



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

Desenvolvimento de iniciadores específicos para identificação de espécies de *Macrophomina* e diversidade de espécies associadas ao feijão-caupi no Nordeste brasileiro

Kledson Mendes dos Santos

**Recife - PE
2021**

KLEDSON MENDES DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO
DE ESPÉCIES DE *MACROPHOMINA* E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES
ASSOCIADAS AO FEIJÃO-CAUPI NO NORDESTE BRASILEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Sami Jorge Michereff (UFCA)

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (UFPE)

Coorientadora: Prof. Dra. Kamila Câmara Correia (UFCA)

**RECIFE - PE
MAIO – 2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- K63d Santos, Kledson Mendes dos
Desenvolvimento de iniciadores específicos para identificação de espécies de *Macrophomina* e diversidade de espécies associadas ao feijão-caupi no Nordeste brasileiro / Kledson Mendes dos Santos. - 2021.
70 f.
- Orientadora: Sami Jorge Michereff.
Coorientador Alexandre Reis Machado; Kamila Camara Correia.
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, 2021.
1. *Vigna unguiculata* 2. charcoal rot. 3. *Macrophomina euphorbiicola*. 4. *Macrophomina phaseolina*. 5. *Macrophomina pseudophaseolina*. I. Michereff, Sami Jorge, orient. II. Correia, Kamila Camara, III. Machado, Alexandre Reis, coorient. IV. Título

**DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO
DE ESPÉCIES DE *MACROPHOMINA* E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES
ASSOCIADAS AO FEIJÃO-CAUPI NO NORDESTE BRASILEIRO**

KLEDSON MENDES DOS SANTOS

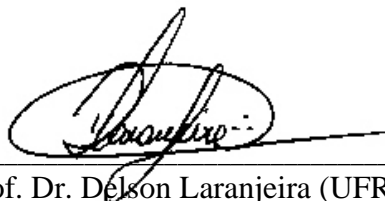
Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/05/2021

ORIENTADOR:



Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFCA)

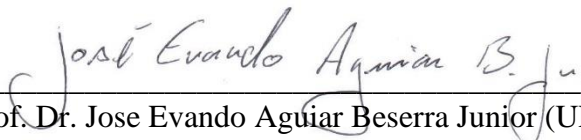
EXAMINADORES:



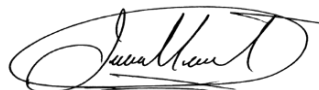
Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)



Profa. Dra. Francine Hiromi Ishikawa (UNIVASF)



Prof. Dr. Jose Evando Aguiar Beserra Junior (UFPI)



Prof. Dr. Juan Manoel Tovar-Pedraza (CIAD, México)

**RECIFE - PE
MAIO - 2021**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Joselita e Celso, por todo amor, caráter, ensinamentos, exemplo, dedicação, apoio, força para sempre me proporcionar o melhor em tudo, inclusive os estudos, sendo essência de inspirações para todas minhas superações e conquistas!!!

Aos meus irmãos, Clécia e Celso Jr. e sobrinha Maria Sophia por todo amor, apoio, força, incentivo, carinho e compreensão em todos os momentos!!!

Minha eternos avós Belinhas (†), Mariinha (†), Manuel (†) e tia Maria (†) por todo amor, apoio, incentivo e inspirações para minha jornada!!!

Ao eterno e infinito amor da minha vida Jêniffa Lira (†), por todo amor, felicidade, cumplicidade, dedicação, força, torcida, energias, orações e sempre apoiando em todos os momentos e eternamente será essência para seguir em frente. Te amarei eternamente! Até um dia, meu eterno amor!!!

Aos meus sogros Vera e Zuino, cunhados Jonathas e Jânio avós Lurdes e Floriano e familiares Robson, Selma, Ellena, Vilma, Lary e toda família Lira por todas orações, apoio, força, carinho e incentivo para superação e conquista desse nosso sonho com nossa eterna Jêniffa Lira (†)!!!

Minha eterna Gratidão!

*Essa é uma velha história
De uma flor e um beija-flor
Que conheceram o amor
Numa noite fria de outono
E as folhas caídas no chão
Da estação que não tem cor*

*E a flor conhece o beija-flor
E ele lhe apresenta o amor
E diz que o frio é uma fase ruim
Que ela era a flor mais linda do jardim
E a única que suportou
Merece conhecer o amor e todo seu calor*

*Ai, que saudade de um beija-flor
Que me beijou, depois voou
Pra longe demais
Pra longe de nós*

*Saudade de um beija-flor
Lembranças de um antigo amor
O dia amanheceu tão lindo
Eu durmo e acordo sorrindo
Flor e o Beija-flor. 🎵*

*A voz do anjo sussurrou no meu ouvido
Eu não duvido já escuto os teus sinais
Que tu virias numa manhã de domingo
Eu te anuncio nos sinos das catedrais
Tu vens, tu vens
Eu já escuto os teus sinais
Anunciação 🎵*

*Ei, há quanto tempo não te vejo
Desde o nosso último encontro
Que só faço me perder
Fui soprando o vento do desejo
E cheguei mesmo a ponto
De tentar te esquecer*

*Vem me matar
Que meu nome é saudade de você
Vem me amar
Nunca some a vontade de te ver
Tento tanto entender
E continuo sem saber*

*Porque o sol ainda ilumina nossas flores
Com a grama do jardim envolvendo o amanhecer
Só que a luz brilhante dessas cores
Sem a chama que há em ti pode o amor anoitecer
Vem me matar
Que meu nome é saudade de você
Vem me amar
Nunca some a vontade de te ver
Tento tanto entender
E continuo sem sabe....
Meu Nome É Saudade de Você 🎵*

*E agora, o que eu vou fazer
Se os seus lábios
Ainda estão molhando os lábios meus?
E as lágrimas não secaram com o sol que fez?*

*E agora, como eu posso te esquecer
Se o seu cheiro ainda está no travesseiro?
E o seu cabelo está enrolado no meu peito?
Espero que o tempo passe
Espero que vida acabe
Pra que eu possa te ver de novo*

*Espero que o tempo voe
Para que você retorne
Pra que eu possa te abraçar
E te beijar de novo
E agora, como eu passo sem te ver
Se o seu nome
Está gravado no meu braço como selo?
Nossos nomes que tem o N como elo*

*E agora, como posso te perder?
Espero que o tempo passe
Espero que a vida...*

Letra N 🎵

*Olha, esta vida vai passar rápido
Não brigue tanto com as pessoas
Não reclame por coisas bobas
Não perca o sono pelas contas
Não deixe de beijar seus pais*

*E não fique guardando as taças
A casa não precisa estar impecável
Deixe mais por perto os cachorros
Repita as suas roupas prediletas
E não critique tanto o seu corpo*

*Lembre-se do porquê começou
Lembre-se do porquê se casou
Por que não falar com Deus agora?
Se perdoar liberta, por que demoras?
Por que não ligar? Por que não abraçar?
Que tal jogar estas desculpas fora?*

*Deixe-me contar um segredo
Não foi pra esta vida que fomos feitos
Não podemos nos completar aqui
Pois, dentro de nós, há uma alma pulsando
Sem fim (Sem fim)...*

Vai passar Rápido 🎵

Meu nome é saudade de vc! (Jêniffa ♥ Kledson) Vou morrer de saudades!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me curar e proporcionar energias positivas, luz e forças para chegar até aqui.

Ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela oportunidade para a realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao orientador Prof. Dr. Sami Jorge Michereff, pela orientação, aprendizado, paciência, ensinamentos e todo suporte, incentivo e conselhos que ultrapassaram a vida acadêmica.

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Alexandre Reis Machado e Prof. Dra. Kamila Câmara Correia, pelo apoio e toda assistência para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Departamento Micologia Prof. Chaves Batista da de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Laboratório Fitobacteriologia (UFRPE) e ao Prof. Dr. Humberson Silva do Laboratório de Epidemiologia de Doenças de plantas (UFRPE), por terem cedido suas estruturas para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador de graduação, Prof. Dr. Ricardo Brainer Martins (UFAL), por todos os ensinamentos e abertura das portas do mundo da Fitopatologia.

Ao Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em especial Fábio, Grazielle, Ana Paula, Tamiris por todo suporte e amizade.

A todos os amigos que fiz durante essa caminhada, em especial Iwanne Coelho, Leandro Victor, Joelma Santana, Alesandra Morais, Diego Cunha, Cinthia Conforto por toda amizade, suporte, ensinamentos, conselhos que foram fundamentais para superação de vida e curso.

A Suzilaine por a todo força, amizade, conselhos e momentos de alegrias.

A todos que, involuntariamente, não foram citados, mas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e por todas orações e carinhos para alcançar essa conquista.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral	10
1. Taxonomia de <i>Macrophomina</i>	11
2. Desenho de iniciadores específicos para espécies de <i>Macrophomina</i>	13
3. Feijão-caupi	18
4. Podridão cinzenta do caule	22
Referências Bibliográficas	26
CAPÍTULO II – Novel specific primers for rapid identification of <i>Macrophomina</i> species	31
Abstract	32
Acknowledgments	37
References	38
CAPÍTULO III – Is <i>Macrophomina phaseolina</i> the only species of this genus that causes cowpea charcoal rot in Brazil?	47
Abstract	49
Acknowledgments	55
References	56
CONCLUSÕES GERAIS	69

RESUMO GERAL

Macrophomina é um gênero fúngico pertencente à família Botryosphaeriaceae até recentemente considerado monotípico, representado por *M. phaseolina*. No entanto, após estudos filogenéticos baseados em sequências de DNA, foram descritas três novas espécies: *M. euphorbiicola*, *M. pseudophaseolina* e *M. vaccinii*. Para identificação das espécies de *Macrophomina* em larga escala e a baixo custo, há necessidade do desenvolvimento de iniciadores específicos. A podridão cinzenta do caule, causada por *Macrophomina*, é considerada uma das principais doenças do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] no Nordeste brasileiro, principalmente em regiões semiáridas. Por muitos anos, apenas *M. phaseolina* foi associada à essa doença no Brasil e em nível mundial. Nesse contexto, essa tese teve como objetivos: (i) desenvolver iniciadores específicos e avaliar a eficácia dos mesmos para identificação das espécies de *Macrophomina*; (ii) identificar com iniciadores específicos as espécies de *Macrophomina* associadas com a podridão cinzenta do feijão-caupi no Nordeste brasileiro; (iii) caracterizar a prevalência das espécies de *Macrophomina* associadas ao feijão-caupi no Nordeste brasileiro; (iv) analisar a patogenicidade e a agressividade de isolados representativos das espécies. Os iniciadores específicos MpTefF / MpTefR, MsTefF / MsTefR, MeTefF / MeTefR desenvolvidos a partir da região TEF-1 α exibiram alta especificidade na amplificação apenas dos isolados-alvo de *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola*, respectivamente. Com esses iniciadores foram identificados 263 isolados de *Macrophomina* obtidos de plantas de feijão-caupi coletadas em 100 áreas de plantio de cinco estados do Nordeste brasileiro. Foram identificadas três espécies de *Macrophomina*, sendo dois isolados de *M. euphorbiicola* (0,8%), 205 de *M. phaseolina* (77,1%) e 56 de *M. pseudophaseolina* (21,3%). Isolados de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* foram constatados em todos os estados amostrados, sendo a primeira espécie registrada em 92% das áreas de produção e a segunda espécie em 41% das áreas de produção, enquanto *M. euphorbiicola* foi detectada em apenas 2% das áreas de produção. Todos os isolados representantes das três espécies de *Macrophomina* foram patogênicos ao feijão-caupi, mas houve diferença na agressividade entre as espécies. *Macrophomina phaseolina* e *M. pseudophaseolina* foram as mais agressivas. Este é o primeiro relato de infecção natural do feijão-caupi por *M. pseudophaseolina* no Brasil e por *M. euphorbiicola* no mundo.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, podridão cinzenta do caule, *Macrophomina euphorbiicola*, *Macrophomina phaseolina*, *Macrophomina pseudophaseolina*, identificação molecular, prevalência.

GENERAL ABSTRACT

Macrophomina is a fungal genus belonging to the Botryosphaeriaceae family until recently considered monotypic, represented by *M. phaseolina*. However, after phylogenetic studies based on DNA sequences, three new species have been described: *M. euphorbiicola*, *M. pseudophaseolina* and *M. vaccinii*. To identify *Macrophomina* species on a large scale and at low cost is necessary to develop specific primers. Charcoal rot, caused by *Macrophomina*, is considered one of the main diseases of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in Northeast Brazil, mainly in semiarid regions. For many years, only *M. phaseolina* has been associated with this disease in Brazil and worldwide. In this context, this thesis aimed to: (i) develop specific primers and evaluate their effectiveness in identifying *Macrophomina* species; (ii) identify the *Macrophomina* species associated with the charcoal rot of cowpea in Northeastern Brazil with specific primers; (iii) characterize the prevalence of *Macrophomina* species associated with cowpea in Northeastern Brazil; (iv) to analyze the pathogenicity and the aggressiveness of isolates representative of the species. The specific primers MpTefF / MpTefR, MsTefF / MsTefR, MeTefF / MeTefR developed from the TEF-1 α region exhibited high specificity in amplifying only the target isolates of *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* and *M. euphorbiicola*, respectively. With these primers, were identified 263 *Macrophomina* isolates obtained from cowpea plants sampled in 100 growing-fields of five states in the Northeast of Brazil. Three species of *Macrophomina* were identified, two isolates of *M. euphorbiicola* (0.8%), 205 of *M. phaseolina* (77.1%) and 56 of *M. pseudophaseolina* (21.3%). Isolates of *M. phaseolina* and *M. pseudophaseolina* were found in all sampled states, with the first species registered in 92% of the fields and the second species in 41% of the fields, while *M. euphorbiicola* was detected in only 2% of the fields. All isolates representing the three *Macrophomina* species were pathogenic to cowpea, but there was a difference in aggressiveness between species. *Macrophomina phaseolina* and *M. pseudophaseolina* were the most aggressive. This is the first report of natural infection of cowpea by *M. pseudophaseolina* in Brazil and by *M. euphorbiicola* in the world.

Key words: *Vigna unguiculata*, charcoal rot, *Macrophomina euphorbiicola*, *Macrophomina phaseolina*, *Macrophomina pseudophaseolina*, molecular identification, prevalence.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *MACROPHOMINA* E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES ASSOCIADAS AO FELJÃO-CAUPI NO NORDESTE BRASILEIRO

INTRODUÇÃO GERAL

1. Taxonomia de *Macrophomina*

O gênero *Macrophomina* Petr pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Dothideomycetes e família Botryosphaeriaceae, tendo sido descrito por Petrak em 1923 (MYCOBANK, 2021). É caracterizado por formar micélio superficial ou imerso, hialino ou marrom, ramificado e septado. Produz conidioma picnidial, isolados, globosos, marrom escuros, uniloculares, com parede espessa e textura angular, tornando-se hialina em direção ao centro. Apresentam um ostíolo central. As células conidiogênicas são curtas, fialídicas, enteroblásticas, obpiriformes ou subcilíndricas, hialinas, lisas que formam conídios inicialmente hialinos, asseptados, obtusos nos ápices, cilíndricos à fusiformes e com apêndices mucilaginosos no ápice que são característicos desse gênero. Com a maturidade, a mucilagem desaparece e os conídios podem se tornar pigmentados e septados. Pequenos escleródios negros, lisos, duros são formados a partir de células marrom escuras e com parede espessa (SUTTON, 1980; CROUS *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, a diferenciação das espécies de *Macrophomina* foi realizada exclusivamente com base nas características morfológicas e várias espécies foram descritas, como *M. limbalis* Syd., *M. phaseoli* (Maubl.) S. F. Ashby, *M. phaseolina* (Tassi) Goid., *M. philippinensis* Petr. e *M. pseudeverniae* Etayo & Diederich. No entanto, por muito tempo foi considerado a existência de apenas uma espécie de *Macrophomina*, representada por *M. phaseolina*. A distinção das espécies de *Macrophomina* com base apenas em caracteres morfológicos sempre foi uma tarefa subjetiva, que levou a confusões taxonômicas, principalmente devido à ampla variação morfológica atribuída a *M. phaseolina* (SUTTON, 1980). Com estudos de filogenia molecular, foi comprovado que *Macrophomina* é constituída por espécies crípticas (SARR *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019), ou seja, indivíduos morfológicamente idênticos ou parecidos, mas que apresentam trajetória evolutiva e reprodutiva total ou parcialmente distintas (BICKFORD *et al.*, 2006). Diante disso, atualmente é considerado impossível a identificação das espécies de *Macrophomina* por características morfológicas, tornando a identificação a nível de DNA a opção mais viável (SARR *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019).

Inicialmente, um estudo filogenético sugeriu que o gênero *Macrophomina* poderia ser monotípico, representado por *M. phaseolina* (PHILLIPS *et al.*, 2013). Estudos posteriores levantaram a hipótese de que além de *M. phaseolina*, outras espécies de *Macrophomina* poderiam estar presentes. Essa hipótese foi confirmada pela análise multilocus das sequências de DNA baseada na região do espaçador interno transcrito (ITS), e dos genes actina (ACT), β -tubulina (TUB), calmodulina (CAL) e fator de alongação 1 α (EF1- α), confirmando a existência de outras espécies de *Macrophomina* e destacando a importância da utilização de ferramentas moleculares baseadas na análise multilocus das sequências de DNA para distinção das espécies de *Macrophomina* (SARR *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019).

Atualmente, quatro espécies de *Macrophomina* são consideradas válidas (MYCOBANK, 2021). Descrita em 1947, *M. phaseolina* é a espécie-tipo do gênero (PHILLIPS *et al.* 2013) e causa doenças em mais de 680 plantas hospedeiras (FARR; ROSSMAN, 2021). É considerada economicamente mais importante em países subtropicais e tropicais de clima semiárido da América do Norte, América do Sul, África, Europa e Ásia (KAUR *et al.*, 2012a). No Brasil, a ocorrência de *M. phaseolina* foi relatada pela primeira vez em 1935, infectando raízes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (BITANCOURT, 1935). Desde então, vem aumentando sua gama de hospedeiro, incluindo algodão (*Gossipium hirsutum* L.), alho (*Allium sativum* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam], batata-inglesa (*Solanum tuberosum* L.), cenoura (*Daucus carota* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), feijão-comum, feijão-chicote (*Vigna sesquipedalis* subsp. *sesquipedalis*), feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), mamona (*Ricinus communis* L.), melancia (*Citrullus lanatus* Thunb.), melão (*Cucumis melo* L.), milho (*Zea mays* L.), pimenta (*Capsicum pendulum* L.), pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), quiabo [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.], soja (*Glycine max* L. Merrill), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill.), trigo (*Triticum aestivum* L.) e outros (URBEN; DIANESE; MENDES, 2019; FARR; ROSSMAN, 2021).

Macrophomina pseudophaseolina Crous, Sarr & Ndiaye, foi descrita em 2014, causando doenças em feijão-caupi, amendoim, hibisco (*Hibiscus sabdarifa* L.) e quiabo no Senegal (SARR *et al.*, 2014). Posteriormente, foi relatada no Brasil causando doença em amendoim, algodão, pinhão-manso e mamona (MACHADO *et al.*, 2019), breo (*Trianthema portulacastrum* L.) e pega-pinto (*Boerhavia diffusa* L.) (NEGREIROS *et al.*, 2019), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (BRITO *et al.*, 2020) e batata-doce (MELLO *et al.*, 2021). *Macrophomina pseudophaseolina* é morfologicamente muito semelhante a *M. phaseolina*, com exceção apenas dos conídios serem um pouco mais curtos. A filogenia molecular com base nas

sequências individuais e concatenadas indicaram clado filogeneticamente distinto *M. phaseolina* em todas as análises (SARR *et al.*, 2014).

Macrophomina euphorbiicola A. R. Machado, D. J. Soares & O. L. Pereira foi descrita em 2018, causando doenças em pinhão-mansão e mamona no Brasil. É filogeneticamente distinta de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* com base em dados moleculares. Devido à ausência de esporulação, não foi possível a descrição morfológica de picnídios e estruturas reprodutivas (MACHADO *et al.*, 2019). Recentemente foi constatada causando doença em batata-doce no Brasil (MELLO *et al.*, 2021).

Macrophomina vaccinii Y. Zhang *et al.* & L. Zhao foi descrita em 2019, causando doença em mirtilo (*Vaccinium* spp.) na China. Morfológicamente, *M. vaccinii* é distinguível de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* por apresentar conídios mais largos, maior tamanho do picnídio e menor tamanho de esclerócio. A filogenia com base na análise concatenada de regiões gênicas apresentou clado distinto de *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina*, porém com a formação de um subclado de *M. vaccinii* intimamente relacionados com de *M. phaseolina*. Apesar disso, os autores concluíram se tratar de um nova espécie (ZHAO *et al.*, 2019).

As informações sobre a distribuição e a gama de hospedeiros das novas espécies de *Macrophomina* descritas nos últimos anos são limitadas. Portanto, há necessidade do desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular para facilitar a identificação em larga escala das espécies de *Macrophomina* associadas nas mais diversas culturas e regiões do mundo.

2. Desenho de iniciadores específicos para espécies de *Macrophomina*

Os campos da biologia molecular e da biotecnologia revolucionaram desde os estudos realizados por Mullis *et al.* (1986), que descobriu como sintetizar grande quantidade de DNA a partir de pequena quantidade desse ácido nucleico, processo conhecido como reação em cadeia da polimerase (PCR), possibilitando fazer milhões de cópias de DNA em um período de algumas horas. A PCR tem sido amplamente utilizada nas diversas áreas, como agricultura, medicina, ciência forense, testes de paternidade, ecologia molecular, biotecnologia, dentre outras (BASU *et al.*, 2015). Embora o resultado da PCR possa ser influenciado por muitas outras condições, como a preparação do molde do DNA e as condições de reação, a eficiência e a sensibilidade dependem em grande parte da eficácia do conjunto de iniciadores que são usados para a amplificação. Portanto, projetar um bom par de iniciador específico é um fator crítico para o sucesso da PCR (YE *et al.*, 2012; BASU *et al.*, 2015).

Iniciador específico é uma ferramenta poderosa que pode ser utilizada para identificação de espécies. Como o próprio nome sugere, o iniciador é o principal ácido nucléico para a ligação da DNA polimerase e determina qual região do ácido nucléico será amplificada. Portanto, pode ser usado para a amplificação seletiva de uma determinada região que contenha caracteres informativos para a análise conforme o objetivo a ser estudado (YE *et al.*, 2012; BASU *et al.*, 2015). O uso de iniciadores específicos pode ser explorado para vários fins na Fitopatologia, como identificação de espécies, subespécies e raças de fitopatógenos, detecção de mutação, detecção de infecção, diversidade genética, estudo evolucionário, entre outros (NEGREIROS *et al.*, 2019; REGO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019; 2020).

O desenho adequado de iniciadores específicos é o passo mais importante para uma amplificação específica bem sucedida do alvo de interesse. O processo de criação de iniciadores específicos normalmente envolve três estágios: desenho da sequência do iniciador, validação *in silico* e validação em laboratório. Inicialmente, são desenhadas as sequências dos iniciadores específicos de acordo com a região de interesse, que podem ser gerados manualmente ou usando programas de bioinformática (KIM, 2000; YE *et al.*, 2012; BASU *et al.*, 2015; KUMAR; CHORDIA, 2015). Em seguida, deve ser realizada a validação *in silico*, pela verificação da eficiência e da especificidade dos iniciadores em banco de dados de sequência de nucleotídeos apropriados como a Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (BLAST) para verificar os alvos potenciais (YE *et al.*, 2012). E por último, os melhores iniciadores devem ser sintetizados para realização do teste de PCR com amostras alvos e não-alvos (KUMAR; CHORDIA, 2015).

Inúmeros programas de bioinformática, como NetPrimer, Primer3, Primer3Plus, Primer3web, PrimerBank, Primer-Blast, PrimerCE, PrimerDesign, QuantPrime e Web Primer, entre outros, foram desenvolvidos para auxiliar no processo de desenho de iniciadores específicos (KUMAR; CHORDIA, 2015; RODRÍGUEZ *et al.*, 2015). Dentre estes, o programa Primer3 é amplamente utilizado e gera iniciadores específicos para uma determinada sequência de modelo com base em uma variedade de parâmetros. Uma vez que não executa a análise do alvo, os usuários geralmente precisam testar a especificidade do iniciador usando ferramentas adicionais (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Mais recentemente, o programa Primer-BLAST oferece um módulo que, além de gerar iniciadores específicos, também verifica a especificidade do alvo e alguns fatores de eficiência da PCR dos iniciadores gerados (YE *et al.*, 2012).

Os iniciadores específicos desenhados devem ser analisados para verificar se preenchem diversos requisitos para melhorar a chance de obter êxito na amplificação da região específica. Embora nem todos os aspectos do processo de PCR sejam completamente descritos e modelados, existem certos fatores que são conhecidos por afetar a taxa de sucesso da PCR.

Alguns desses fatores são descritos: (a) Comprimento dos iniciadores de 18-22 pares de base (bp): este comprimento é longo o suficiente para a especificidade adequada e curto o suficiente para que os iniciadores se liguem facilmente ao molde de DNA na temperatura de anelamento; (b) Temperatura *melting* dos iniciadores na faixa de 52-58 °C: evitando temperatura alta que apresenta tendência para anelamento secundário, nas etapas seguintes de desnaturação e extensão; (c) Cálculo da incompatibilidade de temperatura de *melting* do par dos iniciadores: os dois iniciadores devem ter temperaturas de *melting* próximas para maximizar o rendimento do produto de PCR, evitando diferença maior que 5 °C; (d) Temperatura de anelamento dos iniciadores: a temperatura de anelamento tem a maior influência na especificidade da PCR. Temperatura muito alta produzirá hibridização iniciador-molde insuficiente, resultando em baixo rendimento do produto de PCR. Temperatura muito baixa pode levar a produtos não específicos causados por um grande número de incompatibilidades de pares de bases; (e) O conteúdo de 40-60% guanina (G) e citosina (C) do total de bases do iniciador: os nucleotídeos G e C contém ligação mais forte com três pontes de hidrogênio, proporcionando maior estabilidade ao iniciador; (f) Grampo com G ou C: a presença das bases G e/ou C nas últimas cinco bases da extremidade dos iniciadores ajuda a promover a ligação específica na extremidade, devido à ligação mais forte das bases G e C; (g) Evitar repetições (di-nucleotídeo): que ocorre muitas vezes consecutivamente. Por exemplo: ATATATAT. Um número máximo aceitáveis é de 4 di-nucleotídeos; (h) Evitar execuções de base: exemplo, AGCGGGGGATGGGG tem execuções de base 'G' de valor 5 e 4. Um número máximo de execuções aceitas é 4 bp; (i) Incompatibilidades na extremidade 3' afetam a amplificação do alvo muito mais do que as incompatibilidades na extremidade 5': uma incompatibilidade de duas bases na extremidade 3' geralmente evita a amplificação. Uma única incompatibilidade de base (mesmo na extremidade 3'), bem como algumas incompatibilidades no meio ou próximo à extremidade 5', ainda permite a amplificação, embora com uma eficiência reduzida; (j) Comprimento do produto amplificado de 100 a 500 pares bases; (k) Posição do produto próximo das extremidades: geralmente, a sequência próxima à extremidade 3' é conhecida com maior confiança; (l) Temperatura *melting* do produto; e (m) Evitar homologia cruzada: é essencial que a sequência do iniciador seja altamente específica somente ao alvo (APTE; DANIEL, 2003; YE *et al.*, 2012; KUMAR; CHORDIA, 2015).

Idealmente, um par de iniciador específico deve amplificar apenas o alvo pretendido, mas não quaisquer alvos indesejados. Isso é possível devido à variação de bases da sequência no gene de uma determinada espécie para as demais espécies, permitindo a utilização dessa região variável presente na espécie como alvo para a amplificação diferencial (YE *et al.*, 2012; KUMAR; CHORDIA, 2015; RODRÍGUEZ *et al.*, 2015).

Estudos de filogenia com sequências de regiões dos genes codificadores de proteínas ACT, TUB, CAL e TEF- α para identificação das espécies de *Macrophomina* (SARR *et al.*, 2014, MACHADO *et al.*, 2019, ZHAO *et al.*, 2019) forneceram pistas importantes de sinais filogenéticos suficientes para a discriminação de espécies por iniciadores específicos (SANTOS *et al.*, 2020). A comparação dos dados da sequência de DNA de *M. pseudophaseolina* com *M. phaseolina* revelou a diferença de pares de bases nas regiões gênicas ACT com 2, CAL com 15, TEF-1 α com 22 e TUB com 15 (SARR *et al.*, 2014). A análise da sequência de DNA de *M. euphorbiicola* revelou diferença de *M. phaseolina* em relação aos pares de bases nas regiões ITS com 1, CAL com 13, TEF-1 α com 22 e TUB com 13. Em relação a *M. pseudophaseolina*, *M. euphorbiicola* revelou diferença de pares de bases nas regiões ACT com 1, CAL com 4, TEF-1 α com 26, TUB com 2 (MACHADO *et al.*, 2019). A comparação dos dados da sequência de DNA *M. vacinii* em relação a *M. phaseolina* revelou diferença de pares de bases apenas nas regiões TEF-1 α com 5 e ACT com 1. Em relação a *M. pseudophaseolina*, *M. vacinii* apresentou diferença de pares de bases nas regiões TEF-1 α com 17, TUB com 6 e ACT com 3. Para *M. euphorbiicola*, *M. vacinii* apresentou diferenças na região dos genes TEF-1 α com 13, TUB com 7 e ACT com 3 (ZHAO *et al.*, 2019). Uma vez encontrada a região diversificada e gerados os vários candidatos a iniciadores específicos, todos estes precisam passar por verificação de especificidade (YE *et al.* 2012; KUMAR; CHORDIA, 2015).

A verificação da especificidade dos iniciadores pode ser realizada com a utilização de programas computacionais, como *In-Silico* PCR e *Reverse* ePCR, que determinam os alvos de amplificação de pares de iniciadores fornecidos pelo usuário (ROTMISTROVSKY; JANG; SCHULER, 2004; KUMAR; CHORDIA, 2015). Mesmo com a ajuda dessas ferramentas, encontrar iniciadores específicos ainda pode ser um processo difícil, pois precisam passar por muitos iniciadores candidatos manualmente. O processo de pesquisa pode ser muito longo se cada par for pesquisado com BLAST individualmente. Além disso, uma vez que essas ferramentas computacionais usam principalmente uma estratégia baseada em índice, o que requer um pré-processamento computacionalmente intensivo do banco de dados de pesquisa, eles são limitados pela disponibilidade de bancos de dados e geralmente não são sensíveis o suficiente para detectar alvos que têm um número significativo de incompatibilidades com iniciadores ainda que sejam potencialmente amplificáveis (YE *et al.*, 2012).

Portanto, é desejável combinar vários elementos de requisitos de desenho de iniciadores em um processo, de modo que os usuários possam simplesmente inserir o modelo e obter os iniciadores específicos do alvo desejado. Nesse contexto, o programa Primer-BLAST projeta os iniciadores e verifica a sua especificidade simultaneamente, pois incorpora um mecanismo de alinhamento global muito sensível na detecção de correspondências entre os iniciadores e os

alvos de amplificação em potencial em um conjunto com banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia dos Estados Unidos da América (NCBI) com a interface de programação Primer3 (YE *et al.*, 2012). Para conseguir isso, a sequência do modelo dos iniciadores é submetida ao MegaBLAST (ZHANG *et al.*, 2000). O módulo de verificação de especificidade, por padrão, usa parâmetros de pesquisa BLAST que garantem alta sensibilidade de forma que ele possa detectar um alvo que contém até 35% de incompatibilidade com a sequência do iniciador. Proporcionando uma busca rápida para identificar sequências que são altamente semelhantes e as não intencionais dentro do banco de dados, que pode ser especificado pelo usuário ou até mesmo o número máximo de sequências existentes no banco de dados do NCBI (YE *et al.*, 2012).

Na última etapa, os iniciadores devem ser validados no laboratório com ensaios PCR. Nos ensaios serão avaliados em termos de estabilidade, especificidade e eficiência. A estabilidade dos iniciadores é verificada através do seu resultado em que sua molécula continue funcional durante todas as três etapas do ciclo da PCR a seguir: desnaturação, anelamento e extensão. Primeiro, o material genético é desnaturado, convertendo as moléculas de DNA de fita dupla em fitas simples. Os iniciadores serão anelados nas regiões complementares das moléculas de fita simples. Na terceira etapa, as seqüências alvo são estendidas pela ação da DNA polimerase. Todas essas etapas são sensíveis à temperatura e a escolha comum de temperaturas é em torno de 94 °C, 60 °C e 72 °C, respectivamente. Uma boa estabilidade do par de iniciadores é essencial para reações bem-sucedidas. Um segundo critério de qualidade essencial é a especificidade dos iniciadores. A especificidade é normalmente avaliada verificando através dos resultados de amplificação dos produtos de PCR com amostras alvo, não-alvo e controles positivo e negativo. A especificidade dos iniciadores é determinada através da amplificação apenas das amostras contendo o DNA alvo. Portanto, amostras não-alvo, controle positivo e negativo, devem ser analisadas em ensaios de PCR para constar que nenhum outro produto foi amplificado além do alvo. Se houver amplificações de não-alvo ou não-específico presente na reação de PCR, a polimerase tende a amplificar produtos inespecíficos e a especificidade dos iniciadores é comprometida. Portanto, para garantir alta confiança dos resultados obtidos, todos os produtos de PCR utilizados nos ensaios devem ser identificados previamente através de sequenciamento e análise filogenética confiável. E por último, a eficiência dos iniciadores é calculada a partir dos resultados da quantidade de amostras alvo amplificadas e não amplificadas (APTE; DANIEL, 2003; KUMAR; CHORDIA, 2015).

A elaboração de iniciadores específicos facilita a identificação de maneira rápida, precisa, de baixo custo, possibilitando a elaboração de levantamento em larga escala da distribuição de espécies para o monitoramento de epidemias (MA; MICHAILIDES, 2003;

PÉREZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2008; KARLSSON *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2021). Neste contexto, Babu *et al.* (2007) desenvolveram um iniciador específico para a detecção de *M. phaseolina* com base em sequência ITS. No entanto, esse iniciador específico foi baseado em uma única espécie, que até aquele momento era a conhecida, bem como desenhado com base na região ITS, que potencialmente não é útil para distinção das espécies de *Macrophomina* (SARR *et al.*, 2014, MACHADO *et al.*, 2019, ZHAO *et al.*, 2019). Atualmente, com a existência de três novas espécies de *Macrophomina*, a especificidade desse iniciador pode estar comprometida, além de não existirem iniciadores específicos para as demais espécies. Portanto, há necessidade do desenvolvimento de iniciadores específicos para facilitar a identificação e o monitoramento dessas espécies.

Com a ampla gama de hospedeiros de *Macrophomina*, é provável que mais de uma espécie desse fungo esteja causando doenças em cultivos no Brasil, como já constatado em pinhão-manso e mamona (MACHADO *et al.*, 2019), plantas invasoras em áreas de produção de melão (NEGREIROS *et al.*, 2019), mandioca (BRITO *et al.*, 2020) e batata-doce (MELLO *et al.*, 2021). Nesse contexto, o cultivo do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp)] tem destacada importância socioeconômica no Nordeste brasileiro, mas até o momento não existem estudos sobre a participação de outras espécies de *Macrophomina* além de *M. phaseolina* estarem causando doenças, apesar disso já ter sido comprovado no Senegal (SARR *et al.*, 2014).

3. Feijão-caupi

O feijão-caupi, também conhecido por caupi, feijão-de-corda, feijão-de-macassar, feijão-fradinho e feijão-miúdo, entre outros nomes (FREIRE FILHO; CARDOSO; ARAÚJO, 1983), é uma angiosperma da classe Dicotyledonea, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, seção Catyang, espécie *Vigna unguiculata* e subespécie *unguiculata* (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

Essa leguminosa caracteriza-se por ser uma planta herbácea anual que apresenta uma considerável diversidade morfológica. A estrutura da planta adulta varia dependendo do genótipo, da temperatura e do fotoperíodo que incidiram durante seu crescimento. Mas de forma geral, o porte da planta está dividido em ereto, semiereto, semiprostrado e prostrado, com hábito de crescimento indeterminado, podendo ser determinado em algumas variedades. O sistema radicular é formado por uma raiz principal, pivotante, com ramificações laterais, que podem atingir mais de 2 m de profundidade, e com os nódulos com funções principalmente na

fixação biológica de nitrogênio, sendo essa raiz, mais eficiente na absorção de água e nutrientes, provavelmente, a razão da notável resistência à seca (TIMKO; EHLERS; ROBERTS, 2007). O caule pode ter os formatos angular ou cilíndrico, ser estriado, liso ou apresentar pêlos, com pigmentação de coloração roxa. O primeiro par de folhas é simples e oposto, enquanto o restante está disposto em padrões alternativos e são trifoliados. As folhas são geralmente de cor verde escura. A sua inflorescência pode ser simples ou composta, do tipo racemosa ou intermediárias em extremidades distais, com as flores em pares alternados, geralmente com apenas duas a algumas flores por inflorescência. As flores são visíveis, autopolinizadas, suportada em pedicelos curtos e as corolas podem ser brancas, amarelo, rosa, azul pálido ou roxo (DAFFSA, 2011). Possui fruto tipo vagem, que varia em cor, forma, comprimento e número de sementes. De maneira geral, a vagem pode ter formas cilíndricas, curvadas ou retas, com coloração amarela, rosada, roxa ou rajada e variando entre 8 a 20 sementes por vagem. Duas ou três vagens por pedúnculo são comuns, no entanto, se as condições de crescimento forem muito favoráveis, quatro ou mais vagens podem ser carregadas em um único pedúnculo. A presença de longos pedúnculos é uma característica marcante da espécie, sendo algo que facilita a colheita manual (VALE *et al.*, 2017). O tempo de produção das vagens pode variar, dependendo do genótipo e do fotoperíodo. Em geral, genótipos com floração precoce podem produzir vagens secas em até 60 dias, genótipos com floração tardia podem requerer mais de 90 dias para a colheita (MEENA; KRISHNA; SINGH, 2015).

O feijão-caupi tem importante papel na vida de milhões de pessoas no mundo, especialmente em países em desenvolvimento da África, América Latina e Ásia. Nutricionalmente, é a principal fonte de proteínas complementar à dieta de tubérculos e cereais. O conteúdo total de proteína varia de 23 a 32% do peso do grão. Adicionalmente, os grãos de feijão-caupi são uma rica fonte de vitaminas e minerais, contendo um dos maiores teores de ácido fólico, uma vitamina do complexo B necessária durante a gravidez para a prevenção de defeitos no cérebro e coluna do feto (CAMPBELL; EUSTON; AHMED, 2016). Além disso, também é utilizado como forragem verde, feno, silagem, farinha para alimentação animal e, ainda, como adubação verde e proteção do solo (NOSOLINE, 2012).

O feijão-caupi tem grande importância para o desenvolvimento agrícola, sendo uma fonte geradora de renda e emprego em muitas regiões tropicais e subtropicais no mundo (FREIRE FILHO *et al.*, 2017), principalmente, em regiões secas, que possuem elementos de clima que exercem influência negativamente no desenvolvimento e no crescimento das maiores das culturas, destacam-se a precipitação pluviométrica, temperatura do ar, fotoperíodo, o vento, radiação solar e fertilidade do solo. O feijão-caupi é considerada uma cultura chave com elevado potencial estratégico para o desenvolvimento dessas regiões, por

apresentar alta rusticidade e adaptabilidade com capacidade de crescer nessas regiões com condições adversas, principalmente em relação à demanda hídrica e fertilidade do solo, adaptando-se bem às condições de menor disponibilidade hídrica é mais tolerante à seca do que muitas outras culturas (ANDRADE JÚNIOR; BASTOS; CARDOSO, 2017). Podendo ser cultivado em quase todos os tipos de solo e de baixa fertilidade devido a sua capacidade de estabelecer associações com microrganismos distintos, principalmente bactérias fixadoras de nitrogênio (MARTINS; MARTINS; BORGES, 2017).

Em 2017, a produção mundial de feijão-caupi foi cerca de 8.157 milhões de toneladas (t). A Nigéria destaca-se como principal país produtor (3.410 milhões t), respondendo por 42% da produção mundial, seguida pelo Níger (1.959 milhões t) e Brasil (788 mil t). Esses três países são responsáveis por aproximadamente 73% da produção mundial de grãos secos de feijão-caupi (FAO, 2021).

No Brasil, o feijão-caupi desempenha importante papel estratégico na segurança alimentar e nutricional de grande parte da população brasileira. Além disso, é um importante gerador de renda desde o agricultor familiar ao empresarial. Em 2019, a região Nordeste produziu 398.970 t em 1.012 milhão de hectares (ha) cultivados, com produtividade de 394 kg/ha. A região Centro-Oeste produziu 90.156 t em 78 mil ha cultivados, com produtividade de 1.150 kg/ha. A região Norte produziu 41.138 t em 33 mil ha cultivados, com produtividade de 804 kg/ha (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2020).

O feijão-caupi é cultivado em monocultivo ou em consórcio. No consórcio várias culturas podem ser utilizadas. O mais comum é milho, mas também é consorciado com sorgo, arroz, algodão herbáceo e mandioca. Os consórcios também podem ser feitos com plantas perenes como cajueiro, citros, mangueira e bananeira (CARDOSO; RIBEIRO; CÂMARA, 2017). Pode ser cultivado na maioria dos tipos de solo. De modo geral, em solos com teor de matéria orgânica regular, soltos, leves e profundos, arejados e dotados de média a alta fertilidade. Entretanto, também em solos com baixa fertilidade mediante a aplicação de fertilizantes químicos e/ou orgânicos (MELO; CARDOSO, 2017). Aliado com sua capacidade de estabelecer associações com microrganismos distintos, principalmente bactérias fixadoras de nitrogênio, possibilita o cultivo nas diversas regiões do Brasil (MARTINS; MARTINS; BORGES, 2017).

No Nordeste brasileiro, o cultivo do feijão-caupi se concentra nas áreas semiáridas, onde outras culturas, em razão da irregularidade das chuvas e das altas temperaturas, não conseguem se desenvolver satisfatoriamente. Esse cultivo é composto principalmente por pequenos produtores, em unidades de agricultura familiar com pouco uso de tecnologia. De modo contrário, as áreas da região do Cerrado nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste

apresentaram um expressivo desenvolvimento no seu cultivo nos últimos anos, sendo cultivado principalmente por médios e grandes empresários com produção em larga escala. Este fato está diretamente ligado ao interesse de agricultores, especialmente produtores de soja com base empresarial, possuidores de cultivo altamente tecnológico. Este interesse, é atribuído principalmente ao ciclo rápido de maturação, possibilitando a incorporação aos arranjos produtivos como safrinha utilizando da mesma tecnologia do cultivo principal aliado ao custo de produção bastante competitivo (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

Cultivado principalmente para a produção de grãos secos, o feijão-caupi vem crescendo e ganhando importância no mercado pela demanda por vagens e grãos verdes. O cultivo para grãos verdes não possui safra específica, sendo produzido durante o ano todo pelos agricultores. Os grãos verdes integram um segmento promissor, tanto para agricultores familiares como empresariais. Possibilitando à incorporação de novos produtores, com grande perspectiva de processamento industrial e ampliação do mercado consumidor interno, como também o mercado externo como principais compradores: Índia, Egito e Paquistão, também conquistando outros mercados, como de Portugal, Itália, Turquia, Emirados Árabes, Singapura, Indonésia, Nepal, Vietnã entre outros (FREIRE FILHO *et al.*, 2011, 2017; SILVA; ROCHA; MENEZES JÚNIOR, 2016).

Os estados do Nordeste brasileiro são responsáveis por 76% da produção e 89% da área cultivada com feijão-caupi, constituindo uma das principais culturas de subsistência. Os principais estados produtores são Ceará (107.052 t em 371.537 ha), Piauí (78.642 t em 190.380 ha), Bahia (75.629 t em 117.464 ha) e Pernambuco (49.889 t em 125.801 ha) (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2020).

Tendo em vista os frequentes períodos de seca na região semiárida do Nordeste brasileiro, o cultivo de feijão-caupi constitui uma excelente opção para os agricultores devido à sua maior resistência ao estresse hídrico, sendo a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda (BASTOS *et al.*, 2012). Contudo, sob tais condições, a produção está principalmente abaixo do seu potencial para a cultura e região. O potencial produtivo do feijão-caupi para o Nordeste brasileiro é indiscutível, mas a produtividade é baixa quando comparada ao obtido nas regiões Centro-Oeste e Norte (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2020). Vários fatores contribuem para essa baixa produtividade, destacando-se a instabilidade pluviométrica, o baixo emprego de tecnologia, a utilização de cultivares com potencial genético reduzido e a ocorrência de doenças e pragas (PEREIRA *et al.*, 2001; SILVA; ROCHA; MENEZES JUNIOR, 2016).

As doenças constituem importantes fatores de redução da produtividade do feijão-caupi, causando perdas na quantidade e qualidade dos grãos. Entre as doenças de maior severidade na

cultura do feijão-caupi no Nordeste brasileiro destacam-se as causadas por fungos habitantes do solo, como podridão cinzenta do caule (*Macrophomina* Petr.), rizoctoniose (*Rhizoctonia solani* Kühn), murcha-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii* Sacc.), murcha-de-fusário [*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) Snyder & Hansen] e podridão radicular seca [*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.] (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; ATHAYDE SOBRINHO, 2016, 2017; LIMA, 2017).

4. Podridão cinzenta do caule

A podridão cinzenta do caule do feijão-caupi tem destacada importância no Nordeste brasileiro, principalmente em regiões semiáridas (ATHAYDE SOBRINHO, 2016; GOMES-SILVA *et al.*, 2017; LIMA, 2017). Os danos causados por *Macrophomina* em feijão-caupi podem variar dependendo do órgão e do estágio de desenvolvimento da planta e das condições ambientais, mas podem chegar a 100% de perdas no rendimento da cultura (GOMES-SILVA *et al.*, 2017).

Os sintomas da podridão cinzenta do caule podem se manifestar em todos os estágios de desenvolvimento da planta de feijão-caupi. Em plântulas, os sintomas são observados nos cotilédones na forma de necroses com coloração escuras, que progridem para as margens dos cotilédones, coalescendo em lesões irregulares ligeiramente deprimidas no caule da planta, podendo levar a morte da mesma (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012; NDIAYE *et al.*, 2015). Em plantas adultas, observa-se a presença de lesões caulinares de cor acinzentada com desenvolvimento mais lento. Essas lesões levam à obstrução dos vasos do xilema resultando na morte das raízes e do caule (NDIAYE *et al.*, 2015). Na superfície das lesões são muitas vezes observadas inúmeras pontuações negras, os picnídios, que constituem as estruturas reprodutivas do patógeno e servem como fontes de dispersão do patógeno no campo. Em condições adversas, o patógeno forma estruturas de resistência no solo, denominadas microscleródios (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ATHAYDE SOBRINHO, 2016)

O ciclo da podridão cinzenta do caule é representado pelas fases de sobrevivência, germinação, penetração, infecção e colonização. Os microscleródios, como estruturas de sobrevivência produzidas nas raízes e tecidos do caule de seus hospedeiros, servem como fonte primária de inóculo. Os microscleródios germinam e apressórios são formados a partir dos tubos germinativos, que pode penetrar diretamente a epiderme do hospedeiro pela secreção de enzimas degradadoras de parede celular, bem como por aberturas naturais e ferimentos dos cotilédones e superfície das raízes. Após a penetração, a infecção ocorre através das hifas infectivas que se espalham intercelularmente no tecido vascular do hospedeiro crescendo

através do córtex e, alcançando os vasos do xilema. Uma vez dentro dos tecidos vasculares, a colonização micelial, seguida pela formação de microescleródios, provocam a obstrução dos vasos, evitando que a água e os nutrientes sejam transportados da raiz para a parte superior das plantas, resultando na murcha da planta. A produção de toxinas e a degradação enzimática também podem levar à murcha. Com a morte da planta, os microescleródios formados nos tecidos são liberados no solo, servindo como inóculo para um novo ciclo da doença (KAUR *et al.* 2012a; MARQUEZ *et al.*, 2021).

O sequenciamento completo do genoma de *M. phaseolina* revelou alguns mecanismos que possibilitam a sobrevivência desse microrganismo com bastante êxito em condições ambientais adversas. Essa espécie tem adaptabilidade a amplas faixas osmóticas e de pH, o que pode ser um fator que contribui para a natureza difusa desse microrganismo. É capaz de crescer em concentrações de sais de sódio de 1-8%, com crescimento máximo de 2-4%. A utilização eficiente de vários osmólitos, pequenas moléculas orgânicas que foram selecionadas para contrabalançar estresses ambientais em organismos vivos, fornece pistas para a estratégia de osmo adaptação de *M. phaseolina* e indica que pode ser uma ameaça maior em áreas com solos salinos. Outra informação relevante do genoma é a presença de proteínas receptoras de superfície celular, que são responsáveis por detectar o pH ambiente. Além disso, existem várias proteínas de fosfatases ácidas e alcalinas, indicando a capacidade extraordinária de neutralizar ambientes ácidos e alcalinos para o seu crescimento. Os resultados revelaram que *M. phaseolina* pode crescer em pH variando de fortemente ácido a alcalino (pH 3,5 a 10), com crescimento máximo entre pH 5 e 7. Portanto, *M. phaseolina* possui um robusto sistema sensor de pH que permite sua adaptação às condições adversas (ISLAM *et al.*, 2012).

Os microescleródios desempenham importante papel na sobrevivência de *Macrophomina*, mas também constituem um fator preponderante no início e no desenvolvimento da doença. Essas estruturas, produzidas nas raízes e nos tecidos do caule, são liberadas no solo e distribuídas geralmente em aglomerados, ficando localizadas no solo na profundidade de 0 a 20 cm (MIHAIL, 1989; CAMPBELL; VAN DER GAAG, 1993; MARQUEZ *et al.*, 2021). Alta umidade do solo, baixa relação C:N, baixa densidade do solo e concentração de oxigênio menor que 16% reduzem a viabilidade de microescleródios no campo (DHINGRA; SINCLAIR, 1975; GANGOPADHYAY; WYLLIE; TEAGUE, 1982). Dependendo das condições ambientais e da associação dos microescleródios com os resíduos dos hospedeiros, os microescleródios podem sobreviver de 2 a 15 anos (SHORT; WYLLIE; BRISTOW, 1980; BAIRD; WATSON; SCRUGGS, 2003). A população de *Macrophomina* aumenta no solo com o aumento dos anos de cultivo de culturas suscetíveis (LODHA; MATHUR; SOLANKI, 1990).

A importância da podridão cinzenta do caule aumenta devido à capacidade de *Macrophomina* sobreviver em condições adversas e na ausência do hospedeiro, bem como possuir elevada capacidade de colonização saprofítica, principalmente pela formação de picnídios e microescleródios nos restos culturais (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; LIMA, 2017; MARQUEZ *et al.*, 2021). Outro aspecto relevante é a capacidade que possui de colonizar plantas invasoras, que na maioria das vezes permanecem assintomáticas, e possibilitam a sobrevivência do patógeno de uma safra para a outra na ausência da planta hospedeira (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; FUHLBOHM; RYLEY; AITKEN, 2012; NEGREIROS *et al.*, 2019).

Os sintomas da podridão cinzenta do caule são mais evidentes em condições que reduzem o vigor das plantas, como solo de baixa fertilidade (SINCLAIR; BACKMAN, 1989), solo compactado (ALMEIDA *et al.*, 2014), baixo teor de água no solo (KENDIG; RUPE; SCOTT, 2000), altas temperaturas (MIHAIL, 1989; ALMEIDA *et al.*, 2014; LIMA, 2017) e lesões nas raízes (CANADAY *et al.*, 1986).

Temperaturas elevadas (35 °C) associadas a estresse hídrico na planta são consideradas condições ideais para a infecção por *Macrophomina* (DHINGRA; SINCLAIR, 1978; LIMA, 2017). O aumento na temperatura desencadeia a natureza patogênica dos microescleródios de *Macrophomina* e torna os hospedeiros vulneráveis à infecção (OLAYA; ABAWI, 1996). Isso se deve ao fato de que, em temperaturas mais altas aliadas a condições de seca, *Macrophomina* produz grande número de microescleródios (AKHTAR; SARWAR; ARSHAD, 2011), e também aumenta a produção de enzimas hidrolíticas dentro dos microescleródios, o que torna essas estruturas mais propícias à infecção (KAUR *et al.*, 2012b). A baixa umidade do solo promove a sobrevivência de microescleródios por um longo período de tempo, resultando em aumento da atividade saprofítica (DHINGRA; SINCLAIR, 1978), enquanto a alta umidade do solo impede a sobrevivência dos microescleródios (ARORA; PAREEK, 2013). Baixa umidade do solo é considerada um fator de predisposição mais importante para doenças induzidas por *Macrophomina* do que temperatura elevada (LODHA; MAWAR, 2020).

O controle da podridão cinzenta do caule é muito difícil, pois o patógeno possui elevada agressividade, combinada com capacidade de sobrevivência no solo na ausência da planta hospedeira, transmissibilidade pelas sementes e ampla gama de hospedeiros (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005; GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012; KAUR *et al.*, 2012a; MARQUEZ *et al.*, 2021).

As principais formas de controle da podridão cinzenta do caule do feijão-caupi envolvem a utilização de sementes sadias e certificadas, plantio em áreas livre do patógeno, uso da resistência genética do hospedeiro e eliminação de restos de cultura infectados (ATHAYDE

SOBRINHO, 2016). Além disso, práticas que melhoram as condições físicas do solo e o uso de cultivares com maior tolerância à seca e/ou temperaturas altas, contribuem para a manutenção em níveis baixos de incidência e severidade da podridão cinzenta do caule (ALMEIDA *et al.*, 2014). Não existem fungicidas registrados para o controle de *Macrophomina* em feijão-caupi no Brasil. No entanto, para o controle desse patógeno em feijão-comum são registrados fungicidas químicos à base dos princípios ativos carboxina + tiram, fludioxonil e difenoconazol, bem como fungicidas microbiológicos à base do fungo *Trichoderma harzianum* Rifai, todos aplicados como tratamento de sementes (MAPA, 2021). Nenhuma medida de manejo isolada pode ser considerada efetiva no controle da podridão cinzenta do caule e, portanto, a integração de medidas pode resultar na melhoria do controle da doença (LODHA; MAWAR, 2020).

Na perspectiva do desenvolvimento de medidas mais eficazes para o manejo da podridão cinzenta do caule do feijão-caupi, torna-se fundamental a identificação precisa dos agentes patogênicos envolvidos. Por muito anos, apenas *M. phaseolina* foi associada à doença em feijão-caupi, mas em 2014 foi constatado que *M. pseudophaseolina*, também causava a doença no Senegal (SARR *et al.*, 2014). Não há registro de que as duas outras espécies de *Macrophomina* (*M. euphorbiicola* e *M. vaccinii*) causem a podridão cinzenta do caule em feijão-caupi. Portanto, torna-se necessário realizar estudos de identificação das espécies de *Macrophomina* para compreender a prevalência e a distribuição das espécies presentes nos cultivos de feijão-caupi no Brasil.

Diante do exposto, os objetivos dessa tese foram: (i) desenvolver iniciadores específicos para identificação das espécies de *Macrophomina*; (ii) avaliar a eficácia dos iniciadores específicos para identificação das espécies de *Macrophomina*; (iii) identificar com iniciadores específicos as espécies de *Macrophomina* associadas com a podridão cinzenta do feijão-caupi no Nordeste brasileiro; (iv) caracterizar a prevalência das espécies de *Macrophomina* associadas à podridão cinzenta do feijão-caupi no Nordeste brasileiro; (v) analisar a patogenicidade e a agressividade de isolados representativos das espécies de *Macrophomina* associados à podridão cinzenta do feijão-caupi no Nordeste brasileiro.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, K. P.; SARWAR, G.; ARSHAD, H. M. I. Temperature response, pathogenicity, seed infection and mutant evaluation against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot disease of sesame. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 44, n. 3, p. 320-330, 2011.
- ALMEIDA, A. M. R. *et al.* **Macrophomina phaseolina em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55 p. (Embrapa Soja. Documentos, 346).
- ANDRADE JÚNIOR, A. S.; BASTOS, E. A.; CARDOSO, M. J. Clima. *In*: BASTOS, E. A. (ed.). **Cultivo de feijão-caupi**. 2. ed. [online]. Teresina: Embrapa Meio Norte, 2017. Disponível em:
https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao16_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=9109&p_r_p_-996514994_topicoId=1304. Acesso em: 07 abr. 2021.
- APTE, A.; DANIEL, S. PCR primer design. *In*: DIEFFENBACH, C. W.; DVEKSLER, G. S. (ed.). **PCR primer: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2003. p. 61-74.
- ARORA, M.; PAREEK, S. Effect of soil moisture and temperature on the severity of *Macrophomina* charcoal rot of sorghum. **Indian Journal of Scientific Research**, Lucknow, v. 4, n. 1, p. 155-158, 2013.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. Doenças fúngicas. *In*: CARDOSO, M. J. (ed.). **Feijão-caupi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, 2017. p. 149-161.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. Principais doenças do feijão-caupi no Brasil. *In*: BASTOS, E. A. (ed.). **A cultura do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2016. p. 44-66.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças fúngicas e bacterianas. *In*: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 461-484.
- BABU, K. B. *et al.* Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species specific oligonucleotide primers and probe. **Mycologia**, Bronx, v. 99, n. 6, p.733-739, 2007.
- BAIRD, R. E.; WATSON, C. E.; SCRUGGS, M. Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 5, p. 563-566, 2003.
- BASTOS, E. A. *et al.* Parâmetros fisiológicos e produtividade de grãos verdes do feijão-caupi sob déficit hídrico. **Water Resources and Irrigation Management**, Cruz das Almas, v. 1, n. 1, p. 31-37, 2012.
- BASU, C. (ed.). **PCR primer design**. 2. ed. New York: Springer, 2015. 216 p.
- BICKFORD, D. *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2006.

- BITANCOURT, A. A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, São Paulo, v.1, n. 2, p.41, 1935.
- BRITO, A. C. Q. *et al.* Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with black root rot and stem cutting dry rot in *Manihot esculenta* in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 157, n. 1, p. 583-598, 2020.
- CAMPBELL, C. L.; VAN DER GAAG, D. J. Temporal and spatial dynamics of microsclerotia of *Macrophomina phaseolina* in three fields in North Carolina over four to five years. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 12, p. 1434-1440, 1993.
- CAMPBELL, L.; EUSTON, S. R.; AHMED, M. A. Effect of addition of thermally modified cowpea protein on sensory acceptability and textural properties of wheat bread and sponge cake. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 194, n. 1, p. 1230-1237, 2016.
- CANADAY, C. H. *et al.* Effects of herbicide-induced stress on root colonization of soybeans by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 70, n. 8, p. 863-866, 1986.
- CARDOSO, M. J.; RIBEIRO, V. Q.; CÂMARA, J. A. S. Cultivo consorciado. *In*: CARDOSO, M. J. (ed.). **Feijão-caupi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, 2017. p. 139-147.
- CROUS, P. W. *et al.* Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, n. 1, p. 235-253, 2006.
- DAFFSA (DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES OF SOUTH AFRICA). **Production guidelines for cowpea**. Pretoria: Department of Agriculture, Forestry and Fisheries of South Africa, 2014. 16 p.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil: effects of soil moisture, carbon: nitrogen ratios, carbon sources, and nitrogen concentrations. **Phytopathology**, Lancaster, v. 65, n. 2, p. 236-240, 1975.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1978. 166 p.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2019): área, produção e rendimento** [online]. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2020. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em: 05 abr. 2021.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **FAOSTAT** [online]. Rome: Food and Agriculture Organization, 2020. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 05 abr. 2021.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungus-host distribution database** [online]. Beltsville: United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service, 2021. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>. Acesso em: 05 abr. 2021.
- FREIRE-FILHO, F. R. *et al.* **Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

- FREIRE FILHO, F. R. *et al.* A cultura: Aspectos socioeconômicos. *In:* VALE, J. C.; BERTINI, C.; BORÉM, A. (ed.). **Feijão-caupi: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2017. p. 9-34.
- FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; ARAÚJO, A. G. Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 12, p. 1369-1372, 1983.
- FUHLBOHM, M. J.; RYLEY, M. J.; AITKEN, E. A. B. New weed hosts of *Macrophomina phaseolina* in Australia. **Australasian Plant Disease Notes**, Canberra, v. 7, n. 1, p. 193-195, 2012.
- GANGOPADHYAY, S.; WYLLIE, T. D.; TEAGUE, W. R. Effect of bulk density and moisture content of soil on the survival of *Macrophomina phaseolina*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 68, n. 2, p. 241-247, 1982.
- GOMES-SILVA, F. *et al.* Genetic diversity of isolates of *Macrophomina phaseolina* associated with cowpea from Brazil semi-arid region. **Journal of Agricultural Science**, Ottawa, v. 9, n. 11, p. 112-116, 2017.
- GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 4, p. 167-180, 2012.
- ISLAM, S. *et al.* Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics**, Chichester, v. 13, n. 4, p. 493-509, 2012.
- KARLSSON, I. *et al.* Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 82, p. n. 4, 491-501, 2016.
- KAUR, S. *et al.* Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 38, n. 2, p. 136-51, 2012a.
- KAUR, S. *et al.* Carbohydrate degrading enzyme production by the plant pathogenic mycelia and pycnidia strains of *Macrophomina phaseolina* through koji fermentation. **Industrial Crops and Products**, Maastricht, v. 36, n. 1, p. 140-148, 2012b.
- KENDIG, S. R.; RUPE, J. C.; SCOTT, H. D. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, n. 8, p. 895-900, 2000.
- KIM, T. D. PCR primer design: an inquiry-based introduction to bioinformatics on the World Wide Web. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, New York, v. 28, n. 2, p. 274-276, 2000.
- KUMAR, A.; CHORDIA, K. In silico PCR primer designing and validation. *In:* BASU, C. (ed.). **PCR primer design**. New York: Springer, 2015, p. 143-151.

LIMA, C. S. Manejo de doenças. In: DOVALE, J. C.; BERTINI, C.; BORÉM, A. (ed.). **Feijão-caupi: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2017. p. 142-170.

LODHA, S.; MATHUR, B. K.; SOLANKI, K. R. Factors influencing population dynamics of *Macrophomina phaseolina* in arid soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 125, n. 1, p. 75-80, 1990.

LODHA, S.; MAWAR, R. Population dynamics of *Macrophomina phaseolina* in relation to disease management: A review. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 168, n. 1, p. 1-17, 2020.

LU, Y. *et al.* Specific PCR-based detection of *Phomopsis heveicola* the cause of leaf blight of Coffee (*Coffea arabica* L.) in China. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 72, n. 4, p. 438-444, 2021.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. A PCR-based technique for identification of *Fusicoccum* sp. from pistachio and various other hosts in California. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 5, p. 515-520, 2002.

MACHADO, A. R. *et al.* Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 153, n. 1, p. 89-100, 2019.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Agrofit**: Sistema de agrotóxicos fitossanitários [online]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2021. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 05 mai. 2021.

MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S.; BORGES, W. L. Correção da acidez, adubação e fixação biológica. In: VALE, J. C.; BERTINI, C.; BORÉM, A. (ed.). **Feijão-caupi: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2017. p. 89-112.

MEENA, H. K.; KRISHNA, K. R.; SINGH, B. Genetic variability, heritability and genetic advance in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **The Journal of Plant Science Research**, New Delhi, v. 31, n. 1, p. 13, 2015.

MELO, F. B.; CARDOSO, M. J. Manejo de solo. In: CARDOSO, M. J. (ed.). **Feijão-caupi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa, 2017. p. 67-74.

MELLO, J. F. *et al.* Identification and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with root and stem rot of sweet potato in Brazil. **Plant Pathology**, London, 2021. Artigo aceito. DOI: 10.1111/ppa.13395. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.13395>. Acesso em: 08 mai. 2021.

MARQUEZ, N. *et al.* *Macrophomina phaseolina*: general characteristics of pathogenicity and methods of control. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 12, 634397, 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.634397. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.634397/full>. Acesso em: 08 mai. 2021.

MIHAIL, D. J. *Macrophomina phaseolina*: spatio-temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. **Phytopathology**, St. Paul, v. 79, n. 8, p. 848-855, 1989.

- MULLIS, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, New York, v. 51, n. 1, p. 263-73, 1986.
- MYCOBANK. **Mycobank database**: fungal databases, nomenclature & species banks. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, 2021. Disponível em: <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>. Acesso em: 11 abr. 2021.
- NDIAYE, M. *et al.* Is the recently described *Macrophomina pseudophaseolina* pathogenically different from *Macrophomina phaseolina*? **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 9, n. 45, p. 2232 -2238, 2015.
- NEGREIROS, A. *et al.* Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin v. 167, n. 6, p. 326-337, 2019.
- NOSOLINE, S. M. **Avaliação da produção de biomassa vegetal e grãos por cultivares de feijão-caupi**. 2012. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- OLAYA, G.; ABAWI, G. S. Effect of water potential on mycelial growth and on production and germination of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 12, p. 1347-1350, 1996.
- PEREIRA, P. A. A. *et al.* Produto feijão: perspectivas de produção, do consumo e do melhoramento genético. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, 5., 2001, Teresina. **Anais [...]** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p. 307-311.
- PÉREZ-HERNÁNDEZ, O. *et al.* Development of nested polymerase chain reaction assay for detection of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 12, p. 1655-1661, 2008.
- PHILLIPS, A. J. L. *et al.* The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.76, n. 1, p.51-167, 2013.
- RÊGO, T. J. S. *et al.* Genetic diversity and population structure of *Lasiodiplodia theobromae* from different hosts in northeastern Brazil and Mexico. **Plant Pathology**, Oxford, v. 68, n. 5, p. 930-938, 2019.
- RODRÍGUEZ, A. *et al.* Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. In: BASU, C. (ed.). **PCR primer design**. New York: Springer, 2015, p. 31-56.
- ROTMISTROVSKY, K.; JANG, W.; SCHULER, G. D: A web server for performing electronic PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 108-112, 2004.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 132, n. 3, p. 365-386, 2000.
- SANTOS, K. M. *et al.* Sensitivity to methyl benzimidazole carbamate fungicides of Botryosphaeriaceae species from mango orchards in the Northeast of Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 153, n. 1, p. 209-222, 2019.

- SANTOS, K. M. *et al.* Novel specific primers for rapid identification of *Macrophomina* species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 156, n. 1, p. 1213-1218, 2020.
- SARR, M. P. *et al.* Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 53, n. 2, p. 250-268, 2014.
- SHORT, G. E.; WYLLIE, T. D.; BRISTOW, P. R. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 1, p. 13-17, 1980.
- SILVA, K. J. D.; ROCHA, M. M.; MENZES JÚNIOR, J. Â. N. Socioeconômico. In: BASTOS, E. A. (ed.). **A cultura do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2016. p. 44-66.
- SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of soybean diseases**. 3. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989. 106 p.
- SUTTON, B. C. (Ed.). **The Coelomycetes: fungi imperfecti with acervuli, pycnidia and stromata**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980, 696 p.
- TIMKO, M. P.; EHLERS, J. D.; ROBERTS, P. A. Cowpea. In: KOLE, C. (ed.). **Pulses, sugar and tuber crops**. Berlin: Springer, 2007. p. 49-67.
- URBEN, A. F.; DIANESE, J. C.; MENDES, M. A. S. (org.). **Fungos em plantas no Brasil**. 2. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019. 978 p.
- VALE, J.C.; BERTINI, C.; BOREM, A. **Feijão-caupi: do plantio a colheita**. 1. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2017. 267 p.
- VALE, J.C. *et al.* Botânica e fenologia. In: VALE, J. C.; BERTINI, C.; BOREM, A. (ed.). **Feijão-caupi: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2017. p. 35-51.
- WANG, X. *et al.* Detection of *Puccinia striiformis* in latently infected wheat leaves by nested polymerase chain reaction. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 7-8, p. 490-493, 2009.
- YE, J. *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, London, v. 13, e134, 2012. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-13-134>. Acesso em: 11 fev. 2021.
- ZHANG, Z. *et al.* A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.
- ZHAO, L. *et al.* *Macrophomina vaccinii* sp. nov. causing blueberry stem blight in China. **MycoKeys**, Sofia, v. 55, n. 1, p. 1-14, 2019.

CAPÍTULO II

Novel specific primers for rapid identification of *Macrophomina* species

Publicação: **European Journal of Plant Pathology**
Dordrecht, Holanda
v. 156, p. 1213-1218, 2020
Comunicação Curta
JCR = 1,582 / Qualis = A2

Novel specific primers for rapid identification of *Macrophomina* species

Kledson M. Santos • Grazielle S. Lima • Ana P. O. Barros • Alexandre R. Machado •
Cristina M. Souza-Motta • Kamila C. Correia • Sami J. Michereff

Accepted: / Published online:

K. M. Santos • G. S. Lima • A. P. O. Barros

Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
52171-900, Recife, PE, Brazil

A. R. Machado • C. M. de Souza-Motta

Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-600, Recife, PE,
Brazil

K. C. Correia • S. J. Michereff

Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Universidade Federal do Cariri, 63133-610,
Crato, CE, Brazil

S. J. Michereff (✉)

e-mail: sami.michereff@ufca.edu.br

ORCID <http://orcid.org/0000-0002-2156-3502>

A. R. Machado

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-7440-3097>

Abstract *Macrophomina* is a widely distributed genus of phytopathogenic fungi with a wide range of plant hosts. The present study aimed to design specific primers for the rapid identification/detection of three *Macrophomina* species (*M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. euphorbiicola*). The reference sequences of four nuclear genes actin (ACT), β -tubulin (β T), calmodulin (CAL) and translation elongation factor 1-alpha (TEF1- α) of each *Macrophomina* species were submitted for the generation of specific primers using automated software packages. The better specific primers set generated for detection of each species were

selected and synthesized. Polymerase chain reaction (PCR)-based assays were conducted to verify the specificity with isolates of the three species of *Macrophomina* and 42 species of other genera. Three primer sets to amplify of regions CAL (MpCalF/MpCalR, MsCalF/MsCalR and MeCalF/MeCalR) and three primer sets to amplify of regions TEF-1 α (MpTefF/MpTefR, MsTefF/MsTefR and MeTefF/MeTefR) were designed for *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. euphorbiicola*, respectively. The specific primers MpCalF/MpCalR from region CAL amplified only the isolates of *M. phaseolina*. However, the MsCalF/MsCalR and MeCalF/MeCalR amplified non-target isolates. The specific primers MpTefF/MpTefR, MsTefF/MsTefR, MeTefF/MeTefR from region TEF-1 α , exhibited high specificity in amplifying only the target isolates. No fragment was detected from other fungal species tested, confirming high specificity of these primers. This is the first report to develop specific primers for the identification of *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. euphorbiicola*. The present study reveals that the primer sets can be used for molecular identification and will facilitate a largescale survey of the distribution of species and monitoring the epidemics.

Keywords *Macrophomina phaseolina* • *Macrophomina pseudophaseolina* • *Macrophomina euphorbiicola* • Molecular detection • Calmodulin • Translation elongation factor 1-alpha

The genus *Macrophomina* is an important phytopathogen of the family Botryosphaeriaceae, with a worldwide distribution and a wide range of hosts. It has been reported in more than 700 species of host plants globally (Farr and Rossman 2019).

For many years, the distinction of *Macrophomina* species was problematic for the mycologists and plant pathologists. Even though five species have been described in the past for *Macrophomina*, studies suggest that the genus could be monotypic consisting of *Macrophomina phaseolina* (Phillips et al. 2013). However, after the ephytification of the species, *M. phaseolina* and the use of the multilocus phylogenetic analysis, a better resolution and distinction of the species was made possible. Based on this approach, it was proposed a new species in this genus (Sarr et al. 2014; Machado et al. 2019).

Macrophomina phaseolina is the most common species and represents the type of the genus that was described in 1947 from *Phaseolus* in Italy (Dhingra and Sinclair 1978). *Macrophomina pseudophaseolina* was described in 2014, causing charcoal rot on cowpea (*Vigna unguiculata*), peanut (*Arachis hypogaea*), sorrel (*Hibiscus sabdarifa*), and okra (*Abelmoschus esculentus*) in Senegal (Sarr et al. 2014), and subsequently in peanut, cotton (*Gossypium hirsutum*), and castor bean (*Ricinus communis*) in Brazil (Machado et al. 2019).

Macrophomina euphorbiicola was described in 2018, causing charcoal rot on castor bean and bellyache bush (*Jatropha gossypifolia*) in Brazil (Machado et al. 2019).

The identification of *Macrophomina* species by morphological analysis is considered impossible, mainly due to the overlap of the conidia features between the species (Machado et al. 2019). Currently, the distinction of *Macrophomina* species is based on multilocus phylogenetic analysis of sequences of internal transcribed spacer (ITS) of rDNA, actin (ACT), β -tubulin (β T), calmodulin (CAL) and translation elongation factor 1-alpha (TEF1- α) (Sarr et al. 2014; Machado et al. 2019). However, this technique is laborious, expensive, and requires time and knowledge of phylogenetic analysis for identifying the species. Alternatively, the use of specific primers in a conventional polymerase chain reaction (PCR) can provide an accurate, reproducible, and rapid identification/detection of the species, besides it is inexpensive and easy to perform (Boonham et al. 2016).

The identification of fungal pathogens through PCR using species-specific primers has been widely used, particularly for economically important plant pathogens (Babu et al. 2007; Ni et al. 2012; Fan et al. 2015). In this context, specific primers were already developed for identification of *M. phaseolina*, based on ITS region (Babu et al. 2007). However, it is known that ITS sequences alone did not present sufficient variation to distinguish the three *Macrophomina* species (Sarr et al. 2014; Machado et al. 2019). Therefore, this study aimed to design species-specific primers to be used for rapid identification/detection of *Macrophomina* species based on more informative gene regions.

The reference sequences were obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) of NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA), of four nuclear genes, including ACT, β T, CAL and TEF-1 α from *M. phaseolina* (CBS 205.47 and CPC 21420), *M. pseudophaseolina* (CPC 21417) and *M. euphorbiicola* (CMM 4134) (Supplementary Table 1) (Crous et al. 2006; Sarr et al. 2014; Machado et al. 2019). The reference sequences of each region and species of *Macrophomina* were submitted for the generation of specific primers using automated software packages including Primer3 Plus (Hung and Weng 2016) and Primer-BLAST (Ye et al. 2012). In addition, the sequences were aligned using CLUSTAL X version 2.0 (Larkin et al. 2007) and exported as a Nexus file. The conserved and variable sites were searched and selected for a manual specific primers design.

All specific primers generated were tested for specificity by in silico PCR and were submitted for validation to the BLAST analysis against the NCBI database (Kumar and Chordia 2015). The BLAST search was carried out against the nucleotide (nr) database fungi. Specific

primers that align only with the sequence of the target species and in their entirety were considered validated. In addition, for each specific primers the following parameters were checked: primer length, primer melting temperature, GC content, GC clamp, primer secondary structures (hairpins, self-dimer, and cross dimer), repeats, runs, 3' end stability, avoid template secondary structure, avoid cross homology, amplicon length, product position, tm of product, optimum annealing temperature, primer pair tm mismatch calculation (Kumar and Chordia 2015). The better primer set for detection of each species was selected and synthesized by IDT (Integrated DNATechnologies Inc., San Diego, EUA), and were used in subsequent assays to test their specificity.

The selected specific primers were tested with genomic DNA from the three species of *Macrophomina*, based on different isolates for each species. All isolates were identified by multilocus phylogenetic analysis conducted in a previous study (Machado et al. 2019) and obtained from the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” (CMM) at the Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil) (Supplementary Table 2).

For extracting genomic DNA, the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, USA) was used, following the manufacturer’s instructions. To assess whether each DNA sample is of the right quality for PCR, a Thermo Scientific NanoDrop 2000 was used to determine the concentration and purity of the DNA.

PCR amplifications were performed using 6.25 µl of GoTaq® Green Master Mix (2X) (Promega Corporation, Madison, USA), 4.25 µl of nuclease-free water, 0.5 µl of each primer (forward and reverse) and 1 µl of DNA template (25 ng/ µl). PCR without the addition of DNA was used as negative control. PCR with primers ITS1/ITS4 (White et al. 1990) and with the addition of the DNA template was used as the positive control. Amplifications of the tested primers were performed using the program: initial denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 63 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min; one cycle of final extension at 72 °C for 10 min, and final incubation at 4 °C. Amplification conditions were the same for ITS, except for an optimized annealing temperature of 48 °C. PCR products were analyzed with 1.5% agarose electrophoresis gels stained with GelRed (Biotium, California, USA) and photo-documented under UV light. The size of the fragments was checked using a 100 bp DNA ladder (Kasvi, Brazil).

Each specific primer was tested with representative isolates of other genera of fungi to confirm the specificity. Forty-two fungal isolates belonging to the following different genera were used: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Fusicoccum*,

Lasiodiplodia, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Paramyrothecium*, *Phaeoacremonium*, *Pseudofusicoccum*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Thielaviopsis* and *Trichoderma* (Supplementary Table 3). Procedures for obtaining genomic DNA from the isolates, PCR amplification with the specific primers, and interpretation of the results were the same as described above. Specific primers that amplified only their target species were considered validated.

The software Primer3 Plus and Primer-BLAST facilitated the generation of the candidate-specific primer sets using reference sequences of regions ACT, β T, CAL, and TEF-1 α (Supplementary Table 1), and examined a total of 10,124 BLAST matches. The regions CAL and TEF-1 α were selected for presenting specificity and parameters for the primer designs.

Three primer sets to amplify CAL, namely MpCalF/MpCalR, MsCalF/MsCalR, and MeCalF/MeCalR, were designed for *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. euphorbiicola*, respectively (Table 1). The specific primers MpCalF/MpCalR from CAL region amplified only the isolates of *M. phaseolina* (Table 2 and Supplementary Fig. 1A, lanes 1–5) and exhibited high specificity in detection. However, the MsCalF/MsCalR amplified the isolates of *M. pseudophaseolina* (Table 2 and Supplementary Fig. 1B, lanes 6–10) and *M. euphorbiicola* (Table 2 and Supplementary Fig. 1B, lanes 12–14). The MeCalF/MeCalR amplified all isolates of all species (Table 2 and Supplementary Fig. 1C, lanes 1–15).

Three primer sets to amplify TEF-1 α , namely MpTefF/MpTefR, MsTefF/MsTefR, and MeTefF/MeTefR, were designed for *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. euphorbiicola*, respectively. The specific primers MpTefF/MpTefR, MsTefF/MsTefR, and MeTefF/MeTefR from region TEF-1 α , exhibited high specificity in detecting *M. phaseolina* (Table 2 and Supplementary Fig. 2A, lanes 1–5), *M. pseudophaseolina* (Table 2 and Supplementary Fig. 2B, lanes 6–10), and *M. euphorbiicola* (Table 2 and Supplementary Fig. 2C, lanes 11–15), respectively. No fragment was detected from other fungal species tested (Table 2 and Supplementary Fig. 3), confirming the high specificity of these primers. All isolates were amplified using the universal primers ITS1 and ITS4 in the positive control (Table 2), confirming the viability of DNA used in the experiments.

The regions CAL and TEF-1 α were selected for the development of species-specific primers. The primer sets of CAL were specific only for *M. phaseolina*. However, each primer sets of TEF-1 α were specific for each *Macrophomina* species and did not amplify any of the other genera tested. As already verified for other Botryosphaeriaceae genera, the TEF1- α gene region presented sufficient phylogenetic signal for species discrimination and could be used as

a primary marker for *Macrophomina* species distinction in population screening studies (Hyde et al. 2014).

The better results of TEF1- α can be explained by the presence of highly variable introns in some protein coding genes, such as TEF1- α , becoming them appropriated to resolve relationships between closely related species. The intronic regions evolve relatively fast, accumulating mutations over evolutionary time and increases the phylogenetic signal (Irimia and Roy 2008). Therefore, these differences in the nucleotide composition of the TEF1- α sequences between the *Macrophomina* species allowed the development of specific primers.

The specific primers for *Macrophomina* species designed here could thus contribute to the broader studies that can be conducted to evaluate the diversity and distribution of species of this genus globally. It is known that *M. phaseolina* is more widely distributed than *M. pseudophaseolina* and *M. euphorbiicola*. However, more studies involving molecular identification are needed to confirm it, since most of the previous reports are based only on morphological characteristics.

To the best of our knowledge, this is the first study in which specific primers for identifying *M. pseudophaseolina* and *M. euphorbiicola* were developed. The present study reveals that the primer sets MpTefF/MpTefR, MsTefF/MsTefR, MeTefF/MeTefR can potentially be used for molecular identification and detection assay of *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. euphorbiicola*, respectively. This will facilitate a largescale survey for monitoring the epidemics and distribution of species in the regions and hosts.

Acknowledgments The first author thanks the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for a doctorate scholarship. A. R. Machado and K. C. Correia acknowledge the CNPq for financial support. S. J. Michereff also acknowledges the CNPq research fellowship.

Compliance with ethical standards All principles of ethical and professional conduct have been followed during this research and elaboration of this manuscript.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving Human Participants and/or Animals Not applicable.

Informed consent All authors have reviewed the manuscript and approved its submission to the European Journal of Plant Pathology.

References

- Babu, B. K., Saxena, A. K., Srivastava, A. K., & Arora, D. K. (2007). Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. *Mycologia*, 99, 797–803.
- Boonham, N., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2016). *Molecular methods in plant disease diagnostics*. Wallingford: CABI.
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Philips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., & Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235–253.
- Dhingra, O. D., & Sinclair, J. B. (1978). *Biology and pathology of Macrophomina phaseolina*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Fan, X., Zhang, J., Yang, L., Wu, M., Chen, W., & Li, G. (2015). Development of PCR-based assays for detecting and differentiating three species of *Botrytis* infecting broad bean. *Plant Disease*, 99, 691–698.
- Farr, D. F., & Rossman, A. Y. (2019). Fungal databases: fungushost distributions. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>. Accessed on 30 April 2019.
- Hung, J. H., & Weng, Z. (2016). Designing polymerase chain reaction primers using Primer3Plus. *Cold Spring Harbor Protocol*, 9, <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093096>.
- Hyde, K.D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H.A., Blair, J. E., et al. (2014). One stop shop: Backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity*, 67, 21–125.
- Irimia, M., & Roy, S.W. (2008). Spliceosomal introns as tools for genomic and evolutionary analysis. *Nucleic Acids Research*, 36, 1703–1712.
- Kumar, A., & Chordia, N. (2015). In silico PCR primer designing and validation. In C. Basu (Ed.), *PCR primer design* (2nd ed., pp. 143–151). New York: Springer.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., Mcwilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal Wand Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.

- Machado, A. R., Pinho, D. B., Soares, D. J., Gomes, A. A. M., & Pereira, O. L. (2019). Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 89–100.
- Ni, H. F., Yang, H. R., Chen, R. S., Hung, T. H., & Liou, R. F. (2012). A nested multiplex PCR for species-specific identification and detection of Botryosphaeriaceae species on mango. *European Journal Plant Pathology*, 133, 819–828.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51–167.
- Sarr, M. P., Diaye, M. N., Groenewald, J. Z., & Crous, P. (2014). Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathologia Mediterranea*, 53, 250–268.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). San Diego, California, USA: Academic Press.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134.

Table 1 Primers based in CAL and TEF1- α gene regions developed in this study for detection of *Macrophomina* species

<i>Macrophomina</i> species	Primer sequence (Forward/Reverse)	Gene ^a	Primers	Tm (°C)	G+C (%)	Product size (bp)
<i>M. phaseolina</i>	CAATCTCTTTCTCCCCTACAGGA	CAL	MpCMF	58.97	47.83	403
	ACTGCGCAAAGCGCCAGTAAAC		MpCMR	65.25	52.17	
	AAACACACTTTTCGCACTCCTGC	TEF1- α	MpEFF	62.57	47.83	217
	TATGCTCGCAGAGAAGAACACGA		MpEFR	61.97	47.83	
<i>M. pseudophaseolina</i>	CAATGTCTTTCTCCACTGCAGGA	CAL	MsCMF	60.81	47.83	404
	TACTGCGCAAAGCGGCAGTAAA		MsCMR	65.60	52.17	
	GGCACACTTTTCGCGCTTCTGTA	TEF1- α	MsEFF	64.24	52.17	218
	TGTGCTCGCTGGGAAGAACATGA		MsEFR	64.56	52.17	
<i>M. euphorbiicola</i>	AGCCCGCCTTGCTCCACCCTGTTCT	CAL	MeCMF	74.09	60.00	271
	TGTATACTGCGCAAAGCGGCAGT		MeCMR	67.65	43.33	
	AAGCATACTTTTCGTGCTCCTGC	TEF1- α	MeEFF	61.97	47.83	208
	AAAGGAACATGAGTGGCCAAAAA		MeEFR	59.55	39.13	

^a CAL: partial calmodulin gene; TEF1- α : partial translation elongation factor 1-alpha gene.

1 **Table 2** - Amplification results of *Macrophomina* species using specific primers

Isolate code ^a of <i>Macrophomina</i> species	Amplification results ^b							
	MpCalF/MpCalR ^c	MsCalF/MsCalR ^c	MeCalF/MeCalR ^c	MpTefF/MpTefR ^d	MsTefF/MsTefR ^d	MeTefF/MeTefR ^d	ITS1/ITS4 ^e	C ^f
<i>Macrophomina phaseolina</i>								
CMM 2748	+	-	+	+	-	-	+	-
CMM 3540	+	-	+	+	-	-	+	-
CMM 3615	+	-	+	+	-	-	+	-
CMM 4048	+	-	+	+	-	-	+	-
CMM 4149	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>								
CMM 4029	-	+	+	-	+	-	+	-
CMM 4131	-	+	+	-	+	-	+	-
CMM 4155	-	+	+	-	+	-	+	-
CMM 4161	-	+	+	-	+	-	+	-
CMM 4231	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>Macrophomina euphorbiicola</i>								
CMM 2158	-	-	+	-	-	+	+	-
CMM 2718	-	+	+	-	-	+	+	-
CMM 4045	-	+	+	-	-	+	+	-
CMM 4134	-	+	+	-	-	+	+	-
CMM 4145	-	-	+	-	-	+	+	-

2
3 ^a CMM: Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes”, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil

4 ^b (+) Presence of a single evident band with expected size; (-) Absence.

5 ^c Specific primers for *M. phaseolina* (MpCalF/MpCalR), *M. pseudophaseolina* (MsCalF/MsCalR), *M. euphorbiicola* (MeCalF/MeCalR) from region calmodulin.

6 ^d Specific primers for *M. phaseolina* (MpTefF/MpTefR), *M. pseudophaseolina* (MsTefF/MsTefR), *M. euphorbiicola* (MeTefF/MeTefR) from region translation elongation factor 1-alpha.

7 ^e Universal primers of the internal transcribed spacer (ITS1/ITS4) of the rDNA (Positive control),

8 ^f Negative control (C).

Supplementary Table 2 *Macrophomina* species from different hosts and Brazilian geographical origins used in this study

Isolate code ^a	Host plant	Geographic origin ^b	Genbank accession n° (TEF-1 α)
<i>Macrophomina phaseolina</i>			
CMM 2748	<i>Cucumis melo</i>	Icapuí, CE	MN355988
CMM 3540	<i>Phaseolus lunatus</i>	Esperantina, PI	KX898440
CMM 3615	<i>Jatropha curcas</i>	Janaúba, MG	KF226693
CMM 4048	<i>Ricinus communis</i>	Central, BA	KU058900
CMM 4149	<i>Ricinus communis</i>	Irecê, BA	KU058908
<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>			
CMM 4029	<i>Jatropha curcas</i>	Jaíba, MG	KF553903
CMM 4131	<i>Ricinus communis</i>	Patos, PB	KU058905
CMM 4155	<i>Ricinus communis</i>	Central, BA	KU058909
CMM 4161	<i>Gossypium hirsutum</i>	Apodi, RN	KU058911
CMM 4231	<i>Arachis hypogaea</i>	Apodi, RN	KU058921
<i>Macrophomina euphorbiicola</i>			
CMM 2158	<i>Cucumis melo</i>	Mossoró, RN	MN355953
CMM 2718	<i>Cucumis melo</i>	Mossoró, RN	MN355954
CMM 4045	<i>Jatropha gossypifolia</i>	Lagoa Seca, PB	KU058898
CMM 4134	<i>Ricinus communis</i>	Irecê, BA	KU058906
CMM 4145	<i>Ricinus communis</i>	Irecê, BA	KU058907

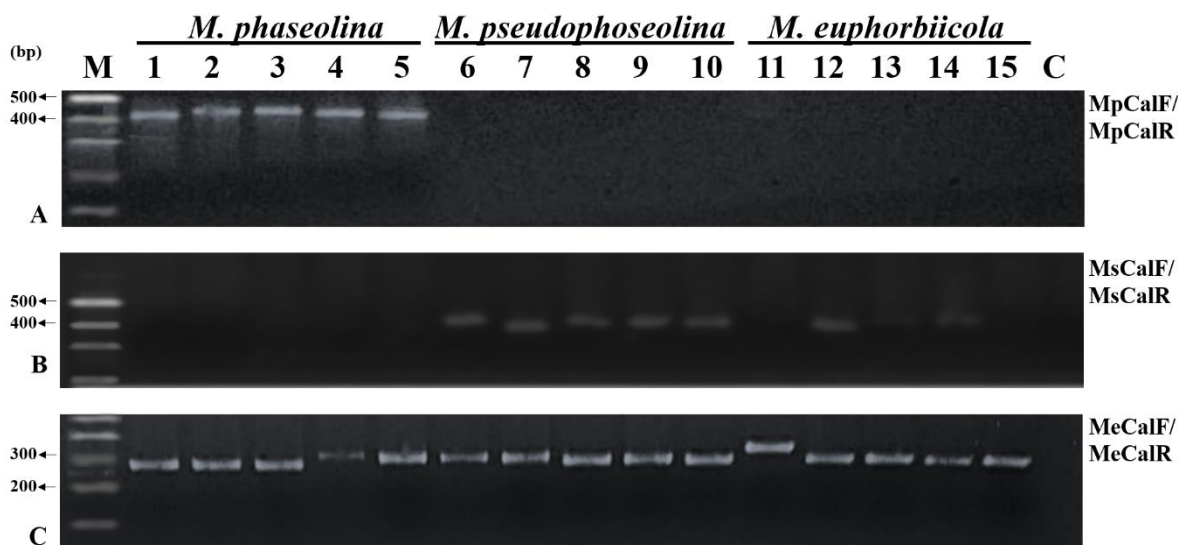
^a CMM: Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes”, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil

^b Brazilian states. BA: Bahia; CE: Ceará; MG: Minas Gerais; PB: Paraíba; PI: Piauí; RN: Rio Grande do Norte

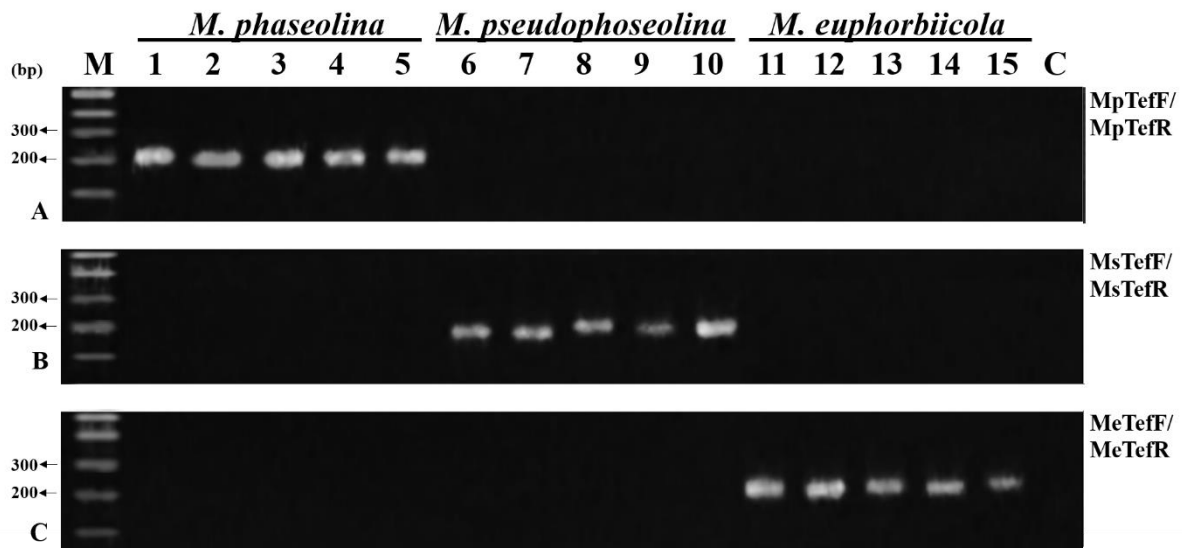
Supplementary Table 3 Isolates of different genera of fungi used in this study

Isolate code ^a	Fungi	Isolate code ^a	Fungi
CMM 4863	<i>Alternaria grandis</i>	CMM 3999	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>
CMM 4874	<i>Alternaria linariae</i>	CMM 4019	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
CBS 109157	<i>Alternaria solani</i>	CMM 4014	<i>Lasiodiplodia viticola</i>
CMM 1195	<i>Alternaria limoniasperae</i>	CMM 0876	<i>Neofusicoccum batangarum</i>
CMM 1373	<i>Alternaria tenuissima</i>	CMM 1291	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CMM 1274	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CMM 0371	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
CMM 1272	<i>Aspergillus niger</i>	CMM 3607	<i>Neoscytalidium hyalinum</i>
CMM 3938	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMM 4729	<i>Paramyrothecium roridum</i>
CMM 4059	<i>Colletotrichum asianum</i>	CMM 4318	<i>Phaeoacremonium minimum</i>
CMM 3915	<i>Colletotrichum brevisporum</i>	CMM 4320	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>
CMM 3365	<i>Colletotrichum fructicola</i>	CMM 1368	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>
CMM 3272	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMM 1850	<i>Rhizoctonia binucleate</i>
CMM 4422	<i>Colletotrichum musae</i>	CMM 1350	<i>Rhizoctonia solani</i>
CMM 4248	<i>Colletotrichum siamense</i>	CMM 0112	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
CMM 2904	<i>Colletotrichum truncatum</i>	CMM 1604	<i>Sclerotium rolfsii</i>
CMM 3577	<i>Fusarium oxysporum</i>	CMM 3693	<i>Thielaviopsis ethacetica</i>
CMM 3825	<i>Fusarium solani</i>	CMM 1524	<i>Thielaviopsis musarum</i>
CMM 3905	<i>Fusicoccum fabicercianum</i>	CMM 3342	<i>Thielaviopsis paradoxa</i>
CMM 3982	<i>Lasiodiplodia crassispora</i>	CFS A149	<i>Trichoderma aperellum</i>
CMM 3983	<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CFS D230	<i>Trichoderma harzianum</i>
CMM 3990	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	CFS K529	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>

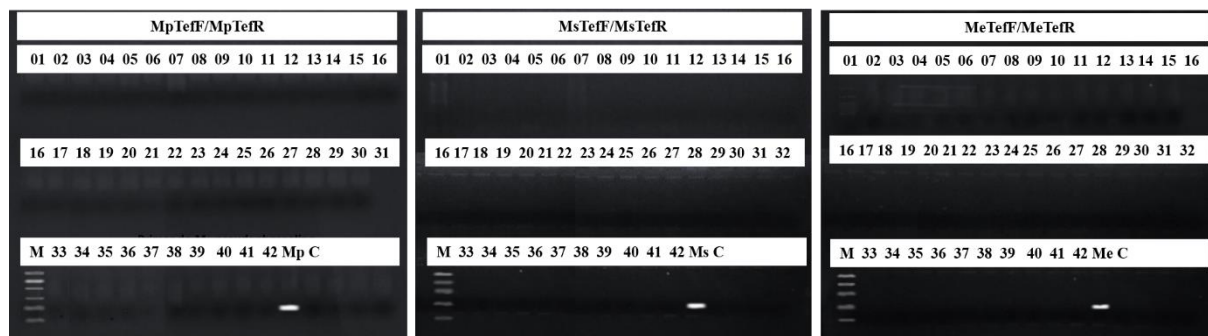
^a CFS: Culture Collection of Soil Fungi, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil; CMM: Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes”, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil



Supplementary Fig. 1 Detection of *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina* and *M. euphorbiicola* using the primer sets MpCalF/MpCalR, MsCalF/MsCalR and MeCalF/MeCalR, respectively. Lane M: DNA marker; lanes 2 to 6: *M. phaseolina* (MP) isolates CMM-2748, CMM-3540, CMM-3615, CMM-4048 and CMM-4149, respectively; lanes 7 to 11: *M. pseudophaseolina* (MS) isolates CMM-4029, CMM-4131, CMM-4155, CMM-4161, CMM-4231, respectively; lanes 12 to 16: *M. euphorbiicola* (ME) isolates CMM-2158, CMM-2718, CMM-4045, CMM-4134 and CMM-4145, respectively.



Supplementary Fig. 2 Detection of *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina* and *M. euphorbiicola* using the primer sets MpTefF/MpTefR, MsTefF/MsTefR and MeTefF/MeTefR, respectively. Lane M: DNA marker; lanes 2 to 6: *M. phaseolina* (MP) isolates CMM-2748, CMM-3540, CMM-3615, CMM-4048 and CMM-4149, respectively; lanes 7 to 11: *M. pseudophaseolina* (MS) isolates CMM-4029, CMM-4131, CMM-4155, CMM-4161, CMM-4231, respectively; lanes 12 to 16: *M. euphorbiicola* (ME) isolates CMM-2158, CMM-2718, CMM-4045, CMM-4134 and CMM-4145, respectively.



Supplementary Fig. 3 Evaluation of the specificity of the primer sets MpTefF/MpTefR, MsTefF/MsTefR and MeTefF/MeTefR in PCR assays using forty-two fungal isolates of the different genera (negative control). Lanes 1 to 42 Isolates in table S3. Mp: *M. phaseolina*; Ms: *M. pseudophoseolina*; Me: *M. euphorbiicola*.

CAPÍTULO III

**Is *Macrophomina phaseolina* the only species of this genus
that causes cowpea charcoal rot in Brazil?**

Submissão: **European Journal of Plant Pathology**
Dordrecht, Holanda
Comunicação Curta
JCR = 1,582 / Qualis = A2

Is *Macrophomina phaseolina* the only species of this genus that causes cowpea charcoal rot in Brazil?

Kledson M. Santos • Grazielle S. Lima • Ana P. O. Barros • Ueder P. Lopes • Cristina M. Souza-Motta • Kamila C. Correia • Alexandre R. Machado • Sami J. Michereff

Accepted: / Published online:

K. M. Santos • G. S. Lima • A. P. O. Barros

Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brazil

U. P. Lopes

Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, 55292-270, Garanhuns, PE, Brazil

C. M. de Souza-Motta • A. R. Machado

Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-600, Recife, PE, Brazil

K. C. Correia • S. J. Michereff

Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Universidade Federal do Cariri, 63133-610, Crato, CE, Brazil

S. J. Michereff (✉)

e-mail: sami.michereff@ufca.edu.br

ORCID <http://orcid.org/0000-0002-2156-3502>

K. C. Correia

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-9113-9064>

A. R. Machado

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-7440-3097>

Abstract Charcoal rot is an important disease of cowpea in Northeastern Brazil. Two hundred and sixty-three isolates of *Macrophomina* obtained from cowpea with charcoal rot symptoms in 100 fields of the five Northeastern Brazil states during 2017 and 2018 were identified by specific primer and analyzed the species aggressiveness. The analysis with specific primers (MpTefF/MpTefR, MsTefF/MsTefR, and MeTefF/MeTefR) allowed the identification of three *Macrophomina* species, being two isolates of *M. euphorbiicola* (0.8%), 205 of *M. phaseolina* (77.1%) and 56 of *M. pseudophaseolina* (21.3%). The phylogenetic analysis based on concatenated ITS and EF1- α sequences dataset of the 12 selected isolates showed a clade grouping corresponding to the same species identified with specific primers. *Macrophomina phaseolina* and *M. pseudophaseolina* isolates were recovered from all Northeastern Brazilian states (Alagoas, Ceará, Maranhão, Pernambuco, and Piauí). Still, the first species was widely distributed, being found in 92% cowpea-growing fields, while the second in 41% cowpea-growing fields. On the other hand, *M. euphorbiicola* was detected in only two Northeastern Brazilian states (Ceará and Pernambuco), in a field in each state. All 62 isolates, representing three different *Macrophomina* species, were pathogenic to cowpea plants, causing necrotic lesions on stems, but there were differences in aggressiveness among different species. *Macrophomina phaseolina* and *M. pseudophaseolina* were most aggressive, without differing from each other, while *M. euphorbiicola* was the less aggressive. This is the first detailed report of the species composition of *Macrophomina* populations causing cowpea charcoal rot in different Brazilian states. To our knowledge, this is the first report of natural infection of cowpea by *M. pseudophaseolina* in Brazil and by *M. euphorbiicola* in worldwide.

Keywords Botryosphaeriaceae • *Macrophomina euphorbiicola* • *Macrophomina phaseolina* • *Macrophomina pseudophaseolina* • *Vigna unguiculata* • Prevalence • Aggressiveness

Vigna unguiculata (L.) Walp., worldwide known as cowpea, has an important role in the lives of millions of people worldwide, especially in developing countries in Africa, Latin America, and Asia. Its grains are rich in protein, vitamins, and minerals, which give high nutritional value and the main source of complement to the tubers and cereals diet (Campbell et al. 2016). In addition, it is also used as green fodder, hay, silage, flour for animal feed and, used as green manure and soil protection (Athayde Sobrinho, 2016; Gomes-Silva et al. 2018).

Brazil is the world's third-largest producer of cowpea, with a production of 522 thousand tons of grains are grown in 1.1 million hectares in 2019 (FAO, 2021). The Northeast region is the largest producer of cowpea in Brazil, with 399 thousand tons produced and 1 million hectares of planting areas (Embrapa Arroz e Feijão, 2020).

Despite the productive potential of cowpea in Northeastern Brazil, its productivity is low. Among the factors that limit the development of this legume in the region stands out the occurrence of diseases. Charcoal rot is the most harmful disease affecting cowpea productions in semiarid areas of the Northeastern Brazil (Athayde Sobrinho 2016; Gomes-Silva et al. 2017). The symptoms can manifest at all stages of cowpea development. After emergence, symptoms on the cotyledons are brown to dark-colored necrosis, which progress to the margins of cotyledons, coalescing into slightly depressed irregular lesions on the plant stem, which can lead to its death (Gupta et al. 2012; Ndiaye et al. 2015). In adult plants, the symptoms are characterized by necrosis on stems and twigs that spread downwards, systemic infection leads to obstruction of the xylem vessels, defoliation, resulting in the death of affected plant, and production of black pycnidia cause the rotted tissues to become blackened (Ndiaye et al. 2015; Athayde Sobrinho, 2016). These symptoms pose a severe impediment to production following a reduction in plant vigor and great plant mortality, leading to increased costs associated with management and replanting (Gomes-Silva et al. 2017).

For many years, charcoal rot in cowpea was attributed exclusively to monotypic *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (Dhingra and Sinclair, 1978). The distinction of *Macrophomina* species was problematic for the mycologists and plant pathologists (Crous et al. 2006; Phillips et al. 2013). However, a study based on the phylogenetic analysis with multilocus provides the distinction of cryptic species in the *Macrophomina* isolates that in the past were described as belonging to the species *M. phaseolina*, confirm the existence of three new species: *M. pseudophaseolina* Crous, Sarr & Ndiaye (Sarr et al. 2014), *M. euphorbiicola* A. R. Machado, D. J. Soares & O. L. Pereira (Machado et al. 2019), and *M. vaccinii* Y. Zhang ter & L. Zhao (Zhao et al. 2019).

The recent development of specific primers for identification/detection of *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. euphorbiicola* species provide the rapid investigation of isolates diversity of *Macrophomina* species associated in various cultures from various geographic origins on a large scale (Santos et al. 2020).

Studies revealed the association of the *M. pseudophaseolina* and *M. euphorbiicola* with various crops in Northeastern Brazil, previously attributed only to *M. phaseolina* (Machado et al. 2019; Negreiros et al. 2019; Mello et al. 2021). So far, *M. phaseolina* is considered the only

causal agent of charcoal rot in cowpea in Brazil (Athayde Sobrinho 2016; Gomes-Silva et al. 2017), but the results with other hosts suggest that more than one species of *Macrophomina* may be causing the disease in this region.

The present study was undertaken to: (a) identify *Macrophomina* species associated with charcoal rot of cowpea in Northeastern Brazil using specific primers, (b) characterize the prevalence of *Macrophomina* species associated with charcoal rot of cowpea in different states of this region, and (c) analyze the pathogenicity and the aggressiveness of representative isolates of *Macrophomina* species to cowpea.

The isolates were collected from cowpea plants with necrosis and pycnidia on stems and twigs in 100 cowpea-growing fields in five Northeastern Brazil states during 2017 and 2018 (Fig. 1; Supplementary Table 1). These states represent the major cowpea producers in this country and the fields in each state were selected arbitrarily. Infected tissues were superficially disinfected, pycnidia were removed and plated in Petri plates with potato dextrose agar (PDA; Acumedia, Lansing, Michigan, USA), supplemented with 0.5 g/L streptomycin sulphate (PDAS). Hyphal tip colonies obtained for each isolate were preserved and deposited in the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi of Cariri (CFC) at the Universidade Federal do Cariri (Crato, Ceará, Brazil).

The specific primers MpTefF/MpTefR, MsTefF/MsTefR, and MeTefF/MeTefR were used to identify the *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina*, and *M. euphorbiicola*, respectively. (Santos et al. 2020). Procedures for obtaining genomic DNA from the isolates, PCR amplifications with the specific primers, and interpretation of the results were the same described by Santos et al. (2020). Initially, all isolates were submitted to MpTefF/MpTefR, non-amplified isolates were submitted to MsTefF/MsTefR, and subsequently to MeTefF/MeTefR.

To confirm the identification of the isolates with specific primers, five isolates of *M. phaseolina*, five isolates of *M. pseudophaseolina* and two isolates of *M. euphorbiicola* were selected at random and used for phylogenetic identification, using the primers ITS1/ITS4 (White et al. 1990), and EF1/EF2 (Jacobs et al. 2004). Amplifications were performed using the following program: initial denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min, annealing at 52 °C for 1 min (ITS) and 55 °C for 1 min (TEF1- α), and extension at 72 °C for 1 min; one cycle of final extension at 72 °C for 10 min and final incubation at 4 °C. PCR products were visualised on a 1% agarose gel stained with GelRed (Biotium, Hayward, California, USA), and visualized under UV light. PCR products (ITS and TEF1- α) were purified with illustra™ ExoProStar™ 1-Step clean-up kit (GE Healthcare Life

Sciences, Marlborough, Massachusetts, USA) and sequenced in both directions with the same primers used for amplification at the Centro de Biociências at the Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brazil).

The consensus sequences were assembled using the Staden Package software v. 2.0 (Staden et al. 1998) and aligned and were compared against NCBI's GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nucleotide database sequences (Table 1) through MAFFT v.7 online interface (Kato and Standley 2013) with the interactive refinement method G-INS-i and manually corrected in MEGA v.7 software (Kumar et al. 2016). The sequences of isolates were analysed separately and then with the concatenated sequences (ITS and TEF1- α) through maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI). For ML analysis was performed with RAxML-HPC2 on XSEDE v. 8.2.10 (Randomized Accelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis 2014). The GTR+GAMMA model was used for the search tree with 1,000 bootstrap iterations. For BI, analysis was performed using MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist and Huelsenbeck 2003), the nucleotide substitution models used were selected using MrMODELTEST v. 2.3 (Nylander 2008) and estimated separately for each gene region based on the Akaike Information Criterion (AIC) (Posada and Buckley 2004). The models of evolution were SYM for ITS and HKY + G for TEF1- α . Four simultaneous Markov chains were run for 10000000 generations. The first 25% trees were discarded as the burn-in phase of each analysis. Posterior probabilities were determined from a consensus tree with 75% of the remaining trees. Both BI and ML were run on the CIPRES Science Gateway portal (Miller et al. 2012). The trees obtained were visualized in FigTree v.1.4.2 (Rambaut 2014) and exported to the graphic program. The *Botryosphaeria dothidea* CMW8000 GenBank Accession sequences ITS (N^oAY236949) and TEF1- α (AY236898) were used as outgroup.

The pathogenicity and aggressiveness of isolates representing *M. phaseolina* (30 isolates), *M. pseudophaseolina* (30 isolates), and *M. euphorbiicola* (2 isolates) identified in this study were tested on cowpea plants, using the toothpick infested method. Mycelium discs (5 mm in diameter) were removed from the colony margin of each *Macrophomina* isolate with 7-days growth on PDA at 30 °C in the dark and transferred to the center of Petri dishes (9 cm diameter) containing PDA. Twenty-five toothpick tips (1.5 cm long), previously sterilized in an autoclave (120 °C, for 20 min, on two consecutive days), were distributed next to the mycelium disk on the surface of the culture medium, and the plates were incubated at 30 °C in the dark for 15 days. After this period, the toothpick tips colonized by the fungus were dried for 12 h in a laminar flow chamber and then transferred to sterile Petri dishes, being kept at 28 °C in the dark until inoculation. The inoculation of the isolates was performed by inserting the

toothpick tip colonized by the fungus into the stem of the 15-days cowpea plants (cv. IPA-207), about 2 cm above the ground. Toothpick tip without the inoculum, also sterilized in an autoclave, were used as control. There were four replicates (three plants/replicate) for each isolate arranged in a randomized complete block design. Cowpea plants were assessed for the presence and severity of disease symptoms 15 days after inoculation. The isolate was considered pathogenic when observed necrosis on the stem from the inoculation point. The aggressiveness was estimated by measuring the length of the visible necrotic lesion (mm) on the stem. The experiment was conducted twice. Differences in mean aggressiveness caused by *Macrophomina* species were determined by one-way analyses of variance (ANOVA) and means were compared by Fisher's least significant difference (LSD) test at the 5% significance level using STATISTIX v. 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, Florida, USA).

A total of 263 *Macrophomina* isolates were obtained from cowpea plants grown in 100 cowpea-growing fields in five Brazilian Northeast states (Fig. 1; Supplementary Table 2). The analysis with specific primers allowed the identification of three *Macrophomina* species, being two isolates of *M. euphorbiicola* (0.8%), 205 of *M. phaseolina* (77.1%) and 56 of *M. pseudophaseolina* (21.3%) (Fig. 1; Supplementary Table 2). The phylogenetic analysis based on concatenated ITS and EF1- α sequences dataset of the 12 selected isolates showed a similar topology of the tree identified by ML and BI analyses. The isolates were grouped in their respective clade corresponding to the same species identified with specific primers (Fig. 2).

Macrophomina phaseolina isolates were widely distributed and recovered from all Northeastern Brazilian states, comprising 92% cowpea-growing fields. *Macrophomina pseudophaseolina* isolates were also recovered from all states but comprising 41% cowpea-growing fields. On the other hand, *M. euphorbiicola* was detected in only two Northeastern Brazilian states (Ceará and Pernambuco), in a field in each state (Supplementary Table 2). In Ceará (163 isolates), 65.5% of the isolates was *M. phaseolina*, 31.9% was *M. pseudophaseolina*, and 0.6% was *M. euphorbiicola*. In Pernambuco (81 isolates), the prevalence of *M. phaseolina* was 95.1%, while *M. pseudophaseolina* was 3.7%, and *M. euphorbiicola* was 1.2%. *Macrophomina phaseolina* was the only species detected in the states of Alagoas (five isolates) and Maranhão (one isolate). In Piauí state (13 isolates), only one isolate was identified as *M. pseudophaseolina*, while the others were identified as *M. phaseolina*. Two species of *Macrophomina* were found in the same field in 35% cowpea-growing fields (Supplementary Table 2).

All 62 isolates of *Macrophomina*, representative of three different species detected in this study, were pathogenic to cowpea plants, causing necrotic lesions on stems. There were

significant differences ($P \leq 0.05$) in disease severity in cowpea stems produced by the different *Macrophomina* species, indicating differences in aggressiveness. *Macrophomina phaseolina* and *M. pseudophaseolina* were most aggressive, causing the largest lesions (43.2 ± 4.1 mm and 38.3 ± 3.1 mm, respectively), without differing from each other. *Macrophomina euphorbiicola* was the less aggressive species with a lesion of 26.8 ± 2.9 mm, differing from other species.

The results obtained with phylogenetic multilocus (ITS and TEF1- α) analysis confirm the accuracy of specific primers for identifying the three *Macrophomina* species, as previously described by Santos et al. (2020). The finding of three *Macrophomina* species causing charcoal rot in cowpea in Northeastern Brazil contradicts the information that this disease was caused only by *M. phaseolina* (Athayde Sobrinho 2016; Gomes-Silva et al. 2017). This is the first report of *M. pseudophaseolina* infecting cowpea in Brazil, but this species had previously been reported causing cowpea charcoal rot in Senegal (Sarr et al. 2014). To our knowledge, this is the first report of *M. euphorbiicola* infecting cowpea worldwide.

The predominance of *M. phaseolina* infecting cowpea observed in this study is in agreement with the previous reports on castor bean (*Ricinus communis*) and bellyache bush (*Jatropha gossypifolia*) (Machado et al. 2019), sweet potato (*Ipomoeae batatas*) (Mello et al. 2021), and weeds (*Trianthema portulacastrum* and *Boerhavia diffusa*) in melon (*Cucumis melo*) fields (Negreiros et al. 2019) in Northeastern Brazil. The reduced prevalence of *M. euphorbiicola* in cowpea-growing fields is similar to that previously observed in other hosts in this region (Machado et al. 2019; Mello et al. 2021). The prevalence of *M. phaseolina* registered in cowpea in Brazil (77.1%) is lower compared to reported on this crop in Niger (100%) and Senegal (99.8%) (Sarr et al. 2014). On the other hand, the frequency of *M. pseudophaseolina* observed in this study (21.3%) is higher than that observed in cowpea in Senegal (0.2%) (Sarr et al. 2014).

The diversity, frequency, and distribution of *Macrophomina* can be affected by the dynamics of host-pathogen relationship, genetic flexibility, and degree of adaptation (Dhingra and Sinclair, 1978; Kaur et al. 2012). The high prevalence of *M. phaseolina* may be related to the wide range, the longevity of its microsclerotia in soil, and the high genetic diversity (Marquez et al. 2021). Although recently described, *M. pseudophaseolina* show the wide distribution in different crops in Brazil (Machado et al. 2019; Negreiros et al. 2019; Mello et al. 2021) and Senegal (Sarr et al. 2014).

The prevalence level of the *Macrophomina* species within each state of Northeastern Brazil was variable according to the state and number of samples. The cause of the higher

prevalence of *M. phaseolina* (95.1%) and lower prevalence of *M. pseudophaseolina* (3.7%) in Pernambuco compared to that found for *M. phaseolina* (65.5%) and *M. pseudophaseolina* (32.9%) in Ceará remains unexplained.

The finding of two species of *Macrophomina* in 35% of the cowpea-growing fields is worrying, because in addition to the high genetic variability existing within each species, the presence of different species in the same growing field may have epidemiological consequences that are still poorly understood.

The high percentage of pathogenic isolates of *Macrophomina*, as found in this study, has been common in several crops (Ndiaye et al. 2015; Machado et al. 2019; Negreiros et al. 2019; Sales Junior et al. 2020; Mello et al. 2021). Only two study has been carried out until the moment of comparing the aggressiveness of *M. phaseolina* and *M. pseudophaseolina* in cowpea (Ndiaye et al. 2015; Sales Junior et al. 2020). The results obtained were similar to those found in this study, in which the two species did not differ in levels of aggressiveness. However, inoculation on melon seedlings revealed that *M. phaseolina* presented higher aggressiveness than *M. pseudophaseolina* (Negreiros et al. 2019). In sweet potato, *M. euphorbiicola*, *M. phaseolina* and *M. pseudophaseolina* caused disease in tubers but did not differ in the aggressiveness levels (Mello et al. 2021).

The present work represents the first large-scale study to identify *Macrophomina* species associated with cowpea charcoal rot in Brazil. The results improve knowledge about the distribution of *Macrophomina* species in Brazilian Northeastern states and differences in aggressiveness among the species. Further work should be undertaken to investigate the epidemiology of cowpea charcoal rot caused by different *Macrophomina* species and the influences on disease management strategies and practices.

Acknowledgments The first author thanks the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for a doctorate scholarship. A. R. Machado and K. C. Correia acknowledge the CNPq for financial support. S. J. Michereff also acknowledges the CNPq research fellowship.

Compliance with ethical standards All principles of ethical and professional conduct have been followed during this research and elaboration of this manuscript.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving Human Participants and/or Animals Not applicable.

Informed consent All authors have reviewed the manuscript and approved its submission to the European Journal of Plant Pathology.

References

- Athayde Sobrinho, C. Principais doenças do feijão-caupi no Brasil (2016). In E. A. Bastos (Ed.), *A cultura do feijão-caupi no Brasil* (pp. 44–66). Teresina: Embrapa Meio-Norte.
- Campbell, R. K., Hurley, K. M., Shamim, A. A., Shaikh, S., Chowdhury, Z. T., Mehra, S., Christian, P. (2016). Effect of complementary food supplementation on breastfeeding and home diet in rural Bangladeshi children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104(5), 1450–1458. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.135509>
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Philips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., & Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235–253. <https://doi.org/10.3114/sim0020>
- Dhingra, O. D., & Sinclair, J. B. (1978). *Biology and pathology of Macrophomina phaseolina*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- Embrapa Arroz e Feijão. (2020). *Dados conjunturais da produção de feijão comum (Phaseolus vulgaris L.) e caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2019): Área, produção e rendimento*. Retrieved April 12, 2021, from <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>
- FAO (Food and Agriculture Organization). *FAOSTAT*. Retrieved February 10, 2021, from <http://www.fao.org/faostat/en/>
- Gomes-Silva, F., Almeida, C. M. A., Silva, A. G., Leão, M. P. C., Silva, K. P., Oliveira, L. G., Silva, M. V., Costa, A. F., Lima, V. L. M. (2017). Genetic diversity of isolates of *Macrophomina phaseolina* associated with cowpea from Brazil semi-arid region. *Journal of Agricultural Science*, 9(11), 112–116. <https://doi.org/10.5539/jas.v9n11p112>
- Gupta, G. K., Sharma, S. K., Ramteke, R. (2012). Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference

- to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Journal of Phytopathology*, 160 (4), 167–180. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01884.x>
- Jacobs, K., Bergdahl, D. R., Wingfield, M. J., Halik, S., Seifert, K. A., Bright, D. E. (2004) *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research*, 108(4), 411–418. <https://doi.org/10.1017/S0953756204009748>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kaur, S., Dhillon, G. S., Brar, S. K., Vallad, G. E., Chand, R., & Chauhan, V. B. (2012). Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology*, 38, 136–151. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.640977>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Machado, A. R., Pinho, D. B., Soares, D. J., Gomes, A. A. M., & Pereira, O. L. (2018). Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 153, 89–100. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1545-1>
- Marquez, N., Giachero, M. L., Declerck, S., & Ducasse, D. A. (2021). *Macrophomina phaseolina*: general characteristics of pathogenicity and methods of control. *Frontiers in Plant Science*, 12, 634397. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634397>
- Mello, J. F., Brito, A. C. Q., Vieira, J. C. B., Câmara, M. P. S., Michereff, S. J., Souza- Motta, C. M., & Machado, A. R. (2021). Identification and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with root and stem rot of sweet potato in Brazil. *Plant Pathology*, accepted. <https://doi.org/10.1111/ppa.13395>
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the 2010 Gateway Computing Environments Workshop* (pp. 1–8.). <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- Ndiaye, M., Sarr, M. P., Cisse, N., & Ndoye, I. (2015). Is the recently described *Macrophomina pseudophaseolina* pathogenically different from *Macrophomina phaseolina*. *African Journal of Microbiology Research*, 9(45), 2232–2238. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7742>

- Negreiros, A. M. P., Sales Júnior, R., Naama, M. L., Melo, J. A., Michereff, S. J., Ambrósio, M. M. Q., Medeiros, H. L. S., Armengol, J. (2019). Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. *Journal of phytopathology*, 167(6), 326–337. <https://doi.org/10.1111/jph.12801>
- Nylander, J. A. A. (2008). *MrModeltest 2*. Program distributed by the author. Uppsala: Department of Zoology, Uppsala University.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76(1), 51–167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Posada, D., & Buckley, T. R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53(5), 793–808. <https://doi.org/10.1080/10635150490522304>
- Rambaut, A. (2014) *Figtree, a graphical viewer of phylogenetic trees*. 1.4.2 ed. Program distributed by the author. Edinburgh: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Sales Júnior, R., Silva Neto, A. N., Negreiros, A. M. P., Gomes, T. R. R., Ambrósio, M. M. Q., & Armengol, J. (2020). Pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in cowpea. *Revista Caatinga*, 33(2), 395–401. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n212rc>
- Santos, K. M., Lima, G. S., Barros, A. P. O. Machado, A. R., Souza-Motta, C. M., Correia, K. C., & Michereff, S. J. (2020). Novel specific primers for rapid identification of *Macrophomina* species. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 1213–1218. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01952-8>
- Sarr, M. P., Diaye, M. N., Groenewald, J. Z., & Crous, P. (2014). Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(2), 250–268. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-13736
- Staden, R., Beal, K. F., & Bonfield, J. K. (1998). The Staden package. In S. Misener, & S. A. Krawetz (Eds.), *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 115-130). Totowa: Humana Press.

- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). San Diego: Academic Press.
- Zhao, L., Cai, J., He, W., Zhang, Y. (2019). *Macrophomina vaccinii* sp. nov. causing blueberry stem blight in China. *MycoKeys*, 55, 1–14. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.54.35015>

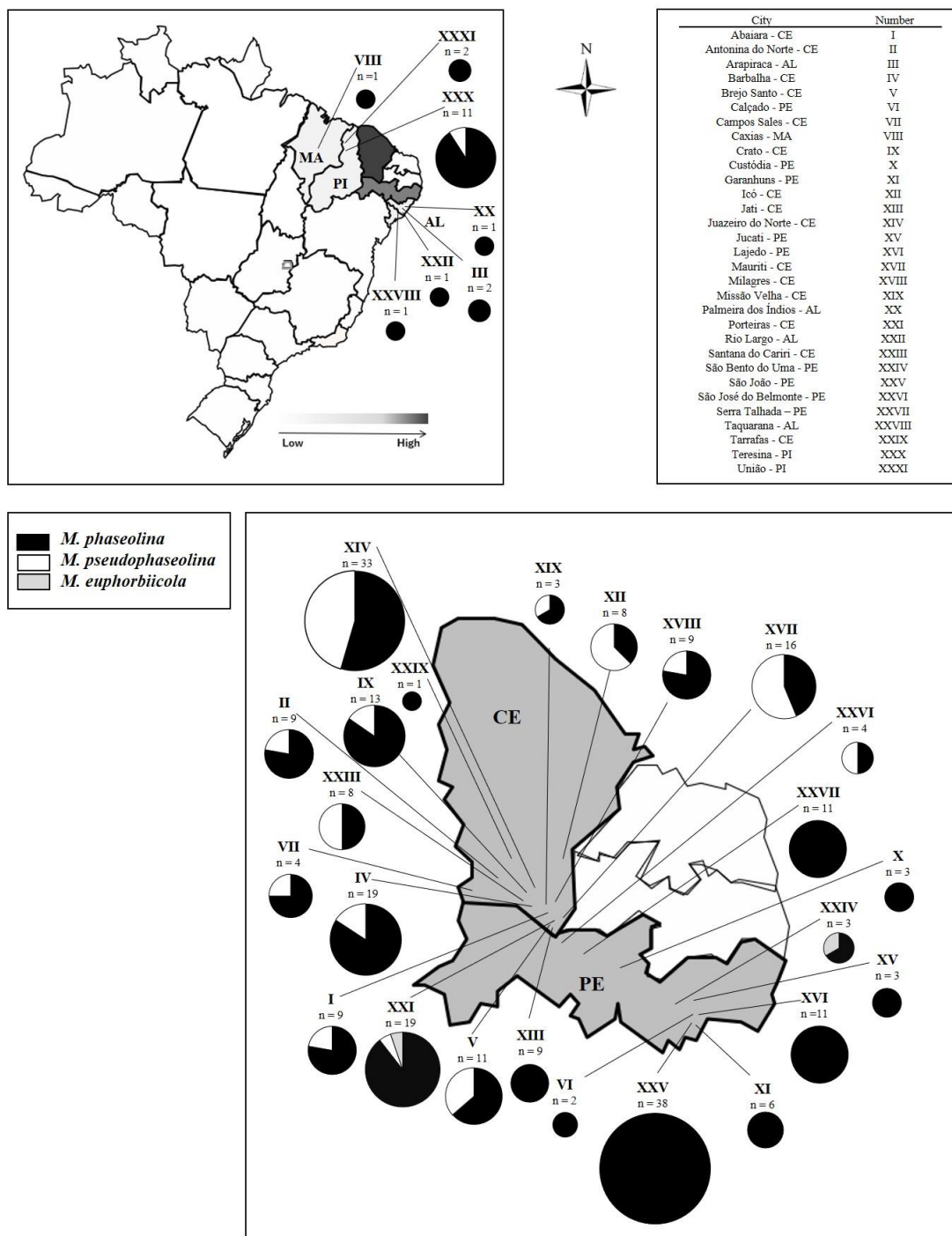


Fig. 1 Collection sites of *Macrophomina* species isolates associated with cowpea in Brazil. Circles represent association frequency of each species with plants exhibiting symptoms in each site sampled. Roman numbers above the circles (I–XXXI) represents the sites identification in Table 1 and n is the number of isolates analyzed in each site. AL, Alagoas; CE, Ceará; MA, Maranhão; PE, Pernambuco; PI, Piauí States

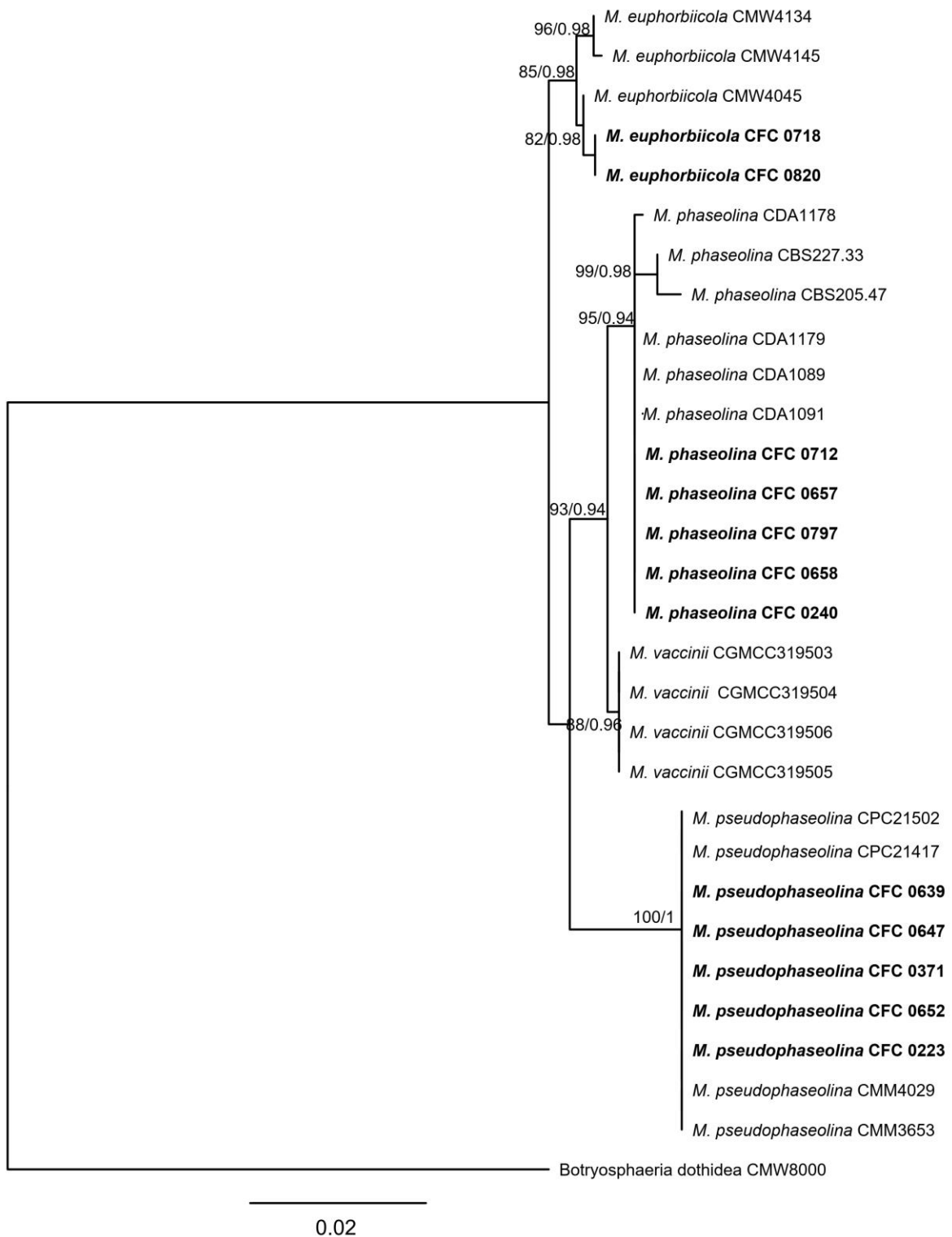


Fig. 2 Phylogenetic analysis of the combined ITS and TEF-1 α sequence data of *Macrophomina* isolates from this study (bold) and GenBank. Tree was constructed using Bayesian Inference analysis. Numbers at nodes indicate bootstrap values. Only bootstrap values >80% are shown. The tree was rooted to *Botryosphaeria dothidea* CMW8000. Scale bar represent a genetic distance of 0.02 for horizontal branch lengths

1 **Supplementary Table 1** - Sequences of the *Macrophomina* isolates used in the phylogenetic analyses obtained from the GenBank

2

Species	Isolate code	Collection location	Host	GenBank accession no.	
				ITS	TEF-
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CBS 115476		<i>Chinese cabbage</i>	KF766151	AY236898
<i>Macrophomina euphorbiicola</i>	CMW 4045	Brazil	<i>Jatropha gossypifolia</i>	KU058928	KU058898
<i>M. euphorbiicola</i>	CMW 4134	Brazil	<i>Ricinus communis</i>	KU058936	KU058906
<i>M. euphorbiicola</i>	CMW 4145	Brazil	<i>Ricinus communis</i>	KU058937	KU058907
<i>Macrophomina phaseolina</i>	CBS 205.47	Italy	<i>Phaseolus vulgaris</i>	KF951622	KF951997
<i>M. phaseolina</i>	CBS 227.33		<i>Zea mays</i>	KF531825	KF531804
<i>M. phaseolina</i>	CDA 1178	Brazil	<i>Ricinus communis</i>	KU058953	KU058923
<i>M. phaseolina</i>	CDA 1089	Brazil	<i>Ricinus communis</i>	KU058929	KU058899
<i>M. phaseolina</i>	CDA 1091	Brazil	<i>Ricinus communis</i>	KU058931	KU058901
<i>M. phaseolina</i>	CDA 1179	Brazil	<i>Ricinus communis</i>	KU058954	KU058924
<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>	CPC 21502	Senegal	<i>Hibiscus sabdarifa</i>	KF951797	KF952159
<i>M. pseudophaseolina</i>	CPC 21417	Senegal	<i>Arachis hypogaea</i>	KF951791	KF952153
<i>M. pseudophaseolina</i>	CMM 3653	Brazil	<i>Jatropha curcas</i>	KF369262	KF553906
<i>M. pseudophaseolina</i>	CMM 4029	Brazil	<i>Jatropha curcas</i>	KF369270	KF553903
<i>Macrophomina vaccinii</i>	CGMCC 3.19503	China	<i>Vaccinium</i> spp.	MK687450	MK687426
<i>M. vaccinii</i>	CGMCC 3.19504	China	<i>Vaccinium</i> spp.	MK687451	MK687427
<i>M. vaccinii</i>	CGMCC 3.19505	China	<i>Vaccinium</i> spp.	MK687452	MK687428
<i>M. vaccinii</i>	CGMCC 3.19506	China	<i>Vaccinium</i> spp.	MK687453	MK687429

3

Supplementary Table 2 Isolates of *Macrophomina* collected from Northeast Brazilian cowpea fields and characterized by specific primers in this study

Isolate code ^a	Cowpea-growing			Species
	City	State ^b	Field ^c	
CFC 0203	Mauriti	CE	51	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0204	Mauriti	CE	53	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0205	Porteiras	CE	67	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0206	Porteiras	CE	67	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0207	Juazeiro do Norte	CE	37	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0208	Crato	CE	24	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0210	Crato	CE	24	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0211	Crato	CE	24	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0212	Crato	CE	24	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0213	Crato	CE	25	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0214	Crato	CE	25	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0215	Crato	CE	22	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0216	Crato	CE	22	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0217	Crato	CE	22	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0218	Crato	CE	22	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0219	Crato	CE	22	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0220	Abaiara	CE	3	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0221	Abaiara	CE	3	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0222	Abaiara	CE	3	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0223	Abaiara	CE	2	<i>Macrophomina pseudophaseolina</i>
CFC 0224	Abaiara	CE	1	<i>Macrophomina phaseolina</i>
CFC 0225	Abaiara	CE	1	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0226	Abaiara	CE	1	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0227	Milagres	CE	58	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0228	Milagres	CE	58	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0229	Milagres	CE	58	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0230	Milagres	CE	59	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0231	Milagres	CE	59	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0232	Abaiara	CE	1	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0233	Abaiara	CE	1	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0234	Barbalha	CE	13	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0235	Barbalha	CE	13	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0236	Barbalha	CE	13	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0237	Barbalha	CE	13	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0238	Barbalha	CE	9	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0239	Barbalha	CE	9	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0240	Barbalha	CE	9	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0241	Barbalha	CE	9	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0242	Barbalha	CE	10	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0243	Barbalha	CE	10	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0244	Barbalha	CE	8	<i>M. phaseolina</i>

CFC 0245	Barbalha	CE	8	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0246	Mauriti	CE	54	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0247	Mauriti	CE	54	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0249	Mauriti	CE	51	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0250	Mauriti	CE	51	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0251	Mauriti	CE	52	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0252	Mauriti	CE	52	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0253	Mauriti	CE	49	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0254	Mauriti	CE	49	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0255	Mauriti	CE	49	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0256	Mauriti	CE	50	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0257	Mauriti	CE	48	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0258	Mauriti	CE	48	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0259	Mauriti	CE	48	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0260	Mauriti	CE	48	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0261	Juazeiro do Norte	CE	38	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0262	Juazeiro do Norte	CE	38	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0263	Juazeiro do Norte	CE	38	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0264	Juazeiro do Norte	CE	38	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0265	Juazeiro do Norte	CE	39	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0266	Juazeiro do Norte	CE	39	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0267	Juazeiro do Norte	CE	39	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0268	Juazeiro do Norte	CE	39	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0269	Juazeiro do Norte	CE	34	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0270	Juazeiro do Norte	CE	34	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0271	Juazeiro do Norte	CE	34	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0272	Juazeiro do Norte	CE	34	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0273	Juazeiro do Norte	CE	34	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0274	Barbalha	CE	11	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0275	Juazeiro do Norte	CE	33	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0276	Barbalha	CE	11	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0277	Barbalha	CE	11	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0278	Barbalha	CE	12	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0279	Barbalha	CE	12	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0280	Barbalha	CE	12	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0281	Barbalha	CE	12	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0282	Icó	CE	29	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0283	Icó	CE	30	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0284	Icó	CE	31	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0285	Icó	CE	31	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0286	Icó	CE	31	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0287	Icó	CE	31	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0288	Icó	CE	29	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0289	Icó	CE	29	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0290	Juazeiro do Norte	CE	35	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0291	Juazeiro do Norte	CE	35	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0292	Juazeiro do Norte	CE	35	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0293	Juazeiro do Norte	CE	35	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0295	Juazeiro do Norte	CE	35	<i>M. pseudophaseolina</i>

CFC 0296	Juazeiro do Norte	CE	36	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0297	Juazeiro do Norte	CE	36	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0299	Juazeiro do Norte	CE	36	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0300	Juazeiro do Norte	CE	42	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0301	Juazeiro do Norte	CE	42	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0302	Juazeiro do Norte	CE	42	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0303	Juazeiro do Norte	CE	42	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0304	Juazeiro do Norte	CE	40	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0305	Juazeiro do Norte	CE	40	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0306	Juazeiro do Norte	CE	40	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0307	Juazeiro do Norte	CE	41	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0309	Juazeiro do Norte	CE	41	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0310	Juazeiro do Norte	CE	41	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0312	Crato	CE	23	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0314	Crato	CE	23	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0356	Campos Sales	CE	19	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0357	Campos Sales	CE	19	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0358	Campos Sales	CE	20	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0359	Campos Sales	CE	20	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0360	Antonina do Norte	CE	4	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0361	Antonina do Norte	CE	4	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0362	Antonina do Norte	CE	4	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0363	Antonina do Norte	CE	4	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0364	Antonina do Norte	CE	5	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0365	Antonina do Norte	CE	5	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0366	Antonina do Norte	CE	5	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0367	Antonina do Norte	CE	6	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0368	Antonina do Norte	CE	6	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0370	Santana do Cariri	CE	69	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0371	Santana do Cariri	CE	69	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0372	Santana do Cariri	CE	69	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0373	Santana do Cariri	CE	70	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0374	Santana do Cariri	CE	70	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0375	Santana do Cariri	CE	70	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0376	Santana do Cariri	CE	71	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0377	Santana do Cariri	CE	71	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0630	Tarrafas	CE	95	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0635	Caxias	MA	21	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0636	Teresina	PI	96	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0637	Teresina	PI	96	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0638	Teresina	PI	96	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0639	Teresina	PI	97	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0640	Teresina	PI	98	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0641	União	PI	100	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0642	Teresina	PI	98	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0643	Brejo Santo	CE	16	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0644	Porteiras	CE	65	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0645	Brejo Santo	CE	16	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0646	Brejo Santo	CE	14	<i>M. pseudophaseolina</i>

CFC 0647	São José do Belmonte	PE	89	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0648	Brejo Santo	CE	15	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0649	Brejo Santo	CE	17	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0650	Serra Talhada	PE	93	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0651	Brejo Santo	CE	15	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0652	Brejo Santo	CE	14	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0653	Serra Talhada	PE	92	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0654	Brejo Santo	CE	16	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0655	Missão Velha	CE	61	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0656	Serra Talhada	PE	92	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0657	Teresina	PI	98	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0658	União	PI	100	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0659	Teresina	PI	98	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0660	Teresina	PI	96	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0661	Teresina	PI	99	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0662	Teresina	PI	99	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0663	Arapiraca	AL	7	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0664	Missão Velha	CE	61	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0665	Serra Talhada	PE	92	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0666	Milagres	CE	55	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0667	Porteiras	CE	64	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0668	Brejo Santo	CE	17	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0669	Serra Talhada	PE	93	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0670	Milagres	CE	57	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0671	Brejo Santo	CE	15	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0672	Porteiras	CE	63	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0673	São José do Belmonte	PE	89	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0674	Porteiras	CE	63	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0675	Serra Talhada	PE	93	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0676	Porteiras	CE	66	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0677	São José do Belmonte	PE	90	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0678	Porteiras	CE	65	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0679	Missão Velha	CE	60	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0680	Serra Talhada	PE	92	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0681	Porteiras	CE	66	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0682	Porteiras	CE	63	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0683	Porteiras	CE	64	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0684	Porteiras	CE	63	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0685	Porteiras	CE	63	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0686	Serra Talhada	PE	93	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0687	Serra Talhada	PE	92	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0688	São José do Belmonte	PE	90	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0689	Milagres	CE	57	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0690	Milagres	CE	56	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0691	Porteiras	CE	65	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0692	Porteiras	CE	65	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0693	Serra Talhada	PE	93	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0694	Brejo Santo	CE	16	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0695	Porteiras	CE	66	<i>M. phaseolina</i>

CFC 0696	Garanhuns	PE	27	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0700	Garanhuns	PE	27	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0701	Garanhuns	PE	28	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0703	Garanhuns	PE	28	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0711	Rio Largo	AL	68	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0712	Palmeira dos Índios	AL	62	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0713	Arapiraca	AL	7	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0714	Garanhuns	PE	28	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0715	Taquarana	AL	94	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0716	São Bento do Una	PE	72	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0717	São Bento do Una	PE	73	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0718	São Bento do Una	PE	72	<i>M. euphobiicola</i>
CFC 0724	Serra Talhada	PE	91	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0725	São João	PE	79	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0726	São João	PE	79	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0727	São João	PE	79	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0728	São João	PE	85	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0729	São João	PE	85	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0731	São João	PE	85	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0732	São João	PE	85	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0733	São João	PE	87	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0734	São João	PE	87	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0737	São João	PE	87	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0738	São João	PE	88	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0739	São João	PE	88	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0741	São João	PE	88	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0742	São João	PE	83	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0743	São João	PE	83	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0744	São João	PE	83	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0745	São João	PE	78	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0746	São João	PE	78	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0747	São João	PE	74	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0748	São João	PE	74	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0749	São João	PE	82	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0750	São João	PE	82	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0751	São João	PE	84	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0752	São João	PE	86	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0753	São João	PE	75	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0754	São João	PE	76	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0755	São João	PE	76	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0756	São João	PE	76	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0757	São João	PE	76	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0758	São João	PE	81	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0759	São João	PE	81	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0760	São João	PE	81	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0761	São João	PE	81	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0762	São João	PE	75	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0763	São João	PE	77	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0764	São João	PE	77	<i>M. phaseolina</i>

CFC 0765	São João	PE	77	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0766	São João	PE	80	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0768	Jucati	PE	43	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0769	Jucati	PE	43	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0770	Jucati	PE	43	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0771	Calçado	PE	18	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0772	Calçado	PE	18	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0773	Lajedo	PE	47	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0774	Lajedo	PE	47	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0775	Lajedo	PE	47	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0776	Lajedo	PE	45	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0777	Lajedo	PE	45	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0778	Lajedo	PE	46	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0779	Lajedo	PE	46	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0780	Lajedo	PE	45	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0781	Lajedo	PE	43	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0782	Lajedo	PE	44	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0783	Lajedo	PE	44	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0790	Garanhuns	PE	26	<i>M. pseudophaseolina</i>
CFC 0793	Jati	CE	32	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0794	Jati	CE	32	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0795	Jati	CE	32	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0796	Custódia	PE	26	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0797	Custódia	PE	26	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0798	Custódia	PE	26	<i>M. phaseolina</i>
CFC 0820	Porteiras	CE	64	<i>Macrophomina euphobiicola</i>

^a CFC = Culture Collection of Phytopathogenic Fungi of Cariri, Universidade Federal do Cariri, Crato, Brazil

^b AL = Alagoas, CE = Ceará, MA = Maranhão, PE = Pernambuco, PI = Piauí,

^c Indicate the field where the plant material was sampled

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. Os iniciadores específicos MpTefF / MpTefR, MsTefF / MsTefR, MeTefF / MeTefR foram eficazes na identificação de *Macrophomina phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola*;
2. Três espécies de *Macrophomina* (*M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* e *M. euphorbiicola*) são causadoras da podridão cinzenta do caule em feijão-caupi no Nordeste brasileiro;
3. Dentre as espécies identificadas, *M. euphorbiicola* é registrada pela primeira vez causando a podridão cinzenta do caule em feijão-caupi no mundo e *M. pseudophaseolina* causando a doença pela primeira vez no continente Americano;
4. *Macrophomina phaseolina* é a espécie mais prevalente e com maior distribuição em áreas de produção de feijão-caupi no Nordeste brasileiro;
5. As espécies de *Macrophomina* associadas à podridão cinzenta do caule do feijão-caupi em diferentes estados do Nordeste brasileiro diferem em agressividade, sendo *M. phaseolina* e *M. pseudophaseolina* as mais agressivas.

Normas do periódico

European Journal of Plant Pathology

Instructions for Authors

Types of papers

All contributions should be submitted in English and are subject to peer reviewing. Research papers describing original research should address biological problems. They should contain a novel and well formulated hypothesis, a sound experimental approach, results that confirm or reject the hypothesis and they should offer novel insight into the existing body of knowledge. Research papers should not exceed twenty pages of printed text, including tables, figures and references (one page of printed text = approximately 600 words).

The Short communication format is intended for presentation of important observations that can be clearly described in an abbreviated format. For example, molecular data useful for typing pathogens or the first report of preliminary data would be suitable for this section.

Short descriptions of genes isolated from pathogens and pest organisms, and of plant genes with a putative function in plant– pathogen interactions can also be presented in the Short communication format. Short communications should contain firm data and will be refereed. A Short communication should have an abstract and should not exceed four printed pages in total. There are no subheadings and a description of Materials and methods should be integrated in the text.

Authors who wish to submit a Mini review should first contact the Editorial Office, since only Mini reviews on topical issues will be considered for publication. Mini reviews should not exceed 12 pages of printed text, including tables, figures, and references.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your

manuscript files following the instructions given on the screen.

Important notes

- Upon submission, the **e-mail addresses of all authors** will be requested. At the end of the submission process, the corresponding author will receive an acknowledgement e-mail and all co-authors will be contacted automatically to confirm their affiliation to the submitted work.
- Please note that it is mandatory to use **line numbering** for the manuscript. If a manuscript does not have line numbers it is returned to the author.

Title page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Harris, M., Karper, E., Stacks, G., Hoffman, D., DeNiro, R., Cruz, P., et al. (2001). Writing labs and the Hollywood connection. *Journal of Film Writing*, 44(3), 213–245.

- Article by DOI

Slifka, M. K., & Whitton, J. L. (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine*, <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

Calfee, R. C., & Valencia, R. R. (1991). *APA guide to preparing manuscripts for journal publication*. Washington, DC: American Psychological Association.

- Book chapter

O'Neil, J. M., & Egan, J. (1992). Men's and women's gender role journeys: Metaphor for healing, transition, and transformation. In B. R. Wainrib (Ed.), *Gender issues across the life cycle* (pp. 107–123). New York: Springer.

- Online document

Abou-Allaban, Y., Dell, M. L., Greenberg, W., Lomax, J., Peteet, J., Torres, M., & Cowell, V. (2006). Religious/spiritual commitments and psychiatric practice. Resource document. American Psychiatric Association. http://www.psych.org/edu/other_res/lib_archives/archives/200604.pdf. Accessed 25 June 2007.

Journal names and book titles should be italicized.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 3 kB)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.