

Isolation and identification of pathogens causing stem rot of the fig tree (*Ficus carica*)

Aislamiento e identificación de patógenos causantes de la pudrición del tallo de la higuera (*Ficus carica*)

Sheyla Natali Jahén-Rivera, Olga Gómez-Rodríguez, David Espinosa-Victoria* Colegio de Postgraduados, Km 36.5, Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, CP 56230. *Autor para correspondencia: despinos@colpos.mx

Recibido: 24 de Enero, 2020.

Aceptado: 09 de Abril, 2020.

Jahén-Rivera SN, Gómez-Rodríguez O and Espinosa-Victoria D. 2020. Isolation and identification of pathogens causing stem rot of the fig tree (*Ficus carica*). Mexican Journal of Phytopathology 38(2).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2001-6

Primera publicación DOI: 15 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 15, 2020.

Resumen. En México, el sistema de producción intensivo de higo (*Ficus carica*) var. “Nezahualcoyotl” requiere de densidades de 12,500 plantas ha⁻¹ para rendimientos superiores a 100 t ha⁻¹. La propagación asexual de esta variedad mediante estacas no está exenta de enfermedades. El objetivo de esta investigación fue identificar los agentes causales de la pudrición de estacas de la variedad “Nezahualcoyotl” y generar la correspondiente escala de severidad. La patogenicidad de los aislamientos se corroboró a través de los postulados de Koch. La secuenciación de las regiones ITS1-ITS4 indicó que los aislamientos estuvieron altamente emparentados con *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*

Abstract. In Mexico, the intensive production system of fig (*Ficus carica*) var. “Nezahualcoyotl” requires densities of 12,500 plants ha⁻¹ for yields greater than 100 t ha⁻¹. The asexual propagation of the fig through cuttings in the nursery is not exempt from diseases. The objective of this investigation was to identify the causal agents of the rot of cuttings of the variety “Nezahualcoyotl” and to generate the corresponding severity scale. The pathogenicity of the isolates was corroborated through Koch’s postulates. The sequencing of the ITS1-ITS4 regions indicated that the isolates were highly related to *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* and *Pythium ultimum*. A severity scale with five levels of damage induced by *F. solani* and *A. alternata* and three by *P. ultimum* is reported for the first time. Inoculation separately with *F. solani* and *A. alternata* promoted 100% cortex damage between 21-25 days after inoculation (DAI). The coinoculation of the three pathogens induced earlier (between 11-13 DAI) necrosis of the epidermis (85%) and the cortex (80%). The severity scale will be a valuable help in the quantification and monitoring of the rot of the fig tree stem.

y *Pythium ultimum*. Se reporta por primera vez una escala de severidad con cinco niveles de daño inducidos por *F. solani* y *A. alternata* y tres por *P. ultimum*. La inoculación por separado con *F. solani* y *A. alternata* promovió el 100% de daño de la corteza entre los 21-25 días después de la inoculación (DDI). La coinoculación de los tres patógenos indujo más tempranamente (entre los 11-13 DDI) la necrosis de la epidermis (85%) y de la corteza (80%). La escala de severidad será un valioso auxilio en la cuantificación y seguimiento de la pudrición del tallo de la higuera.

Palabras clave: Propagación, higo, necrosis, severidad, Oomicetos, Ascomicetos.

La higuera (*Ficus carica*) llegó a México durante la conquista en el siglo XVI (Flaishman *et al.*, 2008) y fueron las higueras comunes las que se adaptaron mejor, ya que no requerían de polinización para el desarrollo de siconos. Sin embargo, a través del tiempo las variedades originales experimentaron variaciones fenotípicas como el tamaño, color y consistencia. Una de estas nuevas variedades fue descrita y nombrada cultivar “Nezahualcōyotl” por García *et al.* (2013). Este material vegetativo es utilizado para la producción intensiva bajo cubierta, debido a su rápido crecimiento, fácil manejo y alta productividad que permite tener densidades de 12 500 plantas ha⁻¹ con rendimientos superiores a 100 t ha⁻¹ (Mendoza *et al.*, 2017). La implementación de este sistema de producción requiere veinte veces más plantas que los sistemas convencionales, y que éstas se encuentren libres de plagas y enfermedades. La principal forma de propagar la higuera es mediante estacas de tallos leñosos podados después de la cosecha (Boliani *et al.*, 2019). Las plantas producidas en vivero pueden presentar pudrición del tallo y raíces asociada

Key words: Propagation, fig, necrosis, severity, Oomycetes, Ascomycetes.

Fig trees (*Ficus carica*) arrived in Mexico during the Spanish conquest in the 16th Century (Flaishman *et al.*, 2008), and it was the common fig trees that adapted best, since they required no pollination for the development of syconia. However, with time, the original varieties underwent phenotypical variations, such as size, color and consistency. One of these new varieties was described and named the “Nezahualcōyotl” cultivar by García *et al.* (2013). This vegetative material is used for the intensive production, under cover, due to its quick growth, simple handling and high productivity, which helps obtain densities of 12,500 plants ha⁻¹ with yields of over 100 t ha⁻¹ (Mendoza *et al.*, 2017). The implementation of this production system requires twenty times as many plants than conventional systems, and for them to be free of pests and diseases. The main way to disseminate fig trees is using a cuttling of a ligneous stem trimmed after harvest (Boliani *et al.*, 2019). The plants produced in the greenhouse may display rotting of the stem and roots, related to the pathogens of the damping off complex (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* and *Phytophthora*), which is favored by a relative humidity of 80%, a temperature of 25 °C and high densities (García *et al.*, 2008).

In order to carry out a disease control plan, the priority is to identify the causal agents, as well as to create guides that help understand the symptoms and the progress of the disease. The severity scales are useful to standardize and quantify the disease, which will help implement management plans (Hernández and Sandoval, 2015). The aim of this investigation was to isolate and identify the causal agents of stem rot in fig trees, as well as to create scales for the evaluation of the severity of the causal

a patógenos del complejo damping off (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Phytophthora*), que es favorecida por la humedad relativa de 80%, temperatura de 25 °C y altas densidades (García *et al.*, 2008).

Para realizar un plan de control de la enfermedad, es primordial llevar a cabo la identificación de los agentes causales, así como elaborar guías que permitan conocer los síntomas y el avance de la enfermedad. Las escalas de severidad son útiles para estandarizar y cuantificar la enfermedad, lo que permitirá implementar planes de manejo (Hernández y Sandoval, 2015). El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los agentes causales de la pudrición del tallo de plantas de higuera, así como elaborar escalas para la evaluación de severidad de los agentes causales que sirvan como guías en futuros estudios epidemiológicos.

Para el aislamiento de los agentes causales, se emplearon 50 individuos distribuidos completamente al azar, de un lote de plantas propagadas por estacas de 20 días de edad, que mostraron lento crecimiento, clorosis, marchitamiento, caída de hojas y pudrición de tallo y raíces. Las plantas se tomaron del invernadero de propagación del Campo Experimental de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo a 19° 29' 30.8" Latitud Norte, 98° 52' 22.0" Longitud Oeste y una altitud de 2266 m. Las plantas fueron lavadas con agua corriente y jabón. Posteriormente, se retiró la epidermis con un bisturí para dejar expuesta la corteza donde se notaban lesiones de color marrón-rojizo en los extremos de la estaca (Figura 1). Con ayuda de un bisturí se cortaron cuatro secciones de cada estaca en los bordes de las lesiones, de 0.3 x 0.3 cm de lado y 0.1 cm de grosor (Leslie y Summerell, 2006), 200 secciones en total. Se tomaron cuatro secciones por cada tallo, que fueron sumergidas en agitación constante en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5% durante un minuto. Posteriormente, se

agents to serve as guides in future epidemiological studies.

For the isolation of the causal agents, 50 individuals, distributed totally at random were chosen out of a plot of trees grown out of 20-day-old cuttings, which displayed slow growth, chlorosis, wilting, fallen leaves and rot in stems and roots. The plants were taken from the propagation greenhouse in the Fitotecnia Experimental Field of the Universidad Autónoma Chapingo at 19° 29' 30.8" latitude North, 98° 52' 22.0" longitude West, and an altitude of 2,266 m. The plants were washed with running water and soap. Later, the epidermis was removed using a scalpel to expose the cortex, which showed reddish-brown lesions on the ends of the cutting (Figure 1). Using a scalpel, we cut four sections on each cutting on the edge of the lesions, 0.3 x 0.3 cm each side, and 0.1 cm thick (Leslie and Summerell, 2006), for a total of 200 sections. Four sections were taken for each stem, which were submerged while constantly shaking in a sodium hypochlorite solution (NaClO) at 0.5% for one minute. They were then rinsed three times in sterile distilled water and dried on sterile paper



Figura 1. Lesiones color marrón-rojizo en la corteza (flechas) de una estaca de *F. carica* inoculadas con *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum*.

Figure 1. Reddish-brown lesions on the cortex (arrows) of a cutting of *F. carica* inoculated with *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum*.

enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron sobre toallas de papel estériles dentro de una campana de flujo laminar. Bajo condiciones de asepsia, se colocaron las secciones de tejido de cada tallo en placas de medio Papa Dextrosa Agar, PDA (BD Bioxon®) y fueron incubadas a 28 °C durante cinco días. Se aislaron dos tipos de hongos y un oomiceto, que se purificaron mediante la técnica de punta de hifa y monoesporángios e identificaron morfológicamente mediante microcultivos de cada aislamiento en bloques de medio PDA, sembrado por punción e incubados a temperatura ambiente. Las muestras se tiñeron con azul de metileno y fueron observadas bajo microscopio óptico a 40X, e identificadas morfológicamente con las claves de Barnett y Hunter (1998).

Se reprodujeron los postulados de Koch empleando los aislamientos microbianos asociados a la pudrición del tallo. Se usaron estacas de higuera frescas de 8 cm de largo, con al menos una yema axilar, que fueron lavadas con agua corriente y desinfectadas en una solución de NaOCl al 1% durante dos minutos. En seguida, las estacas fueron enjuagadas con agua destilada estéril y posteriormente expuestas a alcohol etílico al 96% durante un minuto y enjuagadas nuevamente. Las estacas fueron secadas sobre toallas de papel estériles dentro de una campana de flujo laminar. Después, las estacas fueron colocadas en cámaras húmedas, inoculadas por triplicado con los microorganismos aislados, e incubadas a 28 °C. Al cabo de diez días se tomaron muestras de tejido para re-aislar al microorganismo inoculado y registrar la sintomatología de cada una de las estacas infectadas. La cámara húmeda consistió de un vaso de plástico de 240 mL transparente con tapa, dentro del cual se colocó una estaca de higo sostenida por una base de unicel. El inóculo consistió de tres discos de 0.5 cm de diámetro de siete días de crecimiento, para inoculaciones individuales, 1.5 discos de cada medio en inoculaciones

towels inside a laminar flow hood. Under aseptic conditions, the sections of tissue from each stem were placed in Potato-Dextrose-Agar, or PDA, medium plates (BD Bioxon®), and they were incubated at 28 °C for five days. Two types of fungi were isolated, along with one oomycete, all of which were purified using the hyphal tip method and monosporangia, and were morphologically identified by microcultivations of each isolation in PDA medium blocks, re-sown by puncture and incubated at room temperature. The samples were dyed using methylene blue, observed under an optical microscope at a magnification of 40X, and identified morphologically with the keys by Barnett and Hunter (1998).

Koch's postulates were reproduced using the microbial isolations related to stem rot. Fresh fig tree cuttings, 8 cm in length, were used, which were washed with running water and disinfested in a 1% NaOCl solution for two minutes. Next, the cuttings were rinsed with sterile distilled water, and exposed to ethyl alcohol at 96% for one minute and rinsed again. The cuttings were dried on sterile paper towels inside a laminar flow hood. The cuttings were then placed in wet chambers, inoculated in triplicate with the isolated microorganisms, and incubated at 28 °C. After ten days, tissue samples were taken to re-isolate the inoculated microorganism and record the symptomatology of each one of the infected cuttings. The wet chamber consisted of a transparent 240 mL cup with a lid, inside of which a fig cutting was placed, held up with a styrofoam base. The inoculant consisted of three discs, 0.5 cm in diameter, with 7 days of growth, for individual inoculations, 1.5 discs of each medium in double inoculations, and one disc of each medium for triple inoculations. The discs were placed on a 5 x 5 cm sterile, damp paper towel and 7 x 7 piece of aluminum foil, attached to the base of the cutting with Parafilm "M"®.

dobles y un disco de cada medio en inoculaciones triples. Los discos fueron colocados sobre una toalla de papel húmeda de 5 x 5 cm y papel aluminio de 7 x 7 cm estériles, sujetos a la base de la estaca con Parafilm "M"®. El fondo del vaso se cubrió con una toalla de papel húmeda de 10 x 10 cm y la tapa fue sellada con Parafilm "M"®.

Para la identificación molecular, los aislamientos se incubaron a 27 °C durante siete días para después extraer el ADN. Mediante PCR, se amplificaron las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 de hongos y oomicetos, utilizando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Para los hongos se empleó un ciclo inicial de 94 °C durante cinco minutos, seguidos de 35 ciclos (94 °C, 30 segundos; 56 °C, 45 segundos y 72 °C, dos minutos) y una elongación final a 72 °C durante cinco minutos. Para los oomicetos, se empleó un ciclo inicial de 95 °C durante cuatro minutos, 34 ciclos (95 °C, un minuto; 55 °C, un minuto y 72 °C, dos minutos) y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 minutos (White *et al.*, 1990). Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Las secuencias se ensamblaron y editaron con el programa BioEdit y fueron comparadas contra las secuencias contenidas en la base de datos del GeneBank del National Center of Biotechnology Information (NCBI) mediante la herramienta BLAST para determinar las posibles especies de cada aislamiento.

Por otro lado, Se colocaron estacas frescas de aproximadamente ocho centímetros de largo en cámaras húmedas de forma individual, igual que en las pruebas de patogenicidad. Las estacas fueron inoculadas individualmente con los patógenos aislados, así como con todas las combinaciones, estableciéndose quince repeticiones por tratamiento, lo cual resultó en un total de 120 unidades experimentales. Se incubaron a 28 °C y se seleccionaron al

The bottom of the cup was covered with a 10 x 10 cm damp paper towel and the lid was sealed with Parafilm "M"®.

For the molecular identification, the isolations were incubated at 27 °C for seven days, to then extract the DNA. By means of PCR, we amplified the internal transcribed regions ITS1 and ITS4 of fungi and oomycetes, using the primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). For the fungi, we used an initial cycle of 94 °C for five minutes, followed by 35 cycles (94 °C, 30 seconds; 56 °C, 45 seconds and 72 °C, two minutes) and a final extension at 72 °C for five minutes. For the oomycetes, we used an initial 95 °C cycle lasting four minutes, 34 cycles (95 °C, one minute; 55 °C, one minute and 72 °C, two minutes) and a final extension step at 72 °C for 10 minutes (White *et al.*, 1990). The amplified products were separated by electrophoresis in agarose gels at 0.8%. The sequences were assembled and edited using the program BioEdit, and they were compared with the sequences contained in the GeneBank database of the National Center of Biotechnology Information (NCBI) using BLAST to determine the possible species of each isolation.

On the other hand, fresh cuttlings, approximately eight centimeters long, were placed in wet chambers individually, as in the pathogenicity tests. The cuttlings were inoculated individually with the isolated pathogens, as well as with all the combinations, establishing fifteen repetitions per treatment, which resulted in a total of 120 experimental units. They were incubated at 28 °C and three cuttlings or repetitions of each treatment were chosen at random with time, in order to determine the levels of severity (scale of severity).

Finally, the percentage of rotting was evaluated. This was measured by measuring the area of the rot in the cuttling, both in the cortex and the

azar tres estacas o repeticiones de cada tratamiento a través del tiempo, para determinar los niveles de severidad (escala de severidad).

Finalmente, se evaluó el porcentaje de pudrición, el cual se calculó midiendo el área de pudrición de la estaca tanto de la corteza como de la epidermis, así como el área total de la corteza y de la epidermis, obteniendo su relación con la siguiente fórmula: $(A2 \times 100)/A1$, donde A2 es el área total de la epidermis o de la corteza de la estaca y A1 es el área de la epidermis o de la corteza con pudrición. Las mediciones se hicieron por triplicado, se determinó el promedio y se propuso un rango de porcentaje de daño para cada nivel de severidad con cada tratamiento. Las mediciones se hicieron con ayuda del software de procesamiento de imágenes IMAGE J versión 1.50i desarrollado por el National Institute of Health (Rasband, 2018).

Los aislamientos resultaron altamente emparentados con *F. solani* (99% de similitud) con 95% de frecuencia en estacas enfermas, *A. alternata* (99% de similitud) con 72% de frecuencia y *P. ultimum* (100% de similitud) con 80% de frecuencia. Los postulados de Koch confirmaron que *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum* fueron los agentes causales en la pudrición de las estacas de la higuera, ya que se observaron síntomas similares a los encontrados en el campo. El re-aislamiento de los dos hongos y el oomiceto correspondieron a los que se inocularon inicialmente en un 95%.

El Cuadro 1, corresponde a la escala de severidad donde se muestra el porcentaje de daño ocasionado por *F. solani*, *A. alternata*, y *P. ultimum* individualmente, así como el daño inducido por sus combinaciones a través del tiempo en la corteza y epidermis de la estaca. En general, se establecieron cinco niveles de daño visualmente diferentes entre sí. Sin embargo, para *P. ultimum* se establecieron solamente tres, debido a que solo se detectó avance de la enfermedad hasta los 32 días después de la















epidermis, as well as the total area of the cortex and the epidermis, obtaining the proportion with the following formula: $(A2 \times 100)/A1$, where A2 is the total area of the epidermis or of the cortex of the cuttling, and A1 is the area of the epidermis or of the cortex with rot. The measurements were carried out in triplicate, the average was calculated and damage percentage range was proposed for each level of severity with each treatment. The measurements were taken using the image processing software IMAGE J, version 1.50i, developed by the National Institute of Health (Rasband, 2018).

The isolations turned out to be highly related to *F. solani* (99% similarity) with a 95% frequency in diseased cuttings, *A. alternata* (99% similarity) with a 72% frequency, and *P. ultimum* (100% similarity) with an 80% frequency. Koch's postulates confirmed that *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum* were the causal agents in the rotting of the fig cuttings, since similar symptoms were observed to those found on the field. The re-isolation of the two fungi and oomycetes matched those inoculated initially at 95%.

Table 1 shows the scale of severity, including the percentage of damage caused by *F. solani*, *A. alternata*, and *P. ultimum* individually, as well as the damage induced by its combinations with time in the cortex and epidermis of the cuttling. In general, five visually different levels of damage were established. However, for *P. ultimum*, only three were established, since the progress of the disease was only detected 32 days after inoculation (DAI). To date, there are no reports of the presence of these three pathogens in fig cuttings, although they are present in other crops with similar symptoms under greenhouse conditions.

Fusarium solani attacks adult mango plantations, displaying symptoms of wilting in the stem apex and necrosis in vascular tissues (Khanzada *et al.*, 2004). Likewise, in apple trees, it causes smut

Cuadro 1. Escala de severidad en el que se observa el porcentaje de daño en estacas de *Ficus carica* inducido por *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* y *Pythium ultimum* inoculados individualmente y en combinación.**Table 1. Scale of severity showing the percentage of damage on *Ficus carica* cuttings induced by *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* and *Pythium ultimum* inoculated individually and in combination.**

Patosistema	Nivel	% de daño		DDI ²	Epidermis	Corteza
		Epidermis	Corteza			
<i>F. carica</i> x <i>F. solani</i>	1	0	0-2	0-4		
	2	0-4	3-12	5-9		
	3	5-23	13-20	10-12		
	4	24-56	21-50	13-20		
	5	57-70	51-100	21-25		
<i>F. carica</i> x <i>A. alternata</i>	1	0	0-1	0-4		
	2	0	2-12	5-9		
	3	0	13-35	10-14		
	4	0	36-50	15-21		
	5	0-8	51-100	22-25		
<i>F. carica</i> x <i>P. ultimum</i>	1	0	0-1	0-4		
	2	0	2-20	5-18		
	3	0	21-30	19-32		
<i>F. carica</i> x <i>F. solani</i> x <i>A. alternata</i>	1	0	0-4	0-4		
	2	0	5-37	5-8		
	3	0	38-50	9-12		
	4	0-4	51-73	13-16		
	5	5-40	74-80	17-20		
<i>F. carica</i> x <i>F. solani</i> x <i>P. ultimum</i>	1	0	0-5	0-4		
	2	0-18	6-18	5-12		
	3	19-35	19-40	13-14		
	4	36-45	41-55	15-16		
	5	46-63	56-100	17-20		
<i>F. carica</i> x <i>A. alternata</i> x <i>P. ultimum</i>	1	0	0-7	0-4		
	2	0-20	8-12	5-8		
	3	21-38	13-54	9-12		
	4	39-42	55-80	13-20		
	5	43-63	81-100	21-25		
<i>F. carica</i> x <i>F. solani</i> x <i>A. alternata</i> x <i>P. ultimum</i>	1	0-8	0-4	0-3		
	2	9-40	5-10	4-6		
	3	41-55	11-38	7-8		
	4	56-60	39-60	9-10		
	5	61-85	61-80	11-13		

²Días después de la inoculación / Days after inoculation.

inoculación (DDI). A la fecha, no hay reportes de la presencia de estos tres patógenos en estacas de higuera, aunque éstos se encuentran presentes en otros cultivos con sintomatología similar bajo condiciones de invernadero.

Fusarium solani ataca plantaciones adultas de mango, mostrando síntomas de marchitez de puntas de tallos y necrosis en tejidos vasculares (Khanzada *et al.*, 2004). Igualmente, en manzanos causa tizón y caída de hojas (Wang *et al.*, 2010). Este hongo, produce enzimas como cutinasas, celulasas, quitosanasas, pectinasas y otras que degradan fitoalexinas (Leslie y Summerell, 2006). Debido a este mecanismo, *F. solani* puede afectar fácilmente los tejidos blandos y lignificados, como los tallos de higuera, que manifestaron los primeros síntomas de pudrición a los cinco días después de la inoculación (DDI). Los síntomas de las especies patogénicas del género *Fusarium*, son marchitamiento vascular y pudrición de tallos y raíces (Torres, 2000). En el presente trabajo, los más altos porcentajes de pudrición de epidermis y corteza, la presencia de micelio en el exterior de la estaca, así como el desprendimiento de la epidermis ocurrieron en el nivel 5 de la escala de severidad, mostrando de 57-70 y 51-100 % de daño en epidermis y corteza, respectivamente, entre los 21 y 25 DDI.

Por otra parte, la especie más importante del género *Alternaria* es *A. alternata* que puede manifestarse como patógeno, oportunista o saprofito (Logrieco *et al.*, 2009). En plantas adultas de higuera se han reportado daños causados por especies de *Alternaria*, sin embargo, siempre se asocian a daños en hojas y siconos, así como en frutos de manzano, cítricos, olivos y tomates (López *et al.*, 2016). Todas las especies patogénicas de *Alternaria* producen fitotoxinas específicas y no específicas para sus hospederos, entre las toxinas no específicas se encuentra el zinniol que induce necrosis (Lou *et al.*, 2013). El más alto porcentaje de necrosis de la corteza en las estacas de higuera, promovida por

and defoliation (Wang *et al.*, 2010). This fungus produces enzymes such as cutinases, cellulases, chitinases, pectinases and others that degrade phytoalexins (Leslie and Summerell, 2006). Due to this mechanism, *F. solani* can easily affect soft and lignified tissues, such as the fig tree stems, which displayed their first symptoms of rotting five days after inoculation (DAI). The symptoms of the pathogenic species of the genus *Fusarium* are vascular wilting and the rotting of stems and roots (Torres, 2000). In this investigation, the highest percentages of rotting of the epidermis and cortex, the presence of mycelia on the surface of the cuttling, and the detachment of the epidermis took place in stage 5 of the scale of severity, showing 57-70 and 51-100% of damage on the epidermis and cortex, respectively, between 21 and 25 DAI.

On the other hand, the most important species of the genus *Alternaria* is *A. alternata*, which can appear as a pathogen, an opportunist or a saprophyte (Logrieco *et al.*, 2009). In adult fig trees, damages caused by species of *Alternaria* have been reported, although they are always related to damages in leaves and syconia, as well as in apple, citrus, olive and tomato fruits (López *et al.*, 2016). All the pathogenic species of *Alternaria* produce phytotoxins that are specific and non-specific to their hosts; among the non-specific toxins is the zinniol, which induces necrosis (Lou *et al.*, 2013). The highest percentage of necrosis on the cortex of fig tree cuttings, promoted by *A. alternata* was displayed on level 5 of the severity scale, with 51-100% of damage, between 22 and 25 DAI. However, the epidermis only displayed 8% rotting on level 5. The presence of gray mycelia was also observed on the outside of the cuttling. The separate inoculation with *F. solani* and *A. alternata* induced 100% of damage on the cortex between 22 and 25 DDI.

The oomycete *P. ultimum* is a member of the damping off complex, which causes the death

A. alternata se presentó en el nivel 5 de la escala de severidad, con 51-100% de daño, entre los 22-25 DDI. Sin embargo, la epidermis presentó solo 8% pudrición hasta el nivel 5. Se observó también presencia de micelio de color gris oscuro en el exterior de la estaca. La inoculación por separado con *F. solani* y *A. alternata* indujo 100% de daño de la corteza entre 22-25 DDI.

Para el caso del oomiceto *P. ultimum* es miembro del complejo damping off, causante de la muerte de plántulas de muchas especies de importancia agrícola. Este oomiceto es de las especies más agresivas dentro de su género (Mavrodi *et al.*, 2012). *Pythium ultimum* se asocia a la pudrición de raíces de plantas adultas, portainjertos y plántulas de manzano (Mazzola *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2016). En este trabajo, *P. ultimum* promovió de 21-30% del daño de la corteza entre los 19-32 DDI. También se observó presencia de micelio en la parte superior de la estaca, que al ser tocado se desprendió con facilidad. La epidermis no presentó pudrición ni desprendimiento.

Los porcentajes más altos de daño se presentaron en un rango de menor tiempo (de 17-20 DDI) cuando se hicieron inoculaciones mixtas de *F. solani* + *A. alternata* y *F. solani* + *P. ultimum*. La manifestación drástica más temprana de la necrosis de epidermis (61-85%) y corteza (61-80%) ocurrió entre los 11-13 DDI, cuando se inocularon conjuntamente *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum*. Lo anterior podría explicarse por el efecto sinérgico de las enzimas que cada patógeno sintetiza, lo que facilita el progreso de la enfermedad. Las estacas testigo, mostraron daño ligero debido a la oxidación por el corte. En campo, la necrosis del tallo de la higuera está asociado a la diseminación de esporas y micelio a través del agua, viento o herramientas. No obstante, en vivero, la alta densidad podría favorecer la diseminación de propágulos e infestación, ya que las plántulas se encuentran

of seedlings of various species of agricultural importance. This oomycete is one of the most aggressive species in its genus (Mavrodi *et al.*, 2012). *Pythium ultimum* is related to the rotting of roots in adult plants, rootstocks and apple seedlings (Mazzola *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2016). In this investigation, *P. ultimum* promoted 21-30% of the damage on the cortex 19-32 DAI. The presence of mycelia was also observed in the upper section of the cuttings, and it detached easily when touched. The epidermis presented no rotting or detaching.

The highest damage percentages appeared in a lower time range (17 to 20 DAI), when mixed inoculations were carried out with *F. solani* + *A. alternata* and *F. solani* + *P. ultimum*. The drastic appearance of necrosis on the epidermis (61-85%) and cortex (61-80%) took place between 11-13 DAI, when *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum* were inoculated together. This could be explained by the synergic effect of the enzymes that each pathogen synthesizes, helping the disease to progress. The control cuttings showed slight damage due to oxidation from the cut. On the field, the necrosis of the fig tree stem is related to the dissemination of spores and mycelia through water, wind or tools. Notwithstanding this, in the greenhouse, the high density may favor the dissemination of propagules and infestation, since the seedlings are near each other in the processes of propagation, climatization and transportation.

This work is the first time in which *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum* are reported as causal agents of the rotting of fig tree cuttings. The symptoms found in the cuttings evaluated *in vitro* were similar to those presented in propagation greenhouse seedlings, thus confirming Koch's postulates. The proposed scale of severity will help identify the degree of damage caused by *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum*, whether individually or combined, in intensive fig production systems.

próximas en los procesos de propagación, climatización y transporte.

Este es el primer trabajo en el que se reporta a *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum* como agentes causales de la pudrición de las estacas de la higuera. Los síntomas encontrados en las estacas evaluadas *in vitro* fueron similares a los presentados en plántulas en invernadero de propagación, confirmando así los Postulados de Koch. La escala de severidad propuesta permitirá identificar el grado de daño causado por *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum*, de forma individual o combinada, en los sistemas de producción intensivos de higo. De esta investigación se deriva la necesidad de validar las escalas de severidad en el sistema de propagación de higo en invernadero. Así, al verificarse su precisión y exactitud, podrán emplearse exitosamente en la evaluación de los daños en esta especie. Por otro lado, la identificación de los patógenos *F. solani*, *A. alternata* y *P. ultimum* permitirá realizar un control fitosanitario adecuado, y ofrecer plantas de mejor calidad que permitan el establecimiento óptimo de sistemas intensivos.

AGRADECIMIENTOS

Esta aportación forma parte de una investigación de Maestría en Ciencias del programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, que fue apoyada económicamente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

LITERATURA CITADA

- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA. 200p.
- Boliani AC, Ferreira AFA, Monteiro LNH, Silva MSACD and Rombola AD. 2019. Advances in propagation of *Ficus carica* L. Revista Brasileira de Fruticultura 41:1-13. doi: 10.1590/0100-29452019026
- Flaishman MA, Rodov V and Stover E. 2007. The fig: botany, horticulture, and breeding. Horticultural Reviews 34:113-196. doi: 10.1002/9780470380147.ch2
- García V, Iriarte A, Flores S y Lesino G. 2008. Monitoreo higrotérmico de un edificio acondicionado para propagación agámica de plantas. Avances en energías renovables y medio ambiente 12:29-36. Recuperado de <https://>

This investigation leads to the need to validate the scales of severity in the fig propagation system in the greenhouse. In this way, when verifying their precision and accuracy, they may be used successfully in the evaluation of damages of this species. On the other hand, the identification of the pathogens *F. solani*, *A. alternata* and *P. ultimum* will help carry out an adequate phytosanitary control, and offer better-quality plants that allow an optimum establishment of intensive systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

This contribution is part of an investigation for a Master in Science degree from the Soil Science program of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, which was economically funded by the National Science and Technology Council (Conacyt).

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- [www.mendoza-conicet.gob.ar/asades/modulos/averma/trabajos/2008/2008-t002-a005.pdf](http://www.mendoza-conicet.gob.ar/asades/modulos/averma/trabajos/2008/2008-t002-a005.pdf)
- García RMT, Mendoza CVM, Valadez ME y Muratalla LA. 2013. Initial assessment of natural diversity in Mexican fig landraces. Genetics and Molecular Research 12:3931-3943. doi: 10.4238/2013.September.23.12
- Hernández RL y Sandoval IJS. 2015. Escala diagramática de severidad para el complejo mancha de asfalto del maíz. Revista Mexicana de Fitopatología 33:95-103. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000100095&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100095&lng=es&tlng=es).
- Khanzada MA, Lodhi AM and Shahzad S. 2004. Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango. Pakistan Journal of Botany 36:181-190. Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Saleem\\_Shahzad/publication/266069789\\_Pathogenicity\\_of\\_Lasiodiplodia\\_theobromae\\_and\\_Fusarium\\_solani\\_on\\_mango/links/543d23540cf2c432f742531c.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Saleem_Shahzad/publication/266069789_Pathogenicity_of_Lasiodiplodia_theobromae_and_Fusarium_solani_on_mango/links/543d23540cf2c432f742531c.pdf)
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. USA. 388p.
- Logrieco A, Moretti A and Solfrizzo M. 2009. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. World Mycotoxin Journal 2:129-140. doi: 10.3920/WMJ2009.1145

- López P, Venema D, de Rijk T, de Kok A, Scholten JM, Mol HG and de Nijs, M. 2016. Occurrence of *Alternaria* toxins in food products in The Netherlands. *Food Control* 60:196-204. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.07.032
- Lou J, Fu L, Peng Y and Zhou L. 2013. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules* 18:5891-5935. doi: 10.3390/molecules18055891
- Mavrodi OV, Walter N, Elateek S, Taylor CG and Okubara PA. 2012. Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. *Biological Control* 62:93-102. doi: 10.1016/j.biocontrol.2012.03.013
- Mazzola M, Andrews PK, Reganold JP and Levesque CA. 2002. Frequency, virulence, and metalaxyl sensitivity of *Pythium* spp. isolated from apple roots under conventional and organic production systems. *Plant Disease* 86:669-675. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.6.669
- Mendoza CVM, Vargas CJM, Calderón ZG, Mendoza CMD, and Santacruz VA. 2017. Intensive production systems of fig (*Ficus carica* L.) under greenhouse conditions. *Experimental Agriculture* 53:339-350. doi: 10.1017/S0014479716000405
- Rasband WS. 2018. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.
- Torres GA. 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana* 17:11-16. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/24385/>
- Wang PH, Chen YS, Lin MJ, Tsou YJ and Ko WH. 2010. Severe decline of wax apple trees caused by *Fusarium solani* in northern Taiwan. *Botanical Studies* 51:75-80. Recuperado de <http://hdl.handle.net/11455/68359>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp:315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego USA. 482p. doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1
- Zhu Y, Shin S and Mazzola M. 2016. Genotype responses of two apple rootstocks to infection by *Pythium ultimum* causing apple replant disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 38:483-491. doi: 10.1080/07060661.2016.1260640