Após o crescimento, foram avaliadas a morfologia da colônia (cor e textura).
- b) Capacidade de esporulação - um experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso (DIC) no esquema fatorial duplo com quatro repetições, com parcelas constituídas de uma placa tubos de ensaios com os isolados isogênicos obtidos e analisados conforme o item 3.2.
- c) Virulência dos isolados - Foram conduzidos dois experimentos, sendo um para os isolados sem a cura e o outro com os isolados isogênicos (com a cura) no delineamento em blocos casualizados (DBC) no esquema fatorial 3x4, sendo três cultivares/linhagem de feijoeiro e quatro isolados de *P. griseola*, com três repetições e parcelas constituídas de 8 plantas. Os genótipos de feijoeiro e os procedimentos para a avaliação da severidade da mancha angular do teste de virulência foram realizados de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.

### **3.9 Análises dos dados**

Os dados obtidos para os caracteres avaliados foram submetidos à análise de variância individual e conjunta e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Scott-Knott e Tukey a 5% de probabilidade utilizando os softwares Genes e o R (Cruz, 2016; Mendiburu, 2021).

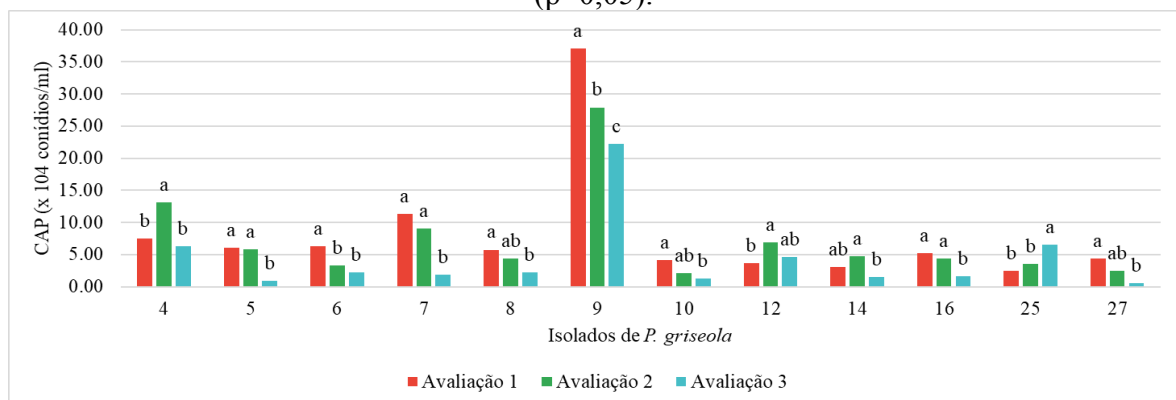
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da capacidade de esporulação

As fontes de variação, isolados (I), época (E) e a interação I x E foram significativas ( $P < 0,01$ ). A presença de interação I x E indica que a esporulação dos isolados não foi coincidente nas diferentes épocas de avaliação (Tabela 1A). A partir da decomposição da interação, verifica-se que para 58,63% dos isolados não apresentaram diferenças na esporulação nas épocas avaliadas. A estimativa do coeficiente de variação experimental foi de 30,2% para a característica em estudo (Tabela 1A). Os 29 isolados de *P. griseola* exibiram uma grande diversidade de esporulação. Considerando todas as 3 épocas, as variações médias dos isolados foi de 0,58 a  $37,08 \times 10^4$  conídios/mL, sendo o isolado 9 o que apresentou maior número de conídios/mL e o isolado 28 o que apresentou menor número de conídios/mL em todas épocas de avaliação (Tabela 2A).

Entre os isolados, cerca de 17,24% apresentaram esporulação precoce, 20,68% apresentaram maior esporulação com oito dias, e somente o isolado 25 apresentou esporulação tardia (Figura 2). Os demais isolados não apresentaram diferenças significativas para este caráter.

Figura 2 – Capacidade de esporulação ( $\times 10^4$  conídios/mL) de isolados de *P. griseola* avaliada com 6, 8 e 11 dias de crescimento da cultura (3 avaliações). Para cada avaliação, as letras idênticas posicionadas em cima da barra indicam que as médias são iguais pelo teste de Tukey ( $p=0,05$ ).



Fonte: Do autor (2024).

## 4.2 Avaliação da virulência dos isolados

As fontes de variação, Isolados (I), Cultivares/linhagens (C) e a interação entre I x C foram significativas ( $P < 0,01$ ). A presença de interação I x C indica que a reação das cultivares/linhagens de feijão comum não foi coincidente nos isolados de *P. griseola* inoculados (Tabela 3A). A partir da decomposição da interação, observou-se que as cultivares possuem diferentes níveis de resistência quando inoculadas com os isolados e estes, apresentam diferentes níveis de virulência.

A estimativa do coeficiente de variação experimental foi de 18,39 % para a característica em estudo (Tabela 3A). Os 29 isolados de *P. griseola* apresentaram variabilidade para a virulência variando a nota de severidade de 2,0 a 4,3 quando inoculados na cultivar BRS horizonte, 2,0 a 5,7 para a cultivar Rosinha e 1,0 a 3,7 para a linhagem MAIII-16157 (Tabela 4A).

Os isolados 6, 12 e 16 foram os mais virulentos (Tabela 4A). As cultivares BRS, Rosinha apresentaram reação de suscetibilidade a 27,58% dos isolados de *P. griseola* avaliados, respectivamente. No entanto, a linhagem MAIII-16159 foi resistente a todos os isolados, exceto ao 22.

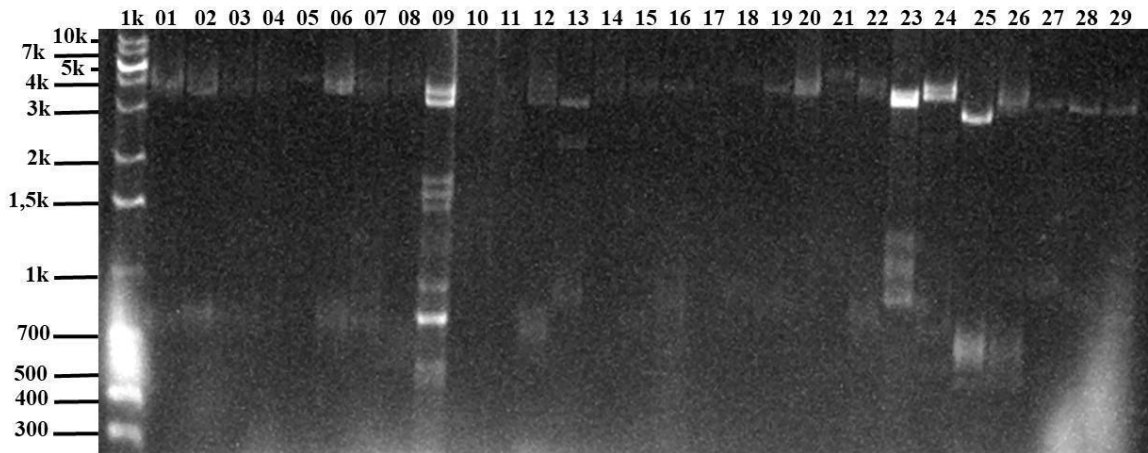
Na análise de agrupamento de médias das notas de severidade da mancha angular pelo teste Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), foram formados três grupos para a cultivar BRS horizonte, quatro grupos para a Rosinha e dois grupos para a linhagem MAIII-16159 (Tabela 4A).

## 4.3 Análise de dsRNA nos isolados de *P. griseola*

Os fragmentos de dsRNA foram identificados em 68,96% dos isolados de *P. griseola* analisados, abrangendo uma diversidade de tamanhos, sendo que o número de bandas observadas variou de 0 a 10 (Figura 3). Entre os isolados armazenados na micoteca, constatou-se que 55,6% exibiram a presença de dsRNA. Em contrapartida, dos isolados recém-coletados no campo, 80,0% apresentaram dsRNA.

Os dsRNA apresentaram pesos moleculares estimados variando de 0,4 a 4,0 kb, sendo os isolados 9, 13, 23, 24 e 25 foram os que apresentaram maior número de bandas, e os isolados 3, 4, 7, 8, 10, 11, 17, 15 e 17 não apresentaram presença de dsRNA (Figura 3).

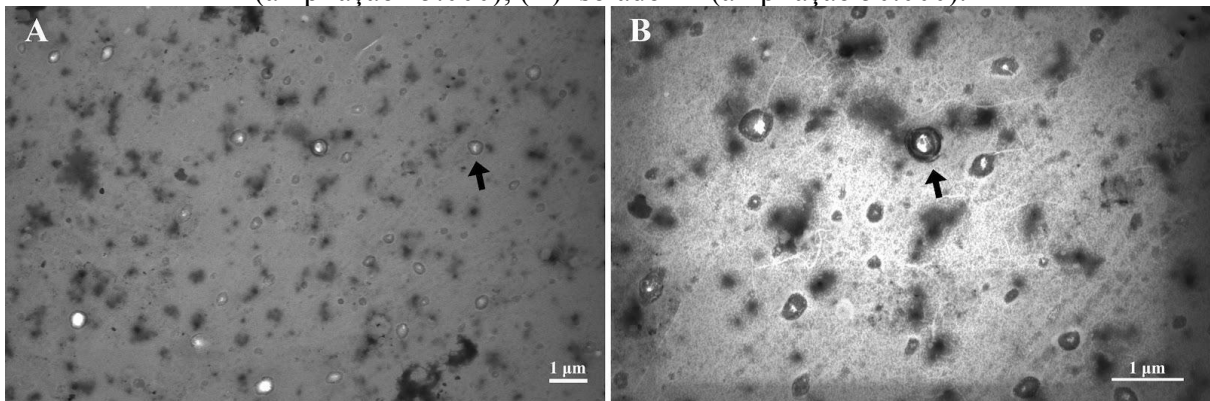
Figura 3 – Perfil de bandas de dsRNA de 29 isolados de *P. griseola*. 1k: 1 kb marcador molecular.



Fonte: Do autor (2024).

A ocorrência de dsRNA nos isolados de *P. griseola* sugere uma infecção por micovírus. Para a confirmação da presença de micovírus de dsRNA, dois isolados foram selecionados (9 e 24) e submetidos à análise por microscopia eletrônica de transmissão (MEV), revelando a presença de partículas virais isométricas (Figura 4).

Figura 4 - Partículas virais presentes em isolados de *P. griseola*, portadores de fragmentos de dsRNA, analisadas em microscópio de eletrônico de transmissão (MEV). (A) isolado 9 (ampliação 25.000); (B) isolado 24 (ampliação 50.000).



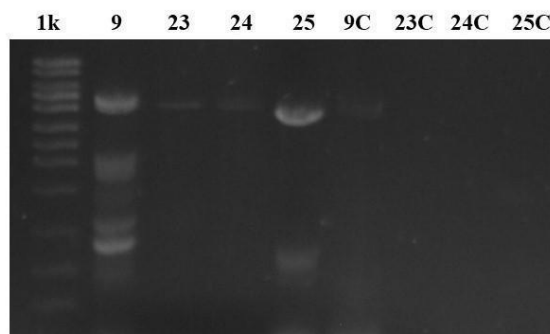
Fonte: Do autor (2024).

#### 4.4 Obtenção de isolados isogênicos

Para avaliar os efeitos do dsRNA em *P. griseola*, foram obtidos isolados isogênicos dos isolados 9, 23, 24 e 25, isentos de vírus por meio do isolamento de um único conídio cultivado em meio com cicloheximida que foram denominados 9C, 23C, 24C e 25C. Na análise dos isolados isogênicos, ou seja, após a cura dos isolados, nenhum segmento de dsRNA foi encontrado nos isolados 23C, 24C e 25C (Figura 5). No entanto, o isolado 9C

revelou uma redução significativa no número de fragmentos de dsRNA, indicando uma alteração notável em sua composição molecular. Portanto, a cura foi parcial neste isolado (Figura 5).

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose de isolados de *P. griseola* após tratamento com cicloheximida para identificação da presença e ausência dsRNA. 1k - 1 kb DNA Ladder da Promega. 9, 23, 24 e 25 - isolados sem o tratamento; 9C, 23C, 24C e 25C isolados isogênicos com tratamento para eliminação dos dsRNA.



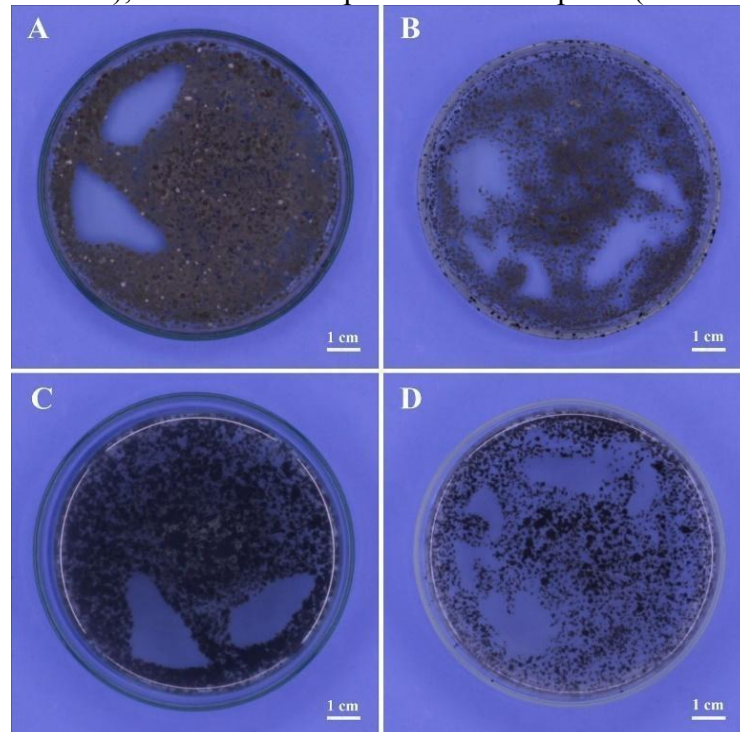
Fonte: Do autor (2024).

## 4.5 Efeito do dsRNA em isolados de *P. griseola*

### 4.5.1 Morfologia da colônia

Na comparação entre os isolados 9, 23, 24 e 25 e seus respectivos isolados isogênicos observou-se que a coloração das colônias foi similar (Figura 6). No entanto, foi observada diferença na textura das colônias, sendo que os isolados isogênicos apresentaram colônias com menor densidade micelial em relação aos seus respectivos isolados selvagens (Figura 6).

Figura 6 - Morfologia da colônia do isolado 25 selvagens e seu isogênico (25C; tratado com cicloheximida) de *P. griseola*. A: Isolado 25, parte superior da placa (Presença de micovírus), B: Isolado 25C parte superior (ausência de micovírus); C: Isolado 25, parte inferior da placa (Presença de micovírus); D: Isolado 25C parte inferior da placa (ausência de micovírus).

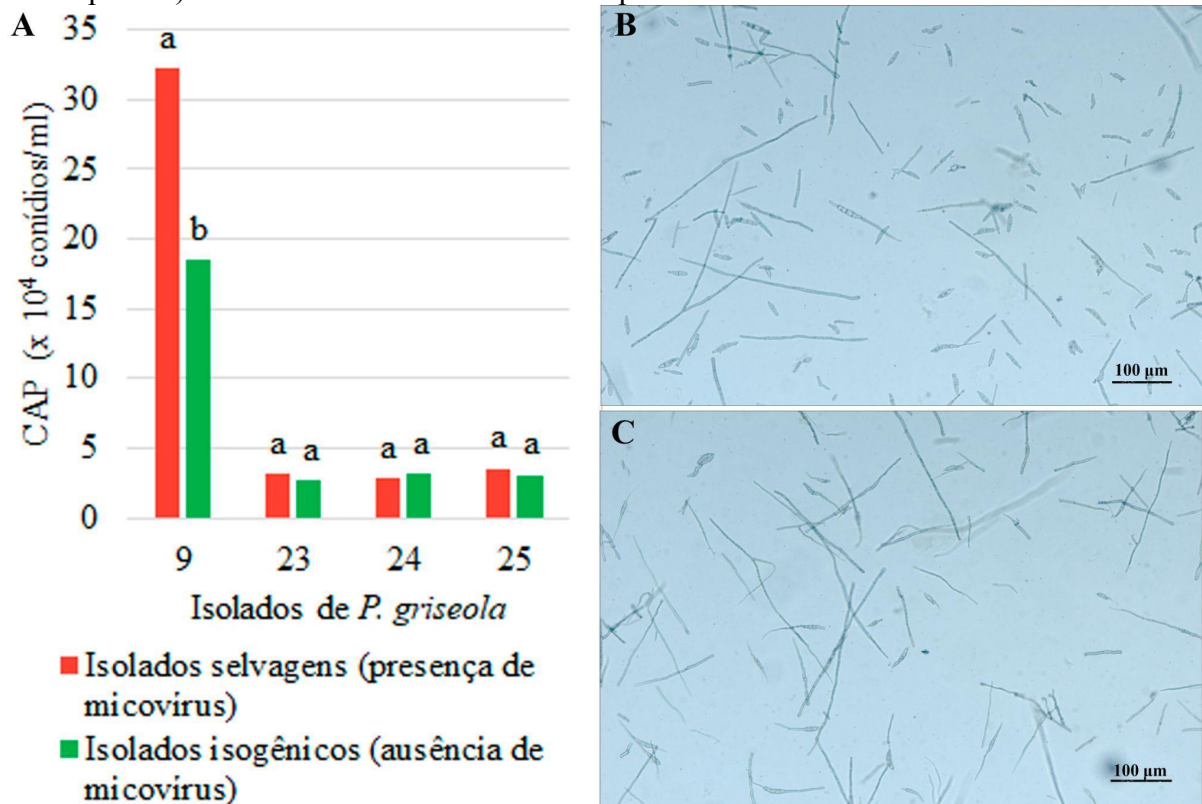


Fonte: Do autor (2024).

#### 4.5.2 Efeito do dsRNA na capacidade de esporulação dos isolados

No resumo da análise de variância para a capacidade de esporulação dos isolados selvagem e isogênicos avaliados, todas as fontes de variação foram significativas (Tabela 5 A). Na decomposição da interação isolados x micovírus, apenas o isolado 9 apresentou diferença significativa para a esporulação, com média de  $32,25 \times 10^4$  e  $18,5 \times 10^4$  conídios/mL na presença e ausência de micovírus respectivamente (Figura 7).

Figura 7 – Efeito dsRNA na capacidade de esporulação dos isolados selvagens e isogênicos 9, 23, 24 e 25 de *P. griseola*, A: Esporulação média (conídios/mL) dos isolados selvagens e isogênicos. B: Conídios do Isolado 9 (sem cura); C: Conídios do Isolado isogênicos 9C (cura parcial). Ambos observados em microscopia eletrônica de luz no aumento 10X.



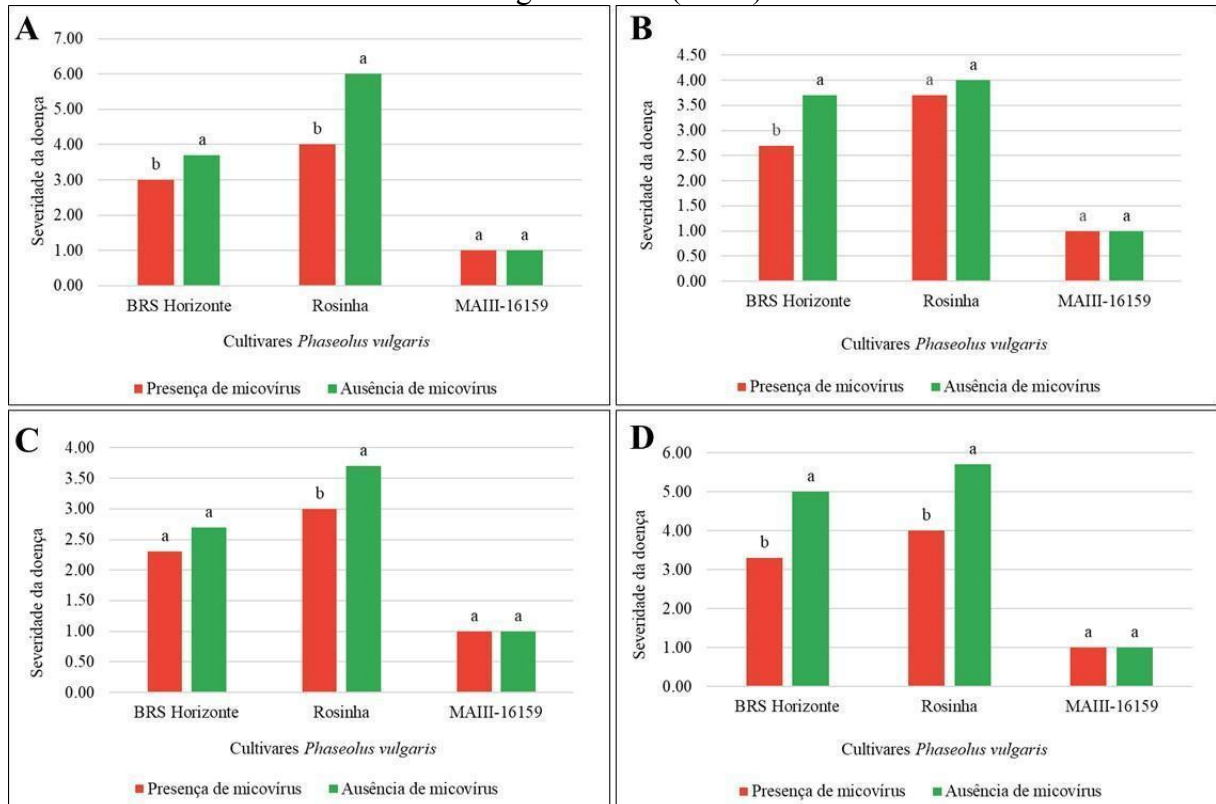
Fonte: Do autor (2024).

Na presença de maior número de dsRNA, a capacidade de esporulação aumentou cerca de  $13,7 \times 10^4$  conídios/mL (Figura 7A). A observação desta evidência é claramente observada nas imagens da microscopia eletrônica de luz, as quais revelaram uma redução no número de conídios do isolado isogênico 9C submetido ao tratamento com cicloheximida, como ilustrado nas Figuras 7B e 7C.

#### 4.5.3 Efeito do dsRNA na virulência dos isolados

Na Tabela 6A observa-se que todas as fontes de variação foram significativas ( $P < 0,01$ ) para as notas de severidade da mancha angular. A presença de interação significativa entre micovírus x isolados x cultivares indica que os isolados apresentaram virulência não coincidente nas diferentes cultivares/linhagens na presença e na ausência de micovírus. A partir da decomposição da interação, foi observado que os isolados apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na média das notas de severidade das plantas quando inoculadas com isolados com e sem micovírus (Tabela 6 A), essas diferenças foram observadas em pelo menos uma das cultivares suscetíveis (Figura 8).

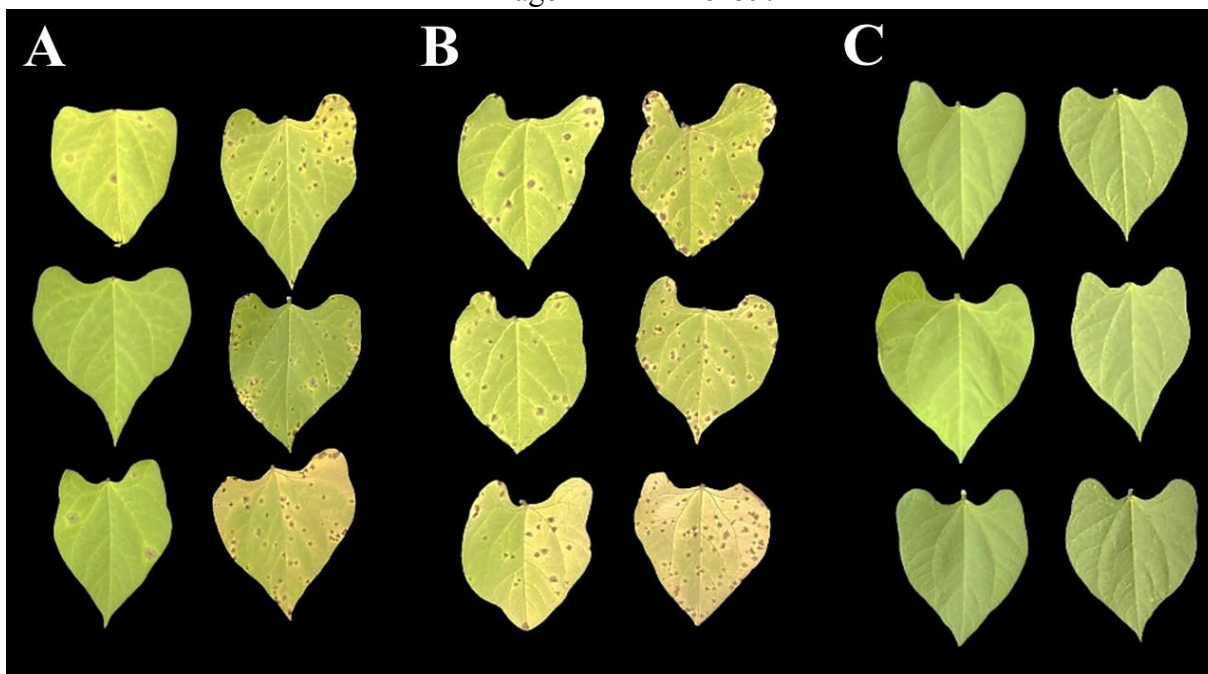
Figura 8 - Médias das notas de severidade da mancha angular nas diferentes cultivares/linhagem de feijoeiro inoculadas com isolados selvagens e isogênicos de *P. griseola*. A: Isolado 9; B: Isolado selvagem 23 (vermelho) e isogênico 23C (verde); C: Isolado selvagem 24 (vermelho) e isogênico 24C (verde); D: Isolado selvagem 25 (vermelho) e isogênico 25C (verde).



Fonte: Do autor (2024).

Para a cultivar BRS Horizonte as notas de severidade da mancha angular foram superiores na ausência do micovírus para todos os isolados, exceto para o isolado 24. Comportamento semelhante ocorreu na cultivar Rosinha, no entanto, neste caso apenas para o isolado 23 não houve diferença nas notas de severidade da doença na presença ou na ausência dos micovírus. Para a linhagem MAIII.16159 não foi observada diferença significativa na presença ou ausência de micovírus dos isolados avaliados (Figura 9).

Figura 9 - Reação da severidade da doença da mancha angular em três cultivares/linhagem do feijoeiro, inoculadas com os isolados selvagens 25 primeira coluna (presença de micovírus) e isogênico 25C segunda coluna. A: Cultivar BRS Horizonte; B: Cultivar Rosinha; C: Linhagem MAIII-16159.



Fonte: Do autor (2024).

## 5 DISCUSSÃO

A presença de variabilidade genética entre os isolados de *P. griseola* avaliados corrobora com a informação relatada na literatura para este patógeno (Librelon et al., 2022). Além disso, os isolados variaram em relação ao número de dias para a esporulação (Tabela 1 A). Esta informação é importante, pois na utilização de um determinado isolado deve-se observar o número de dias que proporcionará a produção máxima de esporos, pois este patógeno germina em poucas horas (Liebenberg; Pretorius, 1997) e dependendo da época de coleta dos conídios, pode-se observar apenas hifas. De acordo com o protocolo utilizado, recomenda-se que os esporos sejam obtidos no oitavo dia da colônia (Pereira; Abreu; Souza, 2011). De acordo com os resultados, 17,24 %, 20,68% e 3,44% apresentaram máxima esporulação aos 6, 8 e 11 dias, sendo que os demais não apresentaram variação entre os dias (Figura 2).

O isolado 9 (raça 63.63) apresentou maior quantidade de conídios em comparação com os demais, com um maior potencial para o desenvolvimento de colônias, uma vez que os esporos representam as estruturas responsáveis pela penetração nos tecidos das plantas (Scortegagna et al., 2022). Este isolado tem sido utilizado em vários trabalhos utilizando

inoculação artificial do patógeno no feijoeiro (Pereira et al. 2015, Pereira et al. 2019; Librelon et al. 2021, Pádua et al., 2021).

A capacidade de esporulação interfere na propagação do patógeno, sendo proporcional ao número de conídios, dessa forma essa característica influencia diretamente na sua disseminação. Especificamente em *P. griseola*, os conídios são predominantemente disseminados por meio do vento e da água, facilitando a distribuição patógeno em lavouras de feijoeiro (Crous et al., 2006; Singh; Schwartz, 2010). A identificação da melhor época de esporulação de cada isolado permitiu a realização do teste de virulência. Verificou-se variabilidade na virulência dos isolados de *P. griseola* avaliados, o que tem sido constatado em outras oportunidades (Damasceno-Silva et al., 2008; Balbi et al., 2009; Librelon et al. 2022). A estimativa do coeficiente de variação experimental (CV) observado no presente trabalho foi de magnitude semelhante ao relatado por Pádua et al. (2021).

No presente estudo, os isolados 6 (armazenado), 12 e 16 (frescos) se destacaram como os mais virulentos apresentando notas médias da severidade da doença nas cultivares suscetíveis Rosinha e BRS Horizonte. Portanto, estes isolados podem ser recomendados para futuros trabalhos com inoculação artificial do patógeno para a obtenção de linhagens resistentes à mancha angular.

Houve diferença significativa para a severidade da mancha angular entre as cultivares/linhagem, sendo as cultivares Rosinha e BRS horizonte suscetíveis à mancha angular para a maioria dos isolados avaliados, estas cultivares são consideradas altamente suscetíveis (Pria; Amorim; Bergamin Filho, 2003; Sousa; Gonçalves; Wendland, 2015). A linhagem MAIII - 16159, proveniente do programa de seleção recorrente visando à resistência à mancha angular da UFLA/Embrapa, foi resistente para todos os isolados, exceto para o isolado 22. Este isolado também foi virulento nas cultivares suscetíveis Rosinha e BRS Horizonte (Tabela 4A).

A presença de micoviroses tem sido relatada para vários fungos (Picarelli et al., 2017 Khan; Baig; Bhatti, 2023) e também, em *P. griseola*. (Lima et al. 2010). A partir da análise da presença de dsRNA nos isolados de *P. griseola* avaliados no presente trabalho, observa-se que o tamanho das bandas variou de 0,4 a 4,0 KB, valores estes semelhantes aos relatados por Lima et al. (2010) que avaliou isolados armazenados. No entanto, neste estudo, foram utilizados isolados armazenados entre os anos de 2013 e 2017, bem como isolados coletados em 2023. Isso evidencia que a infecção por micoviroses origina-se no campo. Além disso, nos isolados armazenados ao longo dos anos, os vírus mantêm-se no hospedeiro, o que pode ser comprovado nos cultivos realizados a partir desses isolados armazenados.

Os isolados que exibiram um maior número de fragmentos de dsRNA podem ter adquirido esses fragmentos através de anastomose de hifas, como observado por Damasceno-Silva et al. (2015). Por outro lado, os isolados que não apresentaram presença de dsRNA provavelmente têm uma menor probabilidade de realizar essa anastomose de hifas. A ausência de compatibilidade pode representar um mecanismo de autodefesa do fungo (Glass; Jacobson; Shiu, 2000).

A variação do número de bandas observadas na Figura 3, também, foi semelhante à reportada por Lima et al. (2010). As famílias de micovírus de dsRNA podem ser classificadas quanto ao seu peso molecular, como descrito por King et al. (2011). De acordo com esta classificação e os segmentos de dsRNA identificados no perfil de bandas (Figura 3), há evidências de micovírus da família Totiviridae (1 segmento, 4-7 kb) 45% dos isolados, Partitiviridae 10% dos isolados (2 segmentos, 1,4-2,4 kb) e Chrysoviridae (4 segmentos, 2,9-3,6 kb) em 60% dos isolados. Estas famílias são as que têm maior similaridade com os resultados obtidos.

O isolado 9, classificado como raça 63.63, apresentou um perfil de bandas diferenciado dos demais isolados (Figura 3), com 10 bandas com peso molecular variando de 0,4 a 4,0 kb. Este isolado, como já mencionado, é altamente virulento (Pereira et al., 2015), e de acordo com o perfil de bandas seriam observados micovírus das famílias Partitiviridae e Chrysoviridae. No entanto, para uma avaliação mais criteriosa e precisa é necessário realizar o sequenciamento do genoma destes micovírus, permitindo uma análise mais detalhada e conclusiva.

A detecção consistente de um padrão de múltiplas bandas de RNA de fita dupla (dsRNA) nos isolados de *P. griseola* sugere a possibilidade de uma infecção mista por micovírus, indicando a presença de mais de um micovírus em um mesmo isolado, observados pela a variação molecular das bandas. Este fenômeno tem sido relatado na literatura em diferentes espécies de fungos (Refos et al., 2013; Chun; Kim, 2021). A existência desses vários fragmentos de dsRNA nos isolados *P. griseola* pode ser atribuída à presença de RNA satélite e/ou de RNA defeituoso. Assim, para uma caracterização molecular mais abrangente desses dsRNAs, é necessário conduzir estudos que abordem a diversidade genética que incluam o sequenciamento completo do genoma (Dawe; Nuss, 2001; Lima et al., 2010; Liang et al., 2022).

A observação de partículas virais isométricas (Figura 4), é consistente com as características de micovírus quando comparadas com as obtidas por Rosseto et al. (2016), Chun, Na e Kim (2020) e Kartali et al. (2022), reforçando a presença de micovírus nos

isolados de *P. griseola*. Evidências morfológicas da infecção viral neste fungo também foram descritas por Lima et al. (2010) fornecendo suporte adicional da presença de micovírus.

Micovírus com infecções persistentes da família Partitiviridae, caracterizados por um peso molecular de 1,4 a 2,4 kb, são difíceis de erradicar usando métodos de cura (King et al., 2011; Khan; Baig; Bhatti, 2023). No entanto, os resultados deste estudo revelaram que isolados contendo fragmentos com tamanho inferior a 2,5 kb foram eliminados com sucesso. Entretanto os fragmentos de tamanho superior a 3,0 kb mostraram-se resistentes ao tratamento, permanecendo intactos, como pode ser observado no perfil de bandas do isolado 9C (Figura 5). Para este isolado o tratamento com cicloheximida proporcionou a cura parcial, com eliminação dos fragmentos de dsRNA de peso molecular inferior a 3,0 kb.

Lima et al. (2010) obtiveram sucesso parcial ao utilizar cicloheximida na busca de obtenção de isolados isogênicos, demonstrando sua capacidade de eliminar fragmentos pequenos de dsRNA. No entanto, o tratamento empregado revelou-se ineficaz na eliminação dos fragmentos maiores que 4,8 kb em isolados de *P. griseola*. Por outro lado, Robinson e Deacon (2002) adotaram uma abordagem semelhante ao empregar cicloheximida na obtenção de isolados isogênicos em *Rhizoctonia solani*. Seus resultados indicaram sucesso parcial na cura, sugerindo eficácia na eliminação de fragmentos menores de dsRNA, porém não afetou os fragmentos maiores de 10 e 12 kb.

A cicloheximida é um antibiótico que atua como inibidor da síntese proteica em eucariotos. Este antibiótico tem sido utilizado como inibidor da síntese do RNA viral em fungos patogênicos, impedindo tanto a replicação como a tradução do genoma viral (Robinson; Deacon, 2002; Schneider-Poetsch et al., 2010). No entanto, com base nos resultados aqui relatados, a utilização da cicloheximida é eficiente na eliminação de dsRNA de baixo peso molecular, sendo assim recomendada para a obtenção de isolados isogênicos que apresentarem RNA viral de menor peso molecular.

A utilização de outros medicamentos, como 5'-Fluorouracil, ribavirina, desoxicolato de sódio, estreptomicina e canamicina podem ser mais eficazes na obtenção de isolados isogênicos de *P. griseola* em comparação com o uso de cicloheximida, com capacidade abrangente de eliminar diversos fragmentos de dsRNA, independentemente do tamanho (Figueirêdo et al., 2010; Khan; Baig; Bhatti, 2023). Outras estratégias podem ser utilizadas no tratamento de dsRNA em *P. griseola*, tais como a exposição à luz ultravioleta (UV), termoterapia (tratamento com calor ou frio), estresse mediado por polietilenoglicol, fragmentação micélica, regeneração de protoplastos, ponta das hifas e isolamento de esporo único (Khan; Baig; Bhatti, 2023).

A presença de micovírus em fungos patogênicos pode exercer uma influência significativa na morfologia dos isolados. Moriyama et al. (2018) identificaram micovírus capazes de reduzir o crescimento, alterar a morfologia das colônias reduzindo a pigmentação para cor branca. Em contra partida, Zhang et al. (2020) observaram diferenças fenotípicas que se manifestaram na presença de micovírus como, crescimento micelial e aumento da pigmentação. No entanto, no presente trabalho não foram identificadas diferenças em relação à pigmentação da colônia dos isolados (Figura 6).

Entretanto, os isolados selvagens de *P. griseola* (com presença de dsRNA) apresentaram maior densidade micelial quando comparados com os respectivos isolados isogênicos (Figura 6), principalmente aqueles que possuem peso molecular similar aos membros da família Partitiviridae. Os micovírus pertencentes a essa família são geralmente considerados como portadores de infecções que podem causar efeito anormal no crescimento da colônia (Jiang et al., 2019), tais como, crescimento lento e margem de colônia irregular (Sasaki et al. 2006), presença de anéis de hifas e redução de pigmentos (Jia et al., 2017). Estas características podem beneficiar a sobrevivência do vírus em seus hospedeiros (Jia et al., 2017).

Este patógeno pode realizar anastomose de hifas em até 85% dos isolados, conforme relatado por Damasceno-Silva et al. (2015). No entanto, alguns isolados não apresentaram compatibilidade micelial, o que impede a fusão das hifas e conseqüentemente a troca de informação genética entre eles. Nesse contexto, o aumento da densidade micelial pode ser considerado uma estratégia adotada pelo vírus para incrementar as chances de transmissão horizontal desse patógeno através da anastomose de hifas.

A presença de dsRNA associado a fitopatógenos, modificando a capacidade de esporulação em seus hospedeiros tem sido relatada na literatura (Picarelli et al., 2017; Liang et al., 2022). No presente trabalho, o isolado 9C que foi parcialmente curado, ou seja, o tratamento ciclohexamida eliminou o dsRNA de baixo peso molecular, revelou uma redução significativa no número de conídios/ml, reduzindo cerca 42% na quantidade de esporos em relação ao isolado selvagem (Figura 7).

A dispersão dos conídios de *P. griseola* é predominantemente pelo vento (Crous et al., 2006). Portanto, quanto maior a quantidade de esporos maior será a capacidade de disseminação do patógeno, aumentando o risco de infecção e do desenvolvimento da mancha angular no feijoeiro. Os resultados obtidos evidenciam que a presença do micovírus pode favorecer a esporulação. Uma provável explicação é que na presença dos micovírus as

colônias de *P. griseola* são mais densas, isso pode favorecer a maior produção de esporos de acordo com o isolado, como pode observado na Figura 6.

Os isolados isogênicos que foram coletados recentemente (23, 24 e 25), apresentaram diferenças na densidade das colônias (Figura 6). No entanto, não houve diferença significativa na capacidade de esporulação dos isolados entre os isolados selvagens e seus isogênicos. Estes isolados quando caracterizados apresentaram menor número de conídios/ml (Tabela 2A) independente da cura e não houve alteração significativa na produção de esporos (Figura 7).

Houve diferença significativa na média das notas de severidade à mancha angular do feijoeiro na presença e ausência de dsRNA (Tabela 6A). Portanto, na média dos isolados, na presença de micovírus a severidade da doença foi reduzida (Figura 8), indicando que estes micovírus tem um efeito de hipovirulência.

A hipovirulência devido à presença dsRNA em fitopatógenos tem sido relatada na literatura (Yu et al., 2010; Gupta et al., 2019; Zhou et al., 2021). No entanto, em *P. griseola*, agente causal da mancha angular do feijoeiro, este é o primeiro relato de micovírus causando hipovirulência neste patógeno, fato este observado em 75% dos isolados avaliados. Para o isolado 9C a cura foi parcial. Portanto, há evidências que os fragmentos de dsRNA menores que 3,0 kb eliminados pelo tratamento com cicloheximida, são responsáveis pela redução na virulência observada para este isolado nas cultivares suscetíveis (Figura 8).

Os micovírus que causam efeito negativo, reduzindo a virulência em seus hospedeiros são de grande interesse para o controle biológico. Além de serem hipovirulentos, é necessário que os micovírus possuam uma alta taxa de transmissão vertical por meio de esporos e que não encontrem obstáculos nos mecanismos do hospedeiro para controlar a propagação e a infecção viral (Bocos-Asenjo et al., 2022).

Em isolados de *P. griseola*, Lima et al. (2010) observaram que a transmissão vertical dos dsRNA ocorre de forma consistente, sendo relatada em 100% dos isolados infectados por micovírus. No entanto, até o momento, não há relatos sobre o efeito do dsRNA em isolados de *P. griseola* quanto à sua infecciosidade em ensaios após a transmissão horizontal.

A compreensão destes relatos é importante, uma vez que compreender quantos desses dsRNA serão transmitidos para as gerações descendentes ou para isolados isogênicos, sendo importante para determinar se a hipovirulência persistirá, o que é de grande interesse para o controle biológico (Bocos-Asenjo et al., 2022). Alterações no ambiente e na fisiologia do fungo e a ocorrência de infecções mistas podem interferir na expressão de virulência e até mesmo na transmissão dos micovírus entre seus hospedeiros (Pearson et al., 2009).

## 6 CONCLUSÃO

Os isolados de *P. griseola* apresentaram variabilidade genética para a capacidade de esporulação e virulência. Dos isolados de *P. griseola* analisados, 69 % apresentaram dsRNA, sugerindo a presença de micovírus tanto para os isolados armazenados como nos isolados frescos, apresentando diversidade no número e tamanho de bandas observadas.

A aplicação de cicloheximida para a limpeza viral foi bem-sucedida em 75% dos isolados, resultando na eliminação dsRNA de baixo peso molecular.

Os isolados isogênicos não apresentaram diferenças na pigmentação da colônia, mas apresentaram menor densidade micelial que os isolados selvagens.

O isolado parcialmente curado 9C revelou uma redução significativa no número de conídios/ml em relação ao isolado selvagem.

Os dsRNA apresentaram efeito negativo para virulência dos isolados de *P. griseola*, sendo este o primeiro relato de hipovirulência neste patógeno.

## REFERÊNCIAS

- ABDOULAYE, A. H.; FODA, M. F.; KOTTA-LOIZOU, I. Viruses infecting the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. **Viruses**, v. 11, n. 12, p. 1113, 2019.
- ABREU, A. F. B. et al. Genetic progress after 18 cycles of recurrent selection for common bean angular leaf spot resistance in Brazil. **Annual Report of the Bean improvement Cooperative**, v. 66, p. 3 - 4, 2023.
- ADAMS, M. J.; KING, A. M. Q.; CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). **Archives of virology**, v. 158, n. 9, p. 2023-2030, 2013.
- ALMEIDA, Á. M. R. et al. Caracterização de isolados de oídio de soja, feijão, girassol e plantas daninhas no Brasil usando sequências de rDNA-ITS. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 20-26, 2008.
- AMARO, G. B. et al. Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L) with carioca-type grains for resistance to the fungi *Phaeoisariopsis griseola*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 584-588, 2007.
- ANSARI, K. I. et al. Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. **Plant pathology**, v. 53, n. 5, p. 635-642, 2004.
- AXTELL, M. J. et al.. Classification and comparison of small RNAs from plants. **Annu Rev Plant Biol**, v. 64, n. 1, p. 137-159, 2013.
- AYTENFSU, M.; TEREFE, H. A review of *Pseudocercospora griseola* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Africa. **CABI Reviews**, n. 2023, 2023.
- BALBI, B. P. et al. Characterization of *Pseudocercospora griseola* isolates collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 52, p. 56-57, 2009.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira**. 2012. p. 247. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/926285/1/seriedocumentos272>. Acesso em: 23 de dezembro. 2023.
- BARROS, A. P. O. de. **Deteção e caracterização molecular e biológica de vírus associados a fungos fitopatogênicos**. 2016. Tese (Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.
- BEEBE, S. et al. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. **Crop Science, Madison**, v. 41, n. 3, p. 854- 862, 2001.
- BIANCHINI, A. et. al. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et. al., . **Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 4. ed., 2005.

- BOCOS-ASENJO, I. T. et al. New insights on the integrated management of plant diseases by RNA strategies: Mycoviruses and RNA interference. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 16, p. 9236, 2022.
- BOLAND, G. J. Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of *Sclerotinia* species. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 26, n. 1, p. 6-18, 2004.v
- BROCK, R. D. Resistência à mancha angular em variedades de feijão. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**. v. 17 p. 25-30. 1951.
- CARNEIRO, S. M. T. P. G. ; ROMANO, E. B.; CASSIO, L. M. Avaliação De Bioterápicos Para O Controle De Doenças De Plantas. **Revista Ciência Agrícola**, v. 20, n. 1, p. 41- 48, 2022.
- CASAS, L. L. et al. Micoviroses em *Colletotrichum spp.*: uma revisão abrangente. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. 1 - 12, 2021.
- CELETTI, M. J.; MELZER, M. S.; BOLAND, G. J. Manejo integrado da mancha angular da folha (*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.) em feijão-vagem em Ontário. **Plant Health Progress**, v. 6, n. 1, p.2, 2005.
- CHIBA, S. et al. ICTV virus taxonomy profile: Quadrviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 11, p. 1480-1481, 2018.
- CHUN, J.; KIM, D. H. Coinfecção de um novo fusagravírus e um partitivírus em um isolado coreano de *Rosellinia necatrix* KACC40168. **Genes de Vírus**, v. 57, n. 1, p. 121-126, 2021.
- CHUN, J.; NA, B.; KIM, D.-H. Characterization of a novel dsRNA mycovirus of *Trichoderma atroviride* NFCF377 reveals a member of “Fusagraviridae” with changes in antifungal activity of the host fungus. **Journal of Microbiology**, v. 58, p. 1046-1053, 2020.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/905-feijao>. acesso em: 10 de dezembro. 2023.
- COTTET, L. et al. Molecular characterization of a new botybirnavirus that infects *Botrytis cinerea*. **Archives of virology**, v. 164, n. 5, p. 1479-1483, 2019.
- CROUS, P. W. et al. Re-evaluating the taxonomic status of *Phaeoisariopsis griseola*, the causal agent of angular leaf spot of bean. **Studies in Mycology**, v. 55, n. 1, p. 163-173, 2006.
- CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**. v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.
- DAMASCENO-SILVA, K. J. et al. Pathogenic variability of isolates of *Pseudocercospora griseola*, the cause of common bean angular leaf spot, and its implications for resistance breeding. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 10, p. 602-606, 2008.

DAMASCENO-SILVA, K. J. et al. Anastomosis groups and molecular variation in *Pseudocercospora griseola*. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 7436-7445, 2015.

DAWE, A. L.; NUSS, D. L. Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. **Annual review of genetics**, v. 35, n. 1, p. 1-29, 2001.

DEMANT, L. A. R.; MARINGONI, A. C. Controle da mancha angular do feijoeiro com uso de fungicidas e seu efeito na produção das plantas. **Idesia (Arica)**, v. 30, n. 2, p. 93-100, 2012.

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. 2023. Disponível em: [https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities\\_by\\_country](https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country). Acesso em: 10 de dezembro. 2023.

FIGUEIRÊDO, G. S. de et al. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1-9, 2010.

GHABRIAL, S. A. et al. Viruses of *Helminthosporium (cochliobolus) victoriae*. **Advances in virus research**, v. 86, p. 289-325, 2013.

GLASS, N. L.; JACOBSON, D. J.; SHIU, P. K. T. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. **Annual review of genetics**, v. 34, n. 1, p. 165-186, 2000.

GUO, J. et al. Hypovirulence caused by mycovirus in *Colletotrichum fructicola*. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1038781, 2022.

GUPTA, T. et al. Biology and mycovirus-assisted biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* infecting vegetable and oilseed crops. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 52, n. 13-14, p. 1049-1067, 2019.

HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, v. 227, n. 5264, p. 1268-1269, 1970.

HOLLINGS, M. Viruses associated with die back disease of cultivated mushroom. **Nature**, v. 196, p. 962-965, 1962.

HUMMON, A. B. et al. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. **Biotechniques**, v. 42, n. 4, p. 467-472, 2007.

HUANG, Y. et al. Molecular characterization of a novel non-segmented double-stranded RNA mycovirus isolated from *Penicillium citrinum* strain RCEF7060. **Archives of Virology**, v. 168, n. 1, p. 12, 2023.

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*. 2023 Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 15 de jan de 2023.

IKEDA, K. et al. Potentiation of mycovirus transmission by zinc compounds via attenuation of heterogenic incompatibility in *Rosellinia necatrix*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3684-3691, 2013.

JARA, C. et al. Virulence diversity of *Pseudocercospora griseola* and its implication for breeding Common bean for resistance to angular leaf spot. In: **International Center for Tropical Agriculture (CIAT)**. Cali, Colombia: poster 1 p, 2015.

JESUS JUNIOR, W. C. A. et al. Effects of Angular Leaf Spot and Rust on Yield Loss of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, v. 91, n. 9, p. 1045- 1053, 2001.

JIA, H. et al. A dsRNA virus with filamentous viral particles. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 168, 2017.

JIAN, J.; LAKSHMAN, D. K.; TAVANTZIS, S. M. A virulence-associated, 6.4-kb, double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani* is phylogenetically related to plant bromoviruses and electron transport enzymes. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 11, n. 7, p. 601-609, 1998.

JIĀNG, D. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Mymonaviridae 2022. **Journal of General Virology**, v. 103, n. 11, p. 001787, 2022.

JIANG, Y. et al. Molecular characterization of a debilitation-associated partitivirus infecting the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 626, 2019.

KARTALI, T. et al. Molecular Characterization of Novel Mycoviruses in Seven *Umbelopsis* Strains. **Viruses**, v. 14, n. 11, p. 2343, 2022.

KE, Z.; SU, Y-Y; LEI, C. An optimized protocol of single spore isolation for fungi. **BioOne Research Evolved**. v. 34, n. 4, p 349-356, 2013.

KHAN, H. A; BAIG, D. I.; BHATTI, M. F. An Overview of Mycoviral Curing Strategies Used in Evaluating Fungal Host Fitness. **Molecular Biotechnology**, p. 1-18, 2023.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, v. 2, 1997.

KING, A. M. Q. et al., Family - Narnaviridae, Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier**. p. 1055-1060. 2011.

KING, A. M. Q. et al. Virus taxonomy. **Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, v. 9, 2012.

KOTTA-LOIZOU, I. Micovirus: passado, presente e futuro. **Vírus** , v. 11, n. 4, p. 361, 2019.

KOTTA-LOIZOU, I. et al. ICTV virus taxonomy profile: Chrysoviridae. **The Journal of general virology**, v. 101, n. 2, p. 143, 2020.

- LEMUS-MINOR, C.33 G. et al. Complete genome sequence of a novel dsRNA mycovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Archives of virology**, v. 160, n. 9, p. 2375-2379, 2015.
- LEMUS-MINOR, C. G. et al. Horizontal and vertical transmission of the hypovirulence-associated mycovirus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* virus 1. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, p. 645-650, 2019.
- LI, H.; et al. RNA sequence determinants of a couple termination-reinitiation strategy for downstream Open Reading Frame translation in *Helminthosporium victoriae* virus 190S and other victoriviruses (Family Totiviridae). **Journal of Virology**, v.85, p.7343-7352, 2011.
- LI, W. et al. Genome structure and diversity of novel endornaviruses from wheat sharp eyespot pathogen *Rhizoctonia cereali*. **Virus Research**, v. 297, p. 198368, 2021.
- LIANG, Z. et al. A botybirnavirus isolated from *Alternaria tenuissima* confers hypervirulence and decreased sensitivity of its host fungus to difenoconazole. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2093, 2022.
- LIBRELON, S. S. et al. Diagrammatic scale to evaluate angular leaf spot severity in primary leaves of common bean. **Australasian Plant Pathology**, v. 44, p. 385-395, 2015.
- LIBRELON, S. S. et al. Increasing the efficiency of recurrent selection for angular leaf spot resistance in common bean. **Crop Science**, v. 60, n. 2, p. 751-758, 2020.
- LIBRELON, S. S. et al. *Pseudocercospora griseola*, the causal agent of common bean angular leaf spot: Strain characterization and sensitivity to fungicides. **Plant Pathology**, v. 71, n. 6, p. 1431-1439, 2022.
- LIEBENBERG, M. M.; PRETORIUS, Z. A. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L). **African Plant Protection**, v. 3, n. 2, p. 81-106, 1997.
- LIMA, S. S. et al. Mycovirus in *Pseudocercospora griseola*, the causal agent of angular leaf spot in common bean. **Canadian journal of microbiology**, v. 56, n. 5, p. 359-365, 2010.
- LONGKUMER, I. Y. et al. Potencial do Mycovirus no Controle Biológico de Patógenos de Plantas Fúngicas: Uma Revisão. **Revistas Agrícolas**, v. 41, n. 3, p. 238-247, 2020.
- LOVATO, F. et al. Composição centesimal e conteúdo mineral de diferentes cultivares de feijão biorfortificado (*Phaseolus vulgaris* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 1-6, 2018.
- LUO, X. et al. Caracterização do Genoma e Análise Filogenética de um Novo Endornavírus que Infecta o Fungo Patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 456, 2022.
- LUTZ, T.; LANGER, G.; HEINZE, C. Complete genome sequence of a new quadrivirus infecting a member of the genus *Thelonectria*. **Archives of virology**, v. 167, n. 2, p. 691-694, 2022.

- MAGAE, Y.; SUNAGAWA, M.. Caracterização de um micovírus associado à coloração marrom do cogumelo comestível, *Flammulina velutipes*. **Virology Journal**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2010.
- MAHAJAN, S. et al. Antiviral strategies targeting host factors and mechanisms obliging+ ssRNA viral pathogens. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 116356, 2021.
- MALATHI, V. G.; RENUKA DEVI, P. ssDNA virus: key players in global virome. **Virusdisease**, v. 30, n. 1, p. 3-12, 2019.
- MATHE, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, n. 4, p. 251-264, 2013.
- MODA-CIRINO, V. et al. Mancha angular. In: PAULA JÚNIOR, T. J. de; WENDLAND, A. (Eds.). Melhoramento Genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças. Viçosa, MG: Epamig Suprema, p. 71-80, 2012.
- MONDA, E. T.; SENDERS, F. E.; HICK, A. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. **Plant Pathology, Honolulu**, v. 50, n. 1, p. 103-110, 2001.
- MORIYAMA, H. et al. *Crisovírus em Magnaporthe oryzae*. **Vírus**, v. 10, n. 12, p. 697, 2018.
- MENDIBURU, F.. Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural. Research. R package version 1.3-5. 2021. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>. acesso em 14 de novembro 2022.
- NAKAYAMA, F. T.; PINHEIRO, G. A. S.; ZERBINI, E. F. Eficiência do fertilizante organomineral na produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em sistema de semeadura direta. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 7, 2013.
- NAY, M. M., et al. A review of angular leaf spot resistance in common bean. **Crop Science**, v. 59, n. 4, p. 1376-1391, 2019.
- PÁDUA, P. F. de et al. Optimizing sporulation of *Pseudocercospora griseola* in vitro. **Annual report of the bean improvement cooperative**, n. 60, p. 1-2, 2017.
- PÁDUA, P. F. de et al. Eficiência de um método de seleção recorrente para obter resistência do feijoeiro comum à *Pseudocercospora griseola* em curto período. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 45, 2021.
- PÁDUA, P. F. et al. Identification of sources of resistance to race 63-63 of *Pseudocercospora griseola* in common bean lines. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. e 36982215, 2022.
- PARK, Y.; JAMES, D.; PUNJA, Z. K. Co-infection by two distinct totivirus-like double-stranded RNA elements in *Chalara elegans* (*Thielaviopsis basicola*). **Virus research**, v. 109, n. 1, p. 71-85, 2005.

PASTOR-CORRALES, M. A.; JAR, A C. E.; SINGH, S.P. Pathogenic Variation in, Sources of, and Breeding for Resistance to *Phaeoisariopsis griseola* Causing the Angular Leaf Spot in Common Beans. **Euphytica** 103:161-171. 1998.

PEARSON, M.N.; BEEVER, R.; BOINE, B.; ARTHUR, K. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.10, p.115-128, 2009.

PEREIRA, R.; ABREU, M. J.; SOUZA, E. A. Alternative method to assess the reaction of common bean lines to *Pseudocercospora griseola*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 54, p. 104-105, 2011.

PEREIRA, R. et al. Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. **Genetics and Molecular Research** v. 14, n. 2, p. 5044-5053, 2015.

PEREIRA, N. B. M. et al. Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains collected in Minas Gerais state, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 62, p. 5-6, 2019.

PICARELLI, M. A. S. C. et al. Virus infecting phytopathogenic fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, p. 1-15, 2017.

PIELHOP, T. P. et al. Three new mycoviruses identified in the apple replant disease (ARD)-associated fungus *Rugonectria rugulosa*. **Virus Genes**, v. 58, n. 5, p. 423-435, 2022.

POIMALA, A. et al. Diversidade viral em população de *Phytophthora cactorum* infectando morangueiro. **Microbiologia Ambiental**, v. 23, n. 9, p. 5200-5221, 2021.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de componentes monocíclicos da mancha angular do feijoeiro. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, p. 394-400, 2003.

RAMALHO, M. A. P. et al., Progresso genético do quinto ao sétimo ciclo de seleção recorrente no melhoramento genético do feijoeiro. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 8., 2005, Goiânia. Anais... Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005b, v. 1, p. 543-546. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 182).

REYNOSO CAMACHO, R. et al. Consumo de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e seu efeito no câncer de cólon em ratos Sprague-Dawley. **Agricultura técnica no México**, v. 33, nº. 1 p. 43-52, 2007.

REFOS, J. M. et al. Double-stranded RNA mycovirus infection of *Aspergillus fumigatus* is not dependent on the genetic make-up of the host. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77381, 2013.

ROBINSON, H. L.; DEACON, J. W. Double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani* AG 3. **Mycological Research**, v. 106, n. 1, p. 12-22, 2002.

RODRÍGUEZ, D. et al. Pathogenic variability of *Pseudocercospora griseola* isolates from two provinces of Ecuador. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 101, n. 1, p. 107-119, 2017.

ROSSETO, P. et al. Investigação de micovírus em cepas endofíticas e fitopatogênicas de *Colletotrichum* de diferentes hospedeiros. **Genet Mol Res**, v. 1, p. 15017651, 2016.

SACCARDO, P. A. Fungi veneti novi vel, critici, vel mycolgise venetae addandi. *Isariopsis griseola* Sacc., **Micheli**, v. 1, p. 273, 1878.

SARTORATO, A. **Controle químico da mancha angular do feijoeiro comum. Comunicado Técnico**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1 ed. 2006. p. 4.

SARTORATO, A.; ALZATE-MARIN, A. L. Analysis of the pathogenic variability of *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report-Bean Improvement Cooperative**, v. 47, p. 235-236, 2004.

SASAKI, A. et al. Infection of *Rosellinia necatrix* with purified viral particles of a member of Partitiviridae (RnPV1-W8). **Archives of Virology**, v. 151, p. 697-707, 2006.

SASAKI, A. et al. Artificial infection of *Rosellinia necatrix* with purified viral particles of a member of the genus Mycoreovirus reveals its uneven distribution in single colonies. **Phytopathology**, v. 97, n. 3, p. 278-286, 2007.

SATO, Y. et al. Perfil da Taxonomia do Vírus ICTV: megabirnaviridae. **Journal of General Virology**, v. 100, n. 9, p. 1269-1270, 2019.

SCORTEGAGNA, P. V. et al. **Produtos alternativos para proteção e indução de resistência à mancha angular em plantas de feijão**. 2022. Dissertação (mestrado em Agronomia), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2022.

SCHNEIDER-POETSCH, T. et al. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. **Nature chemical biology**, v. 6, n. 3, p. 209-217, 2010.

SILVA, O. F. da; WANDER, A. E. **O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro**. 1. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. p. 1 - 63. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/961699>. Acesso em: 23 de dezembro. 2023.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199-2223, 2010.

SOUSA, R. S.; GONÇALVES, F. J.; WENDLAND, A. Reação de genótipos de feijoeiro comum da Embrapa Arroz e Feijão aos patótipos 63-23, 31-31 e 63-63 de *Pseudocercospora griseola*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, São Pedro, SP. Fitopatologia de precisão: fronteiras da ciência: anais. São Pedro, SP: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2015.

STENGLEIN, S. et al. Angular leaf spot: A disease caused by fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris on *Phaseolus vulgaris* L. **Advances in Applied Microbiology**. London. v. 52, p. 209-244, 2003.

STENGLEIN, S. A.; BALATTI, P. A. Diversidade genética de *Phaeoisariopsis griseola* na Argentina revelada por marcadores patogênicos e moleculares. **Patologia Fisiológica e Molecular de Plantas**, v. 68, n.4, p. 158-167, 2006.

STRAUSS, E. E.; LAKSHMAN, D. K.; TAVANTZIS, S. M. Caracterização molecular do genoma de um partitivírus do basidiomiceto *Rhizoctonia solani*. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 549-555, 2000.

SUPYANI, S. Partial characterization of a novel reovirus isolated from a hypovirulent strain (9B21) of *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 10, n. 2, 2009.

SUZUKI, N. et al. Complete genome sequence of Mycoreovirus-1/Cp9B21, a member of a novel genus within the family Reoviridae, isolated from the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 11, p. 3437-3448, 2004.

TAPIA, C. R. et al. Influencia de la presencia de mitovirus en el crecimiento micelial de aislados de *Gremmeniella abietina* in vitro en diferentes condiciones de temperatura, pH y potencial osmótico. **Actas De La Ii Reunión Sobresanidad Forestal**, p. 61, 2012.

TUOMIVIRTA, T. T.; HANTULA, J. Two unrelated double-stranded RNA molecule patterns in *Gremmeniella abietina* type A code for putative viruses of the families Totiviridae and Partitiviridae. **Archives of virology**, v. 148, n. 12, p. 2293-2305, 2003.

VIECELLI, C. A. et al. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 87-96, 2009.

VIEIRA, C. Melhoramento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de Minas Gerais. IV: Estudos realizados no período de 1970 à 1973. **Revista Ceres**, v. 21, p. 470-485, 1974.

VIEIRA, P. D. S. et al. Estudo da caracterização morfológica, esporulação e germinação dos conídios de *metarhizium anisopliae* var. *Acridum* em diferentes temperaturas. **Biológico**. v. 71, n. 1, p. 43-47, 2009.

WANG, Q. et al. Discovery of two mycoviruses by high-throughput sequencing and assembly of mycovirus-derived small silencing RNAs from a hypovirulent strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1415, 2019.

WEISSENHORN, W. et al. Como sair: vírus envelopados de ssRNA e fissão de membrana. **Opinião atual em virologia**, v. 3, n. 2, pág. 159-167, 2013.

XIANG, J. et al. Caracterização de um novo botybirnavirus isolado de um fungo fitopatogênico *Alternaria*. **Arquivos de virologia**, v. 162, n. 12, pág. 3907-3911, 2017.

- XIE, J. et al. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 1, p. 241-249, 2006.
- YAEGASHI, H. et al. Aparecimento de RNAs de fita dupla semelhantes a micovírus no fungo da podridão branca da raiz, *Rosellinia necatrix*, em um pomar de macieiras. **FEMS microbiologia ecologia**, v. 83, n. 1, p. 49-62, 2013.
- YOKOI, T.; YAMASHITA, S.; HIBI, T. A sequência de nucleotídeos e a organização do genoma do vírus *Magnaporthe oryzae* 1. **Archives of virology**, v. 152, n. 12, p. 2265-2269, 2007.
- YU, X. et al. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 18, p. 8387-8392, 2010.
- YU, X. et al. Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 4, p. 1452-1457, 2013.
- ZHANG, Lihang et al. Molecular characterization of a novel strain of *Fusarium graminearum* virus 1 infecting *Fusarium graminearum*. **Viruses**, v. 12, n. 3, p. 357, 2020.
- ZHONG, J. et al. Molecular characterization of a trisegmented mycovirus from the plant pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Viruses**, v. 8, n. 10, p. 268, 2016.
- ZHOU, L. et al. A mycovirus modulates the endophytic and pathogenic traits of a plant associated fungus. **The ISME Journal**, v. 15, n. 7, p. 1893-1906, 2021.

## APÊNDICES

Tabela 1 A- Resumo da análise conjunta de variância da capacidade de esporulação (CAP) dos 29 isolados de *P.griseola* avaliados em três épocas (6, 8 e 11 dias).

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Épocas (E)	2	5	54,75	0**
Isolados (I)	28	4	124,48	0**
E x I	3	3	6,35	0**
E/I-1	2	2,34	1,30	0,27 <sup>NS</sup>
E/I-2	2	1,71	0,95	0,38 <sup>NS</sup>
E/I-3	2	2,96	1,65	0,19 <sup>NS</sup>
E/I-4	2	39,71	22,10	0**
E/I-5	2	25,46	14,17	0**
E/I-6	2	12,84	7,14	0**
E/I-7	2	73,52	40,92	0**
E/I-8	2	9,298	5,17	0**
E/I-9	2	168,08	93,56	0**
E/I-10	2	6,36	3,54	0,03*
E/I-11	2	1,89	1,05	0,35 <sup>NS</sup>
E/I-12	2	8,42	4,68	0,01*
E/I-13	2	1,08	0,60	0,54 <sup>NS</sup>
E/I-14	2	7,93	4,41	0,01*
E/I-15	2	4,88	2,71	0,06 <sup>NS</sup>
E/I-16	2	10,92	6,08	0,00**
E/I-17	2	1,96	1,09	0,33 <sup>NS</sup>
E/I-18	2	2,45	1,36	0,25 <sup>NS</sup>
E/I-19	2	0,54	0,30	0,73 <sup>NS</sup>
E/I-20	2	4,77	2,65	0,07 <sup>NS</sup>
E/I-21	2	1,58	0,87	0,41 <sup>NS</sup>
E/I-22	2	0,14	0,08	0,92 <sup>NS</sup>
E/I-23	2	0,92	0,51	0,59 <sup>NS</sup>
E/I-24	2	1,29	0,71	0,48 <sup>NS</sup>
E/I-25	2	13,42	7,47	0,00**
E/I-26	2	1,86	1,03	0,35 <sup>NS</sup>
E/I-27	2	10,54	5,87	0,00**

E/I-28	2	0,04	0,02	0,97 <sup>NS</sup>
E/I-29	2	1,02	0,57	0,56 <sup>NS</sup>
I/E				
I/E-6 dias	28	121,50	67,63	0**
I/E-8 dias	28	77,73	43,27	0**
I/E-11 dias	28	47,23	26,29	0**
Erro	174	1,76		

---

**CV (%)            30,2 %**

---

FV: Fonte de variação; GL: Grau de Liberdade; QM: quadrado médio; F: teste F; Pr>Fc: P-valor; CV (%): Coeficiente de variação; NS: Não significativo; \*, \*\*: Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Tabela 2 A - Agrupamento de médias Scott-Knott da capacidade de esporulação (CAP) dos 29 isolados de *P.griseola* avaliados com 6, 8 e 11 dias.

<b>Avaliação 1 (6 dias)</b>		
<b>Grupos</b>	<b>Amplitude da esporulação (x 10<sup>4</sup>)</b>	<b>Isolados</b>
A	37,08	9
B	9,00 a 7,50	7; 4
C	6,58 a 5,25	18; 6; 5; 8; 16
D	4,33 a 2,41	27; 10; 26; 15; 20; 1; 11; 12; 2; 28; 14; 13; 19; 21; 3; 23; 17; 22; 25; 29
<b>Avaliação 2 (8 dias)</b>		
<b>Grupos</b>	<b>Amplitude da esporulação (x 10<sup>4</sup>)</b>	<b>Isolados</b>
A	27,91	9
B	13,08 a 11,33	7; 4
C	6,91 a 4,33	12; 5; 18; 14; 8; 16
D	3,75 a 1,83	11; 13; 25; 21; 15; 6; 28; 19; 2; 3; 29; 17; 23; 1; 22; 26; 27; 10; 24; 20
<b>Avaliação 3 (11 dias)</b>		
<b>Grupo</b>	<b>Amplitude da esporulação (x 10<sup>4</sup>)</b>	<b>Isolados</b>
A	22,25	9
B	6,50 a 4,58	25; 4; 18; 12
C	3,58 a 0,58	29; 19; 28; 22; 26; 13; 11; 6; 8; 1; 2; 21; 7; 23; 16; 14; 15; 20; 24; 17; 10; 3; 5; 27

Tabela 3 A – Resumo da análise conjunta de variância da severidade da doença (SV) para reação de cultivares de feijão comum a 29 isolados de *P. griseola*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Isolados (I)	28	6	4,77	0**
Cultivares (C)	2	5	17,83	0**
I x C	56	3	596,01	0**
I/C - BRS Horizonte	28	1,75	8,85	0**
I/C - Rosinha	28	2,75	13,88	0**
I/C - MA3-16159	28	0,75	3,78	0**
Erro	172	2	4,35	
<b>CV (%)</b>	<b>18,39</b>			

FV: Fonte de variação; GL: Grau de Liberdade; QM: quadrado médio; F: teste F; Pr>Fc: P-valor; CV (%): Coeficiente de variação; \*, \*\*: Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Tabela 4 A- Agrupamento de médias pelo Scott-Knott ( $P < 0,05$ ) das notas de severidade da mancha angular considerando escala descritiva e a porcentagem da área foliar com sintomas em três cultivares/linhagem de feijoeiro inoculadas com a 29 isolados de *P. griseola*.

BRS Horizonte			Rosinha			MAIII -16159		
I	S	G	I	S	G	I	S	G
6	4,3S*	a	6	5,7S	a	22	3,7S	a
12	4,3S	a	12	5,7S	a	9	1,3R	b
16	4,0S	a	16	5,0S	a	10	1,3R	b
22	4,0S	a	4	4,7S	b	14	1,3R	b
4	3,7S	b	22	4,3S	b	18	1,3R	b
2	3,3S	b	2	4,0S	b	1	1,0R	b
9	3,3S	b	17	4,0S	b	2	1,0R	b
10	3,3S	b	21	4,0S	b	3	1,0R	b
15	3,0R	b	9	3,7S	c	4	1,0R	b
21	3,0R	b	10	3,7S	c	5	1,0R	b
17	2,7R	c	15	3,7S	c	6	1,0R	b
25	2,7R	c	25	3,7S	c	7	1,0R	b
26	2,7R	c	8	3,3S	c	8	1,0R	b
5	2,3R	c	11	3,3S	c	11	1,0R	b
8	2,3R	c	26	3,3S	c	12	1,0R	b
11	2,3R	c	7	3,0R	d	13	1,0R	b
18	2,3R	c	18	3,0R	d	15	1,0R	b
20	2,3R	c	27	3,0R	d	16	1,0R	b
24	2,3R	c	3	2,7R	d	17	1,0R	b
27	2,3R	c	5	2,7R	d	19	1,0R	b
1	2,0R	c	13	2,7R	d	20	1,0R	b
3	2,0R	c	19	2,7R	d	21	1,0R	b
7	2,0R	c	20	2,7R	d	23	1,0R	b
13	2,0R	c	23	2,7R	d	24	1,0R	b
14	2,0R	c	24	2,7R	d	25	1,0R	b
19	2,0R	c	29	2,7R	d	26	1,0R	b
23	2,0R	c	14	2,3R	d	27	1,0R	b
28	2,0R	c	28	2,3R	d	28	1,0R	b
29	2,0R	c	1	2,0R	d	29	1,0R	b

I: Isolados de *P. griseola*; S: notas de severidade da doença; G: grupos; a, b, c, d: médias com as mesmas letras não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ); \*cultivares que apresentaram médias de 1 a 3 consideradas resistentes (R), e as com médias 3,1 ou maior, suscetíveis (S).

Tabela 5 A – Resumo da análise de variância para características capacidade de esporulação entre 4 isolados de *P.griseola* com efeito de presença e ausência de micovírus.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Presença e ausência de micovírus (V)	1	2	30,63	0**
Isolados (I)	3	5	295,32	0**
V x I	3	4	27,26	0**
V/I				
V/I -9	1	378,12	112,12	0**
V/I - 23	1	0,38	0,11	0,73 <sup>NS</sup>
V/I - 24	1	0,19	0,05	0,81 <sup>NS</sup>
V/I - 25	1	0,50	0,14	0,70 <sup>NS</sup>
I/V				
I/V-Presença de micovírus	3	846,21	250,92	0**
I/V-Ausência de micovírus	3	241,69	71,68	0**
Erro	24	80,93	3,37	
<b>CV (%)</b>	<b>21,25</b>			

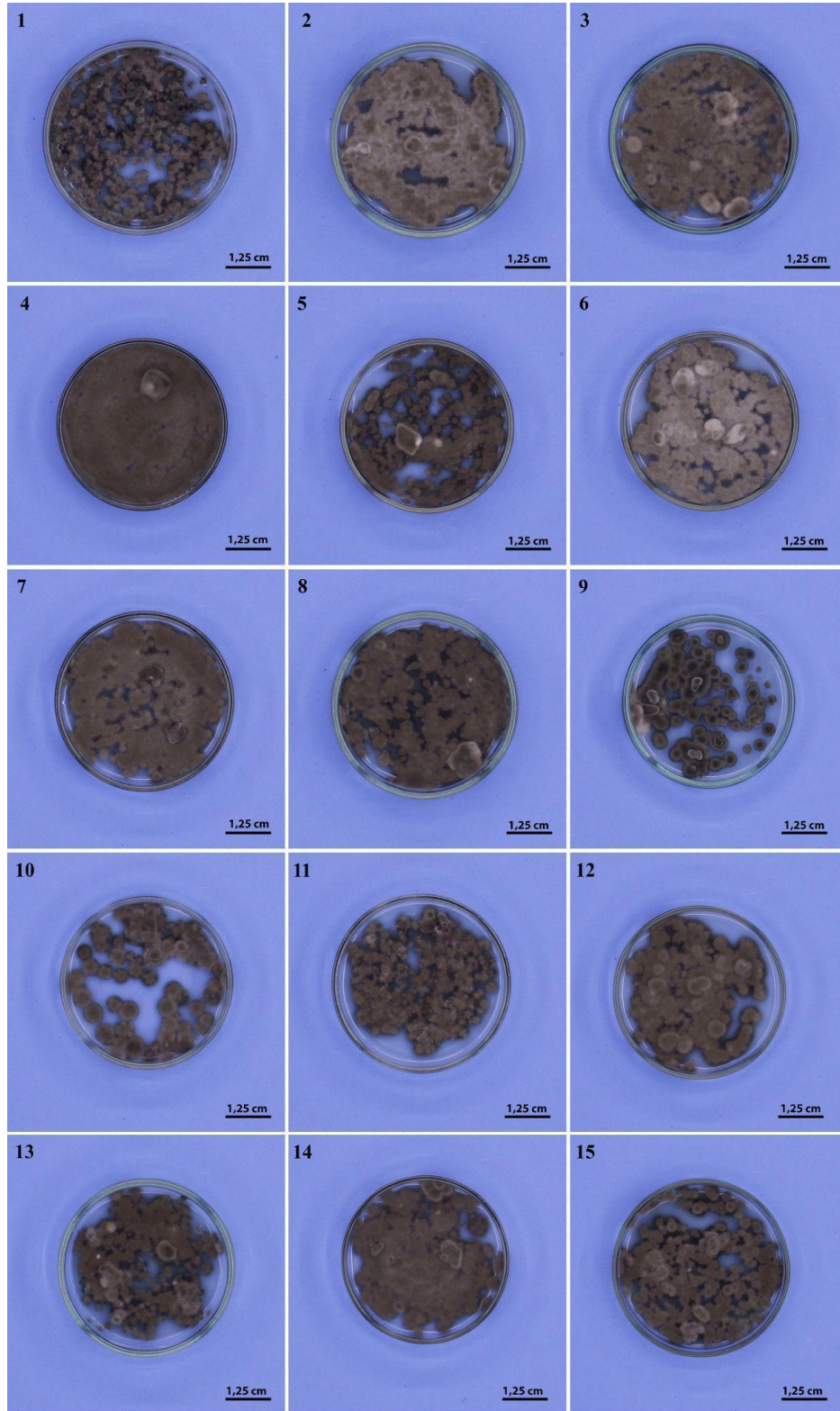
FV: Fonte de variação; GL: Grau de Liberdade; QM: quadrado médio; F: teste F; Pr>Fc: P-valor; CV (%): Coeficiente de variação; NS: Não significativo; \*, \*\*: Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Tabela 6 A - Resumo da análise de variância da severidade da doença (SV) para reação de cultivares de feijão comum a 29 isolados de *P. griseola*.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Presença e ausência de micovírus (V)	1	3,12	32,14	0**
Isolados (I)	3	3,23	33,28	0**
Cultivares/linhagens (C)	2	35,72	367,42	0**
V x I	3	1,45	15,00	0**
V x C	2	2,16	22,28	0**
I x C	6	1,05	10,85	0**
V x I x C	6	0,50	5,14	0**
V/I- 9/ C BRS Horizonte	1	1,50	15,42	0,01*
V/I- 9/ C Rosinha	1	0,66	6,85	0**
V/I- 9/C MAIII	1	1,50	15,42	1 <sup>NS</sup>
V/I- 23/ C BRS Horizonte	1	0,66	6,87	0**
V/I- 23/ C Rosinha	1	0,16	1,71	0,21 <sup>NS</sup>
V/I- 23/C MAIII	1	0,00	0	1 <sup>NS</sup>
V/I- 24/ C BRS Horizonte	1	0,00	0	0,21 <sup>NS</sup>
V/I- 24/ C Rosinha	1	0,16	1,71	0,01*
V/I- 24/C MAIII	1	0,00	0	1 <sup>NS</sup>
V/I- 25/ C BRS Horizonte	1	6,00	61,71	0**
V/I- 25/ C Rosinha	1	4,16	42,85	0**
V/I- 25/C MAIII	1	0,00	0	1 <sup>NS</sup>
Erro	46	0,09		
<b>CV (%)</b>		<b>12,83</b>		

FV: Fonte de variação; GL: Grau de Liberdade; QM: quadrado médio; F: teste F; Pr>Fc: P-valor; CV (%): Coeficiente de variação; NS: Não significativo; \*, \*\*: Significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

**APÊNDICE A-** Isolados do fungo *P. griseola* da micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças da UFLA e coletados de linhagens de feijão que apresentavam sintomas de mancha angular.



APÊNDICE A- Continuação.

