

Identificación de estructuras de infección de *Phytophthora palmivora* en hojas de clones de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.)*

Identification of infection structures of *Phytophthora palmivora* in leaves of oil palm clones (*Elaeis guineensis* Jacq.)

CITACIÓN: Ávila-Méndez, K., Pico, G., Ávila, R., Sarria, G. A., & Romero, H. M. (2018). Identificación de estructuras de infección de *Phytophthora palmivora* en hojas de clones de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Palmas*, 39(1), 120-130.

PALABRAS CLAVE: *Phytophthora palmivora*, in vitro, patosistema, ortet, apresorio, quiste.

KEYWORDS: *Phytophthora palmivora*, in vitro, pathosystem, ortet, appressorium, cyst.

RECIBIDO: diciembre de 2017

APROBADO: diciembre de 2017

* Artículo de investigación científica y tecnológica.

KELLY ÁVILA MÉNDEZ

Programa de Biología y Mejoramiento,
Cenipalma

GILBERTO PICO ORTIZ

Programa de Biología y Mejoramiento,
Cenipalma

RODRIGO ÁVILA DÍAZ-GRANADOS

Programa de Biología y Mejoramiento,
Cenipalma

GREICY SARRIA VILLA

Programa de Plagas y Enfermedades,
Cenipalma

HERNÁN MAURICIO ROMERO ANGULO
Programa de Biología y Mejoramiento,
Cenipalma

Departamento de Biología, Universidad
Nacional de Colombia – Bogotá
hromero@cenipalma.org

Resumen

Este trabajo investigó el modelo de interacción planta-patógeno mediante discos de hojas de clones de palma de aceite inoculados en condiciones *ex situ* con un aislamiento de *Phytophthora palmivora*. Las inoculaciones se realizaron en condiciones controladas en cámara de crecimiento. En total, seis diferentes ortets fueron evaluados en seis tiempos de infección (2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas postinfección, o hpi). Se determinó la presencia de estructuras de patogenicidad de *P. palmivora* como quiste, apresorio y tubos germinativos. Los quistes fueron identificados principalmente a las 2, 4 y 6 hpi. A partir de las 48 hpi no hubo presencia de zoosporas enquistadas para ningún ortet evaluado. En cuanto a los apresorios, estos se empezaron a desarrollar a las 4 horas de realizada la inoculación (siendo las 12 y 24 hpi los tiempos de mayor registro de estas estructuras).

Por su parte, los tubos germinativos se encontraron a partir de las 48 hpi únicamente. Finalmente, se pudo establecer que el patógeno logra colonizar tejidos de foliolo no lignificados de clones de palma. Además, se encontró una relación entre el número de estructuras del patógeno con el comportamiento del cultivar de la palma donor (ramet).

Abstract

Plant-pathogen model interaction was studied using leaf disks of oil palm clones inoculated *ex situ* with a *Phytophthora palmivora* isolate. The inoculation process was performed under growth chamber conditions. Six ortets were evaluated at six post-inoculation times (2, 4, 6, 12, 24 y 48 hours post infection, or hpi). Pathogen's infection structures as cyst, apressorium and germinative tubes were found. Cysts were identified mainly at 2, 4 and 6 hpi. After 48 hpi there were not any cysts for the evaluated ortets. The apresoria started to develop at 4 hpi, with the highest presence of these structures at 12 and 24 hpi. Germinative tubes were found only after 48 hpi. Therefore, it was established that the pathogen can colonize no-lignified tissue of oil palm clones. Finally, we found a relation between the pathogen's structures number and the response of the ortet related to its susceptibility and resistance response. Thus, it was found that the susceptible cultivar showed the highest number of germinative tubes.

Introducción

La Pudrición del cogollo (PC) es una de las principales enfermedades que afecta al cultivo de palma de aceite, destruyendo plantaciones desde 1964. En Colombia la enfermedad se presenta en las cuatro zonas palmeras y ha alcanzando proporciones epidémicas (Sarria *et al.*, 2013a, 2016). A finales de 2004 en la Zona Suroccidental se registró un incremento en el número de casos, con un crecimiento exponencial de esta enfermedad, y a partir de 2007 se vieron afectadas más de 30.000 ha de cultivos de palma de aceite. En la Zona Central un comportamiento similar de la enfermedad fue registrado para la región de Puerto Wilches (Norte de Santander) entre 2009 y 2013, periodo en el cual se perdieron más de 40.000 ha como consecuencia de una epidemia de PC (Sanz, 2016). Por su parte, los productores de la Zona Norte actualmente hacen frente a la amenaza de una expansión epidémica de la PC con síntoma de hoja clorótica, la cual da cuenta de un estado avanzado de la enfermedad. Una amplia revisión del impacto de esta enfermedad desde sus inicios se encuentra

en Benítez & García (2015), Sundram & Intan-Nur (2017) y Torres *et al.* (2016).

La enfermedad de la Pudrición del cogollo es causada por el oomiceto hemibiótrofo *P. palmivora* (Sarria *et al.*, 2008, 2013). Desde su identificación como agente causal de la PC en 2008, el Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma) ha liderado diferentes investigaciones que han dado como resultado el desarrollo de estrategias de manejo integrado del cultivo de palma, así como la descripción del patógeno por medio de inoculación en condiciones *in vitro* en foliolos inmaduros de palma (Martínez *et al.*, 2013, 2014a), entre otras.

En cuanto a la presencia de esta enfermedad en otros cultivos, Mohamed-Azni *et al.* (2017) emplearon la técnica de foliolo inmaduro, logrando infectar foliolos de palma de aceite con *P. palmivora* aislada proveniente de cultivos de cacao y durián.

Teniendo en cuenta que actualmente no se conocen fuentes probadas de resistencia de cultivares de *Elaeis guineensis* a la PC, y que un ciclo de mejoramiento genético de palma puede durar más de 25 años

(Romero, 2013), la búsqueda de materiales de siembra resistentes a esta enfermedad es una tarea que requiere de herramientas alternas para acelerar los procesos en la selección de genotipos. Una de estas herramientas de selección es la evaluación de genotipos bajo condiciones *ex situ*, la cual permite recortar los tiempos de selección además de utilizar menos espacio en campo. Diferentes estudios reportan el uso de herramientas *ex situ* para la selección de cultivares resistentes. Estos métodos son de gran utilidad cuando se está desarrollando un nuevo modelo de estudio (Huisman *et al.*, 2015; Nyadanu, Assuah, Adomako & Opoku, 2012; Ray, Mondal, Chowdhury & Kundu, 2015; Weiland, Nelson & Hudler, 2010).

De otro lado, la identificación de estructuras en tejido es una práctica habitual en la descripción de enfermedades en plantas. A nivel general, los métodos se dividen en *in vivo* y *ex situ*. Los métodos *in vivo* son

aquellos donde se realiza la inoculación del patógeno en la planta y posteriormente se procesa el tejido intervenido para su análisis. Por su parte, a través de los métodos *ex situ* se toman secciones de tejido –hojas completas (*detached-leaf*) o disco de hoja (*leaf-disk*)– y sobre estas se realiza el proceso de inoculación para la respectiva identificación o conteo, con el cual se busca generar las descripciones de tipo histológico (Van-Wees, 2009). En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos de patosistemas que han hecho uso de estas metodologías para la detección de este tipo de estructuras, así como para determinar la respuesta de los cultivares al patógeno.

El objetivo principal de este ensayo fue identificar estructuras de infección de *P. palmivora* en discos de hojas de clones de palma de aceite, y relacionar la presencia de dichas estructuras con la respuesta del cultivar de la palma donador (ortet).

Tabla 1. Ejemplos de patosistemas que implementan el método de disco de hoja (D) y hoja desprendida (H).

Patosistema	Método		Tipo de estudio	Referencias
	D	H		
Cacao – <i>P. palmivora</i>		X	Análisis de resistencia foliar.	Iwaro <i>et al.</i> (1997); Nyadanu <i>et al.</i> (2009, 2012); Tahi <i>et al.</i> (2000, 2006).
Tomate – <i>Botrytis cinerea</i>	X		Pruebas histoquímicas y detección de estructuras del patógeno.	Asselbergh <i>et al.</i> (2007).
<i>Capsicum annum</i> – <i>Phytophthora</i>	X		Evaluación agresividad de aislamientos del patógeno.	Monroy-Barbosa & Bosland (2010).
Tabaco – <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	X		Respuesta de cultivares.	Tedford (1990).
<i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Phytophthora cinnamomi</i>		X	Descripción histológica; conteo de estructuras.	Eshraghi <i>et al.</i> (2011).
Trigo – <i>Puccinia triticina</i>		X	Evaluación de materiales.	Boydom (2013).

Materiales y métodos

Material vegetal

Los cultivares clonados (ortets) que fueron evaluados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Material vegetal utilizado para la identificación de estructuras de *P. palmivora*.

Ortet	Sitio de colecta*	Observaciones	Comportamiento de la palma donor en condiciones de campo/ invernadero
1	Campo Experimental Palmar de La Vizcaína (Barrancabermeja, Santander)	Palma <i>tenera</i> sobreviviente a un brote de PC en condiciones de vivero.	Posible resistente
33	Tumaco (Nariño)	Palma <i>tenera</i> sobreviviente a un foco de PC en el municipio de Tumaco.	Posible resistente
57	Campo Experimental Palmar de La Vizcaína (Barrancabermeja, Santander)	Palma <i>pisifera</i> colección Angola.	Posible susceptible
28	Puerto Wilches (Santander)	Palmas <i>tenera</i> sobrevivientes a un foco de PC en el municipio de Puerto Wilches.	Posible resistente
35			
34			

* Hace referencia a la ubicación en la que fue tomada la palma donor (ramet).

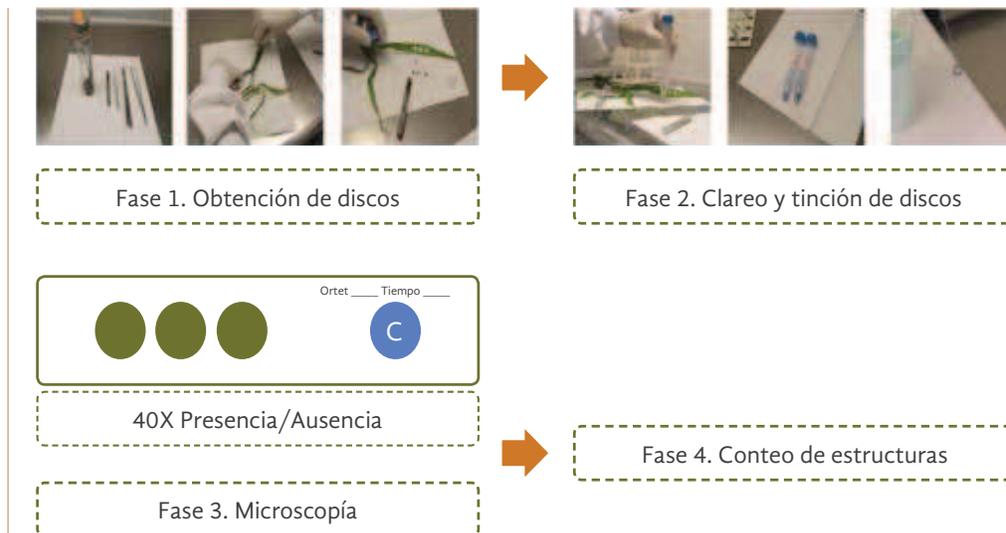
Inoculación de clones

El aislamiento de *P. palmivora* usado en este ensayo es originario de la Zona Central y fue entregado por el Área de Fitopatología de Cenipalma (Código ANLA CPPhZC-05). Los cultivos del patógeno fueron mantenidos en el laboratorio de microbiología de Cenipalma a una temperatura ambiente de 25 °C y un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad en medio V8 agar clarificado. Las inoculaciones se realizaron con cultivos de 10 días de crecimiento. Para las inoculaciones se tomaron tres clones por ortet, y de cada clon se extrajeron tres discos para inoculación y un disco para control (disco inoculado con agua destilada estéril), tal como se detalla en la Figura 1.

Los discos de hoja se obtuvieron a través de un sacabocado de 1,0 cm de diámetro y fueron inoculados con una suspensión de zoosporas de *P. palmivora* (previa inducción de zoosporas por choque térmico) con una concentración de 300.000 zoosporas/ml. El experimento se llevó a cabo bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento (fitotrón) marca Weiss Gallenkamp®; equipos disponibles en el laboratorio de fisiología del Centro Experimental Palmar de La Vizcaína.

Los discos fueron mantenidos en placas estériles de seis pozos a una temperatura de 28 °C con una humedad relativa de 72 % y un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad en condiciones de cámara de crecimiento. Los tiempos de infección evaluados fueron: 2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas postinfección (hpi).

Figura 1. Esquema de la metodología empleada para la obtención de discos de hoja de clones de palma de aceite. El procedimiento se realiza en cabina de flujo laminar.



Clareo, identificación y conteo de estructuras

El clareo de los discos se realizó con una solución A (ácido acético: etanol = 1:3 v/v), dejando cada disco en 2,5 ml de esta solución en agitación durante 12 horas. Posteriormente, se realizó cambio a la solución B (ácido acético: etanol:glicerol = 1:5:1 v/v/v), utilizando 2 ml de esta solución en agitación durante 4 horas. Por último, se removió la solución y los discos fueron lavados con agua destilada estéril, para luego ser preservados en glicerol al 60 %. La Figura 1 resume el proceso realizado para el clareo y conteo de estructuras en cada ortet evaluado (fase 2).

Posteriormente, los discos fueron montados en un portaobjetos. Como paso inicial para el conteo de estructuras se detectó la presencia/ausencia de la estructura en el objetivo de 40X. Los conteos fueron realizados en el objetivo de 10X, realizando 3 conteos en campos aleatorios en cada disco por repetición. De esta forma se obtuvieron 27 datos de conteo por individuo, por tiempo. Las observaciones y conteos se realizaron en un microscopio Nikon Eclipse 50i, Leica DMI 6000B.

Análisis de datos

La normalidad de los datos fue verificada y se realizó una prueba de ANOVA para determinar las diferencias estadísticas entre ortet y tiempo de infección en cada estructura del patógeno.

Resultados y discusión

Estructuras del patógeno

Todas las estructuras del patógeno fueron visualizadas con la metodología de disco de hoja. Adicionalmente, se logró observar una distribución diferencial entre los ortets evaluados. Sin embargo, es importante aclarar que en este trabajo, debido al tipo de tejido evaluado, se presentó una variación en los tiempos registrados con respecto a lo expuesto por otros autores (Martínez *et al.*, 2013; Sarria *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2016). La Figura 2 muestra un esquema de las estructuras identificadas en este trabajo con su respectiva micrografía.

Las zoosporas son las unidades infectivas que usa el patógeno para colonizar un tejido (Hardham & Blackman, 2010; Orłowska, Llorente & Cvitanich, 2013). Estas estructuras se “enquistan”, perdiendo sus dos flagelos, luego de alcanzar el tejido del hospedero (Hardham, 2007). En el ANOVA se encontraron diferencias significativas entre ortet ($p < 0,05$) pero no en el tiempo de infección ($p > 0,05$), hecho que se pudo haber presentado por la concentración del patógeno usada en este ensayo, la cual se aumentó de acuerdo con las concentraciones sugeridas para ensayos de tamizaje en hojas de cacao infectadas con *P. palmivora* (Iwaro *et al.*, 1997; Nyadanu *et al.*, 2012; Nyadanu *et al.*, 2009; Tahi *et al.*, 2000, 2006a, 2006b).

Para otras especies del género *Phytophthora* se ha reportado agregación de zoosporas en el proceso infeccioso (Savory *et al.*, 2014). De esta forma, la alta concentración usada pudo afectar este proceso de agregación para la infección y generar sesgos en el conteo.

En cuanto a la respuesta de los ortets, tres de estos presentaron la mayor cantidad de quistes (ortets 1, 28 y 33) en los tiempos de infección evaluados (2, 4 y 6 hpi). Por su parte, los ortets 34, 35 y 57 registraron una menor cantidad de quistes en promedio (Figura 3).

Desarrollo de apresorios

Posterior al proceso de enquistamiento, el quiste se adhiere al tejido por medio del apresorio (Horbach, Navarro-Quesada, Knogge & Deising, 2011; Kebdani *et al.*, 2010). En el análisis ANOVA se encontraron diferencias significativas para ortet y tiempo de infección ($p < 0,05$). Adicionalmente, la tendencia de los ortets con mayor número de estas estructuras se mantuvo (mayor número promedio en los ortets 1, 28 y 33) (Figura 4).

Figura 2. Detección de estructuras de *P. palmivora* en discos de hoja de clones de palma: a. Esquema con las estructuras de infección de *P. palmivora* para colonización del tejido de un hospedero; b. Micrografía de zoosporas (círculo naranja) y zoospora enquistada [quiste] (círculo amarillo); c. Micrografía de apresorio (círculo rojo); d. Micrografía de tubos germinativos (círculo verde).

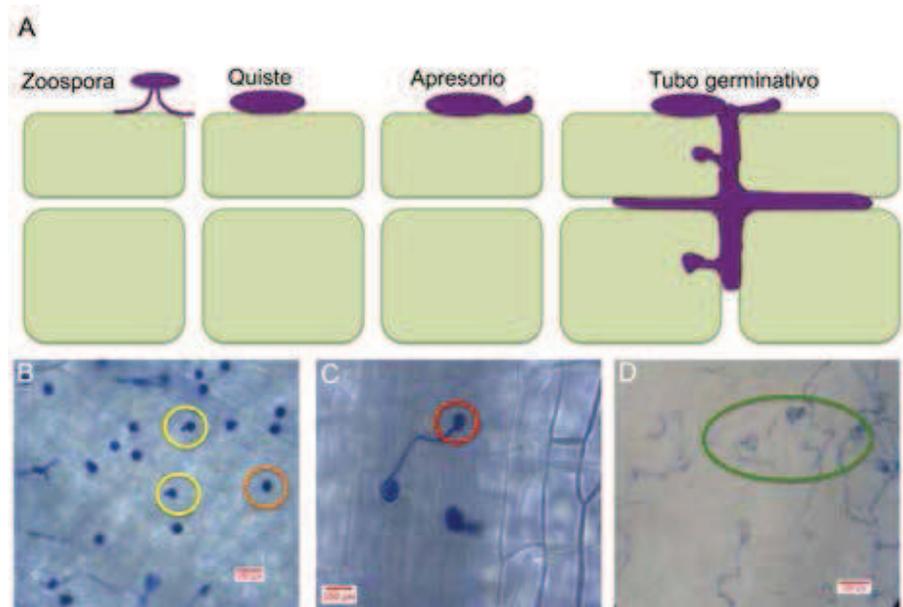
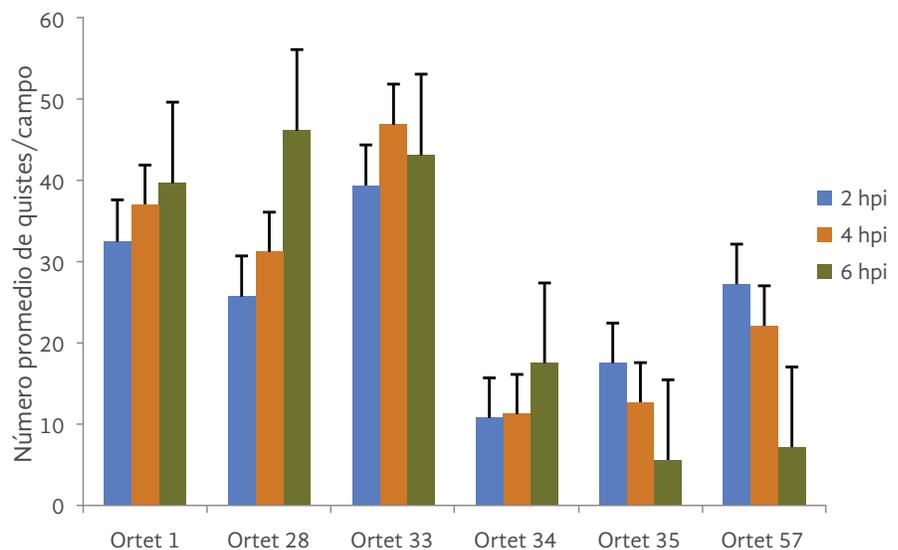


Figura 3. Promedio de quistes en 6 ortets evaluados en 3 tiempos de infección.

Cada barra representa el promedio de conteo en 3 campos por cada repetición.



Tubos germinativos

La finalidad de un patógeno hemibiótrofo es colonizar un tejido para la obtención de nutrientes y así completar su ciclo de vida. En el modelo evaluado, los tubos germinativos fueron detectados a partir de las 48 horas de infección.

La presencia de los tubos germinativos sugiere que el microorganismo ha logrado evadir los mecanismos de defensa de la planta e iniciar una fase de colonización del tejido. Es de resaltar que, para el caso de los tubos germinativos, los ortets no tuvieron la misma distribución con respecto al conteo de las estructuras anteriores (Figura 5). Esta diferencia

puede sugerir que un alto número de quistes no necesariamente garantiza el inicio de un ciclo infeccioso en el tejido evaluado.

Los resultados indican que cada ortet tuvo una interacción particular con el patógeno y que este, a su vez, es más efectivo colonizando tejidos de cultivos susceptibles, lo cual podría ser explicado por el aumento de estas estructuras ($p < 0,05$). En cuanto a la cantidad de estructuras, se evidenció una mayor proporción en el cultivar catalogado como posible susceptible (ortet 57), mientras que los ortets 34 y 35 tuvieron la menor cantidad de estructuras registradas; este comportamiento se puede asociar posiblemente a la respuesta en campo de la palma donora.

Figura 4. Número promedio de apresorios en 6 ortets evaluados en cuatro (4) tiempos de infección (4, 6, 12 y 24 horas).

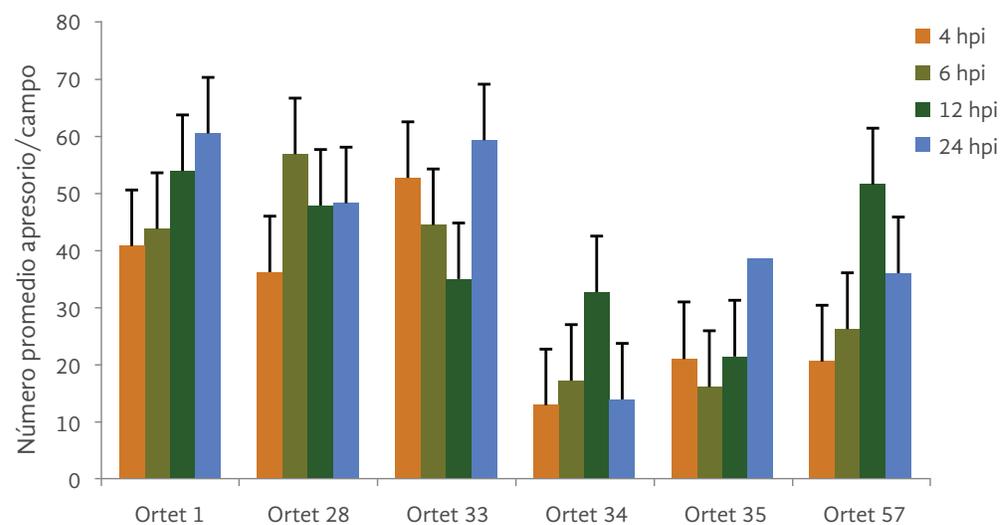
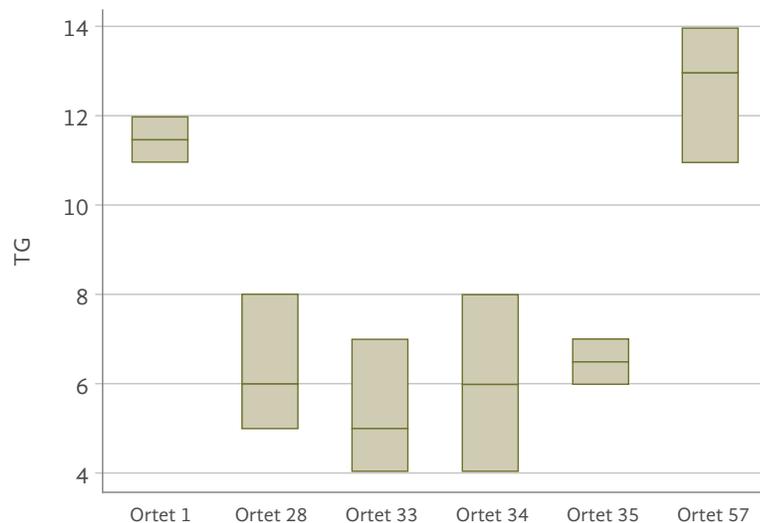


Figura 5. Diagrama de cajas para el número promedio de tubo germinativo en 6 ortets evaluados a las 48 horas post infección.



Respuesta de los materiales clonales (ortets)

La descripción del proceso de infección en palma de aceite ha sido ampliamente documentada en folíolos inmaduros. Estudios sobre el tema han permitido replicar los síntomas de los primeros estados de la enfermedad, confirmando la interacción entre la planta y *P. palmivora* (Martínez *et al.*, 2013, 2014; Martínez, Sarria, Torres & Varón, 2010; Sarria *et al.*, 2008, 2013, 2016; Sundram & Intan-Nur, 2017).

Este trabajo describió un método alternativo de infección basado en la inoculación de discos de folíolos no lignificados, puesto que los clones, debido a su condición *in vitro* y su tamaño, no tienen una base peciolar amplia que permita la extracción de folíolos inmaduros para la utilización del método de hoja caída, como ha sido reportado en otros trabajos. De otro lado, la categorización de la respuesta de los materiales clonales de palma ante el patógeno no ha sido reportada con anterioridad, por lo que este trabajo ofrece una metodología sencilla que puede servir para la selección de materiales, considerando que el proceso de selección de especies perennes puede tomar varios años (Santos, Fragoeiro & Phillips, 2005).

Vale la pena aclarar que todo método *ex situ* requiere de validaciones con el modelo *in vivo*, así como una mayor estandarización que asegure una relación entre lo observado en condiciones *ex situ* contraladas

con respecto a las condiciones de campo (Efombagn *et al.*, 2011; Nyadanu *et al.*, 2009).

Adicionalmente, este trabajo abarcó un aspecto básico en la búsqueda y el desarrollo de metodologías de evaluación de genotipos en respuesta a *P. palmivora*. En la medida en que fue posible detectar dichas estructuras, se registró evidencia de una interacción compatible para este patosistema.

Es importante tener en cuenta que de acuerdo a lo expuesto por Orłowska, Llorente & Cvitanich (2013), los modelos *ex situ* no involucran todos los mecanismos de respuesta de una planta en condiciones *in vivo*. Sin embargo, en el patosistema cacao – *P. palmivora* se ha logrado seleccionar materiales en inoculaciones realizadas en hoja caída (Tahi *et al.*, 2006, 2007).

Finalmente, se sugiere que para el caso de la palma de aceite se hace necesario seguir profundizando en el tema, a través de la realización de investigaciones que permitan perfeccionar dichos métodos, ya sea en clones o en folíolos inmaduros.

Agradecimientos

A los diferentes integrantes del grupo de Biología y Mejoramiento de Cenipalma por su apoyo en la fase experimental de este trabajo. La investigación de Cenipalma es financiada por el Fondo de Fomento Palmero administrado por Fedepalma.

Referencias bibliográficas

- Asselbergh, B., Curvers, K., Franca, S. C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F., & Hofte, M. (2007). Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an Abscisic Acid-Deficient Tomato Mutant, Involves Timely Production of Hydrogen Peroxide and Cell Wall Modifications in the Epidermis. *Plant Physiology*, 144(4), 1863-1877. doi: 10.1104/pp.107.099226.
- Benítez, É., & García, C. (2015). The history of research on oil palm bud rot (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Agronomía Colombiana*, 32(3), 390–398. doi: 10.15446/agron.colomb.v32n3.46240.
- Boydton, A. (2013). Evaluation of Detached Leaf Assay for Assessing Leaf Rust (*Puccinia triticina* Eriks.) Resistance in Wheat. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 4(5), 176. doi: 10.4172/2157-7471.1000176.

- Efombagn, M. I. B., Bieysse, D., Nyassé, S., & Eskes, A. B. (2011). Selection for resistance to *Phytophthora* pod rot of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon: Repeatability and reliability of screening tests and field observations. *Crop Protection*, 30(2), 105-110. doi: 10.1016/j.cropro.2010.10.012.
- Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., McComb, J., Hardy, G. E. S. J., & O'Brien, P. A. (2011). Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 60(6), 1086-1095. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02471.x.
- Hardham, A. R. (2007). Cell biology of plant-oomycete interactions. *Cellular Microbiology*, 9(1), 31-39. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00833.x.
- Hardham, A. R., & Blackman, L. M. (2010). Molecular cytology of *Phytophthora* -plant interactions. *Australasian Plant Pathology*, 39(1), 29. doi: 10.1071/AP09062.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., & Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*, 168(1), 51-62. doi: 10.1016/j.jplph.2010.06.014.
- Huisman, R., Bouwmeester, K., Brattinga, M., Govers, F., Bisseling, T., & Limpens, E. (2015). Haustorium formation in *Medicago truncatula* roots infected by *Phytophthora palmivora* does not involve the common endosymbiotic program shared by AM fungi and rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact*, 28(12), 1271-1280. doi: 10.1094/MPMI-06-15-0130-R.
- Iwaro, A. D., Sreenivasan, T. N., & Umaharan, P. (1997). Foliar Resistance to *Phytophthora palmivora* as an Indicator of Pod Resistance in *Theobroma cacao*. *Plant Disease*, 81(6), 619-624. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.6.619.
- Kebdani, N., Pieuchot, L., Deleury, E., Panabières, F., Le Berre, J. Y., & Gourgues, M. (2010). Cellular and molecular characterization of *Phytophthora parasitica* appressorium-mediated penetration. *New Phytologist*, 185(1), 248-257. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03048.x.
- Martínez, G., Arango, M., Sarria, G. A., Velez, D., Rodriguez, J., Mestizo, Y., ..., & Guest, D. (2013). Avances en la investigación sobre las dos enfermedades más importantes en la palma de aceite en Colombia: la Pudrición del cogollo y la Marchitez letal. *Palmas*, 34(1), 39-48.
- Martínez, G., Sarria, G. A., Torres, G., & Varon, F. (2010). Avances en la investigación de *Phytophthora palmivora*, el agente causal de la Pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 31(1), 55-63.
- Martínez, G., Sarria, G. A., Torres, G., Varón, F., Drenth, A., & Guest, D. (2014). Nuevos hallazgos sobre la Pudrición del cogollo de la palma de aceite en Colombia: biología, detección y estrategias de manejo. *Palmas*, 35(1), 11-17.
- Mohamed Azni, I. N. A., Sundram, S., Ramachandran, V., & Abu Seman, I. (2017). An in vitro investigation of Malaysian *Phytophthora palmivora* isolates and pathogenicity study on oil palm. *Journal of Phytopathology*, 165(11-12), 800-812. doi: 10.1111/jph.12620.

- Monroy-Barbosa, A., & Bosland, P. W. (2010). A rapid technique for multiple-race disease screening of *Phytophthora* foliar blight on single *Capsicum annuum* L. plants. *HortScience*, 45(10), 1563-1566.
- Nyadanu, D., Akromah, R., Adomako, B., Kwoseh, C., Lowor, S. T., Dzahini-Obiatey, H., ..., & Assuah, M. K. (2012). Inheritance and general combining ability studies of detached pod, leaf disc and natural field resistance to *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora megakarya* in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica*, 188(2), 253-264. doi: 10.1007/s10681-012-0717-x.
- Nyadanu, D., Assuah, M. K., Adomako, B., & Opoku, I. Y. (2009). Efficacy of screening methods used in breeding for black pod disease resistance varieties in cocoa. *African Crop Science Journal*, 17(4), 175-186.
- Orłowska, E., Llorente, B., & Cvitanich, C. (2013). Plant integrity: An important factor in plant-pathogen interactions *Plant Signaling & Behavior*, 8(1), e22513. doi: 10.4161/psb.22513.
- Ray, S., Mondal, S., Chowdhury, S., & Kundu, S. (2015). Differential responses of resistant and susceptible tomato varieties to inoculation with *Alternaria solani*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 90, 78-88. doi: 10.1016/j.pmpp.2015.04.002.
- Romero, H. M. (2013). Desarrollo de materiales genéticos resistentes a la Pudrición del cogollo (PC). *Palmas*, 34(2), 95-108.
- Santos, C., Fragoeiro, S., & Phillips, A. (2005). Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* isolates: An in vitro approach using plants and calluses. *Scientia Horticulturae*, 103(2), 187-198. doi: 10.1016/j.scienta.2004.04.023.
- Sanz, J. (2016). Pudrición del cogollo: enfrentamiento integral contra un enemigo letal, *P. palmivora*. *Palmas*, 37(Especial Tomo I), 109-114.
- Sarria, G. A., Mestizo, Y., Betancourt, W., & García, A. (2016). Pudrición del cogollo: avances, retos y oportunidades en el manejo integrado de esta enfermedad. *Palmas*, 37(4), 91-107.
- Sarria, G. A., Varón, F. H., Martínez, G., Drenth, A., & Guest, D. I. (2013a). Nuevas evidencias del cumplimiento de los postulados de Koch en el estudio de las relaciones entre *Phytophthora palmivora* y la Pudrición del cogollo (PC) de la palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 34(4), 41-45.
- Sarria, G., Martínez, G., Varón, F., Drenth, A., & Guest, D. (2016). Histopathological studies of the process of *Phytophthora palmivora* infection in oil palm. *European Journal of Plant Pathology*, 145(1), 39-51. doi: 10.1007/s10658-015-0810-9.
- Sarria, G., Torres, G., Aya, H., Ariza, J., Rodríguez, J., Velez, D., ..., & Martínez, G. (2008). *Phytophthora* sp. es el responsable de las lesiones iniciales de la Pudrición del cogollo (PC) de la Palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 29(3), 31-41.
- Savory, A. I., Grenville-Briggs, L. J., Wawra, S., van West, P., Davidson, F. A. (2014). Auto-aggregation in zoospores of *Phytophthora infestans*: the cooperative roles of bioconvection and chemotaxis. *J. R. Soc. Interface*, 11(94), 20140017. doi: 10.1098/rsif.2014.0017.

- Sundram, S., & Intan-Nur, A. M. A. (2017). South American Bud rot: A biosecurity threat to South East Asian oil palm. *Crop Protection*, *101*, 58-67. doi: 10.1016/j.cropro.2017.07.010.
- Tahi, G. M., Kebe, I., Eskes, A. B., Ouattara, S., Sangare, A., & Mondeil, F. (2000). Rapid screening of cacao genotypes for field resistance to *Phytophthora palmivora* using leaves, twigs and roots. *European Journal of Plant Pathology*, *106*(1), 87-94. doi: 10.1023/A:1008747800191.
- Tahi, G. M., Kebe, B. I., Sangare, A., Cilas, C., & Eskes, A. B. (2007). Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the field: The effect of light intensity and time of day of leaf collection. *Plant Pathology*, *56*(2), 219-226. doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01547.x.
- Tahi, G. M., Kebe, B. I., Sangare, A., Mondeil, F., Cilas, C., & Eskes, A. B. (2006). Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the field: Interaction of cacao genotype, leaf age and duration of incubation. *Plant Pathology*, *55*(6), 776-782. doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01453.x.
- Tedford, E. C. (1990). A detached-leaf technique for detecting resistance to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in Tocabbo. *Plant Disease*, *74*(4), 313-316.
- Torres, G., Sarria, G. A., Martinez, G., Varon, F., Drenth, A., & Guest, D. (2016). Bud Rot Caused by *Phytophthora palmivora* : A Destructive Emerging Disease of Oil Palm. *Phytopathology*, *106*(4), 320-329. doi: 10.1094/PHTO-09-15-0243-RVW.
- Van-Wees, S. (2009). Phenotypic analysis of *Arabidopsis* mutants: Trypan blue stain for fungi, oomycetes, and dead plant cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, *3*(8). doi: 10.1101/pdb.prot4982.
- Weiland, J. E., Nelson, A. H., & Hudler, G. W. (2010). Aggressiveness of *Phytophthora cactorum*, *P. citricola* I, and *P. plurivora* from European Beech. *Plant Disease*, *94*(8), 1009-1014. doi: 10.1094/PDIS-94-8-1009.