



Programa de Estudios de Posgrado

Acondicionamiento térmico de semillas de *Ocimum basilicum*: efecto sobre el vigor de la planta y su relación con la resistencia a *Peronospora* spp.

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Agricultura Sustentable)

Presenta

M.C. Mirella Romero Bastidas

La Paz, Baja California Sur, Diciembre de 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 22 del Mes de Noviembre del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Acondicionamiento térmico de semillas de *Ocimum basilicum*: efecto sobre el vigor de la planta y su relación con la resistencia a *Peronospora* spp."

Presentada por la alumna:


Mirella Romero Bastidas

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Agricultura Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

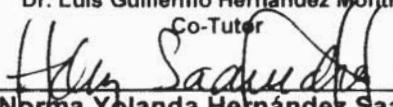

Dra. Alejandra Nieto Garibay
Co-Director de Tesis


Dr. Bernardo Murillo Amador
Co-Director de Tesis


Dr. Enrique Troyo Diéguez
Co-Tutor


Dr. Rogelio Ramirez Serrano
Co-Tutor


Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Comité tutorial

Dra. Alejandra Nieto Garibay Co-Director de tesis	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Dr. Bernardo Murillo Amador Co-Director de tesis	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Dr. Enrique Troyo Diéguez Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Dr. Rogelio Ramírez Serrano Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Comité revisor de tesis

Dra. Alejandra Nieto Garibay
 Dr. Bernardo Murillo Amador
 Dr. Enrique Troyo Diéguez
 Dr. Rogelio Ramírez Serrano
 Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel

Jurado de examen de grado

Dra. Alejandra Nieto Garibay
 Dr. Bernardo Murillo Amador
 Dr. Enrique Troyo Diéguez
 Dr. Rogelio Ramírez Serrano
 Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
 Suplente: Dra. Lilia Alcaraz Meléndez
 Suplente: Dr. Juan A. Larrinaga Mayoral

Resumen

Actualmente, los estudios de acondicionamiento de la semilla están relacionados a la mejora de las características morfológicas y fisiológicas de las plantas y escasamente a la relación del vigor de las mismas sobre la inducción de la resistencia a enfermedades. El acondicionamiento térmico podría representar una alternativa de manejo para enfermedades como la del mildiu veloso en la albahaca, provocado por el hongo *Peronospora belbahrii*, principal limitante en su producción. La albahaca, es considerada la planta aromática de mayor importancia económica en Baja California Sur, debido a la demanda constante a nivel mundial por su utilidad multifacética. En el presente trabajo de investigación, se incluyó como primer objetivo, la identificación de la especie de *Peronospora* spp. observada en algunos sitios de producción de albahaca. Para lo cual, se realizaron estudios sobre identificación morfológica y molecular del patógeno, a través de plantas infectadas. Como segundo objetivo, se evaluó el efecto del acondicionamiento térmico de la semilla sobre la respuesta morfométrica y fisiológica de plantas durante las etapas de germinación, emergencia y etapa vegetativa inicial. El tercer objetivo fue evaluar la relación del vigor de la planta, derivado del acondicionamiento térmico con la incidencia y severidad de la enfermedad del mildiu veloso. Para ello, semillas de albahaca variedad Nuffar, se sometieron a cinco tratamientos de temperatura; 25, 40, 50, 60 y 70°C, en tres tiempos de exposición; 30, 60 y 90 minutos. Las variables de respuesta fueron el porcentaje y tasa de germinación y emergencia, características morfométricas y fisiológicas de la planta, así como la incidencia y severidad de la enfermedad. Los resultados obtenidos mostraron que el hongo correspondió a *P. belbahrii*. En todas las variables evaluadas, el tratamiento de 70°C afectó negativamente la respuesta de la planta. Las mejores respuestas de vigor, presentaron una tendencia determinada hacia el tratamiento de 60°C por un tiempo de exposición de 60 min. Los resultados de resistencia, incidencia, porcentaje de hojas infectadas y la curva del progreso de la enfermedad del mildiu veloso, mostraron que el tratamiento a 60°C presentó estadísticamente un mayor porcentaje de reducción en estas variables. Desde el punto de vista práctico lo anterior sugiere que el acondicionamiento térmico a ésta temperatura puede inducir una resistencia al mildiu veloso en la albahaca y ser utilizado como un control efectivo de esta enfermedad.

Palabras claves: Acondicionamiento térmico, vigor, resistencia, Mildiu Velloso

Dra. Alejandra Nieto Garibay
Co-director de tesis

Dr. Bernardo Murillo Amador
Co-director de tesis

Summary

At present, seed conditioning studies are related to the improvement of the morphological and physiological characteristics of the plants and very little to the relation of the vigor of the plants on the induction of resistance to diseases. Thermopriming could represent an alternative management for diseases such as mildew downy mildew in basil, caused by the fungus *Peronospora belbahrii*, main limiting in its production. Basil is considered the aromatic plant of major economic importance in Baja California Sur, due to the constant demand worldwide for its multifaceted utility. In the present investigation, the identification of the species of *Peronospora* spp. was included as the first objective present in some sites of production of basil. For this, studies were carried out on morphological and molecular identification of the pathogen, through infected plants. As a second objective, the effect of seed thermopriming on the morphometric and physiological response of plants during germination, emergence and initial vegetative stages was evaluated. The third objective was to evaluate the relationship of vigor of the plant, derived from thermopriming with the incidence and severity of downy mildew disease. For this, Nuffar variety basil seeds, were subjected to five temperature treatments; 25, 40, 50, 60 and 70°C, in three exposure times; 30, 60 and 90 minutes. The response variables were percentage and germination rate and emergence, morphometric and physiological characteristics of the plant, as well as the incidence and severity of the disease. The results showed that the fungus corresponded to *P. belbahrii*. In all variables evaluated, the treatment of 70°C negatively affected the plant response. The best vigor responses showed a tendency toward treatment at 60°C for an exposure time of 60 min. The results of resistance, incidence, percentage of infected leaves and the progression curve of hairy mildew disease, showed that the treatment at 60°C presented a statistically higher reduction percentage in these variables. From the practical point of view, the above suggests that the thermopriming at this temperature can induce resistance to downy mildew in the basil and be used as an effective control of this disease.

Key words: thermopriming, vigour, resistance, downy mildew

Dra. Alejandra Nieto Garibay
Co-director de tesis

Dr. Bernardo Murillo Amador
Co-director de tesis

Dedicatoria

A Dios, por darme la fuerza de seguir cada día
A la memoria de mi padre, por su gran ejemplo de fortaleza y constancia
A mi madre, por su amor incondicional y apoyo al alma
A mi esposo, por su paciencia y amor, gracias por estar siempre a mi lado
A mi hijo, por darle luz a mi vida
A mis hermanos por sus sabios consejos y su cariño

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por su apoyo para la realización de los estudios del Doctorado, mediante la Beca Nacional N°49976.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR), por la oportunidad de alcanzar esta meta de superación personal.

A los proyectos: CONACyT-CB-2014-01 (236240) "*Análisis del sistema suelo-planta-atmósfera en cultivos de hierbas aromáticas dentro de malla sombra por medio de algoritmos multivariantes inteligentes*" y SAGARPA-CONACyT: *Innovación Tecnológica de Sistemas de Producción y Comercialización de Especies Aromáticas y Cultivos Élite en Agricultura Orgánica Protegida con Energías Alternativas de Bajo Costo.*

A la Dra. Alejandra Nieto Garibay, por brindarme la oportunidad de realizar el presente proyecto de investigación bajo su dirección, así como por sus consejos y su gran apoyo incondicional.

Al Dr. Bernardo Murillo Amador, por creer en mi capacidad dentro de la investigación y por ser un excelente guía durante la realización de este trabajo.

A los miembros del Comité Tutorial, Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel, Dr. Enrique Troyo Diéguez y Dr. Rogelio Ramírez Serrano, por sus acertadas críticas en la mejora de la investigación.

A la M.C. María del Carmen Mercado Guido, Lic. Lidia Hiraes Lucero, Ing. Saúl Briseño Ruíz, M.D. Martín Aguilar García, Roberto Hernández Herrera, y la M.C., Carmen Rodríguez Jaramillo, así como personal de apoyo en campo; el señor Raymundo Ceseña Núñez, Adrián Jordán Castro y Pedro Luna García. A todos mi agradecimiento por su valiosa ayuda durante la realización de las diferentes etapas experimentales, tanto en laboratorio como en campo.

Al personal del Programa de Estudios de Posgrado del CIBNOR, Lic. Leticia González Rubio Rivera, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Tania Núñez Valdez, Lupita Sánchez, Claudia E. Olachea, Horacio Sandoval Gómez, por su atención prestada y gran apoyo durante los diferentes trámites relacionados a mis estudios.

A la patobanda, mis amigos de posgrado, Elvia, Federico, Claudia, Ana, Paty, Cristian, Fernando, Zuami, Tere, Daulemys, Michel, Yuneisy, de quienes me llevo grandes aprendizajes y recuerdos de agradables momentos durante la realización de mi investigación.

A todos.....mil gracias!!!

Contenido

RESUMEN	iv
SUMMARY	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Origen de <i>Ocimum basilicum</i>	2
2.1.1 Principales compuestos aromáticos	3
2.1.2 Importancia económica del cultivo	5
2.2 La producción de albahaca en México	6
2.3 Factores que merman la producción	7
2.3.1 Enfermedades originadas por hongos fitopatógenos	7
2.3.2 Los Oomicetes y su importancia económica	8
2.4 <i>Peronospora belbahrii</i> como principal factor de daño en albahaca	9
2.4.1 Proceso de infección	10
2.4.2 Síntomas característicos de <i>P. belbahrii</i>	12
2.5 Métodos de control	13
2.5.1 Alternativas de manejo de la enfermedad	14
2.6 La Inducción de resistencia en plantas para el control de patógenos	14
2.6.1 La acción de los mecanismos de defensa en la planta	15
2.6.2 Estudios relacionados a la inducción de resistencia en plantas	17
2.7 El vigor de la planta en la resistencia a patógenos	18
2.7.1 Características que determinan el índice de vigor	18
2.7.2 El vigor de las plantas y su relación con las propiedades de la semilla	19
2.7.3 Técnicas de acondicionamiento de la semilla para estimular el vigor de la planta	20
2.8 El acondicionamiento térmico en semillas	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Área de estudio	25
6.2 Identificación de la especie <i>Peronospora</i> presente en áreas de producción de albahaca en Baja California Sur	25
6.2.1 Muestreo de material vegetal en campo	25
6.2.2 Identificación morfológica	26

6.2.3 Identificación molecular.....	27
6.3 Tratamientos de acondicionamiento térmico en el vigor de las plantas durante la etapa de germinación, emergencia y etapa vegetativa inicial.	28
6.3.1 Etapa de germinación	28
6.3.1.1 Variables evaluadas en la etapa de germinación.....	30
6.3.2 Etapa de emergencia	31
6.3.2.1 Variables morfométricas.....	33
6.3.3 Etapa vegetativa	33
6.3.3.1 Variables morfométricas y fisiológicas de plantas.....	33
6.4 Determinación del contenido total de carbohidratos, lípidos y proteínas en las semillas de albahaca sometidas a acondicionamiento térmico.	35
6.4.1 Carbohidratos totales	36
6.4.2 Lípidos totales	37
6.4.3 Proteínas totales	38
6.5 Evaluación de la respuesta del vigor de plantas de albahaca procedentes de semillas sometidas a acondicionamiento térmico ante la enfermedad del mildiu veloso.	38
6.5.1 Evaluación de la enfermedad.....	39
6.5.1.1 Incidencia	39
6.5.1.2 Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)	40
6.5.1.3 Sobrevivencia del patógeno (% de hojas infectadas).....	40
6.5.2 Variables morfométricas y fisiológicas de plantas infectadas.....	41
7. RESULTADOS	43
7.1 Identificación de la especie <i>Peronospora</i> presente en diferentes áreas de producción de albahaca en Baja California Sur.	43
7.2 Efecto del acondicionamiento en el vigor de las plantas durante la etapa de germinación, emergencia y vegetativa inicial.	45
7.2.1 Germinación.....	45
7.2.1.1 Variables morfométricas.....	45
7.2.2 Emergencia	53
7.2.2.1 Variables morfométricas.....	53
7.2.3 Crecimiento vegetativo inicial.....	61
7.2.3.1 Variables fisiológicas.....	61
7.2.3.2 Variables morfométricas.....	67
7.3 Efecto de las temperaturas en el contenido total de carbohidratos, lípidos y proteínas de semillas de albahaca.....	73
7.3.1 Carbohidratos.....	73
7.3.2 Lípidos.....	73
7.3.3 Proteínas.....	76
7.4 Efecto del acondicionamiento térmico en el vigor de la planta y la resistencia al mildiu veloso.....	78
7.4.1 Análisis fisiológicos en plantas infectadas con <i>Peronospora</i>	78
7.4.2 Análisis morfométricos en plantas infectadas con mildiu veloso	82
7.4.3 Incidencia de <i>Peronospora</i> en plantas de albahaca.....	85
7.4.4 Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)	86

7.4.5 Sobrevivencia del patógeno	87
8. DISCUSIÓN	90
8.1 Identificación de la especie de <i>Peronospora</i> presente en áreas agrícolas de Baja California Sur.	90
8.2 Determinación del efecto de la exposición de semillas de albahaca a diferentes gradientes de temperatura y tiempos de exposición en el vigor de plántulas en las etapas germinación, emergencia y la fase vegetativa inicial, así como la respuesta morfo-fisiológica de la semilla	90
8.2.1 Germinación y emergencia	90
8.2.2 Etapa vegetativa	92
8.2.3 Efecto de las temperaturas en el contenido total de carbohidratos, lípidos y proteínas.....	95
8.3 Vigor de las plantas de albahaca procedentes de semillas tratadas con diferentes gradientes de temperatura y tiempos de exposición ante el mildiu veloso (<i>Peronospora</i> spp.)	97
8.3.1 Incidencia de <i>P. belbahrii</i> en plantas de albahaca infectadas naturalmente.	97
8.3.2 Variables morfométricas.....	99
9. CONCLUSIONES	102
10. LITERATURA CITADA	104
11. ANEXOS	121

Lista de figuras

Figura 1. Estructura algunos metabolitos especializados encontrados en tricomas glandulares de hojas de albahaca. A) superficie abaxial de una hoja joven con alta densidad de glandulas peltata y capitatas. B) glandula peltata y capitata en la misma hoja (Xie, 2007).	4
Figura 2. Ciclo infectivo de <i>P. belbahrii</i> en planta de albahaca.	12
Figura 3. Síntomas de <i>Peronospora</i> spp. en albahaca en la zona agrícola de El Pescadero. A) Cultivo enfermo, B), Planta infectada, C) amarillamiento y esporulación de <i>Peronospora</i> en el haz y envés de la hoja, D) cultivo sano y E) esporangióforos en tejido.....	13
Figura 4. Mecanismo de defensa en la planta. Equilibrio de la respuesta inmune y los costos del acondicionamiento físico.....	16
Figura 5. A y B) Muestra de plantas enfermas (Los Planes y El Pescadero), C y D) síntoma típico de <i>Peronospora</i> spp. en follaje (amarillamiento y esporulación). 25	
Figura 6. Experimento de germinación. A) Horno para el tratamiento de semillas, B) siembra de semillas tratadas, C) cámara bioclimática de crecimiento y D) medición de semillas germinadas.....	28
Figura 7. Experimento de emergencia. A) Horno, B) Plástico negro sobre semillas tratadas, C) proceso de emergencia y D) plántulas emergidas.	31
Figura 8. A) Experimento de etapa vegetativa, B) determinación de fotosíntesis, C y D) determinación morfométrica en plantas.	33
Figura 9. A) Peso de semillas de albahaca, B) horno, C) muestra pulverizada, D) centrifugación y E) lectura en placa de los compuestos presentes en las semillas.....	35
Figura 10. A) Experimento en invernadero, B) evaluación de incidencia del mildiu vellosa, C) determinación de % de hojas esporuladas y D) determinación de fotosíntesis.....	40
Figura 11. Microscopía de <i>P. belbahrii</i> . (A y C) Esporas tipo elipsoidal; (B y D) esporangióforo ramificado con esporas en el ápice de las ramas.	42
Figura 12. Especificidad de <i>P. belbahrii</i> . Pescadero Punto A (P1), Pescadero Punto B (P2) y Los Planes (P3).	43
Figura 13. Germinación a los 14 días después de la siembra de semillas no tratadas (control) y tratadas a 40, 50, 60 y 70°C en diferentes tiempos de exposición 30, 60 y 90 minutos.....	45
Figura 14. Morfología de semillas germinadas; (longitud de parte aérea y radícula) sin tratar (control 25°C) y tratadas a las diferentes temperaturas y tiempos de exposición.....	49
Figura 15. Plántulas emergidas a los 30 días después de la siembra de semillas no tratadas (control) y tratadas a 40, 50, 60 y 70°C en diferentes tiempos de exposición 30, 60 y 90 min.	53

- Figura 16.** Morfología de semillas emergidas; longitud de parte aérea y radícula sin tratar (control 25°C) y tratadas a las diferentes temperaturas y tiempos de exposición..... 57
- Figura 17.** Porcentaje de incidencia de *P. belbahrii* en plantas de albahaca derivadas de semillas sometidas a tratamiento térmico con temperaturas de 40, 50 y 60°C, así como semillas sin tratar (control). Literales diferentes refieren diferencias estadísticas (Tukey $p \leq 0.05$). Las barras verticales indican el error estándar de la media. 83
- Figura 18.** Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) en plantas de albahaca infectadas naturalmente con *P. belbahrii* y bajo tratamientos de acondicionamiento térmico con temperaturas de 40, 50 y 60°C y tiempos de exposición a 30, 60 y 90 minutos, así como semillas sin tratar (control). 84
- Figura 19.** Diferencias en el porcentaje de hojas infectadas por *P. belbahrii* en plantas de albahaca. Semillas sometidas al acondicionamiento térmico con temperaturas de 40, 50 y 60°C durante 30, 60 y 90 minutos de exposición, así como de semillas sin tratar (control). Literales diferentes refieren diferencias estadísticas (Tukey $p \leq 0.05$). Las barras verticales indican el error o desviación estándar de la media. 85
- Figura 20.** Tratamientos con presencia de síntomas típicos de *P. belbahrii* en las plantas de albahaca. Relación del vigor de planta con la resistencia a la enfermedad del mildiu veloso. 86

Lista de Tablas

Tabla I. Diseño de los tratamientos de temperatura y tiempos de exposición para la etapa de germinación. Donde R es la repetición, T temperatura y t es el tiempo de exposición.	29
Tabla II. Acondicionamiento térmico en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en la tasa, porcentaje y variables morfométricas de plántulas en la etapa de germinación.	50
Tabla III. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en la tasa, porcentaje y variables morfométricas de plántulas en la etapa de germinación.	50
Tabla IV. Interacción del acondicionamiento térmico por tiempos de exposición en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en la tasa, porcentaje y variables morfométricas de plántulas en la etapa de germinación.	51
Tabla V. Acondicionamiento térmico en semillas de <i>O. basilicum</i> L. en la tasa, porcentaje y variables morfométricas de plántulas en la etapa de emergencia.	58
Tabla VII. Interacción del acondicionamiento térmico por tiempos de exposición en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en la tasa, porcentaje y variables morfométricas de plántulas en la etapa de emergencia.	59
Tabla VIII. Acondicionamiento térmico en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en variables fisiológicas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.	63
Tabla IX. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en las variables fisiológicas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.	63
Tabla X. Interacción del acondicionamiento térmico por tiempos de exposición en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en variables fisiológicas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.	64
Tabla XI. Acondicionamiento térmico en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en variables morfométricas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.	68
Tabla XII. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en variables morfométricas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.	68
Tabla XIII. Interacción del acondicionamiento térmico por tiempos de exposición en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en variables morfométricas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.	69
Tabla XIV. Respuesta de la interacción de los factores temperaturas por tiempos en el contenido total de lípidos (mg/g) en dos diferentes tiempos de medición (días).	72
Tabla XV. Respuesta de la interacción de los factores temperaturas por tiempos en el contenido de proteínas (mg/g) en dos diferentes tiempos de medición (días).	74
Tabla XVI. Relación de la temperatura en semillas de <i>O. basilicum</i> L. sobre el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas.	74

Tabla XVII. Interacción del acondicionamiento térmico × días de evaluación en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas.....	75
Tabla XVIII. Acondicionamiento térmico en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en variables fisiológicas de plantas infectadas por <i>P. belbahrii</i>	78
Tabla XIX. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en las variables fisiológicas de plantas <i>P. belbahrii</i>	78
Tabla XX. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en variables morfométricas de plantas <i>P. belbahrii</i>	81
Tabla XXI. Interacción del acondicionamiento térmico × tiempos de exposición en semillas de <i>O. basilicum</i> L. y su efecto en variables morfométricas de plantas <i>P. belbahrii</i>	81

Lista de abreviaturas

°C	Grados centígrados
min	Minutos
%	Porcentaje
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
T	Toneladas
mg ha ⁻¹	Miligramos por hectárea
Kg/ha	Kilogramos por hectárea
MN	Moneda Nacional
USA	Estados Unidos de América
h	Horas
pH	Potencial de hidrógeno
mL	Mililitros
ADN	Acido Desoxirribonucleico
NaCl ₂	Cloruro de Sodio
μL	Microlitros
rpm	Revoluciones por minuto
U/μL	Unidades por microlitro
mg/mL	Miligramos por microlitro
UV	Ultravioleta
ng/μL	Nanogramos por microlitro
ITS	Internal Transcribed Spacer (Espaciadores intertranscritos)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
mM	Milimolar
mm	Milímetros
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
g	Gramos
μmol m ⁻² s ⁻¹	Micromol metros cuadrados por segundo
Mmol m ⁻² s ⁻¹	Milimol metros cuadrados por segundo
ADNr	Acido Desoxirribonucleico ribosomal
pb	Pares de bases
CO ₂	Dióxido de carbono
cm ²	Centímetros cuadrados
cm	Centímetros
BABA	B-aminobutiric acid (β-Acido aminobutirico)

1 INTRODUCCIÓN

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.; Lamiaceae) es la planta aromática de mayor importancia económica a nivel mundial (Garibaldi *et al.*, 1997). En México, Baja California Sur es el principal productor y exportador de este cultivo (SAGARPA, 2014). Recientemente, el rendimiento de la albahaca se ha visto afectado por el hongo *Peronospora* spp., agente causal del mildiu vellosa. Su principal daño es el amarillamiento y necrosis de las hojas, lo que disminuye la calidad comercial del follaje. Hasta el momento se desconoce la especie presente, sin embargo, estos síntomas están relacionados con *P. belbahrii*, uno de los patógenos más destructivos en este cultivo a nivel mundial (Koroch, *et al.*, 2013), lo que lleva a considerar que ambos podrían ser el mismo agente. Actualmente no existen variedades resistentes a esta enfermedad y la mayoría de los fungicidas no tienen registro para su aplicación (Cohen *et al.*, 2013). Una alternativa en el manejo de enfermedades, es la inducción de resistencia en plantas, mediante la activación de sus propios mecanismos de defensa (Sharma *et al.*, 2002). Diversos estudios han determinado que la resistencia vegetal está estrechamente relacionada con el vigor de la planta (Van, 1997). Se ha encontrado que esta característica, proporciona la capacidad de responder rápidamente a factores causantes de estrés (Hammerschmidt, 2009), mediante el aumento de moléculas de señalización, ligadas a la defensa natural (Upchurch y Ramírez 2010; Hussian *et al.*, 2014). Uno de métodos que estimulan el vigor de la planta, es el acondicionamiento térmico de la semilla (García *et al.*, 2006), el cual activa procesos físicos y bioquímicos que aumentan el desarrollo vegetal (Castillo y Santibañez, 1987; Hampton *et al.*, 2000). En el caso particular de la albahaca, esta técnica de acondicionamiento térmico, podría ser de gran interés en el manejo de *Peronospora* spp. e impactar consecuentemente en la calidad del cultivo. La técnica actuaría mediante la activación temprana de la respuesta de defensa de la planta gracias a un estado de salud reflejado en el vigor de la misma. Por lo anterior, los objetivos del presente estudio, incluyeron en primera instancia la

identificación de la especie de *Peronospora* en algunos sitios de producción de Baja California Sur, la evaluación del vigor de plantas provenientes de semillas sometidas a diferentes temperaturas y tiempos de exposición de las temperaturas, así como la evaluación de la resistencia de plantas cuyas semillas fueron sometidas a los tratamientos de temperaturas y tiempos de exposición ante la incidencia de *Peronospora* spp.

2 ANTECEDENTES

2.1 Origen de *Ocimum basilicum*.

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.; familia Lamiaceae), conocida también como albacar, ahbenga, y albahaca dulce (Adigüzel *et al.*, 2005), es considerada una planta de gran significancia histórica en muchas culturas del mundo, desde hace siglos. En la religión hindú, hasta la actualidad se considera una especie sagrada y se usa para la protección contra espíritus (Muenscher, 1978). Etimológicamente presenta diferentes definiciones tales como la correspondiente al género *Ocimum*, la cual deriva del griego “ozo” que significa oler, en referencia a los fuertes olores de las especies dentro del género (McIntosh, 1853). “El rey de las hierbas” derivado del griego “*basileus*” o rey, en relación a la albahaca con la corona, debido a su uso en la medicina real (Grieve, 1971). La derivada del latín “*basilisk*” o dragón, conexión simbólica entre la albahaca y los escorpiones, bajo la superstición de que las hojas de albahaca se convertían en escorpiones al caer estas de las plantas (Stobart, 1982). Esta planta es nativa de Asia y África, donde crece de manera silvestre como una planta perenne (Muenscher, 1978). Fue traída desde la India hasta Europa a través del Medio Oriente en el siglo XVI y posteriormente a América en el siglo XVII (Stobart, 1982). Actualmente es cultivada en todo el mundo.

En la edad media se encontraba entre las plantas medicinales consideradas como mágicas, ya que por su contenido en compuestos aromáticos hacían efectivo el tratamiento contra diferentes enfermedades (Sam *et al.*, 2002), tales como dolores de cabeza, tos, y diarrea (Javanmardi *et al.*, 2002). A partir de entonces, se hizo indispensable en las sociedades, teniendo un especial interés como fuente de materia prima en el ámbito social, económico y ambiental. Desde entonces, han surgido numerosas aplicaciones tanto en la medicina tradicional, como la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y de perfumería (Benavides *et al.*, 2010),

provocando una continua y creciente demanda en los mercados locales y extranjeros (Reyes-Pérez *et al.*, 2013).

Las características distintivas de esta planta aromática corresponden al tipo herbáceo, anual con tallo ramificado (López-Delgado, 1998). Llega a medir entre 20 y 60 cm de largo, con flores que van desde color blanco a púrpura. Sus hojas son opuestas, ovales y apuntadas, color verde, las cuales llegan a medir hasta 2 pulgadas de longitud (Blank *et al.*, 2004), lo que genera una mayor biomasa y en consecuencia una mayor producción de aceites esenciales. Su principal fuente de propagación es por semilla, la cual es de naturaleza mucilaginosa (Lu *et al.*, 2010).

2.1.1 Principales compuestos aromáticos

Las hojas, tallo, sépalos y superficie floral de la albahaca poseen glándulas especializadas conocidas como tricomas glandulares (Walters *et al.*, 1991). Estas estructuras producen una diversidad de metabolitos secundarios con funciones tales como, agentes de defensa contra patógenos, insectos o animales y/o atrayente de polinizadores, entre otros (Lijima *et al.*, 2004). Este tipo de glándulas se clasifican en dos grupos; las glándulas peltato, las cuales consisten de 4 células secretoras y un saco de aceite (Bohlmann *et al.*, 1998). En estas glándulas se sintetizan y almacenan compuestos de tipo monoterpenos (α -Pineno, β -Pineno, β -Myrceno, Limoneno, 1,8-Cineolo, Ocimeno, Linalool, Sabineno, Fencol, Camfor, α -Terpineol, Geranial, Neral, Geraniol, Nero), sesquiterpenos (β -Caryophylleno, α -Bergamoteno, β -Farneseno, α -Caryophylleno, α -Zingibereno Germacreno, γ -Cadineno, β -Selineno, α -Selineno, α -Bisaboleno y α -Cadinol) y fenilpropanoides (Metil cavicol, Metil eugenol y Eugenol) (McCaskill y Croteau, 1995) (Fig. 1). El otro grupo de tricomas glandulares corresponde al tipo capitata, el cual contiene una o dos células secretoras y presentan menor tamaño, pero son más numerosas en la superficie de la hoja que las glándulas peltato. Este tipo de glándulas no sintetizan compuestos aromáticos, ya que no poseen la actividad enzimática necesaria para la biosíntesis de este tipo de sustancias, pero se ha comprobado que son metabólicamente activas (Gang *et al.*, 2001).

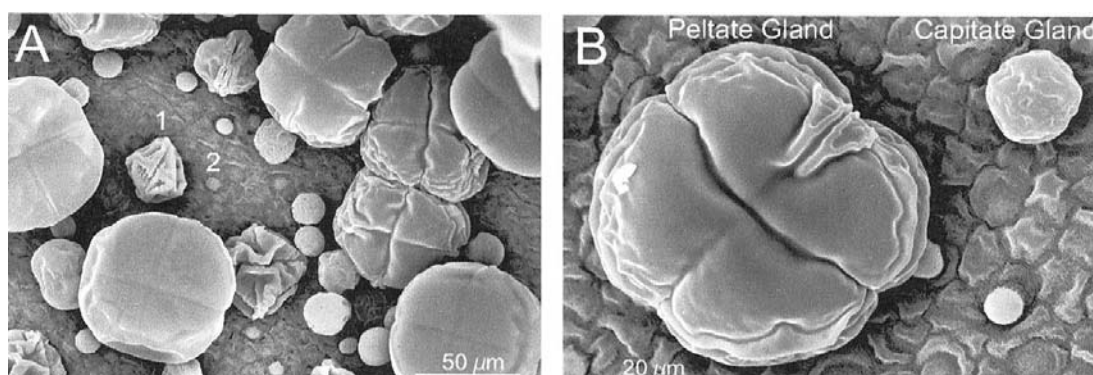
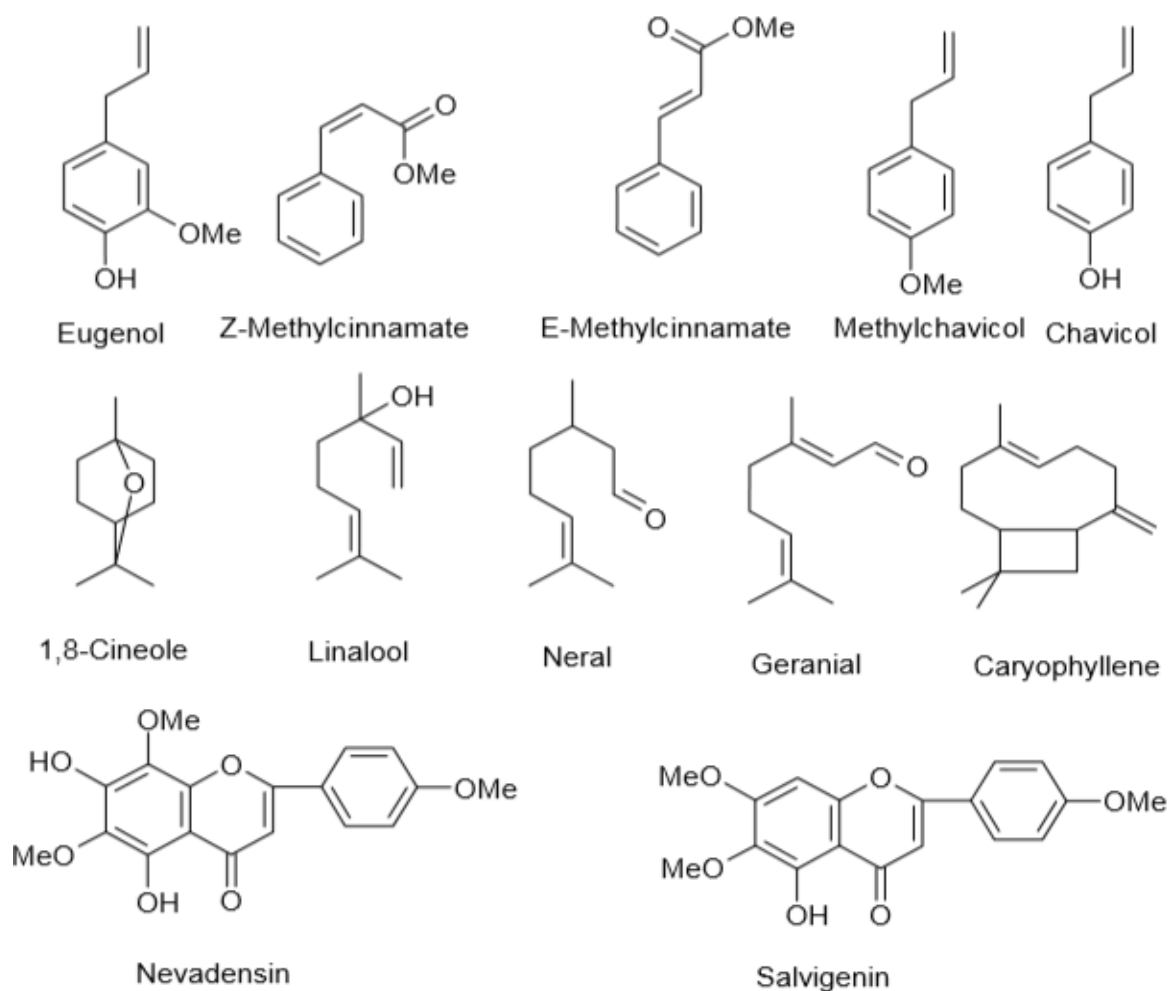


Figura 1. Estructura algunos metabolitos especializados encontrados en tricomas glandulares de hojas de albahaca. A) superficie abaxial de una hoja joven con alta densidad de glándulas peltata y capitatas. B) glándula peltata y capitata en la misma hoja (Tomado de Xie, 2007).

2.1.2 Importancia económica del cultivo

Actualmente, la albahaca, es uno de los principales cultivos de plantas aromáticas de mayor importancia económica a nivel mundial (Garibaldi *et al.*, 1997). Sus hojas, semillas y flores se consideran una rica fuente de aceites esenciales y compuestos aromáticos derivados principalmente de terpenos y fenilpropanoides (Viuda-Martos *et al.*, 2011). Estas sustancias reflejan una diversidad de aromas y sabores que las hace atractivas a nivel comercial, donde la materia fresca es utilizada principalmente en el ámbito culinario, mientras que los aceites esenciales tienen especial uso en perfumería, aromaterapia y cosmética (Wyenandt *et al.*, 2010). En la actualidad existen alrededor de 150 especies distribuidas a nivel mundial, principalmente en regiones de clima tropical y subtropical (Makri y Kintzios, 2007). Muchas de las variedades que dominan el mercado americano pertenecen al grupo de la albahaca dulce (Sweet basil) con variedades como “Genovese”, “hoja grande italiana”, “Mammoth”, “Napoletano” y “Sweet o Nuffar”. Su aroma suave semejante al anís, es un factor especialmente atractivo en la elaboración de alimentos (Phippen y Simon, 1998) y deriva principalmente de sustancias como el citral, eugenol, linalool, metilcavicol y metilcinamato. Todos estos clasificados dentro de los principales quimiotipos de aceites esenciales (Simón *et al.*, 1999).

La producción de esta planta aromática tanto en campo como en invernadero se ha incrementado significativamente en los últimos años debido a la demanda y su alto valor económico (Homa *et al.*, 2014). Tan solo en el 2010, en Estados Unidos fueron sembradas 4,400 ha aproximadamente. En algunos casos, se ha estimado que la producción de albahaca genera un mercado al por menor de más de 300 millones de dólares (Wyenandt *et al.*, 2015). Otros países como Francia, produce 30 ha cada año para mercado fresco y procesado (Garibaldi *et al.*, 2005), mientras que en Alemania se producen anualmente cerca de 50 millones de macetas con albahaca, en más de 25 ha de invernadero, esto solo por mencionar algunos casos. Con ello, se ha considerado a la albahaca como uno de los cultivos más

rentables de todas las hierbas frescas en el mercado (Farahani-Kofoet *et al.*, 2012). Los grandes productores y distribuidores señalan a esta planta aromática como producto líder que conduce la comercialización en el mercado internacional de otras hierbas culinarias tales como, orégano, salvia, tomillo y otro nicho de productos que se extienden principalmente por el impacto económico dentro de los mismos grupos de interés (Wyenandt *et al.*, 2015). Actualmente se ha considerado que los principales países productores de albahaca son España, Italia, Francia, Egipto y México (Mukherjee y Datta, 2005).

2.2 La producción de albahaca en México

En México, el cultivo de albahaca tiene un registro de producción nacional 3,723.45 T., donde el 100% es destinado a exportación (Sánchez-Verdugo y Lucero-Flores, 2012). Los principales estados productores son Morelos (252 T), Puebla (270 T), Baja California Norte (364.7 T), Nayarit (675.3 T) y Baja California Sur (2,486 T). Siendo éste último, el que aporta más del 50% de la producción de ésta planta aromática, lo que lo ubica como líder nacional en este cultivo (SAGARPA, 2014). En Baja California Sur (B.C.S.), la albahaca se origina a partir de sistemas de producción tanto orgánicos como convencionales, sin embargo, la producción orgánica, es la actividad económica más rentable en la rama agrícola (SIAP, 2012). La albahaca orgánica de este Estado se comercializa en los Estados Unidos de Norteamérica en los estados de California, Texas y Chicago principalmente (Alarcón-Miranda *et al.*, 2014). Este cultivo es capaz de producir un rendimiento de biomasa verde del orden de las 20 T ha⁻¹ al año en dos cortes (12 y 8 T ha⁻¹ respectivamente) y de 40 kg/ha de aceite esencial (Vega *et al.*, 2012). Este cultivo presenta una producción de 1,900 T con un valor de \$29,540.64/100 MXN al final del ciclo 2013, siendo la variedad Nuffar la principal que se siembra en B.C.S. (SAGARPA, 2014). La siembra se realiza en dos temporadas: otoño-invierno y primavera-verano, ésta última, con una mayor superficie de siembra.

2.3 Factores que merman la producción

Generalmente, la calidad de las plantas aromáticas como la albahaca está determinada por el contenido de aceites esenciales u otros metabolitos secundarios (Gil *et al.*, 1998). Uno de los principales factores que se presentan durante el desarrollo del cultivo, es la presencia de enfermedades provocada principalmente por microorganismos fitopatógenos, las cuales llegan a reducir considerablemente la producción y los aspectos cualitativos del producto (Capanoglu, 2010). La interacción de las plantas con los patógenos siempre ha sido una limitación crucial en la agricultura (Strange y Scott, 2005). La mayoría de los cultivos son atacados por patógenos devastadores que cuestan millones de dólares cada año a la industria agrícola y son potencialmente desastrosos para muchas sociedades (Singh *et al.*, 2011). La globalización de la agricultura ha provocado que las plantas cultivadas, a menudo con una estrecha base genética, crezcan fuera de sus centros de origen y por lo tanto lejos de los patógenos que han co-evolucionado con ellas. Como resultado estas no desarrollan resistencia a las nuevas cepas del patógeno (Bonas y Lahaye, 2002). Hasta hace algunos años se pensaba que las plantas aromáticas no presentaban problemas serios de plagas o enfermedades, debido a que el área de producción donde se establecían dichos cultivos era limitada. Sin embargo, a medida que ha aumentado la demanda de este tipo de plantas, se ha originado que éstas se establezcan en extensas superficies, lo que provoca un riesgo mayor de daño por estos organismos (Simón *et al.*, 1984).

2.3.1 Enfermedades originadas por hongos fitopatógenos

Dentro de los patógenos que dañan a las plantas, las enfermedades causadas por hongos, es uno de los problemas más comunes, al causar tizones en las hojas, defoliación, muerte de meristemas, lesiones de tallo y algunas veces la pérdida completa de la planta (Cabrera *et al.*, 2010). Este tipo de patógenos, son los responsables de las epidemias más recurrentes dentro de los cultivos, debido a que sus esporas son liberadas en el aire y pueden dispersarse por el viento a

grandes distancias (Agrios, 1997). Las enfermedades más comunes reportadas en el cultivo de albahaca son; las manchas foliares (*Alternaria alternata*, *Colletotrichum spp.* y *Cercospora spp.*), moho gris (*Botrytis cinerea*), muerte vascular (*Fusarium oxysporum*), pudrición basal (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *microdochium tabacinum*) y damping off (*Pythium ultimum*), (Garibaldi *et al.*, 1997; Garibaldi *et al.*, 2011). Sin embargo, recientemente en diferentes países, ha surgido la presencia del oomicete *P. belbahrii* comúnmente conocido como mildiu veloso, y en la actualidad es considerado uno de los patógenos más destructivos en este cultivo a nivel mundial (Koroch, *et al.*, 2013). Un ejemplo de ello, es la problemática que está enfrentando Estados Unidos y otros países, donde este patógeno ha causado pérdidas en la producción estimadas en más de 60 millones de dólares, por lo que se ha visto en la necesidad de solicitar la importación del producto a otros países dentro de los que destacan Colombia, Israel, México y Perú (Wyenandt *et al.*, 2015). Sin embargo, en México, principalmente en el estado de Baja California Sur, desde hace más de 6 años, la producción y la calidad de la albahaca, se ha visto seriamente afectada, por una especie de *Peronospora*. Los síntomas que provoca están relacionados con los ocasionados por *P. belbahrii*, lo que lleva a considerar que ambos pudieran ser el mismo patógeno.

2.3.2 Los Oomicetes y su importancia económica

Los oomicetes forman un grupo filogenéticamente distintivo de microorganismos eucariotes y son los causantes de algunas de las enfermedades más devastadoras de los cultivos a nivel mundial, conduciendo a la pérdida del rendimiento y daño a los ecosistemas naturales y agrícolas (Jiang y Tyler, 2012). Entre estos miembros, se encuentra los del orden Peronosporales, donde algunos de éstos provocan los llamados mildiu velosos (Thines, 2014), los cuales son difíciles de identificar entre ellos, ya que éstos poseen el mismo nombre común y tienen características morfológicas similares. Sin embargo, lo que los diferencia, es que éstos son muy específicos de cultivos (Hausbeck y Harlan, 2012). Este tipo

de patógenos, constituyen un gran grupo taxonómico dentro de este orden, con más de 700 especies conocidas (Voglmayr, 2003). Estos patógenos pueden ser específicos de hospederos o pueden abarcar un amplio rango de los mismos. Son biotróficos obligados, lo que los hace dependiente de su hospedero para completar su ciclo de vida y por lo tanto tienen constantemente que atenuar las respuestas de defensa de las plantas para obtener nutrientes, mientras mantienen a su hospedero vivo. Este modo de infección requiere una manipulación sofisticada por el patógeno (Holub, 2008).

Los oomicetos, colonizan las células de las plantas mediante la modulación de sus defensas específicamente liberando un conjunto de efectores dentro y fuera de la célula a través de una estructura especializada llamada haustorio (Rafiqi *et al.*, 2012). Los efectores son definidos como moléculas que manipulan la estructura celular del hospedero y su función por lo tanto es facilitar la infección y/o desencadenar las respuestas de defensa de la planta (Denance *et al.*, 2013). Actualmente se distinguen dos clases de efectores que se dirigen a sitios distintos en la planta hospedera; efectores apoplásticos, son principalmente inhibidores de enzimas llamados EPI1, los cuales son secretados dentro del espacio extracelular donde interactúan con receptores de superficie y; efectores citoplásmicos pertenecientes a la familia de proteínasas RXLR, denominados AVR3a. Estos, son traslocados dentro de la célula de la planta a través de estructuras especializadas similares a vesículas de infección y haustorios que se invaginan dentro de las células del hospedero (Kamoun, 2006).

2.4 *Peronospora belbahrii* como principal factor de daño en albahaca

Peronospora belbahrii es uno de los oomicetos que pertenece a la familia Peronosporaceae y es el agente causal de la enfermedad del mildiu veloso en albahaca (Belbahri *et al.*, 2005). Este patógeno se reporta como una de las enfermedades más destructivas a nivel mundial en este cultivo (Korocho *et al.*, 2013) y su severidad ocasiona hasta el 100% de las pérdidas en la producción

(Roberts *et al.*, 2009). Primero fue observada en Uganda en 1930 (Hansford, 1933), después en el 2000, se reportó como responsable del incremento de serias pérdidas en varios países, iniciando desde Suiza (Lefort *et al.*, 2003), Italia (Garibaldi *et al.*, 2004), Bélgica (Coosemans, 2004), Francia (Garibaldi *et al.*, 2005), EUA (Roberts *et al.*, 2009), Cuba (Martínez de la Parte *et al.*, 2010), Hungría (Nagy y Horvath, 2011) y Argentina (Uchida, 2011). Dentro de los cultivares más susceptibles a esta enfermedad se encuentran todos los tipos pertenecientes a albahaca dulce, una de las de mayor demanda en el mercado internacional (Phippen y Simon, 1998). Aunque se han determinado fuentes de resistencia en otros cultivares de albahaca, estas no son comercialmente aceptables, debido a sus diferentes características morfológicas y aromáticas (Wyenandt *et al.*, 2010). Sin embargo, se pueden realizar hibridaciones con los genotipos más tolerantes. Para ello, es necesario realizar un criterio de selección tales como presencia de metabolitos secundarios, características morfológicas de las plantas y otros factores que provocan un microambiente menos favorable para el establecimiento del patógeno (Garibaldi, 2004).

2.4.1 Proceso de infección

P. belbahrii requiere de alta humedad relativa (85 % o más), temperatura moderada (21 a 25°C) y lluvias prolongadas para esporular (Beckerman 2009), las cuales coinciden con las condiciones de desarrollo del cultivo de albahaca (Farahani-Kofoet *et al.*, 2012). Además, posee un ciclo de vida que dura de 11 a 15 días y la diseminación de esporas por el viento hace que su capacidad de extenderse en el cultivo sea rápida (Cohen *et al.*, 2013). Este hongo se establece a partir de esporas, generalmente en la parte inferior de la hoja y provoca lesiones que pueden llegar a ser muy severas y eventualmente matar a la planta. Algunas de las esporas que son dispersadas por el viento, se depositan sobre la hoja e infectan la lámina foliar produciendo un tubo germinativo que penetra dentro de la pared celular de la epidermis y produce en el mesófilo un micelio intercelular con haustorio (Ben-Naim *et al.*, 2015).

Los esporangios, los cuales corresponden al cuerpo fructífero del hongo se producen en gran número en el envés de las hojas y maduran durante la noche cuando la humedad relativa (85 % o más) se mantiene por 6 h o más (Garibaldi *et al.*, 2007). Las esporas se liberan durante la mañana cuando disminuye la humedad relativa, lo que le ayuda a diseminarse a distancias largas a través del viento (Uchida, 2011) (Fig. 2). Frecuentemente la infección puede darse desde la etapa de emergencia de la planta, lo que sugiere que el hongo puede también diseminarse a través de semillas contaminadas (Farahani-Kofoet *et al.*, 2012). Por lo tanto, se considera que ésta, es una de las principales vías de diseminación de este patógeno, el cual se cree, logra penetrar e infectar las semillas de albahaca (Belbahri *et al.*, 2005; Garibaldi *et al.*, 2004). Después de 6 a 10 días de la inoculación inicial aparecen lesiones cloróticas en las hojas, dependiendo de la temperatura, la cual generalmente es óptima a 25 °C., mientras que la esporulación se lleva a cabo dentro de 7 h a 100 % de humedad relativa. Al menos 7.5 h de oscuridad son necesarias para que el patógeno inicie la esporulación, mientras que la exposición a la luz suprime la formación de esporas. Sin embargo, permite a los esporangióforos emerger a través de los estomas y volver a iniciar el ciclo de infección (Cohen *et al.*, 2013).

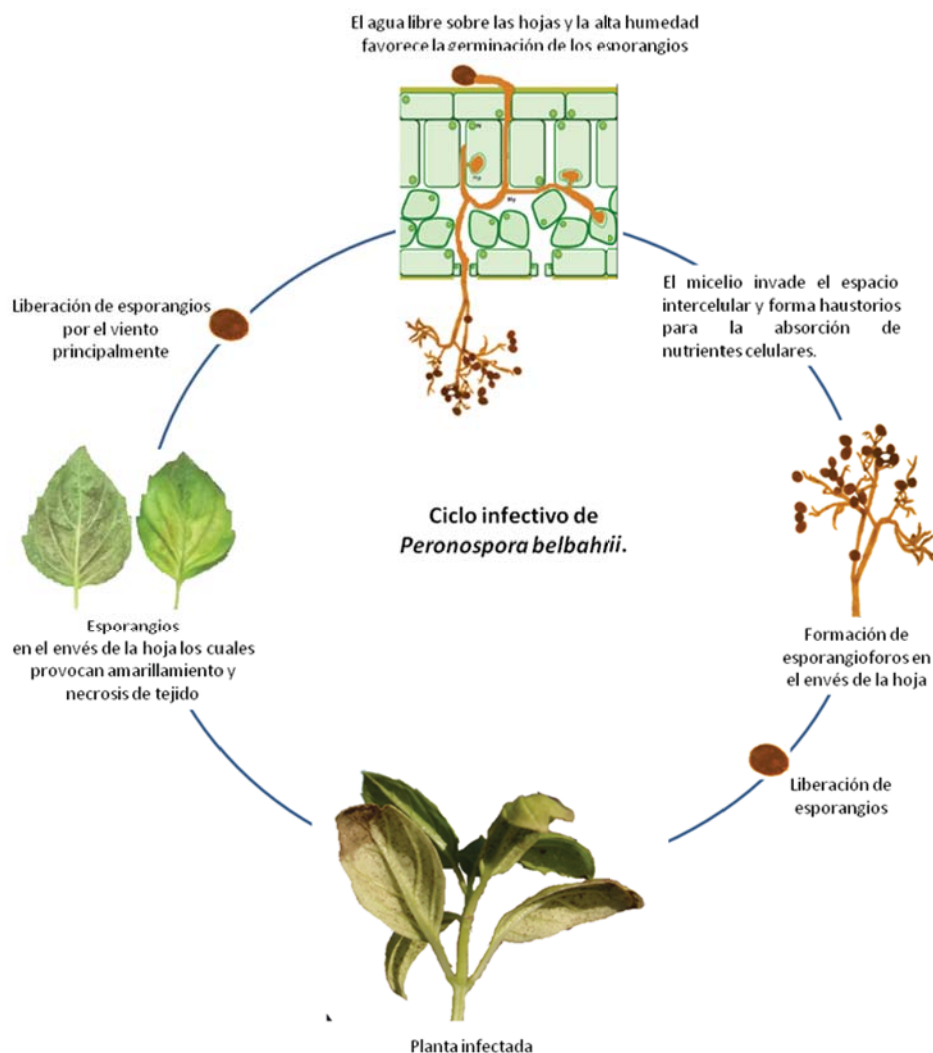


Figura 2. Ciclo infeccioso de *P. belbahrii* en planta de albahaca

2.4.2 Síntomas característicos de *P. belbahrii*

El síntoma más visible de *P. belbahrii*, es la aparición de áreas cloróticas color verde-amarillento confinadas a las regiones intervenales de la hoja (Garibaldi *et al.*, 2004). Dicho síntoma pueden ser fácilmente confundible con deficiencias nutricionales, principalmente nitrógeno (Wyenandt *et al.*, 2010). Además, el envés de la hoja se cubre de esporas de color gris y las lesiones pueden llegar a convertirse en tejido necrótico con la posterior muerte de la hoja (Fig. 3) (McGrath,

2013). Todo este ciclo resulta en una reducción considerable del rendimiento y puede ser dañino en la albahaca, ya que la producción de esta planta recae completamente en la producción de hojas (Francescangeli, 2013).



Figura 3.- Síntomas de *Peronospora* spp. en albahaca en la zona agrícola de El Pescadero. A) Cultivo enfermo, B), Planta infectada, C) amarillamiento y esporulación de *Peronospora* en el haz y envés de la hoja, D) cultivo sano y E) esporangióforos en tejido.

2.5 Métodos de control

El manejo de *P. belbahrii* es complicado, por varias razones. La principal es que la albahaca pertenece a los cultivos menores, por lo tanto el número de fungicidas registrados para su uso es relativamente bajo (Gilardi *et al.*, 2015). Así mismo se ha comprobado que el hongo desarrolla resistencia a los agroquímicos utilizados (Belbahri *et al.*, 2005) y existe el riesgo de la presencia de residuos en la cosecha (Leadbeater y Gisi, 2010). Algunos de los fungicidas que se han registrado gradualmente en algunos países para el control del mildiu en albahaca, son dimetomorfos con mancozeb, clorotalonil, boscalid con pyraclostrobin, azoxystrobin, fosfito de potasio y mfenoxam con mancozeb. Este último fue

potencialmente el más efectivo, pero desafortunadamente se encontró que el patógeno generó resistencia a mefenoxam (Cohen *et al.*, 2013.) y para el 2014 ya no mostraba efectividad en el control. Según lo que indica la Ministry of Agriculture Extension Service, los fungicidas deben ser utilizados dentro de intervalos de tiempo definidos durante la etapa de crecimiento de la planta, lo que provoca un número limitado de aplicaciones (Gilardi *et al.*, 2013). En el caso de los productos biológicos en Estados Unidos, solo unos pocos tienen registro para uso general contra mildiu veloso en plantas aromáticas, pero no específicamente en albahaca (McGrath, 2011). Aunado a esto, las variedades de albahaca mayormente demandadas en el mercado internacional no presentan resistencia al mildiu veloso. Otra de las problemáticas es que la obtención de semilla certificada no garantiza que ésta se encuentre libre de propágulos pertenecientes al hongo, lo que disminuye las posibilidades de control contra este patógeno (Wyenandt *et al.*, 2010).

2.5.1 Alternativas de manejo de la enfermedad

Debido a este tipo de problemáticas dentro de la agricultura, se ha hecho necesario y urgente explorar nuevas estrategias que sean efectivas, con acción duradera y amigable con el ambiente para su uso dentro del manejo de enfermedades. Una de éstas alternativas y que actualmente es un área de gran interés, es la manipulación artificial del sistema de defensa natural de la planta (Sharma *et al.*, 2002), para inducir resistencia ante diferentes tipos de estrés (Beckers y Conrath, 2007). Este tipo de métodos ha mostrado gran potencial en la reducción de la incidencia y severidad de enfermedades causadas por patógenos (Baysal *et al.*, 2003).

2.6 La Inducción de resistencia en plantas para el control de patógenos.

La resistencia, según Agrios (1988), es la capacidad de un organismo para excluir o sobreponerse completamente o en algún grado, al efecto de un patógeno o algún factor de daño. Esta resistencia se manifiesta por los síntomas limitados,

reflejando la incapacidad de crecimiento del patógeno, multiplicación o diseminación (Van, 1997). Se ha determinado que en ciertas condiciones, algunas plantas o variedades muy susceptibles pueden permanecer libres de la infección o síntomas y de esta manera ser resistentes (Conrath *et al.*, 2002). La resistencia aparente que muestran algunas plantas a las enfermedades y de las que se saben son susceptibles en general, es el resultado de procesos de escape o tolerancia a la enfermedad (Agrios, 1998). Las respuestas de la planta a la infección de patógenos son complejas y no existe un modelo universal o secuencia de eventos que actualmente describa la dinámica de la resistencia en las interacciones estudiadas, ya que cada interacción es de acuerdo a la activación, localización, tiempo y magnitud de cada componente dentro de la respuesta de defensa (Ponce de León y Montesano, 2013). La resistencia es raramente absoluta y si una planta termina siendo resistente o susceptible depende de la suma de muchas respuestas individuales (Hammond-Kosack y Parker, 2003).

2.6.1 La acción de los mecanismos de defensa en la planta

Las plantas constantemente se encuentran expuestas al ataque de microorganismos fitopatógenos (Zhang *et al.*, 2013), los cuales requieren de sus nutrientes y la maquinaria celular para su desarrollo y reproducción (Horbach *et al.*, 2011). Durante esta interacción, el patógeno se dirige al interior de la planta a través de heridas o estomas presentes en las hojas. Durante el proceso de invasión, el patógeno degrada la pared celular, mediante la síntesis y liberación de enzimas degradadoras. Posteriormente libera sus efectores especializados de infección e interfiere con las actividades normales del hospedero (Tilsner y Oparka, 2010). Debido a este tipo de interacción negativa, las plantas han creado diferentes mecanismos de defensa altamente coordinados a través de la activación de barreras a nivel molecular, celular y de tejido (Fig. 4) (Karthikeyan *et al.*, 2005). Los diferentes mecanismos de defensa con los que cuentan las plantas son activados después del reconocimiento de los factores de virulencia del

patógeno (Hammon-Kosack y Parker, 2003). Para ello, el hospedero produce diversas clases de proteínas receptoras (proteínas R) altamente polimórficas, pero con estructuras bastante conservadas, capaces de reconocer bien directa o indirectamente a determinantes proteicos específicos de los patógenos para posteriormente producir una respuesta amplificada de resistencia que se suele denominar de “inmunidad activada por efectores” (ETI, “*effector-triggered immunity*”) (Boller y Félix, 2009). En el caso de la respuesta de defensa de la planta a los patógenos se incluye la activación de las rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas, incremento en la actividad de enzimas tales como fenilalanina amonía-liasa, (Mazid *et al.*, 2011), deposición de callosa y/o lignina y la acumulación de compuestos fenólicos, peroxidasa, oxidasa polifenol, superóxido dismutasa, quitinasas e inhibidores de proteínasa (Siemmens, 2002). Estos tipos de respuesta, provoca que la planta se vuelva insensible a las toxinas del patógeno, originando que se retarde su desarrollo y reproducción, mediante la inhibición de la germinación y penetración del propágulo, lo que origina en la mayoría de los casos la muerte del patógeno (Dangl *et al.*, 1996).

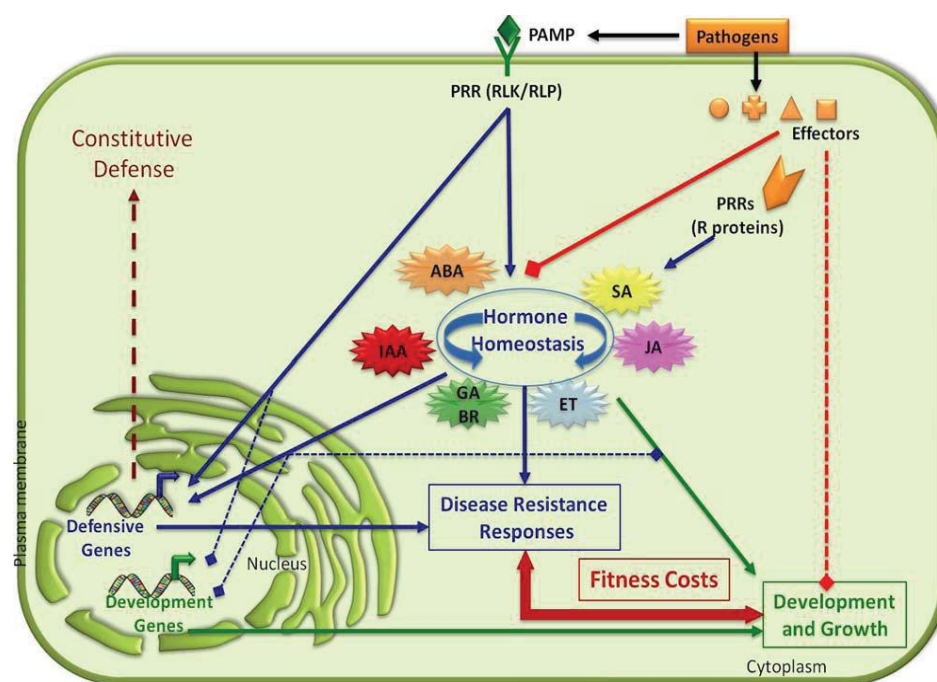


Figura 4. Mecanismo de defensa en la planta. Equilibrio de la respuesta inmune y los costos del acondicionamiento físico (Tomado de

El mecanismo de defensa de la planta puede darse tanto de forma pasiva como activa (Sticher *et al.*, 1997). El mecanismo de defensa pasivo, generalmente está presente desde antes de que la planta esté en contacto con algún patógeno. Su sistema se relaciona con la producción de barreras físicas tales como, la cutícula, pared celular, apertura de estomas o lenticelas o barreras químicas incluyendo compuestos inhibidores (fitoanticipinas o defensinas) o ausencia de compuestos estimulantes necesarios para el desarrollo del patógeno (Nutrientes o modificación del pH) (Karthikeyan *et al.*, 2005). En el mecanismo de defensa activo, éste solo se activa después del reconocimiento del patógeno. La capacidad de las plantas para responder a patógenos potenciales implica que ésta debe reconocer a estos patógenos como no propios de su sistema (Lebeda *et al.*, 1999). Este mecanismo puede darse de manera rápida o retardada. La defensa activa rápida está involucrado el cambio en la función de la membrana celular, la explosión oxidativa, el reforzamiento de la pared celular, la muerte celular por la reacción de hipersensibilidad, así como la producción de fitoalexinas (Mishra *et al.*, 2000). Dentro de la defensa activa retardada está involucrado el mecanismo de producción de proteínas relacionadas a la patogenicidad y la resistencia sistémica adquirida (Roth *et al.*, 2000).

2.6.2 Estudios relacionados a la inducción de resistencia en plantas

A través de los años han surgido diferentes estudios relacionados con la inducción de resistencia en la planta, los cuales han mostrado una efectividad en la reducción de la incidencia de enfermedades (Kúc, 1987; Goellner y Conrath, 2008). Algunos involucran la utilización de bacterias promotoras de crecimiento (Van *et al.*, 1998), aplicaciones de ácido salicílico (Kessmann *et al.*, 1994), sustancias sintéticas y naturales tales como productos derivados de urea, manganeso y zinc (Fuster *et al.*, 1995), vitamina B (Ahn *et al.*, 2007), sisteminas (Stennis *et al.*, 1998) y β -ácido aminobutírico (BABA) (Zimmerli *et al.*, 2000). En el caso de los Oomicetes, como *Peronospora* spp. se han evaluado productos basados en fosfitos, los cuales han mostrado su capacidad para activar la defensa

de la planta, mediante la síntesis y translocación de fitoalexinas (Guest y Grant, 1991; Bock *et al.*, 2012). Así mismo, la aplicación de acibenzol-S-metil, rizobacterias o el compuesto prohexadione-Ca (Bazzi *et al.*, 2003; Oostendorp *et al.*, 2001; Van *et al.*, 1998). Sin embargo, en el caso de la albahaca, no todos son aprobados para su aplicación y la acción de la mayoría de estos métodos ha presentado un costo en el desarrollo de la planta y la producción de semilla (Goellner y Conrath, 2008).

2.7 El vigor de la planta en la resistencia a patógenos

Actualmente se ha considerado al vigor de la planta como un factor importante en la resistencia a diversos factores estresantes. Esta característica está relacionada con la efectividad de la activación de los mecanismos de defensa de la planta (Ghanbari *et al.*, 2013). Desde años anteriores se ha hecho evidente que en la mayoría de las relaciones hospedero-patógeno, existen plantas resistentes o tolerantes a microorganismos fitopatógenos, debido a un vigor excepcional de la planta, relacionado principalmente con una reducida vitalidad de la misma, así como procesos fisiológicos normales que empiezan a desequilibrarse en mayor o menor grado (Kolmer, 1917). Por lo tanto, la evidencia parece suponer que el vigor vegetativo permite a la planta protegerse en cierto grado del ataque de algún patógeno. Esta conclusión conduce a que la resistencia a enfermedades y el vigor vegetativo están estrechamente relacionados (Agrios, 1998).

2.7.1 Características que determinan el índice de vigor

El vigor de la planta es un concepto complejo que incluye muchas características que contribuyen al desarrollo y crecimiento sucesivo en estados tempranos de las plantas (Hacisalihoglu y Ross, 2010). Este concepto es definido como la suma de las propiedades que determinan el nivel potencial de actividad de la semilla durante la germinación y emergencia de la planta. Entonces, una rápida y sincronizada tasa de germinación, el incremento rápido de biomasa, así como el crecimiento y desarrollo de la planta en ausencia de patógenos, serán las

características de una planta vigorosa (Cervantes, 2000). Dentro de la agricultura, el vigor de las plantas es un factor indispensable en el incremento del rendimiento de los cultivos y calidad de los productos. La creciente demanda del mercado internacional, se basa en las diferentes exigencias relacionadas al producto, dentro de los cuales se incluyen la reducción de residuos de plaguicidas, incremento en la calidad de sus características organolépticas, mayor producción de biomasa y la sanidad del producto (Hussian *et al.*, 2014). Estudios anteriores han determinado que uno de los procesos esenciales para incrementar el rendimiento con respecto a la cantidad y calidad, es la velocidad y uniformidad de la germinación, así como la emergencia y el desarrollo vegetativo de la planta en campo (Hacisalihoglu y Ross, 2010). Estos parámetros están relacionados con el vigor, el cual a su vez, se relaciona con una resistencia mayor a los distintos factores estresantes (Bittencourt *et al.*, 2005).

2.7.2 El vigor de las plantas y su relación con las propiedades de la semilla
Las características que determinan el índice de vigor en la planta se relacionan con las propiedades de la semilla (Zhu, 2002), la cual tiene influencia en la velocidad de germinación y/o emergencia, uniformidad, incremento de biomasa, longitud de raíz, longitud del vástago (Selvarani y Umarani, 2011), producción de carbohidratos, lípidos y proteínas (Randhir *et al.*, 2002). Estas características proporcionan a la planta un nivel de actividad potencializada con la capacidad de responder rápidamente de manera eficaz a los diferentes factores causantes de estrés (Hammerschmidt, 2009). Debido a un aumento en la cantidad de componentes celulares con funciones importantes de señalización en la respuesta de defensa, la cual solo se induce después del contacto con un factor abiótico o un patógeno virulento (Hussian *et al.*, 2014).

2.7.3 Técnicas de acondicionamiento de la semilla para estimular el vigor de la planta

Entender los procesos involucrados en la germinación de la semilla es de especial interés dentro de la agricultura, ya que se pueden implementar métodos para modificar estos procesos y obtener un mejor desarrollo de las plantas cultivadas (Bewley *et al.*, 2013). Actualmente existen varias técnicas que estimulan el vigor de las plantas mediante el acondicionamiento previo de la semilla para reaccionar con mayor rapidez a la exposición posterior de algún tipo de estrés (Haigh *et al.*, 1986; Bittencourt *et al.*, 2005). Además de que sustentan el balance entre la utilización de energía para la defensa de la planta y el crecimiento normal o incrementado de la misma (Pal *et al.*, 2015). Este mecanismo de sensibilización o también llamado “priming” ha surgido como una parte importante en el desarrollo óptimo de la planta (Capanoglu, 2010). Su principio se basa en someter a la semilla a diferentes tratamientos que permitan la activación de eventos metabólicos pre-germinativos, pero insuficientes para permitir la protrusión de la radícula (Selvarani y Umarani, 2011). Durante la activación de estos eventos metabólicos se producen cambios físicos, bioquímicos y fisiológicos que determinan incremento en el rendimiento de la producción, en la tolerancia al estrés abiótico o en la síntesis de metabolitos secundarios en las semillas y las plantas (Randhir *et al.*, 2002). Algunas de las técnicas que estimulan el vigor de la planta son el uso del agua (hidropriming), temperatura (termipriming), soluciones de azúcares (osmopriming), sales minerales (halopriming), hormonas (hormonal priming), entre otros (Farahani *et al.*, 2011). Aunque este fenómeno se conoce desde hace años (Kúc, 1987), la mayoría de los avances se dirigen a la aplicación de compuestos naturales o sintéticos tales como el ácido salicílico, el β -amino butírico o la aplicación de microorganismos benéficos (Beckers y Conrath, 2007). Sin embargo, la eficacia de estas medidas es variable y a menudo de corta duración (García *et al.*, 2006).

2.8 El acondicionamiento térmico en semillas

Uno de los tratamientos a la semilla que se considera relevante como método de acondicionamiento en el incremento del vigor de las plantas, es la exposición a la temperatura (Lee *et al.*, 1995). Esta variable es uno de los factores más importantes en la activación y estimulación de los procesos metabólicos de la semilla y tiene efectos cuantitativos en el grado de germinación (Hampton *et al.*, 2000), aumento del desarrollo vegetal (Castillo y Santibañez, 1987), desinfección de semillas (Babadoost, 1992), regulación de la germinación (Adhikary y Tarai, 2013), síntesis de proteínas (Lee *et al.*, 1995), variación del nivel de lípidos (Braccia *et al.*, 2003) y acumulación de carbohidratos (Horbowicz *et al.*, 1998). Este factor es considerado una parte importante durante la germinación, debido a que regula la tasa de absorción de agua y los sustratos adicionales necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta. Por lo tanto se considera que la temperatura actúa como regulador de la germinación y se cree que es percibida dentro de las membranas de la semilla (Buriro, 2011). Algunos estudios relacionados con esta técnica son los realizados por Yari *et al.*, (2010), quienes observaron que al someter la semilla de trigo (*Triticum aestivum* L.) a 20°C durante 12 h, se aumentaba la velocidad y porcentaje de germinación, así como el vigor de la planta. Por otro lado, Kumar y Sharma (2012), determinaron que la luz y la temperatura incrementaron considerablemente el porcentaje de germinación en semillas de tres plantas aromáticas, tales como *Stevia rebaudiana*, *Salvia sclarea* y *Tagetes minuta*. Otros estudios como el de Denton *et al.* (2013), determinaron que una exposición de 5 min a 120°C en semillas de *Corchorus olitorious* incrementó la germinación, emergencia y vigor de la plántula. Asimismo, Pinna *et al.* (2014), observaron que la aplicación de pre-tratamientos y la exposición a temperaturas de 15°C en semillas de *Juniperus macrocarpa* Sm. provocó un incremento en la viabilidad y germinación. Estos estudios revelan el impacto que tiene el factor temperatura en la estimulación del desarrollo de la planta, lo que sugiere que su efecto también se relaciona con la inducción de resistencia contra patógenos. En el caso particular de la albahaca, no se han

encontrado a la fecha reportes sobre estudios basados en tratamientos de temperaturas en semillas sobre la estimulación del vigor de la planta y su relación en la inducción de resistencia. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes condiciones de temperatura en semillas de albahaca a distintos intervalos de tiempo para su mejoramiento y sanidad, durante el desarrollo de las etapas de germinación, emergencia y fase vegetativa. Así como, conocer la resistencia de las plantas sobre la incidencia de la enfermedad del mildiu veloso provocada por *Peronospora* spp.

3 JUSTIFICACIÓN

El mildiu vellosa (*Peronospora spp.*) es un serio problema en el cultivo de albahaca (*O. basilicum*) a nivel mundial. Su rápida diseminación se atribuye a semillas contaminadas, lo que hace que el problema se extienda y agrave. Aunado a esto, los fungicidas no han mostrado el éxito esperado, por lo que es de especial interés establecer nuevas estrategias encaminadas a la inducción de la resistencia, mediante la implementación de técnicas de acondicionamiento térmico que inciten el incremento del vigor de la planta para una respuesta efectiva de defensa.

4 HIPÓTESIS

Si la exposición de las semillas a diferentes gradientes de temperatura, activa y estimula los procesos metabólicos de la semilla, entonces se espera que el acondicionamiento térmico en semillas de albahaca incrementará el vigor de las plántulas y propicie una resistencia mayor a la enfermedad del mildiu vellosa a través de la activación temprana en la respuesta de defensa de la planta.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de tratamiento térmico en semillas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en el vigor de la plántula y su relación con la resistencia a *Peronospora* spp.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar las especies de *Peronospora* asociadas al mildiu veloso en plantas de albahaca cultivada en diferentes áreas de producción en Baja California Sur.
- 2) Determinar el efecto de la exposición de semillas de albahaca a diferentes gradientes de temperatura y tiempo de exposición en el vigor de plántulas en las etapas de germinación, emergencia y vegetativa y la respuesta morfo-fisiológica de la semilla.
- 3) Evaluar la respuesta del vigor de las plantas de albahaca procedentes de semillas tratadas con diferentes gradientes de temperatura y tiempos de exposición ante el mildiu veloso (*Peronospora* spp.).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El estudio se realizó en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), ubicado a 17 km al Noroeste de La Paz, Baja California Sur, México (24°08'LN 110°24'LO). El área se caracteriza por tener un clima Bw (h') hw (e) considerado como semiárido y de vegetación xerófita (García, 2004), con temperaturas medias anuales de 24.7°C con máximas en verano de 35°C y mínimas de 17°C, con precipitación promedio anual de 334.7 mm (CONAGUA, 2014).

6.2 Identificación de la especie *Peronospora* presente en áreas de producción de albahaca en Baja California Sur

6.2.1 Muestreo de material vegetal en campo

Para la identificación de la especie de *Peronospora*, se colectaron plantas con síntomas típicos de la enfermedad, tales como amarillamiento, necrosis en el haz de la hoja y la presencia del micelio veloso en la parte del envés de la misma. Para ello, se realizaron muestreos en dos localidades del municipio de La Paz (Los Planes: 23°96069" N, 109°93061" O; El Pescadero: 23°21051" N, 110°10006" O). (Pescadero y Los Planes, Baja California Sur), donde se lleva a cabo la producción de albahaca (Fig. 5). En cada localidad se seleccionaron 10 plantas al azar, de las cuales se obtuvo material vegetal, tomándose 10 hojas de cada planta. Las muestras se depositaron en tubos estériles de un volumen de 15 mL y colocaron en hielo para evitar daño en el ADN del hongo; posteriormente se trasladaron al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) para su posterior análisis.



Figura 5. Muestra de plantas enfermas A) Los Planes y B) El Pescadero). C y D) síntomas y signos típicos de *Peronospora* spp. en follaje (amarillamiento y esporulación).

6.2.2 Identificación morfológica

La identificación de las características morfológicas del hongo se realizó mediante montaje de esporas y esporangióforos obtenidos de las hojas infectadas que se colectaron en campo. Con una aguja de disección se montaron estructuras completas del hongo (esporas y esporangióforos), sobre un portaobjetos que contenía una gota de agua destilada. Los montajes realizados se visualizaron en un microscopio binocular óptico, marca LABOMED, modelo LX-400 con una cámara DINO-LITE MODELO AM-7023 y se determinaron las características de color, longitud y radio de la espora y esporangióforos, así como la forma y el número de ramificaciones presentes en el hongo. Esto en base a las claves taxonómicas de Thines *et al.* (2009). De igual forma se llevaron a cabo montajes para realizar observaciones en un microscopio electrónico de Barrido (Hitachi, S-3000N) de acuerdo a la metodología de Melo y Faull (2004) para la obtención de cuerpos fructíferos del hongo (micelio y esporas) y se obtuvieron electromicrografías con el fin de confirmar los datos de las dimensiones.

6.2.3 Identificación molecular

En el caso de la identificación molecular, inicialmente se realizó un aislamiento de las esporas observadas en la superficie de las 10 hojas obtenidas en cada planta muestreada e inmediatamente se preservaron en solución salina (NaCl_2 0.85%) hasta la extracción del ADN. De dicha solución, se obtuvo un volumen de 200 μL y transferido a un tubo de 1.7 mL, donde fue centrifugado a 8000 rpm para la extracción del DNA. Para ello, realizó una maceración mecánica de la suspensión de esporas utilizando perlas de cristal (0.2 μm). Posteriormente se realizó una precipitación con fenol-cloroformo y etanol como lo describe Sambrook y Rusell. (2001). Una vez obtenida la muestra, se realizó una digestión enzimática con quitinasa (25 U/ μL) y proteinasa K (20 mg/mL). El ADN de las muestra se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñida con GelRed (Biotium, Cat. No. 41003) y visualizados con luz UV. La muestra final se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y las muestras se diluyeron a 20 ng/ μL . las regiones ITS y 5.8S se amplificaron por PCR utilizando los primers universales ITS-5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') y ITS-4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: las reacciones de un volumen de 25 μL contenían 1X PCR Buffer, 1.5 mM de MgCl_2 , 1 μM de cada primer, 0.2 mM de dNTP's, 1 μL de ADN y 0.04 U/ μL de Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsberg Ca. USA). Las condiciones del termociclador consistieron en un ciclo de 94°C por 5 min, 35 ciclos de 3 temperaturas; 94°C por 1 min., 55 °C por 50 segundos, 72 °C por 1 min y un ciclo final de 72 °C por 10 min. Todos los productos positivos de PCR se purificaron con el kit PCR QIAquick (QIAGE, Germany) y posteriormente se enviaron a secuenciar al Genewiz (South Plainfield, NJ, USA). Posteriormente la secuencia fue comparada con la secuencia presente en el GenBank blast, para comparar la homología con otras especies de *Peronospora*, dentro de éstas la relacionada a *P.belbahrii*.

6.3 Tratamientos de acondicionamiento térmico en el vigor de las plantas durante la etapa de germinación, emergencia y etapa vegetativa inicial.

Los tratamientos consistieron en someter de un mismo lote, semillas de albahaca variedad Nufar de la compañía la compañía Vis Seed[®] Company Inc. (Arcadia, CA, USA), facilitada por la empresa agrícola “Orgánicos de los Cabos”. Su selección se debió a que es la variedad más comercializada por los productores. Las temperaturas a las que se sometieron las semillas fueron de 40, 50, 60 y 70 °C a diferentes tiempos de exposición de 30, 60 y 90 min, lo cual se realizó en un horno de secado (Shel-Lab[®] modelo FX-5, serie 1000203). De tal forma que las plántulas evaluadas durante la etapa de germinación, emergencia y la etapa vegetativa inicial, se originaron de semillas tratadas a las temperaturas y tiempos de exposición mencionados. Los tratamientos se compararon con plántulas cuyas semillas no fueron tratadas (grupo control), es decir que se mantuvieron a una temperatura ambiente (25 °C promedio). En los experimentos donde se evaluó el efecto del acondicionamiento térmico ante la infección del mildiu veloso, las plantas también se originaron de las semillas bajo los mismos tratamientos y se compararon con las semillas no tratadas.

6.3.1 Etapa de germinación

Para esta etapa, las semillas tratadas y las no tratadas (control) se colocaron en cajas Petri de 150 x 15 mm, con un papel filtro Whatman No. 2 en su base, humedecido previamente. Las cajas se depositaron en una cámara de germinación (Lumistell, modelo IES-OS, serie 1408-88-01) en condiciones controladas de temperatura (25 ± 1 °C), a humedad constante (80 %) y un fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad (ISTA, 1996). Para cada tratamiento se consideraron cuatro repeticiones, donde una repetición correspondió a una caja Petri, cada una con 50 semillas. El porcentaje y la tasa de germinación total se cuantificaron mediante conteos diarios de las semillas germinadas, considerando como germinación cuando la semilla presentó un crecimiento de radícula de 3 mm de longitud en su radícula (Fig. 6). Quince días después del tiempo de germinación total, 10 plántulas de cada tratamiento se utilizaron para obtener las

variables de longitud de radícula y tallo, biomasa fresca y seca de radícula y parte aérea, con los que se calculó el índice de vigor I y II que se explica más adelante. Este primer experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar el cual consistió de dos factores; temperaturas y tiempos de exposición y sus combinaciones, cada factor a evaluar con diferentes niveles (Tabla I). El factor 1 fueron las temperaturas, con cuatro niveles (40, 50, 60 y 70 °C) y el factor 2 fueron los tiempos de exposición de las semillas a las diferentes temperaturas, con tres niveles (30, 60 y 90 min) y un control de semillas sin tratar.



Figura 6. Experimento de germinación. A) horno para el tratamiento de semillas, B) siembra de semillas tratadas, C) cámara bioclimática de crecimiento y D) medición de semillas germinadas.

Tabla I. Diseño de los tratamientos de temperatura y tiempos de exposición para la etapa de germinación.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE EXPOSICIÓN (min)											
	30				60				90			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Control	T25	T25	T25	T25	T25	T25	T25	T25	T25	T25	T25	T25
40	T40	T40	T40	T40	T40	T40	T40	T40	T40	T40	T40	T40
	t3	t3	t3	t3	t6	t6	t6	t6	t9	t9	t9	t9
50	T50	T50	T50	T50	T50	T50	T50	T50	T50	T50	T50	T50
	t3	t3	t3	t3	t6	t6	t6	t6	t9	t9	t9	t9
60	T60	T60	T60	T60	T60	T60	T60	T60	T60	T60	T60	T60
	t3	t3	t3	t3	t6	t6	t6	t6	t9	t9	t9	t9
70	T70	T70	T70	T70	T70	T70	T70	T70	T70	T70	T70	T70
	t3	t3	t3	t3	t6	t6	t6	t6	t9	t9	t9	t9

R = repetición, T = temperatura, t = tiempo de exposición

6.3.1.1 Variables evaluadas en la etapa de germinación

Porcentaje y tasa de germinación

La germinación se registró diariamente y el porcentaje final se determinó a los 15 días, siguiendo la fórmula:

$$G (\%) = (NSG/TSS) 100 \quad 1)$$

Donde:

G (%) = porcentaje de germinación

NSG = número de semillas germinadas

TSS = total de semillas sembradas

La tasa de germinación se calculó utilizando la ecuación de Maguire (1962):

$$M = n1/t1 + n2/t2 + \dots + n30/t7 \quad (2)$$

Donde: n1, n2, ... n30 son el número de semillas germinadas en los tiempos t1, t2, t7 (en días).

Longitud de tallo y de radícula

Estas variables se obtuvieron mediante escaneo de las plántulas utilizando un equipo analizador de imágenes (WinRHIZO®, Regent Instruments Inc).

Biomasa fresca y seca de la parte aérea (tallos + hojas) y radícula de la plántula

Se determinó al obtener el peso de tallos y raíz de cada plántula, utilizando una balanza analítica (Mettler Toledo, modelo AG204). Para el peso total se sumaron ambas, partes y los resultados se expresan en gramos. El peso seco se obtuvo en gramos utilizando un horno de secado (Shel-Lab, modelo FX-5, serie-1000203) a 70 °C durante 24 h hasta obtener su deshidratación completa.

Índice de vigor I y II

Con los valores de % de germinación, peso seco y longitud de plántula, se calcularon los índices de vigor I y II, acorde con Abdul y Anderson (1970), con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Índice de vigor I} = \text{germinación (\%)} \times \text{longitud de la planta (cm)} \quad (3)$$

$$\text{Índice de vigor II} = \text{germinación (\%)} \times \text{peso seco de la planta (g)} \quad (4)$$

Índice de peso fresco y seco

Con los valores obtenidos de peso fresco y seco de parte aérea de la plántula y de la raíz, se calcularon los índices de peso fresco y seco para determinar la proporción de desarrollo de la planta, acorde con Nieto-Garibay (2009), mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Índice de peso fresco} = \text{peso fresco de parte aérea} / \text{peso fresco de raíz (g)} \quad (5)$$

$$\text{Índice de peso seco} = \text{peso seco de parte aérea} / \text{peso seco de raíz (g)} \quad (6)$$

6.3.2 Etapa de emergencia

El experimento de emergencia se llevó a cabo en una estructura de malla sombra, modelo 1610 PME CR, 16×10 hilos cm² con orificios de 0.4 × 0.8 mm, color cristal,

con 40% de sombreado, de monofilamento de polietileno estabilizado. Ubicada en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., en la ciudad de La Paz, Baja California Sur, utilizando los mismos tratamientos de temperaturas y tiempos de exposición. Las semillas tratadas y no tratadas (control), se sembraron en contenedores con 200 cavidades, los cuales fueron llenados con sustrato comercial (Sunshine^{MR}). Una vez sembradas las semillas en las charolas, éstas se cubrieron con un plástico negro para acelerar el proceso de emergencia en todos los tratamientos (Fig. 7). El riego aplicado a las charolas se llevó a cabo diariamente con el fin de lograr una emergencia homogénea de las plántulas. De igual forma se tomaron mediciones diarias sobre las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa.



Figura 7. Experimento de emergencia. A) horno, B) plástico negro sobre semillas tratadas, C) proceso de emergencia y D) plántulas emergidas.

6.3.2.1 Variables morfométricas

El porcentaje y la tasa de emergencia se cuantificaron diariamente en las semillas germinadas, considerándose como emergencia, cuando la superficie del suelo se rompe debido a la presión de la plántula en crecimiento. A los 21 días, se seleccionaron al azar 10 plántulas por repetición de cada tratamiento y se les determinó peso fresco y seco (g) de parte aérea y de raíz, así como los índices de vigor propuestos por Abdul y Anderson (1970) y los índices de peso fresco y seco, como se detalló en la evaluación de plántulas de germinación (Nieto-Garibay *et al.*, 2009). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial con cuatro repeticiones. El factor 1 fueron las temperaturas, con cuatro niveles (40, 50, 60 y 70 °C) y el factor 2 fueron los tiempos de exposición de las semillas a las diferentes temperaturas, con tres niveles (30, 60 y 90 min) y el control sin tratar.

6.3.3 Etapa vegetativa

Esta etapa también se estableció bajo la malla sombra donde se llevó a cabo el experimento de emergencia con semillas del mismo lote. Las semillas se sometieron a los tratamientos de temperatura y tiempos de exposición anteriormente explicados. Se sembraron en contenedores de poliestireno de 200 cavidades, con sustrato comercial (Sunshine^{MR}). El trasplante se realizó cuando las plantas presentaban una altura promedio de 15 cm en macetas de plástico de 500g, colocando una planta por maceta (Fig. 8). Se aplicaron dos riegos por semana y una fertilización por mes Triple 17[®] (17-17-17 de nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente), utilizando 1 g de Triple 17[®] L⁻¹ de agua y aplicando 1 mL planta⁻¹ y se monitorearon las condiciones climatológicas con miniestaciones.

6.3.3.1 Variables morfométricas y fisiológicas de plantas

En esta etapa, el vigor de la planta se determinó en base al desarrollo de la misma mediante la evaluación de los caracteres morfométricos y fisiológicos. Para ello, sesenta días después de la siembra (DDS), se midió longitud de tallo y raíz (cm), área foliar (cm²) con un medidor LiCor[®], (modelo Li-3100C), peso fresco y seco (g)

de raíces, tallo y hojas y se determinaron los índices de peso fresco y seco de la planta de acuerdo a como se detalla en los experimentos anteriores.



Figura 8. A) Experimento de etapa vegetativa. B) determinación de fotosíntesis; C y D) determinación morfométrica en plantas.

Las variables fisiológicas se registraron a los 50 y 60 días DDS con un analizador portátil de gas infrarrojo (IRGA) y un sistema de fotosíntesis portátil LCpro-SD con una cámara de amplificación de la hoja (ADC[®], Hoddesdon, Herts, UK). Se registró tasa fotosintética (A, $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiración (E, $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperatura de la hoja ($T_h^{\circ}\text{C}$), conductividad estomática ($g, \text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y contenido sub-estomático de carbono ($C_i, \mu\text{molmol}^{-1}$). Estas mediciones se realizaron a las 11:00 horas del día, en la tercera hoja inferior del meristemo apical de cada planta, en hoja completamente turgente y sana, la cual posteriormente se cosechó para cuantificar la clorofila a, b y total mediante la metodología de Bruinsma (1963), utilizando un espectrofotómetro (Beckman[®] Coulter, modelo 800). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial con cinco repeticiones. El factor 1 fueron las temperaturas, con cuatro niveles (40, 50, 60 y 70° C) y el factor 2 fueron los tiempos de exposición de las semillas a las diferentes temperaturas, con tres niveles (30, 60 y 90 min) y el control.

6.4 Determinación del contenido total de carbohidratos, lípidos y proteínas en las semillas de albahaca sometidas a acondicionamiento térmico.

A las semillas tratadas con temperaturas y tiempos establecidos en los experimentos anteriores, se les cuantificó el contenido total de carbohidratos, lípidos y proteínas a las 24 y 48 h posteriores a los tratamientos de calor. Previo al tratamiento térmico, se obtuvo el peso fresco de las semillas depositando un grupo de 15 semillas en un tubo Eppendorf de 2 mL, donde se registró el peso del tubo y los datos de la muestra. Posteriormente las semillas se sometieron a los diferentes tratamientos de calor e intervalos de tiempo. Una vez acondicionadas, se depositaron en una liofilizadora (VirtTis, BenchTop 3.5, NY-USA) por 8 h para su deshidratación, a una temperatura máxima de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una presión máxima de 100 mTorr, para un óptimo proceso de sublimación del agua presente en los tejidos. Una vez que las muestras estuvieron completamente deshidratadas, estas se pasaron a tubos Eppendorf previamente tarados y se pesaron en una balanza analítica para obtener su peso seco. Las muestras liofilizadas se pulverizaron con ayuda de perlas de acero inoxidable colocando una en cada tubo con semillas y mediante agitación mecánica utilizando un homogeneizador (MPI, Fast Prep-24, CA-USA), para desintegrar el tejido. Posteriormente las muestras se re-hidrataron agregando 1 mL de agua destilada. De este homogenizado se tomaron los volúmenes necesarios para realizar las pruebas bioquímicas correspondientes (Fig. 9).



Figura 9. Procesamiento de semillas para la realización de pruebas bioquímicas. A) peso de semillas de albahaca, B) horno, C) muestra pulverizada, D) centrifugación y E) lectura en placa de los compuestos presentes en las semillas.

6.4.1 Carbohidratos totales

Para la medición de carbohidratos, se tomaron 0.1 mL de homogeneizado de cada muestra y se mezclaron con 0.1 mL de ácido TriCloroAcético (TCA) al 20% en tubos Eppendorf de 0.65 mL, esto con la finalidad de precipitar proteínas que interfieren en la medición de carbohidratos. Los tubos se centrifugaron a 1376g por 10 min a 4 °C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5810 R, NY-USA). Se recuperó el sobrenadante en tubos limpios. La concentración de estos azúcares se determinó utilizando el método basado en Roe *et al.* (1961), donde se colocaron 0.025 mL (25 μ L) de sobrenadante en un mini tubo, se le agregó 0.25 mL de solución de antrona 0.1 % diluida en H₂SO₄ al 96 %. Se calentaron a baño maría a 85° C durante 10 min y se enfriaron en baño de hielo. Posteriormente esta solución se sembró en una microplaca depositando 200 μ L en cada cavidad. Se

leyó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 620 nm. Para la comparación en la curva tipo se utilizó una solución estándar que contiene 5 mg/mL de carbohidratos. Se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 500 μ L de TCA, quedando concentraciones de 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 y 0.0390625 mg/mL de carbohidratos. La cantidad de carbohidratos se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Concentración de carbohidratos (mg/g)} = (\text{Abs} \times \text{FD}) / (m \times \text{peso}) \quad (7)$$

Dónde:

Abs = 620 nm

m es la pendiente en la curva tipo

FD es el factor de dilución

6.4.2 Lípidos totales

Se utilizó el método de la sulfa fosfovainillina según Knigh *et al.* (1972). Una alícuota de 0.025 mL (25 μ L) de cada muestra, se depositó en mini tubos a los cuales se les agregó 0.25 mL de ácido sulfúrico concentrado y se homogenizó la muestra. Posteriormente se incuban a baño maría a 90°C por 10 min. Los tubos se enfriaron en baño de hielo, luego se tomaron 20 μ L de cada tubo y se colocaron en el fondo del pozo de una microplaca (placa Elisa) de 96 pozos; se les agregó solución reactiva para lípidos (fosfovainillina al 0.2 % en ácido sulfúrico al 80 %), se dejó incubar la placa por 40 min a temperatura ambiente y se tomó la lectura de la placa en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 540 nm. Al mismo tiempo que las muestras, se hizo reaccionar una curva de calibración la cual se preparó de la siguiente manera:

Curva tipo: la solución estándar de lípidos (Lin-Trol Sigma L2648) contiene 20 mg/mL, de ésta se preparan diluciones en proporción 1:2, en 1 mL de solución salina, quedando concentraciones de 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 mg/mL de lípidos. Se utilizó solución salina como blanco.

La cantidad de lípidos se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Concentración de lípidos (mg/g)} = (\text{Abs} \times \text{FD}) / (m \times \text{Peso}) \quad (8)$$

Dónde:

Abs = 540 nm

m es la pendiente en la curva tipo

FD es el factor de dilución.

6.4.3. Proteínas totales

Se realizó mediante la metodología por BCA o ácido bicinconínico, utilizando una alícuota de 25 µL del homogeneizado, el cual se digirió en 500 µL de NaOH 0.1N durante 2 h. Posteriormente se tomaron 25 µL del digerido y se depositaron en el fondo de una microplaca, donde se le agregaron 200 µL del reactivo preparado de BCA. Se incubó a 60 °C durante 15 min y se procedió a leer su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 562 nm. Para la comparación de la reacción de las muestras se utilizó una solución estándar con una concentración de 2 mg/mL de albúmina bovina, la cual se diluyó en proporción 1:2 en solución salina hasta tener concentraciones, de 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/mL de proteína y solución salina como blanco. La concentración de proteínas se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de proteínas (mg/g)} = (\text{Abs} \times \text{FD}) / (m \times \text{peso}) \quad (9)$$

Dónde:

Abs = 562 nm

FD es el factor de dilución

m es la pendiente en la curva tipo.

6.5 Evaluación de la respuesta del vigor de plantas de albahaca procedentes de semillas sometidas a acondicionamiento térmico ante la enfermedad del mildiu vellosa.

El experimento se realizó en el laboratorio de fisiotecnia vegetal, en el campo experimental de CIBNOR y el vivero de la empresa agrícola “Orgánico de los Cabos”. Este último ubicado en San José del Cabo, B.C.S. Para este experimento, 30 semillas de albahaca se sometieron a los tratamientos ya descritos de

temperatura y tiempo, de igual forma que en los experimentos anteriores se compararon con semillas no tratadas (ISTA, 1996). Las semillas se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato comercial (Sunshine[®]), aplicando riego diariamente. En la primera etapa, el experimento se llevó a cabo en una malla sombra, (modelo 1610 PME CR), con 40% de sombreado ubicada en el campo experimental de CIBNOR.

Una vez que las plántulas presentaron las primeras hojas verdaderas, se trasplantaron en bolsas negras de plástico con capacidad de 500 g con el mismo sustrato comercial. Durante el desarrollo de las mismas, se aplicaron dos riegos por semana y una fertilización por mes con fertilizante comercial Triple 17[®] (17-17-17 de nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente), utilizando 1 g de Triple 17[®] L⁻¹ de agua y aplicando 1 mL planta⁻¹. 15 días después del trasplante, las plantas se trasladaron a un invernadero facilitado por la empresa cooperante con antecedentes de infestación de *Peronospora* spp., para que se llevara a cabo la infección de forma natural en las plantas derivadas de las semillas sometidas a los tratamientos de temperaturas y tiempos de exposición. La temperatura y la humedad relativa fueron monitoreadas con el equipo analizador HOBO UX100-003 (Onset Computer Corp).

6.5.1 Evaluación de la enfermedad

La evaluación de la enfermedad se determinó mediante la incidencia del mildiu veloso y el porcentaje de hojas con esporulación.

6.5.1.1 Incidencia

En el caso de la incidencia, se determinó cada 5 días mediante monitoreo visual y el conteo de plantas enfermas en cada tratamiento en relación al total de plantas evaluadas (Fig. 10). Las plantas se consideraron como enfermas cuando éstas tenían la presencia de esporangióforos típicos de *Peronospora* spp. y/o con presencia de amarillamiento en las hojas. La incidencia de la enfermedad se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{No. de plantas enfermas}}{\text{No. de plantas evaluadas}} \times 100 \quad (10)$$

6.5.1.2 Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)

Para determinar el patrón de comportamiento de la enfermedad, se determinó el número de plantas enfermas, a través del tiempo. Para ello, se obtuvieron el número de plantas enfermas por cada día de evaluación y se calculó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) de acuerdo al método de Shaner y Finney (1977), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^n [(Y_i + Y_{i+1})/2] [X_{i+1} - X_i] \quad (11)$$

Donde Y_i = severidad del mildiu (por unidad)

X_i = tiempo (días)

N = número total de observaciones

6.5.1.3 Sobrevivencia del patógeno (% de hojas infectadas)

A los 60 días después de la siembra se determinó la sobrevivencia del patógeno mediante el conteo del número de hojas con esporulación en relación al total del número de hojas por planta en cada tratamiento. Los resultados fueron expresados como % de hojas infectadas. La sobrevivencia del patógeno se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de hojas infectadas} = \frac{\text{No. de hojas infectadas}}{\text{No. total de hojas evaluadas}} \times 100 \quad (12)$$



Figura 10. Evaluación de la enfermedad. A) experimento en invernadero, B) evaluación de incidencia del mildiu vellosa, C) determinación de % de hojas esporuladas y D) determinación de fotosíntesis.

6.5.2. Variables morfométricas y fisiológicas de plantas infectadas

Sesenta días después de la siembra (DDS) se midió en cinco plantas por tratamiento, la longitud de la parte aérea y raíz (cm), peso fresco y seco (g) de raíces y hojas. Así mismo se determinaron los índices de peso fresco y seco de la planta para determinar la proporción de desarrollo acorde con Nieto-Garibay *et al.* (2009), mediante las siguientes ecuaciones:

$$IPF = PFa/PFr \quad (13)$$

Donde:

IPF = índice de peso fresco

PFa = peso fresco de parte aérea (g)

PFr = peso fresco de raíz (g)

$$\text{IPS} = \text{PSa}/\text{PSr} \quad (14)$$

Donde:

IPS = índice de peso seco

PSa = peso seco de parte aérea (g)

PSr = peso seco de raíz (g)

Las variables fisiológicas se registraron a los 50 y 60 días después de la siembra con un analizador portátil de gas infrarrojo (IRGA) y un sistema de fotosíntesis portátil LCpro-SD con una cámara de amplificación de la hoja (ADC[®], Hoddesdon, Herts, UK). Se registró tasa fotosintética (A , $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), transpiración (E , $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperatura de la hoja ($^{\circ}\text{C}$), conductividad estomática (g , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y contenido sub-estomático de carbono (C_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Estas mediciones se realizaron a las 11:00 horas en la tercera hoja inferior del meristemo apical de cada planta, en hoja completamente turgente. Las mismas hojas se cosecharon para determinar la clorofila a, b y total mediante la metodología de Bruinsma (1963), utilizando un espectrofotómetro (Beckman[®] Coulter, modelo 800). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial con 3 repeticiones, donde cada repetición estuvo representada por 5 plantas. El factor 1 fueron las temperaturas, con cuatro niveles (40, 50, 60 y 70 $^{\circ}\text{C}$) y el factor 2 fueron los tiempos de exposición de las semillas a las diferentes temperaturas, con tres niveles (30, 60 y 90 min) y un grupo control (25 $^{\circ}\text{C}$). Se realizaron análisis de varianza y comparaciones múltiples de medias (Tukey HSD, $p=0.05$). En todas las variables, los valores promedio se consideraron diferentes estadísticamente cuando $p \leq 0.05$. Los valores de incidencia y severidad se transformaron mediante arcoseno (Little y Hills, 1989; Steel y Torrie, 1995). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica v. 10.0 para Windows (StatSoft[®], Inc., 2011).

7 RESULTADOS

7.1 Identificación de la especie *Peronospora* presente en diferentes áreas de producción de albahaca en Baja California Sur.

Las observaciones en todas las muestras de albahaca colectadas en los dos sitios de muestreo con síntomas de amarillamiento, necrosis y presencia de micelio en el envés de las hojas, fueron consistentes con las características morfológicas de *Peronospora* spp. Los esporangióforos mostraron un tamaño entre 240-530 micras x 7 a 11, de 5-8 ramas dicotómicamente. El esporangio fue de color café, subgloboso o elipsoidal con un tamaño de 27-31 x 21-25 micras, con una longitud/radio de 1.12 a 1.29. Basado en las características propuestas por Thines *et al.* (2009), el patógeno se identificó como *P. belbahrii* en los dos sitios de muestreo. En las microelectrográficas se observan las características estructurales de este hongo (Fig. 11).

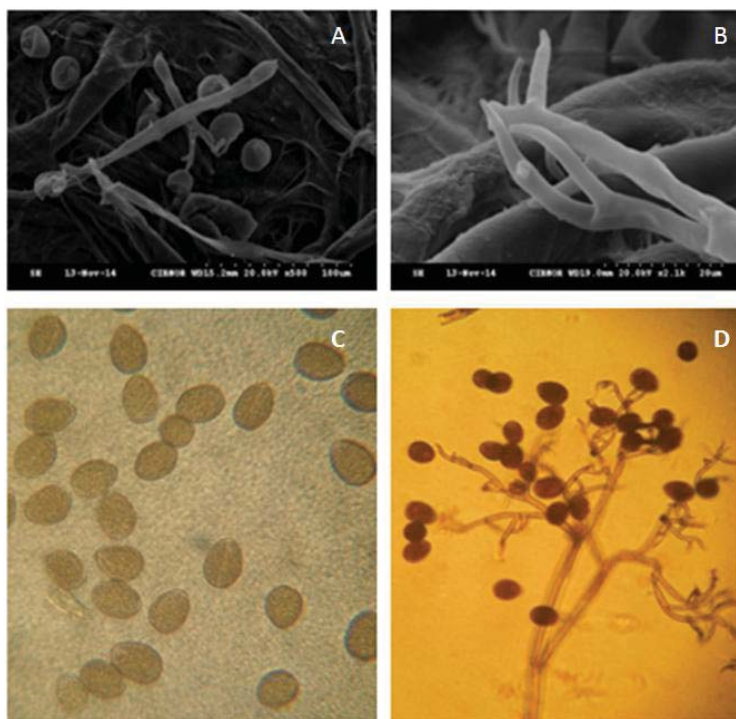


Figura 11. Microscopía de *P. belbahrii*. (A y C) esporas tipo elipsoidal; (B y D) esporangióforo ramificado con esporas en el ápice de las ramas (40 x).

Las pruebas de PCR mostraron amplificación para todas las muestras. Las secuencias del ITS y 5.8S ADNr fueron de ≈ 850 bp. Todas las muestras presentaron el mismo tipo de secuencia. El dato de la secuencia única presente en el GenBank blast mostró 99 % de identidad a *P. belbahrii* con AC HQ730979. Basado en los síntomas de la planta hospedera, las características morfológicas y el dato del análisis molecular del patógeno, este hongo se identificó como *P. belbahrii* en los dos sitios de muestreo. Este patógeno es un hongo de importancia global, debido a que causa pérdidas en la producción cercanas al 100% en esta hierba aromática (Wyenandt *et al.*, 2010; Nagy y Horvath, 2011). En Baja California Sur, México, este es el primer reporte de la presencia de *P. belbahrii*, agente causal del mildiu veloso en albahaca. La amplificación del ADN extraído de esporangióforos y esporas obtenidas de hojas de albahaca infectadas con el mildiú veloso, mediante la utilización de los primers universales ITS-5 e ITS-4, produjeron fragmentos de aproximadamente 850 pb para todas las muestras colectadas en campo. La homología de la secuencia de estas regiones del ADNr amplificado de las muestras del patógeno del mildiu veloso confirmaron que *P. belbahrii* es el agente causal de la enfermedad que afecta el cultivo de albahaca en Baja California Sur (Fig. 12).

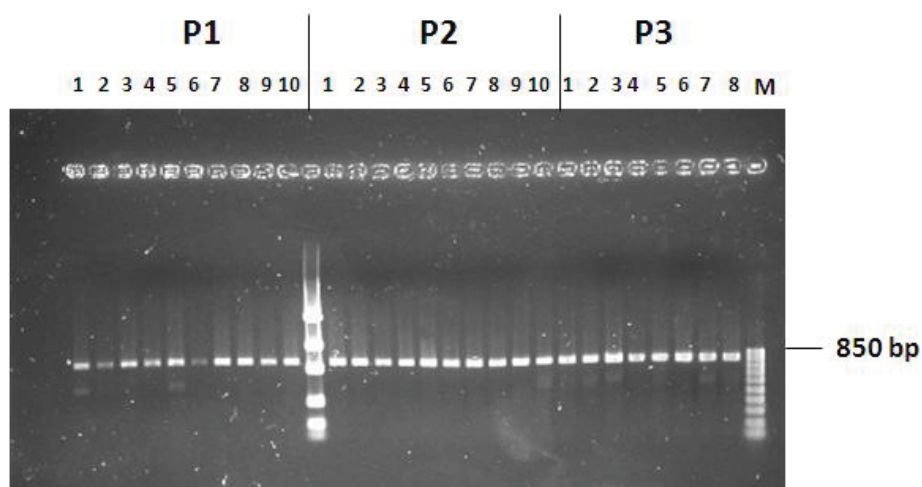


Figura 12. Especificidad de *P. belbahrii*. Pescadero Punto A (P1), Pescadero Punto B (P2) y Los Planes (P3).

7.2 Efecto del acondicionamiento en el vigor de las plantas durante la etapa de germinación, emergencia y vegetativa inicial.

7.2.1 Germinación

7.2.1.1 Variables morfométricas

Porcentaje y tasa de germinación. Los resultados presentaron diferencias significativas para porcentaje de germinación solo en el factor temperatura ($p \leq 0.0001$), pero no en el factor tiempo de exposición ($p \geq 0.232$) y la interacción temperatura \times tiempo ($p \geq 0.779$). Entre temperaturas, la diferencia estadística correspondió a semillas tratadas a 70 °C con el menor porcentaje (Tabla II). La interacción de los factores no mostró una tendencia clara en cuanto a la respuesta de la semilla a los tratamientos de acondicionamiento térmico, sin embargo, se observó que los porcentajes de germinación disminuyeron significativamente en semillas tratadas con 70 °C, expuestas a 30, 60 y 90 min (Fig. 13).

La tasa de germinación también mostró diferencias significativas solo en la temperatura ($p \leq 0.00001$), no significativas en tiempo de exposición ($p \geq 0.956$), ni en la interacción temperatura \times tiempo ($p \geq 0.830$). En la Tabla II, se observa que la diferencia correspondió a semillas tratadas con 70 °C, con una disminución relacionada al 72 % con respecto al resto de los tratamientos. Estos resultados indican que solo el tratamiento a 70 °C afectó el porcentaje y la tasa de germinación en los tres tiempos de exposición. El análisis de la interacción temperaturas \times tiempos, a pesar de no existir diferencias significativas, el efecto de prolongar el tiempo de exposición de las semillas a 90 min y aumentar a cierto grado la temperatura, se apreciaron cambios relevantes en la tasa de germinación en semillas tratadas con 40, 50 y 60 °C, mientras que en las tratadas con 70 °C, tanto en 30 como en 60 y 90 min, disminuyeron considerablemente la tasa de germinación (Tabla IV).

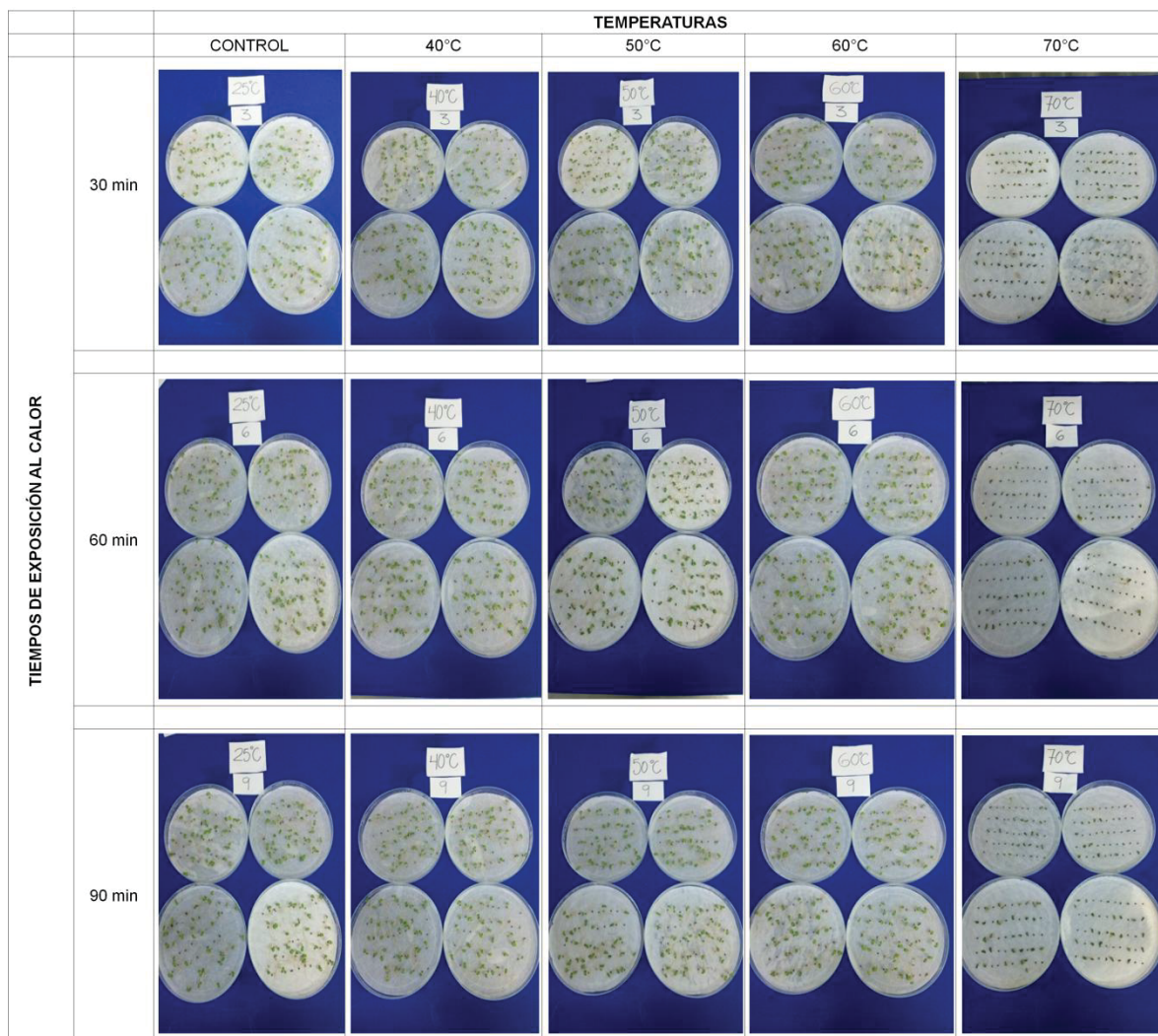


Figura 13. Germinación a los 14 días de la siembra de semillas no tratadas (control) y tratadas a 40, 50, 60 y 70 °C en diferentes tiempos de exposición 30, 60 y 90 minutos.

Peso fresco y seco de parte aérea. El peso fresco de la parte aérea presentó diferencias significativas entre las temperaturas ($p \leq 0.00085$), pero no para el factor tiempo ($p \geq 0.6044$) y la interacción temperatura \times tiempo de exposición ($p \geq 0.6200$). En el factor temperatura, el peso fresco de parte aérea fue mayor en las plántulas cuya semilla se sometió a 40°C, seguido en orden decreciente por 60°C, 25°C (control) y 50°C, observándose que éste disminuyó considerablemente en 70°C (Tabla II). Durante los tres tiempos de exposición se presentaron valores similares; sin embargo, el tiempo de exposición de 90 min incrementó ligeramente el valor de

esta variable (Tabla III). Para la interacción temperaturas x tiempos de exposición, el peso fresco de parte aérea fue mayor en las plántulas de semillas relacionadas al grupo control seguido de las tratadas a 40 °C y 90 min de exposición (Tabla IV). En el peso seco de parte aérea, solo se mostraron diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00645$) y tiempos de exposición ($p \leq 0.04530$), pero en la interacción temperaturas x tiempos no se mostraron diferencias significativas ($p \geq 0.2232$). El análisis del factor temperatura mostró que las plántulas de semillas del grupo control mostraron peso seco de parte aérea mayor (Tabla II). Para tiempos de exposición se observó que el peso seco fue mayor en plántulas cuya semilla se sometió a 60 y 90 min, mientras que el valor inferior fue en 30 min (Tabla III).

Peso fresco y seco de raíz. El peso fresco de radícula presentó diferencias significativas en la temperatura ($p \leq 0.0001$) y en la interacción temperatura x tiempo ($p \leq 0.01358$), pero no en el factor tiempo ($p \geq 0.29724$). Para el factor temperatura, las plántulas cuya semilla se sometió a 70 °C provocaron una disminución significativa en esta variable (Tabla II). Para el factor tiempos de exposición, a pesar de que no hubo diferencias significativas, el peso fresco de raíz de las plántulas de semillas tratadas por 90 min, presentaron un ligero incremento, comparadas con las que se sometieron a 30 y 60 min (Tabla III). La interacción temperaturas x tiempos de exposición mostró que el peso fresco de raíz fue superior en las plántulas cuya semilla se sometió a 40 °C a 30 y 90 min, mientras que el tratamiento de 70 °C mostró una menor reducción en esta variable durante los tres tiempos de exposición (Tabla IV). En el caso del peso seco de radícula, también se presentaron diferencias significativas para temperaturas ($p \leq 0.0001$) para el factor tiempo de exposición ($p \leq 0.04692$), mientras que en el caso de la interacción temperaturas x tiempos ($p \geq 0.0601$) no se mostraron diferencias significativas. Para temperaturas, las plántulas de semilla (control) presentaron los valores más altos, mientras que en 70 °C se observó el valor más bajo de todos los tratamientos más bajo de todos los tratamientos (Tabla II). Para tiempos de

exposición, los valores fueron superiores y los mostraron las plántulas de semilla sometida a 60 y 90 min (Tabla III).

Longitud de plántula y raíz. La longitud de plántula mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$) y la interacción temperatura \times tiempo ($p \leq 0.01601$), pero no en el factor tiempo ($p \geq 0.5803$). Respecto a la temperatura, el tratamiento significativamente menor fue el de 70 °C y aunque no se presentó con diferencia estadística el tratamiento con 60 °C mostró numéricamente una mayor longitud al resto de los tratamientos (Tabla II). El análisis de la interacción temperaturas \times tiempos de exposición, mostró que la semilla sometida a 60 °C y 30 min, provocó un incremento en la longitud de las plántulas (Tabla IV). Para longitud de radícula, se presentaron diferencias significativas en el factor temperatura ($p \leq 0.00001$). Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas en el tiempo de exposición ($p \geq 0.1616$); así como tampoco en la interacción temperaturas \times tiempo ($p \geq 0.1523$). Para el factor temperaturas, la longitud de raíz fue significativamente menor para plántulas de semillas tratadas a 70 °C, igual que en la longitud de la planta, las plántulas de semillas tratadas a 60 °C presentaron la mayor longitud de raíz, aunque no con diferencia estadística (Tabla II). Para tiempos de exposición, aunque no se presentaron diferencias significativas, se observó una longitud mayor en las plántulas de semilla expuesta durante 60 min (Tabla III). Sin bien, no se presentaron diferencias estadísticas, para la interacción temperaturas \times tiempos de exposición, la longitud de raíz fue mayor en las plántulas de semilla tratada con 60 °C a 30 y 60 min de exposición, mientras que los valores menores se presentaron en las plántulas de semilla sometida a 70 °C en los tres tiempos de exposición (Tabla IV) (Fig. 14).

Índice de peso fresco y seco. El índice de peso fresco presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.0006$) y para la interacción temperaturas \times tiempos de exposición ($p \leq 0.013$), mientras que para el factor tiempos de

exposición, no se presentaron diferencias significativas ($p \geq 0.087$). Considerando las temperaturas, el índice de peso fresco fue mayor en plántulas cuya semilla se sometió a 70 °C, mientras que en el resto de temperaturas, esta variable presentó valores similares (Tabla II). En el factor tiempos de exposición, aunque no se presentaron diferencias significativas, se observó que las plántulas de semilla expuesta por 30 min, mostraron índice de peso fresco mayor (Tabla III). En la interacción temperaturas por tiempos de exposición, las plántulas de semilla tratada con 70 °C y 30 min, mostraron un índice de peso fresco mayor (Tabla IV). El índice de peso seco de igual manera presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.0006$) y en la interacción temperaturas \times tiempos de exposición ($p \leq 0.024$), pero no mostró diferencias en el factor tiempos de exposición ($p \geq 0.058$). El análisis entre temperaturas muestra que esta variable fue superior en aquellas plántulas cuya semilla fue tratada con 70 °C, con valores estadísticamente iguales en el resto de las temperaturas (Tabla II). Para tiempos de exposición, aunque no se presentaron diferencias significativas, se observó un incremento de esta variable en las plántulas procedentes de semilla tratada durante 60 min (Tabla III y IV). En la interacción de los factores en estudio, esta variable mostró valores superiores en plántulas de semilla tratada con 70 °C y 60 min (Tabla IV).

Vigor I y II. El índice de vigor I presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.0000$) y la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.0238$), pero no así en el tiempo de exposición ($p \geq 0.8065$). El índice de vigor I fue menor en las plántulas de semilla tratada con 70 °C, mientras que en las plántulas de semilla expuesta a 60 °C, este índice se incrementó aunque sin diferencias estadísticas para éste último caso (Tabla II). En la interacción, se observó que el índice de vigor I lo mostraron las plántulas de semilla tratada a 60 °C y 30 min, mientras que los valores inferiores se presentaron en plántulas cuya semilla fue tratada con 70 °C y 30 min y 60 °C y 90 min (Tabla IV).

El índice de vigor II mostró de igual manera diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$), así como en el factor tiempo ($p \leq 0.00175$), pero no en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.17001$). El índice de vigor II fue mayor en plántulas de semilla control, seguido en orden descendente por plántulas procedentes de semilla tratada con 50, 40, 60 y 70 °C (Tabla II). Para tiempos de exposición, este índice fue superior en plántulas cuya semilla fue tratada durante 60 y 90 min (Tabla III).

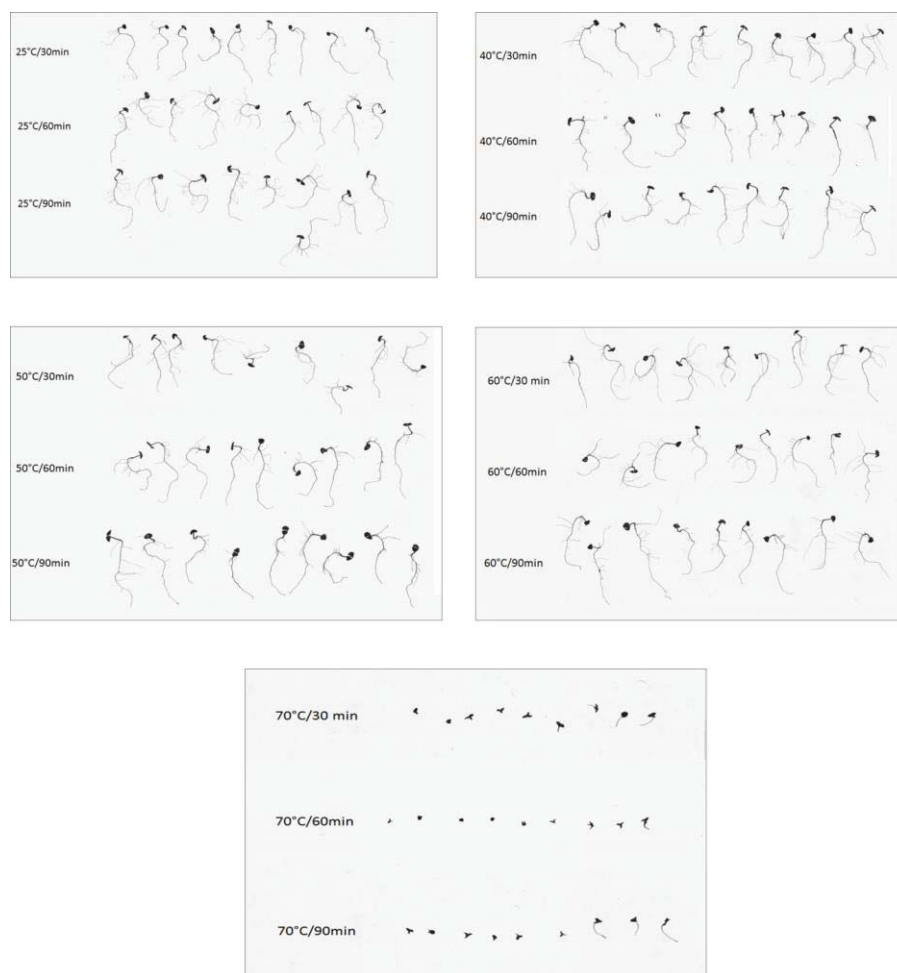


Figura 14. Morfología de semillas germinadas. Longitud de parte aérea y radícula sin tratar (control 25 °C), y tratadas a las diferentes temperaturas y tiempos de exposición.

Tabla II. Acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en la tasa, porcentaje y variables morfológicas de plántulas en la etapa de germinación.

Temp. (°C)	Germinación (%)	Tasa de germinación	Peso fresco de parte aérea (g)	Peso seco de parte aérea (g)	Peso fresco de raíz (g)	Peso seco de raíz (g)	Longitud de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)	Índice de peso fresco	Índice de peso seco	Vigor I	Vigor II
Control	82.50a	19.53a	0.114b	0.009a	0.072a	0.008a	10.99a	8.99a	1.62b	1.13b	905.74a	1.58a
40	81.66a	19.72a	0.127a	0.006b	0.079a	0.004b	11.07a	8.69a	1.59b	1.48b	905.59a	0.91b
50	85.00a	19.60a	0.110b	0.008b	0.071a	0.004b	11.04a	8.46a	1.57b	1.7b	937.27a	1.08b
60	82.00a	19.75a	0.119b	0.005b	0.070a	0.004b	12.31a	10.05a	1.68b	1.37b	1007.77a	0.84b
70	46.33b	5.34b	0.07c	0.008b	0.005b	0.0009c	2.18b	0.95b	5.57a	3.57a	108.05b	0.46c

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$). Control= 25°C.

Tabla III. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en la tasa, porcentaje y variables morfológicas de plántulas en la etapa de germinación.

Tiempo (min)	Germinación (%)	Tasa de germinación	Peso fresco de parte aérea (g)	Peso seco de parte aérea (g)	Peso fresco de raíz (g)	Peso seco de raíz (g)	Longitud de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)	Índice de peso fresco	Índice de peso seco	Vigor I	Vigor II
30	75.60a	17.05a	0.110a	0.006b	0.0572a	0.0038b	9.81a	7.31a	3.34a	1.88a	780.906a	0.834b
60	73.60a	16.22a	0.102a	0.008a	0.0588a	0.0045a	9.39a	8.06a	2.34a	2.38a	759.62a	1.014a
90	77.20a	17.1a	0.111a	0.008a	0.0634a	0.0045a	9.35a	6.91a	1.54a	1.29a	778.14a	1.078a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$).

Tabla IV. Interacción del acondicionamiento térmico x tiempos de exposición en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en la tasa, porcentaje y variables morfométricas de plántulas en la etapa de germinación.

Temp. (°C)	Tiempo (min)	Germinación (%)	Tasa de germinación	Peso fresco de parte aérea (g)	Peso seco de parte aérea (g)	Peso fresco de raíz (g)	Peso seco de raíz (g)	Longitud de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)	Índice de peso fresco	Índice de peso seco	Vigor I	Vigor II
Control	30	81.00a	19.46a	0.089a	0.007a	0.060b	0.007a	9.98a	8.42a	1.48b	1.05bc	810.77b	1.25a
	60	83.00a	19.73a	0.111a	0.010a	0.063ab	0.009a	10.81a	9.06a	1.77b	1.16bc	893.06ab	1.68a
	90	83.50a	19.42a	0.144a	0.011a	0.094a	0.009a	12.20a	9.51a	1.61b	1.20bc	1013.41ab	1.82a
40	30	79.50a	19.61a	0.127a	0.006a	0.085ab	0.004a	11.50a	8.40a	1.49b	1.40bc	913.92ab	0.93a
	60	81.50a	19.17a	0.126a	0.006a	0.070ab	0.004a	10.54a	9.63a	1.78b	1.57bc	863.01ab	0.83a
	90	84.00a	20.38a	0.129a	0.006a	0.084ab	0.004a	11.18a	8.05a	1.52b	1.48bc	939.85ab	0.97a
50	30	87.00a	20.31a	0.106a	0.006a	0.064ab	0.004a	10.13a	7.09a	1.65b	1.66bc	881.37ab	0.92a
	60	81.50a	18.77a	0.116a	0.011a	0.083ab	0.005a	12.63a	10.60a	1.42b	1.98abc	1032.56ab	1.28a
	90	86.50a	19.74a	0.110a	0.007a	0.066ab	0.004a	10.36a	7.69a	1.65b	1.46bc	897.89ab	1.05a
60	30	81.00a	19.79a	0.118a	0.003a	0.070ab	0.003a	13.77a	11.81a	1.69b	0.88c	1114.01a	0.57a
	60	81.50a	19.22a	0.117a	0.006a	0.073ab	0.004a	11.69a	10.00a	1.61b	1.70bc	953.50ab	0.90a
	90	83.50a	20.25a	0.122a	0.007a	0.069ab	0.005a	11.49a	8.35a	1.76b	1.55bc	955.81ab	1.05a
70	30	49.50a	6.08a	0.114a	0.008a	0.007c	0.001a	3.70b	0.87a	10.40a	4.41ab	184.46c	0.50a
	60	41.00a	4.25a	0.042a	0.008a	0.005c	0.0009a	1.31b	1.03a	5.15ab	5.50a	55.97c	0.38a
	90	48.50a	5.71a	0.054a	0.009a	0.004c	0.0008a	1.55b	0.95a	1.16b	0.80c	83.74c	0.50a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$). Control= 25°C.

7.2.2 Emergencia

7.2.2.1 Variables morfométricas

Porcentaje y tasa de emergencia. Para porcentaje de emergencia solo se presentaron diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$). No así en el factor tiempo de exposición ($p \geq 0.64$), ni en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.29$). Las semillas tratadas con 70 °C presentaron los valores significativamente menores con respecto al resto de los tratamientos y las no tratadas (control) y tratadas con 60 °C mostraron porcentaje de germinación mayor, aunque sin diferencias estadísticas (Tabla V). En relación a la tasa de emergencia, se observaron diferencias significativas en el factor temperatura ($p \leq 0.00001$), pero no en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.49$), ni en el caso del tiempo de exposición ($p \geq 0.14$). La tasa fue significativamente mayor en semillas tratadas con 60°C y significativamente menor en semillas tratadas con 70 °C (Tabla V). Aunque sin significancia, numéricamente se pudo observar una tendencia de incremento en la tasa de emergencia en los tiempos de exposición para semillas tratadas con 60 °C y 90 min y de valores menores las semillas tratadas con 70 °C en los tres tiempos de exposición (Tabla VII) (Fig. 15).

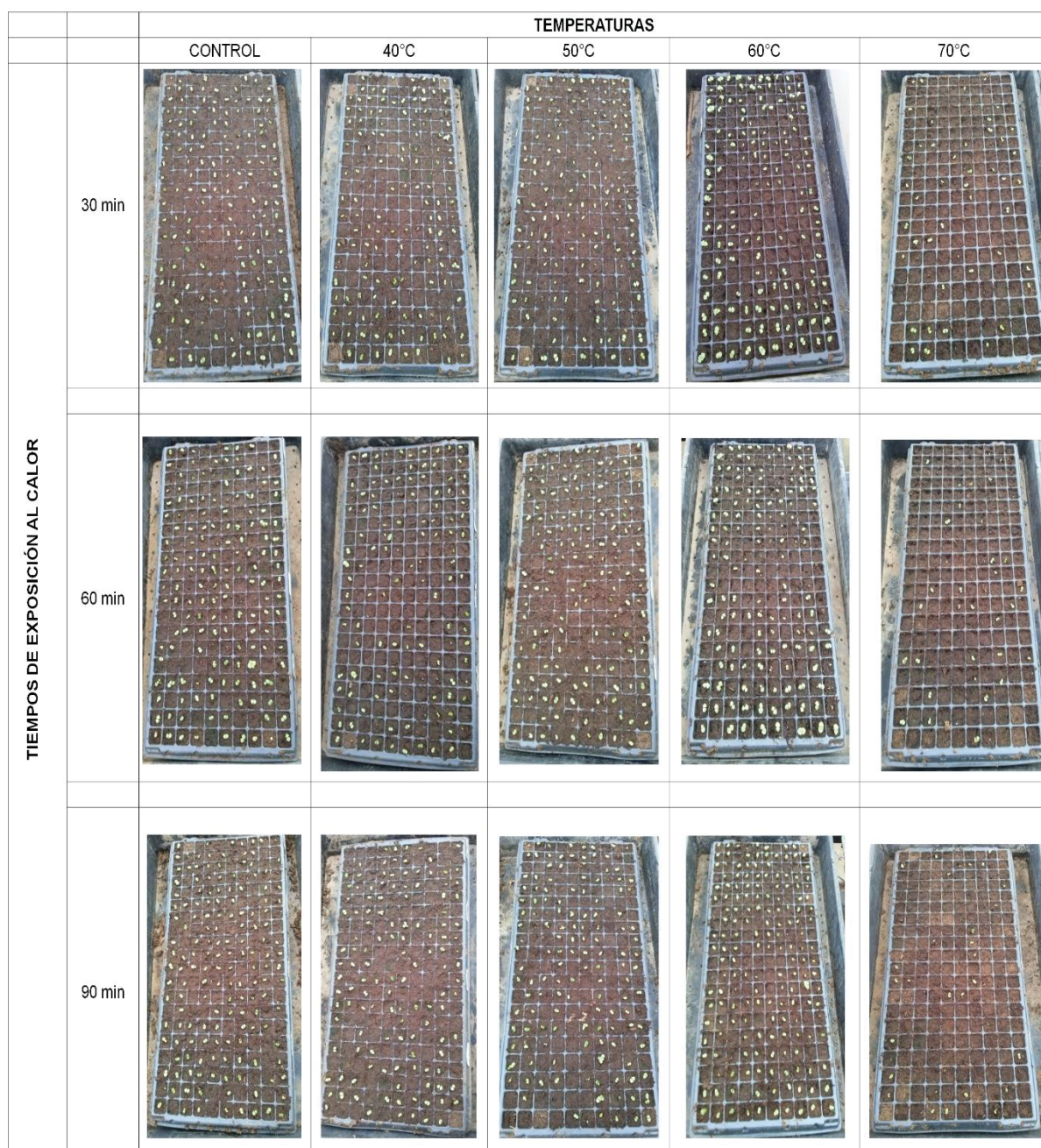


Figura 15. Plántulas emergidas a los 30 días después de la siembra de semillas no tratadas (control) y tratadas a 40, 50, 60 y 70°C en diferentes tiempos de exposición 30, 60 y 90 min.

Peso fresco y seco de parte aérea. El peso fresco de la parte aérea presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.0002$), mientras que para la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.06351$) y el tiempo de exposición ($p \geq 0.5989$) no se presentaron diferencias significativas. El análisis del factor temperaturas, mostró que el peso fresco de parte aérea fue significativamente mayor en plántulas de semilla tratada con 60 °C (Tabla V). En la interacción de los factores, aunque sin diferencia estadística la tendencia se presentó con un incremento en plántulas de semillas expuestas a 60 °C a 30 y 60 min de exposición (Tabla VII). El peso seco de la parte aérea también mostró diferencias significativas en el factor temperatura ($p \leq 0.0008$) y en el tiempo de exposición ($p \leq 0.0378$), pero no para la interacción de los factores ($p \geq 0.0683$). El peso seco de parte aérea fue significativamente mayor en plántulas de semillas tratadas con 60 °C (Tabla V). Aunque sin diferencia estadística significativa se observó en la interacción que las plántulas de semillas tratadas con 60 °C y 60 min, mostraron mayor peso seco de parte aérea y uno menor las que se trataron a 70 °C y 90 min de exposición (Tabla VII).

Peso fresco y seco de raíz. El peso fresco de raíz mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.001$) y entre la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.001$), pero no entre tiempos de exposición ($p \geq 0.26$). El peso fresco de raíz fue mayor en las plántulas procedentes de semilla tratada con 60 °C (Tabla V). En la interacción, el peso fresco de raíz fue mayor en plántulas de semillas tratadas con 60 °C y 60 min de exposición, mostrando valor inferior las plántulas de semilla tratada con 50 °C y 30 min (Tabla VII). El peso seco de raíz mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.001$) y en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.0005$) pero no entre tiempos de exposición ($p \geq 0.38$). El peso seco de raíz fue mayor en plántulas de semilla tratada con 50 y 60 °C; las plántulas cuya semilla recibió tratamiento de 40 °C y las que no fueron tratadas (control), disminuyeron en esta variable (Tabla V). En la interacción de los factores, el peso seco de raíz fue superior en plántulas de semilla tratada con 60

°C y 60 min de exposición, con valores inferiores las plántulas cuya semilla fue tratada con 40°C y 60 min y 70 °C con 90 min de exposición (Tabla VII).

Longitud de plántula y raíz. La longitud de la plántula mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.000001$), tiempos de exposición ($p \leq 0.00006$) y entre la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.00002$). Entre temperaturas, esta variable se incrementó significativamente en plántulas cuya semilla fueron tratadas con 60 °C; las plántulas de semilla tratada con 70 °C fueron significativamente menores (Tabla V). La longitud de plántula fue mayor en las plántulas de semilla expuesta a 60 min y menor en plántulas de semilla expuesta a 90 min (Tabla VI). En la interacción de los factores, esta variable fue superior en plántulas de semilla tratada con 60 °C y 60 min de exposición, siendo menor en las plántulas cuya semilla se sometió a 70 °C y 90 min de exposición (Tabla VII). La longitud de raíz presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$), tiempos de exposición ($p \leq 0.024$) y en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.0002$). La longitud de raíz fue significativamente mayor en plántulas de semilla tratada con 60 °C; las plántulas cuya semilla recibió 70 °C presentaron la menor longitud de raíz (Tabla V). Esta variable mostró el valor mayor en plántulas de semilla expuesta a 60 min y disminuyó en las plántulas de semilla expuesta a 90 min (Tabla VI). La interacción de los factores mostró que las plántulas de semilla tratada con 60 °C y 60 min de exposición incrementaron la longitud de raíz con respecto al grupo control, pero las plántulas de semilla sometida a 70 °C y 90 min de exposición, disminuyeron significativamente (Tabla VI) (Fig. 16).

Índice de peso fresco y seco. El índice de peso fresco no presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \geq 0.26$), tiempos de exposición ($p \geq 0.24$), ni en la interacción temperaturas \times tiempos de exposición ($p \geq 0.073$). Sin embargo, esta variable mostró un valor ligeramente superior en plántulas de semillas tratadas con 50 °C (Tabla V). En relación a tiempos de exposición, el índice de

peso fresco fue mayor en plántulas de semilla expuesta a 30 min (Tabla VI). En la interacción de los factores, el índice de peso fresco fue mayor en plántulas sometidas a los tratamientos de 50 °C y 30 min de exposición (Tabla VII). El índice de peso seco no mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \geq 0.16$), ni en tiempos de exposición ($p \geq 0.73$), pero si en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.027$). El índice de peso seco mostró valor superior en plántulas de semillas sometidas a 70 °C y 90 min de exposición (Tabla VII).

Índice de vigor I y II. El índice de vigor I, presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$), tiempos de exposición ($p \leq 0.036$) y entre la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.012$). En el factor temperatura el índice de vigor I, fue significativamente mayor en aquellas plántulas de semilla tratada con 60 °C, con los menores registros para plántulas cuya semilla fue tratada con 70 °C (Tabla V). Entre tiempos de exposición, esta variable fue superior en las plántulas de semilla expuesta durante 60 min y menor en las plántulas de semilla expuesta a 90 min (Tabla VI). La interacción de los factores mostró que el índice de vigor I fue superior en las plántulas de semilla tratada con 60 °C y 60 min y menor significativamente en plántulas de semilla tratada con 70 °C y 90 min (Tabla VII). El índice de vigor II, mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$), pero no en tiempos de exposición ($p \geq 0.27$), ni en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.22$). El índice de vigor II fue mayor en plántulas de semillas que recibieron el tratamiento térmico de 60 °C, reduciendo significativamente en plántulas de semilla tratada con 70 °C (Tabla V). Para el factor tiempos de exposición, esta variable mostró valor ligeramente superior en plántulas de semilla expuesta durante 60 min sin ser estadísticamente significativo (Tabla VI). El índice de vigor II mostró un valor superior numérico en plántulas de semilla tratada con 60 °C y 60 min pero disminuyó significativamente en aquellas plántulas procedentes de semillas que recibieron tratamientos de 70 °C, tanto a 60 como a 90 min de exposición sin llegar a ser estadísticamente significativos (Tabla VII).

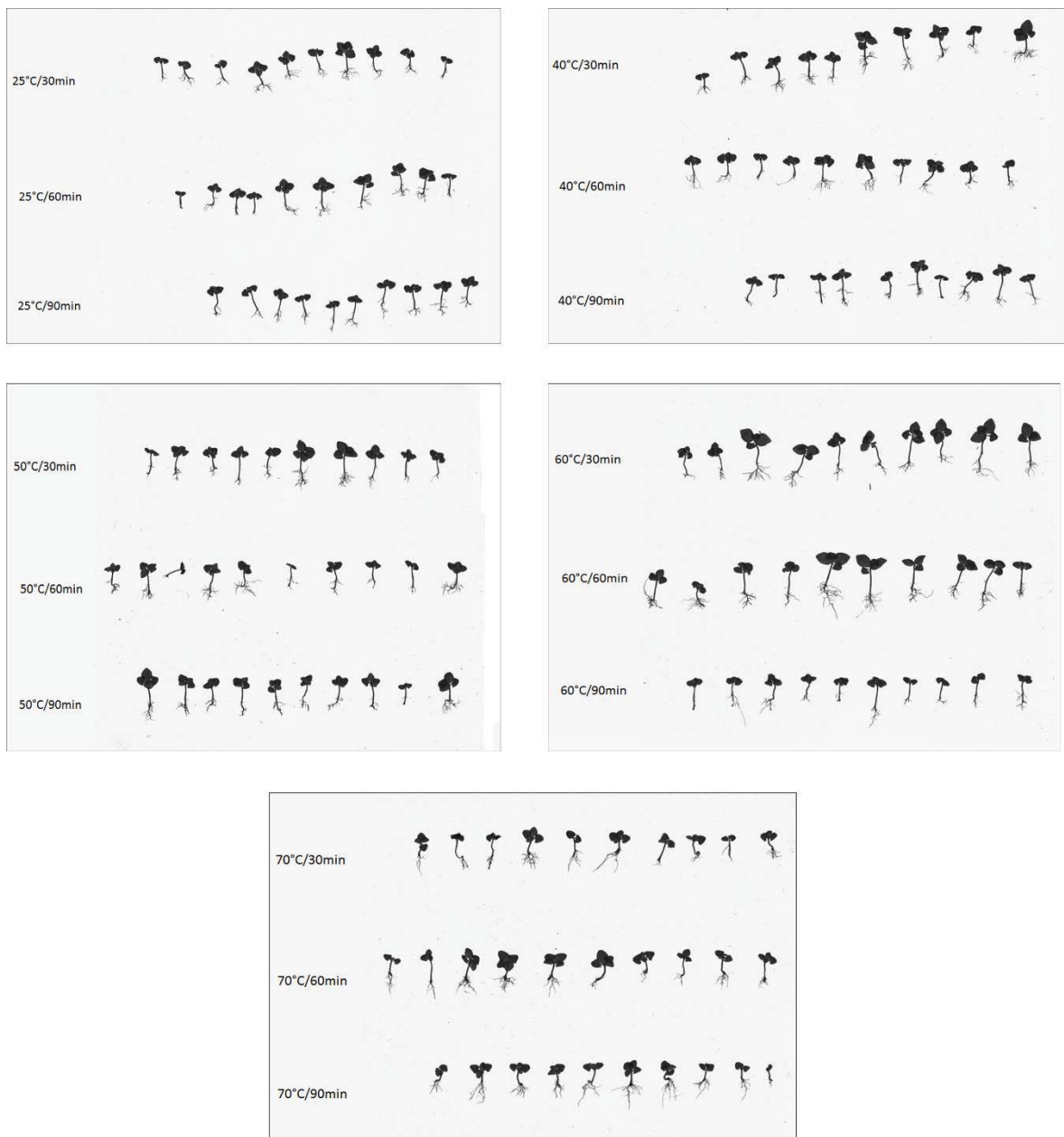


Figura 16. Morfología de semillas emergidas. Longitud de parte aérea y radícula sin tratar (control 25°C) y tratadas a las diferentes temperaturas y tiempos de exposición.

Tabla V. Acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. en la tasa, porcentaje y variables morfométricas de plántulas en la etapa de emergencia.

Temp. (°C)	Emergencia (%)	Tasa de emergencia	Peso fresco de parte aérea (g)	Peso seco de parte aérea (g)	Peso fresco de raíz(g)	Peso seco de raíz (g)	Longitud de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)	Índice de peso fresco	Índice de peso seco	Vigor I	Vigor II
Control	78.16a	7.63b	0.27c	0.020b	0.050b	0.005c	5.334b	1.939c	5.56a	3.62a	419.063b	2.12b
40	66.83a	6.01b	0.27c	0.021b	0.049c	0.005c	4.859c	1.962c	5.54a	4.07a	325.164c	1.81c
50	74.33a	6.79b	0.3b	0.025b	0.049b	0.007a	5.885b	2.062b	6.91a	3.37a	441.57b	2.49b
60	78.66a	9.27a	0.39a	0.028a	0.071a	0.008a	7.376a	2.642a	5.67a	3.46a	576.961a	2.95a
70	18.23b	1.33c	0.29b	0.021b	0.055b	0.006b	4.721c	1.579d	5.46a	5.18a	128.545d	0.72d

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$). Control= 25°C.

Tabla VI. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en la tasa, porcentaje y variables morfométricas de plántulas en la etapa de emergencia.

Tiempo (min)	Emergencia (%)	Tasa de emergencia	Peso fresco de parte aérea (g)	Peso seco de parte aérea (g)	Peso fresco de raíz (g)	Peso seco de raíz (g)	Longitud de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)	Índice de peso fresco	Índice de peso seco	Vigor I	Vigor II
30	63.4a	5.82a	0.32a	0.062a	0.055a	0.006a	5.69b	2.111b	6.39a	3.89a	364.48b	1.95a
60	64.6a	6.46a	0.32a	0.024b	0.059a	0.007a	6.33a	2.099a	5.61a	3.72a	423.06a	2.17a
90	66.0a	6.33a	0.27a	0.021b	0.051a	0.006a	4.88c	1.9c	5.48a	4.20a	347.24c	1.93a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$).

Tabla VII. Interacción del acondicionamiento térmico x tiempos de exposición en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en la tasa, porcentaje y variables morfométricas de plántulas en la etapa de emergencia.

Temp. (°C)	Tiempo (min)	Emergencia (%)	Tasa de emergencia	Peso fresco de parte aérea (g)	Peso seco de parte aérea (g)	Peso fresco de raíz (g)	Peso seco de raíz (g)	Longitud de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)	Índice de peso fresco	Índice de peso seco	Vigor I	Vigor II
Control	30	73.00a	6.94a	0.24a	0.018a	0.053bc	0.005bc	4.46cd	1.70cd	4.58a	3.81ab	326.15cd	1.73a
	60	80.50a	8.47a	0.31a	0.023a	0.052bc	0.007abc	5.69bc	2.01c	6.03a	3.41ab	457.72bc	2.49a
	90	81.00a	7.48a	0.28a	0.020a	0.047bc	0.005bc	5.84bc	2.10bc	6.09a	3.65ab	473.31bc	2.14a
40	30	71.00a	5.76a	0.28a	0.021a	0.047bc	0.005bc	4.97cd	1.98c	6.00a	4.07ab	352.28bcd	1.93a
	60	65.00a	5.96a	0.25a	0.021a	0.041c	0.004c	4.97cd	1.94c	6.00a	4.71ab	323.88cd	1.66a
	90	64.50a	6.31a	0.28a	0.022a	0.061abc	0.006abc	4.62cd	1.96c	4.63a	3.43ab	299.33cde	1.86a
50	30	72.00a	6.63a	0.29a	0.025a	0.037c	0.006abc	5.52bc	2.11bc	9.67a	4.22ab	404.913bc	2.34a
	60	74.50a	7.18a	0.31a	0.025a	0.055bc	0.008abc	6.06bc	1.95c	5.64a	3.07b	454.850bc	2.52a
	90	76.50a	6.57a	0.30a	0.025a	0.055bc	0.009abc	6.06bc	2.12bc	5.43a	2.83b	464.965bc	2.61a
60	30	72.50a	8.31a	0.45a	0.030a	0.076ab	0.007abc	7.86ab	2.75ab	5.99a	4.73ab	574.071ab	2.75a
	60	77.00a	9.39a	0.44a	0.032a	0.091a	0.012a	9.32a	2.94a	4.86a	2.63b	726.09a	3.47a
	90	86.50a	10.13a	0.29a	0.023a	0.047bc	0.007abc	4.94cd	2.23bc	6.18a	3.03b	430.71bc	2.65a
70	30	28.50a	1.48a	0.34a	0.027a	0.063abc	0.010ab	5.62bc	2.00c	5.74a	2.63b	164.99de	1.02a
	60	26.00a	1.34a	0.31a	0.022a	0.056bc	0.005bc	5.61bc	1.65cd	5.55a	4.82ab	152.75de	0.75a
	90	21.50a	1.19a	0.240a	0.016a	0.048bc	0.003c	2.92d	1.08d	5.09a	8.10a	67.88e	0.41a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$). Control=25°C.

7.2.3 Crecimiento vegetativo inicial

7.2.3.1 Variables fisiológicas

Temperatura de la hoja. La temperatura de la hoja mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$), tiempos de exposición ($p \leq 0.00001$) y en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.00001$). Las plantas de semillas no tratadas (control) mostraron el mayor valor en esta variable (Tabla VIII). La temperatura de la hoja fue mayor en plantas obtenidas de semilla sometida a 60 y 90 min de exposición (Tabla IX). La temperatura de la hoja fue superior en las plantas cuya semilla no fue tratada (control) y 30 min de exposición, siendo menor en aquellas plantas de semilla sometida a 70 °C y 30 min (Tabla X).

Concentración de CO₂. La concentración de CO₂ en la cavidad sub-estomática mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$), tiempos de exposición ($p \leq 0.00008$) y en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.00001$). Esta variable fue superior en las plantas cuya semilla fue tratada con 50 y 70 °C y disminuyó en las tratadas con 60 °C (Tabla VIII). Las plantas cuya semilla se expuso durante 30 min, mostraron mayor concentración de CO₂ (Tabla IX). La concentración de CO₂ incrementó en las plantas cuya semilla fue tratada con 70 °C y 30 min de exposición, reduciendo esta concentración en las plantas cuya semilla fue tratada con 40 °C y 90 min de exposición (Tabla X).

Transpiración. La transpiración presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$), tiempos de exposición ($p \leq 0.037$) y en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.00001$). La transpiración fue mayor en las plantas cuya semilla fue tratada con 70 y 50 °C y se redujo en las plantas tratadas con 40 y 60 °C (Tabla VIII). Las plantas cuya semilla se expuso durante 30 min, mostraron mayor transpiración con respecto a las plantas cuya semilla se expuso a 90 min (Tabla IX). Las plantas de semilla tratada con 70 °C y 60 min de exposición

mostraron mayor transpiración, reduciéndose en las plantas de semilla tratada con 40 °C y 90 min de exposición (Tabla X).

Conductividad estomática. La conductividad estomática mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$), tiempos de ($p \leq 0.0001$) y en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.0002$). La conductividad estomática fue mayor en las plantas de semilla tratada con 70 °C, pero se redujo en plantas tratadas con 40 °C y 60 °C (Tabla VIII). Esta variable fue superior en plantas cuya semilla se expuso por 30 min y se redujo conforme se incrementó el tiempo de exposición (Tabla IX). La interacción de 70 °C con 30 y 60 min de exposición, provocó mayor conductividad estomática en las plantas cuya semilla se sometió a estos tratamientos (Tabla X).

Tasa fotosintética. La tasa fotosintética mostró diferencias significativas en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.003$), pero no entre temperaturas ($p \geq 0.09$), ni en tiempos de exposición ($p \geq 0.33$). Las plantas cuyas semillas fueron tratadas con 70 °C mostraron mayor tasa fotosintética y esta se redujo en las plantas de semillas tratadas con 40 °C (Tabla VIII). La tasa fotosintética fue mayor en las plantas de semillas expuestas al tratamiento térmico durante 60 min y se redujo a los 90 min (Tabla IX). La tasa fotosintética mayor la mostraron aquellas plantas cuyas semillas se trataron con 70 °C y 90 min, mientras que las plantas de semillas sometidas a 50 °C y 30 min, redujeron su tasa fotosintética (Tabla X).

Clorofila "a". Esta variable no mostró diferencias significativas en los factores temperatura ($p \geq 0.78$), tiempos de exposición ($p \geq 0.66$) ni en la interacción de temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.055$). Solo se observan en la Tabla VIII valores mayores para el grupo control u otras plantas de semillas tratadas a 60 °C, pero sin diferencia significativa. El análisis del tiempo mostró que la clorofila "a" fue mayor en las plantas de semillas expuestas a 90 min (Tabla IX). La interacción de los factores mostró que las plantas cuyas semillas recibieron pretratamientos térmicos de 40 °C y 90 min y 60 °C y 60 min, mostraron valores superiores de clorofila "a" (Tabla X).

Clorofila “b”. Mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00001$), pero no en tiempos de exposición ($p \geq 0.93$) ni en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.50$). Las plantas de cuya semilla no fue tratada (control) mostraron mayor contenido de clorofila “b” y el valor menor se presentó en las plantas de semillas sometidas a 40 °C (Tabla VIII). Aunque sin diferencias estadísticas se observó que en la interacción de los factores, el contenido de clorofila “b” fue mayor en las plantas de semillas sin tratar (control), mientras que el contenido menor fue en las plantas de semilla tratada con 40 °C y 60 min (Tabla X).

Clorofila total. No presentó diferencias significativas en los factores temperaturas ($p \geq 0.18$), tiempos de exposición ($p \geq 0.81$) ni en la interacción temperaturas \times tiempos de exposición ($p \geq 0.14$) (Tabla VIII, IX, X).

Tabla VIII. Acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en variables fisiológicas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.

Temp. (°C)	Temperatura de la hoja (°C)	Concentración de CO ₂ en la cavidad sub-estomática (μmol mol ⁻¹)	Transpiración (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Conductividad estomática (mol m ⁻² s ⁻¹)	Tasa fotosintética (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Clorofila a (μg cm ⁻²)	Clorofila b (μg cm ⁻²)	Clorofila total (μg cm ⁻²)
Control	34.20a	269.50b	4.30a	0.16c	8.2a	17.251a	5.41a	22.67a
40	33.50d	253.10c	3.50b	0.13e	7.8a	16.431a	4.04c	20.47a
50	33.80c	289.20a	4.30a	0.19b	8.0a	16.830a	4.81b	21.65a
60	33.90b	168.90d	3.70b	0.14d	8.4a	17.268a	4.76b	21.89a
70	33.30e	289.60a	4.40a	0.24a	9.0a	16.790a	4.66b	21.45a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, p=0.05). Control= 25°C.

Tabla IX. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en las variables fisiológicas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.

Tiempo (min)	Temperatura de la hoja (°C)	Concentración de CO ₂ en la cavidad sub-estomática (μmol mol ⁻¹)	Transpiración (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Conductividad estomática (mol m ⁻² s ⁻¹)	Tasa fotosintética (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Clorofila a (μg cm ⁻²)	Clorofila b (μg cm ⁻²)	Clorofila total (μg cm ⁻²)
30	33.0b	278.74a	4.14a	0.19a	8.34a	16.63a	4.75a	21.38a
60	34.0a	268.00b	4.12b	0.17b	8.54a	17.00a	4.76a	21.68a
90	34.0a	262.12c	3.88c	0.15c	8.04a	17.10a	4.70a	21.81a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, p=0.05).

Tabla X. Interacción del acondicionamiento térmico x tiempos de exposición en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en variables fisiológicas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.

Temp. (°C)	Tiempo (min)	Temp. de la hoja (°C)	Conc. de CO ₂ en la cavidad subestomatica (µmol mol ⁻¹)	Transp. (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Cond. estomática (mol m ⁻² s ⁻¹)	Tasa fotosintética (µmol m ⁻² s ⁻¹)	Clorofila a (µg cm ⁻²)	Clorofila b (µg cm ⁻²)	Clorofila total (µg cm ⁻²)
Control	30	34.7a	262.00defg	4.40abc	0.16bc	8.8abc	17.96a	5.31a	23.27a
	60	34.0abcd	268.80cdef	4.30abcd	0.16bc	8.3abc	16.79a	5.33a	22.13a
	90	34.0cdef	277.80bcd	4.30abcd	0.17bc	7.7abc	16.99a	5.60a	22.60a
40	30	33.0h	270.80cdef	4.20abcd	0.19bc	8.7abc	14.66a	4.07a	18.73a
	60	33.0gh	253.60defg	3.50de	0.13cd	8.1abc	16.00a	3.82a	19.83a
	90	34.7ab	235.00g	2.80e	0.09d	6.6bc	18.61a	4.23a	22.85a
50	30	33.6fgh	302.20ab	4.00bcd	0.18bc	6.4c	16.63a	4.85a	21.49a
	60	34.0cde	277.80bcd	4.30abcd	0.20b	8.9abc	16.42a	4.75a	21.17a
	90	34.0def	275.60bcde	4.60ab	0.19bc	8.7abc	17.42a	4.85a	22.28a
60	30	34cdef	245.00fg	4.00bcd	0.15bcd	9.4ab	16.79a	4.65a	21.45a
	60	34.0cd	248.80efg	3.60cde	0.132cd	8.2abc	18.61a	4.99a	23.19a
	90	33.7efg	258.00defg	3.50cde	0.138cd	7.7abc	16.38a	4.65a	21.04a
70	30	32.0i	313.70a	4.10abcd	0.27a	8.4abc	17.09a	4.88a	21.98a
	60	34.0bcd	291.00abc	4.90a	0.26a	9.2ab	17.16a	4.92a	22.09a
	90	34.0abc	264.20def	4.20abcd	0.19bc	9.5a	16.10a	4.17a	20.27a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, p=0.05).

7.2.3.2 Variables morfométricas

Peso fresco y seco de parte aérea. El peso fresco de parte aérea presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.001$), tiempos de exposición ($p \leq 0.007$) y la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.0003$). El peso fresco de parte aérea fue mayor en las plantas de semilla tratada con 70 °C y disminuyó en las plantas de semilla tratada con 40 °C y grupo control (Tabla XI). Las plantas cuya semilla se expuso a 30 min, mostraron valores superiores en el peso fresco de parte aérea (Tabla XII). La interacción mostró que los valores más bajos del peso fresco de la parte aérea correspondieron a las plantas del tratamiento de 40 °C a 60 y 90 min de exposición, estadísticamente con valores similares a las plantas del grupo control. El peso fresco de parte aérea fue mayor en plantas de semilla tratada con 40 °C y 30 min de exposición, seguido de 60 °C y 90 min (Tabla XIII). El peso seco de parte aérea mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.0002$), tiempos de exposición ($p \leq 0.0002$) y la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.00001$). El valor superior de peso seco de parte aérea se presentó en las plantas de semilla tratada con 50 °C y 70 °C (Tabla XI). Las plantas de semilla expuesta a 30 min incrementaron el peso seco de parte aérea (Tabla XII). En la interacción de los factores, las plantas de semilla tratada con 50 °C y 30 min de exposición, incrementaron el peso seco de parte aérea, mientras que las plantas de semilla tratada con 40 °C y 90 min de exposición, disminuyeron los valores en esta variable (Tabla XIII).

El área foliar mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.000001$), tiempos de exposición ($p \leq 0.002$) y la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.000001$). Las plantas cuya semilla se expuso a 70 °C mostraron mayor área foliar, mientras que plantas procedentes de semilla tratada con 40 °C, redujeron el área foliar (Tabla XI). Para tiempos de exposición, las plantas de semilla expuesta a 30 min incrementaron el área foliar (Tabla XII). La interacción de los factores mostró que el área foliar se incrementó en las plantas de semilla tratada con 40 °C

y 30 min, 60 °C y 90 min y 70 °C y 30 min, mientras que las plantas procedentes de semilla sometida a 40 °C y 90 min de exposición, mostraron área foliar menor (Tabla XIII).

Peso fresco y seco de área foliar. Peso fresco de área foliar mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00003$), tiempos de exposición ($p \leq 0.001$) y la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.000001$). Las plantas cuya semilla se sometió a 50 °C incrementaron el peso fresco de área foliar, seguido de las plantas de semilla tratada con 70 °C (Tabla XI). Las plantas de semilla expuesta durante 30 min a los tratamientos térmicos, mostraron peso fresco de área foliar superior con respecto al resto de los tiempos de exposición (Tabla XII). En la interacción de los factores, las plantas procedentes de semillas tratadas con 60 °C, 40 °C, 70 °C y 50 °C, todas con 30 min, presentaron peso fresco de área foliar mayor (Tabla XIII). El peso seco de área foliar presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.001$), tiempos de exposición ($p \leq 0.003$) y la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.000001$). Para temperaturas, las plantas de semilla tratada con 50 °C incrementaron el peso seco de área foliar, mientras que lo contrario mostraron las plantas cuya semilla fue tratada con 40 °C (Tabla XI). El tiempo de exposición fue determinante para incrementar el peso seco de área foliar en las plantas de semilla tratada por 30 min (Tabla XII). La interacción de los factores mostró que el peso seco de área foliar incrementó en plantas de semilla tratada con 40 °C y 30 min, 60 °C y 90 min, mientras que lo contrario lo sucedió en las plantas cuya semilla se sometió a 40 °C y 90 min (Tabla XIII).

Peso fresco y seco de raíz. Peso fresco de raíz presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.000001$), pero no en tiempos de exposición ($p \geq 0.27$) ni en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.62$). La temperatura a la cual se sometió la semilla y que propició un incremento en el peso fresco de raíz de las plantas fue 60 °C, seguido de 40 °C (Tabla XI). El peso seco de raíz reveló diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.000001$) pero no tiempos de

exposición ($p \geq 0.10$) ni en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.18$). Las plantas de semilla tratada con 60 °C estimularon un incremento en el peso seco de raíz mientras que las procedentes del grupo control mostraron lo contrario (Tabla XI).

Longitud de parte aérea y de raíz. Longitud de parte aérea presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.007$), tiempos de exposición ($p \leq 0.043$) y la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.004$). Esta variable mostró valores mayores en las plantas cuya semilla recibió tratamiento térmico de 70 °C y menores en aquellas que recibieron tratamiento de 40 °C (Tabla XI). La longitud de parte aérea expresó valor mayor en plantas de semilla expuesta a 30 min (Tabla XII). En la interacción de los factores, la longitud de parte aérea fue mayor en plantas de semilla tratada con 40 °C y 30 min, seguido de 70 °C y 90 min (Tabla XIII). La longitud de raíz exhibió diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.000001$) y la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.002$) pero no en tiempos de exposición ($p \geq 0.25$). Para temperaturas, las plantas cuyo origen de la semilla fue tratada con 60 °C presentaron longitud de raíz mayor, mientras que las tratadas con 40 °C, mostraron lo contrario (Tabla XI). En la interacción temperaturas \times tiempos, las plantas de semilla tratada con 60 °C y 90 min, mostraron longitud de raíz mayor, mientras que las plantas de semilla tratada con 40 °C y 90 min mostraron lo contrario (Tabla XIII).

Índice de peso fresco y seco. Índice de peso fresco presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.001$) pero no entre tiempos de exposición ($p \geq 0.75$) ni en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.04$). El índice de peso fresco se incrementó en las plantas de semillas tratadas con 50 °C, mientras que disminuyó en plantas cuya semilla se sometió a 40 °C (Tabla XI). El índice de peso seco exhibió diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.03$) pero no entre tiempos de exposición ($p \geq 0.56$) ni en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq$

0.36). El índice de peso seco fue mayor en las plantas de semillas tratadas con 70 °C y 25 °C (control) (Tabla XI).

Tabla XI. Acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en variables morfométricas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.

Temp. (°C)	Peso fresco parte aérea (g)	Área foliar (cm ²)	Peso fresco área foliar (g)	Peso seco área foliar (g)	Peso fresco raíz (g)	Peso seco raíz (g)	Longitud parte aérea (cm)	Longitud raíz (cm)	Índice de peso fresco	Índice de peso seco
Control	3.53d	335.50d	9.14d	1.19c	8.90c	0.63d	21.93d	14.11d	0.39c	0.79a
40	3.40e	307.17e	8.37e	1.06d	9.77b	1.08c	22.46c	15.53c	0.33e	0.41b
50	4.34b	411.49b	10.96a	1.41a	6.68d	1.33b	25.10b	18.00b	0.70a	0.47b
60	4.02c	369.11c	9.95c	1.33b	12.06a	1.43a	24.63b	20.00a	0.34d	0.42b
70	4.55a	427.57a	10.87b	1.35a	9.51c	1.07c	25.80a	18.80b	0.47b	0.80a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$). Control= 25°C.

Tabla XII. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en variables morfométricas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.

Tiempo (min)	Peso fresco parte aérea (g)	Área foliar (cm ²)	Peso fresco área foliar (g)	Peso seco área foliar (g)	Peso fresco raíz (g)	Peso seco raíz (g)	Longitud parte aérea (cm)	Longitud raíz (cm)	Índice de peso fresco	Índice de peso seco
30	4.37a	397.199a	10.486a	1.407a	10.014a	1.232a	24.93a	17.98a	0.45a	0.56a
60	3.57c	337.384c	8.964c	1.170c	9.014a	1.0232a	22.94c	16.66a	0.44a	0.52a
90	3.97b	375.933b	10.138b	1.24b	9.141a	1.084a	24.08b	17.23a	0.45a	0.65a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$).

Tabla XIII. Interacción del acondicionamiento térmico × tiempos de exposición en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en variables morfológicas de plantas en la etapa de crecimiento vegetativo inicial.

Temp. (°C)	Tiempo(min)	Peso fresco parte aérea (g)	Peso seco parte aérea (g)	Área foliar (cm ²)	Peso fresco área foliar (g)	Peso seco área foliar (g)	Peso fresco raíz (g)	Peso seco raíz (g)	Longitud parte aérea (cm)	Longitud de raíz (cm)	Índice de peso fresco	Índice de peso seco
Control	30	3.03cdef	0.38cde	282.200cde	7.35cde	0.93cd	7.77a	0.47a	20.26bc	13.90cd	0.40a	0.82a
	60	3.60abcdef	0.51abcde	343.800abcde	9.82abcd	1.30abc	8.99a	0.61a	22.04abc	13.70cd	0.40a	0.83a
	90	3.96abcdef	0.59abcd	380.505abcd	10.27abc	1.36abc	9.96a	0.81a	23.50abc	14.75bcd	0.39a	0.73a
40	30	5.11 a	0.72ab	448.166a	12.04a	1.68a	12.83a	1.43a	26.90 a	20.40ab	0.40a	0.51a
	60	2.85 def	0.34de	245.484de	6.69de	0.85cd	9.11a	0.93a	21.50abc	13.60cd	0.31a	0.38a
	90	2.24 f	0.28e	227.874e	6.39e	0.64d	7.39a	0.90a	19.00c	12.60d	0.30a	0.35a
50	30	4.76 abc	0.74a	435.13ab	11.68a	1.58ab	7.88a	1.57a	25.30ab	17.00abcd	0.65a	0.49a
	60	4.04abcdef	0.56abcd	399.68abc	10.62abc	1.36abc	5.45a	1.06a	23.90abc	19.20abc	0.78a	0.53a
	90	4.24abcde	0.55abcd	399.68abc	10.57abc	1.30abc	6.70a	1.36a	26.10ab	17.80abcd	0.68a	0.41a
60	30	4.16abcde	0.62abc	350.81abcde	9.60abcde	1.29abc	11.96a	1.46a	26.20ab	19.20abc	0.35a	0.44a
	60	3.09 cdef	0.46bcde	306.47bcde	8.11cde	1.05bcd	12.18a	1.41a	22.50abc	18.60abcd	0.25a	0.33a
	90	4.81ab	0.68ab	450.05a	12.15a	1.66a	12.05a	1.42a	25.20ab	22.20a	0.42a	0.51a
70	30	4.79abc	0.70ab	469.68a	11.74a	1.54ab	9.61a	1.21a	26.00ab	19.40abc	0.48a	0.58a
	60	4.28 abcde	0.56abcd	391.48abc	9.56abcde	1.28abc	9.32a	1.09a	24.80abc	18.20abcd	0.46a	0.53a
	90	4.60 abcd	0.58abcd	421.54ab	11.30ab	1.24abc	9.59a	0.91a	26.60a	18.80abcd	0.49a	1.29a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$). Control= 25°C.

7.3 Efecto de las temperaturas en el contenido total de carbohidratos, lípidos y proteínas de semillas de albahaca

7.3.1 Carbohidratos

El contenido total de carbohidratos no presentó diferencias significativas entre días de evaluación ($p \geq 0.116$), tiempos de exposición ($p \geq 0.379$), la interacción días x tiempo ($p \geq 0.0.791$), así como tampoco en la interacción temperatura x tiempos ($p \geq 0.193$), ni en la interacción día x temperatura x tiempos de exposición ($p \geq 0.211$). Sin embargo, si se presentaron diferencias significativas en el factor temperatura ($p \leq 0.007$) y la interacción día x temperatura ($p \leq 0.010$). En la temperatura, el contenido de carbohidratos mostró un incremento mayor en el tratamiento a 50 °C, seguido de la temperatura a 60 °C y 40 °C. Sin embargo, no fue así para el tratamiento control, el cual el presentó el menor contenido de este compuesto (Tabla XVI). En el caso de la interacción día x temperaturas, el contenido de carbohidratos mostró un incremento desde el primer día en todos los tratamientos de calor, excepto el control. En el tratamiento a 70 °C, se incrementó considerablemente la producción de carbohidratos, presentando éste, el mayor valor seguido del tratamiento a 40 °C, 50 °C y 60 °C. Para el segundo día de evaluación, se observó que la producción de carbohidratos siguió incrementándose mayormente en el tratamiento a 50 °C, seguido de la temperatura a 60 °C y en el tratamiento control, aunque en este ultimo la producción fue mínima comparado con los anteriores. En el caso del tratamiento a 40 °C, éste ya no incrementó la concentración por lo tanto se mantuvo similar al primer día, mientras que en el caso del tratamiento a 70 °C, su concentración disminuyó considerablemente. De manera general se pudo apreciar que durante el segundo día de evaluación, los tratamientos presentaron concentraciones similares entre sí, excepto la temperatura de 50 °C (Tabla XVII).

7.3.2 Lípidos

Para esta variable no se presentaron diferencias significativas en el factor día ($p \geq 0.07$), tiempos de exposición ($p \geq 0.294$) y la interacción día x tiempo ($p \geq 0.073$),

pero si en el factor temperatura ($p \leq 0.0001$), la interacción día x temperatura ($p \leq 0.001$), en la interacción temperatura x tiempo ($p \leq 0.004$) y en la interacción día x temperatura x tiempo ($p \leq 0.002$). En el caso del factor temperatura, el tratamiento de 70 °C y 50 °C mostraron el mayor contenido en esta variable, seguido del tratamiento de 40 °C. Mientras que en el caso de la temperatura a 60 °C y el control el contenido de lípidos fue menor (Tabla XVI). Durante la interacción de día x temperatura, se observó desde el primer día de evaluación que en los tratamientos de 70 °C y 50 °C el contenido fue mayor, sin embargo, éste disminuyó considerablemente al segundo día de evaluación. En el caso del tratamiento de 60 °C, se presentó el contenido más bajo de lípidos en el primer día, respecto a estos tratamientos y el grupo control, pero este aumento al segundo día de evaluación, mientras que los otros disminuyeron (Tabla XVII). En la interacción triple, día x temperatura x tiempo, el contenido de lípidos más alto lo presentó el tratamiento de 40 °C a 60 minutos de exposición durante el segundo día de evaluación, seguido de los tratamientos de 50 °C y 70 °C a 90 minutos de exposición en el primer día de evaluación. Mientras que los tratamientos que presentaron el menor contenido fueron la temperatura a 50 °C a 90 minutos de exposición y la temperatura de 60 °C durante el segundo día y primer día de evaluación respectivamente (Tabla XIV). De manera general las respuestas de este tipo de interacción varó entre los tratamientos en los diferentes días en que se determinó en contenido de lípidos en las semillas, donde se puede observar que en algunos casos el valor de esta variable se incrementa de forma considerable respecto a los otros tratamientos, pero el segundo día de evaluación este valor disminuye abruptamente.

Tabla XIV. Respuesta de la interacción de los factores temperaturas × tiempos en el contenido total de lípidos (mg/g) en dos diferentes tiempos de medición (días).

Temperaturas (°C)	Tiempo (minutos)	Día*	
		1	2
Control	-	160.53cdefg	156.58defg
40	30	147.75fg	192.53abcde
40	60	159.92cdefg	204.34a
40	90	150.96fg	146.30fg
50	30	177.95abcdef	161.08cdefg
50	60	194.70abcd	133.73g
50	90	202.03ab	153.54efg
60	30	152.50efg	156.92defg
60	60	145.84fg	166.11abcdefg
60	90	138.11fg	173.25abcdefg
70	30	177.63abcdef	161.71bcdefg
70	60	192.44abcde	171.28abcdefg
70	90	198.86abc	156.24defg

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey, $p=0.05$).

7.3.3 Proteínas

Para el contenido de proteínas solo se presentaron diferencias significativas entre días de evaluación ($p \leq 0.000$), la interacción días x temperatura ($p \leq 0.019$) y día x temperatura x tiempo ($p \leq 0.044$). No se mostraron diferencias para el factor temperatura ($p \geq 0.102$), tiempos de exposición ($p \geq 0.950$), la interacción día x tiempo ($p \geq 0.881$) y la interacción temperatura x tiempo ($p \geq 0.252$). Para el factor días de evaluación se observó que el contenido de proteínas fue mayor en el día 1, pero disminuyó al día 2. En la interacción días x temperatura, el tratamiento a 50 °C mostró el mayor valor desde el primer día, mientras que el tratamiento control fue el que presentó el menor contenido de este compuesto tanto en el día 1 como el día 2 de la evaluación. El resto de los tratamientos fueron iguales estadísticamente. En la interacción días x temperatura x tiempo de exposición el tratamiento que mostro el contenido mayor de proteínas fue la temperatura de 50 °C a 30 y 60 minutos de exposición en el primer día de evaluación. Mientras que los tratamientos que presentaron el menor valor en esta variable fueron el tratamiento de 50 °C a 60 minutos en el día 2, seguido de la temperatura de 70 °C a 90 minutos, 40°C a 30 min y el grupo control (Tabla XV).

Tabla XV. Respuesta de la interacción de los factores temperaturas × tiempos en el contenido de proteínas (mg/g) en dos diferentes tiempos de medición (días).

Temperaturas (°C)	Tiempo (minutos)	Día	
		1	2
Control	-	418.00abc	348.41bc
40	30	348.11bc	338.92bc
40	60	390.63abc	367.33 abc
40	90	432.14abc	373.68 abc
50	30	449.72ab	380.33 abc
50	60	477.75a	325.24c
50	90	408.27abc	407.89 abc
60	30	413.92abc	380.27 abc
60	60	376.94abc	387.27 abc
60	90	386.64abc	382.72 abc
70	30	396.02abc	397.73 abc
70	60	378.00abc	390.63 abc
70	90	390.56abc	342.59bc

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey, $p=0.05$).

Tabla XVI. Relación de la temperatura en semillas de *O. basilicum* L. sobre el contenido de Carbohidratos, Lípidos y Proteínas.

Temperaturas	Carbohidratos (mg/g)	Lípidos (mg/g)	Proteínas (mg/g)
Control	117.27c	158.55b	383.20a
40°C	121.73b	166.97ab	375.14a
50°C	125.27a	170.50a	408.20a
60°C	123.07b	155.46b	387.96a
70°C	125.05a	176.36a	382.59a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$).

Tabla XVII. Interacción del acondicionamiento térmico × días de evaluación en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en el contenido de Carbohidratos, Lípidos y Proteínas.

Temperatura	Día 1			Día 2		
	Carbohidratos (mg/g)	Lípidos (mg/g)	Proteínas (mg/g)	Carbohidratos (mg/g)	Lípidos (mg/g)	Proteínas (mg/g)
Control	114.63b	160.53cd	418.00ab	119.91ab	156.58cd	348.41c
40°C	121.74ab	152.87cd	390.30abc	121.71ab	181.06ab	359.98c
50°C	120.76ab	191.54a	445.25a	129.78a	149.45cd	371.15bc
60°C	12.55ab	145.48d	392.50abc	125.60a	165.43bc	383.42bc
70°C	128.75a	189.64a	388.20abc	121.35ab	163.08bcd	376.98bc

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey, $p=0.05$).

7.4 Efecto del acondicionamiento térmico en el vigor de la planta y la resistencia al mildiu veloso.

El efecto del tratamiento de calor a 70 °C en todos los experimentos evaluados, afectó negativamente el desarrollo de las plantas, por lo que éste se descartó para ser evaluado en la resistencia al mildiu veloso.

7.4.1 Análisis fisiológicos en plantas infectadas con *Peronospora*

Temperatura de la hoja. La temperatura de la hoja mostró diferencias significativas entre el factor temperatura ($p \leq 0.000064$), pero no en el factor tiempos de exposición ($p \geq 0.399$) ni en la interacción temperaturas × tiempos ($p \geq 1.177$). Las plantas del tratamiento a 60 °C mostraron el mayor valor en esta variable (Tabla XVIII), mientras que el grupo control y los tratamientos donde la semilla se sometió a 40 y 50 °C presentaron el menor valor en esta evaluación.

Concentración de CO₂. La concentración de CO₂ en la cavidad sub-estomática mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.005$), tiempos de exposición ($p \leq 0.0003$) y en la interacción temperaturas × tiempos ($p \leq 0.0002$). En el factor temperatura, el tratamiento a 60 °C mostró la mayor concentración de CO₂, seguido del tratamiento a 50 °C, mientras que el tratamiento a 40 °C y el

control, presentaron el menor valor en esta variable. Para el caso de los tiempos de exposición, el tratamiento a 90 y 60 minutos fueron mayores (Tabla XVIII y XIX). En la interacción de los factores temperaturas x tiempo, el tratamiento a 60 °C por 60 minutos de exposición fue el que presentó el mayor valor, respecto a los demás tratamientos.

Transpiración. La transpiración presentó diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.0001$) y en tiempos de exposición ($p \leq 0.038$), pero no en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.554$). Esta variable fue mayor en las plantas control y fue menor en las plantas tratadas con 50 y 60 °C (Tabla XVIII). Las plantas cuya semilla se expuso durante 30 min, mostraron mayor transpiración con respecto a las plantas cuya semilla se expuso a 90 min (Tabla XIX).

Conductividad estomática. En esta variable se mostraron diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.0007$), tiempos de exposición ($p \leq 0.043$), pero no en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.79$). La conductividad estomática fue mayor en las plantas del grupo control, pero se redujo en el tratamiento a 60 °C (Tabla XVIII). Esta variable fue superior en plantas cuya semilla se expuso por 30 min y se redujo conforme se incrementó el tiempo de exposición (Tabla XIX).

Tasa fotosintética. La tasa fotosintética mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.00000$) y tiempos de exposición ($p \leq 0.00001$), pero no en la interacción temperaturas \times tiempo ($p \geq 0.066$). Las plantas del grupo control mostraron mayor tasa fotosintética y esta se redujo en las plantas de semillas tratadas (Tabla XVIII). Las semillas expuestas al tratamiento térmico durante 30 min incrementaron esta variable a diferencia del resto de los tratamientos donde se redujo a los 90 min ($1.94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Tabla XIX).

Clorofila. La clorofila “a”, no mostró diferencias significativas en los factores temperatura ($p \geq 0.2787$), tiempos de exposición ($p \geq 0.07921$) ni en la interacción de temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.0700$). Así como tampoco en la clorofila “b” se mostraron diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.31153$), tiempos de exposición ($p \geq 0.12471$) ni en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \geq 0.79468$), ni en la clorofila total en los factores temperaturas ($p \geq 0.30042$), tiempos de exposición ($p \geq 0.8711$) ni en la interacción temperaturas \times tiempos de exposición ($p \geq 0.72313$) (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en variables fisiológicas de plantas infectadas por *P. belbahrii*.

Temp. (°C)	Temperatura de la hoja (°C)	Concentración de CO ₂ en la cavidad subestomatosa (μmol mol ⁻¹)	Transpiración (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Conductividad estomatosa (mol m ⁻² s ⁻¹)	Tasa fotosintética (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Clorofila a (μg cm ⁻²)	Clorofila b (μg cm ⁻²)	Clorofila total (μg cm ⁻²)
Control	30.27c	316.13b	3.16a	0.155a	5.17 ^a	22.45a	6.66a	29.11a
40	30.43bc	321.17b	2.66ab	0.130ab	3.57b	25.47a	7.66a	33.14a
50	30.56ab	333.20ab	2.56b	0.120ab	2.87b	23.22a	7.30a	30.52a
60	30.78a	356.13a	2.13b	0.094b	2.6b	22.33a	7.01a	29.35a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, p=0.05). Control= 25°C.

Tabla XIX. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en las variables fisiológicas de plantas *P. belbahrii*.

Tiempo (min)	Temperatura de la hoja (°C)	Concentración de CO ₂ en la cavidad subestomatosa (μmol mol ⁻¹)	Transpiración (mmol m ⁻² s ⁻¹)	Conductividad estomatosa (mol m ⁻² s ⁻¹)	Tasa fotosintética (μmol m ⁻² s ⁻¹)	Clorofila a (μg cm ⁻²)	Clorofila b (μg cm ⁻²)	Clorofila total (μg cm ⁻²)
30	30.5	308.6b	2.89a	0.13a	4.97a	24.3 ^a	7.4a	31.8a
60	30.5	341.3a	2.64ab	0.13ab	3.79b	21.2 ^a	6.6a	28.4a
90	30.4	345.5a	2.35b	0.10b	1.94c	23.9 ^a	7.3a	31.3a

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, p=0.05).

7.4.2 Análisis morfométricos en plantas infectadas con mildiu veloso

Peso fresco y seco de parte aérea. El peso fresco de la parte aérea no presentó diferencias significativas en el factor temperatura ($p \geq 0.34$), pero si en los tiempos de exposición ($p \leq 0.0001$) y en la interacción temperaturas x tiempo ($p \leq 0.03$). El peso seco de parte aérea no mostró diferencias significativas entre temperaturas ($p \geq 0.058$), pero si en tiempos de exposición ($p \leq 0.001$) y la interacción temperaturas x tiempos ($p \leq 0.010$). Las plantas de semilla expuesta a 30 y 60 min incrementaron el peso seco de parte aérea significativamente a diferencia del tratamiento a 90 min (Tabla XX). Durante la interacción de los factores, las plantas del grupo control, seguido del tratamiento a 60 °C a 60 min de exposición incrementaron el peso seco de parte aérea, mientras que las plantas de semilla tratada a 60 y 40 °C a 90 min y 50 °C a 60 min de exposición, disminuyeron los valores en esta variable (Tabla XXI).

Peso fresco y seco de raíz. El peso fresco de raíz presentó diferencias significativas en el factor temperatura ($p \leq 0.0004$) y en los tiempos de exposición ($p \leq 0.0001$), pero no en la interacción temperaturas x tiempo ($p \geq 0.07$). El peso seco de raíz reveló diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.010$) y tiempos de exposición ($p \leq 0.001$), pero no en la interacción temperaturas x tiempos ($p \geq 0.249$). Las plantas control (1.01g) y aquellas derivadas de semilla tratada a 60 °C (0.95g) estimularon un incremento en el peso seco de raíz mientras que las procedentes de semilla de 40 y 50 °C mostraron lo contrario (ambas con 0.86g). Las plantas de semillas expuestas a 30 y 60 min incrementaron el peso seco de raíz (0.48 y 0.50g) (Tabla XX).

Longitud de parte aérea y de raíz. Longitud de parte aérea no se presentaron diferencias significativas entre temperaturas ($p \geq 0.573$), pero si en los tiempos de exposición ($p \leq 0.001$) y la interacción temperaturas x tiempos ($p \leq 0.001$). En el tiempo de exposición se expresó significativamente un valor mayor en plantas de semilla expuesta a 30 y 60 min (Tabla XX). En la interacción de los factores, la

longitud de parte aérea fue mayor en plantas del tratamiento control, seguido del tratamiento a 60 °C a 60 min y en menor grado el tratamiento a 40 °C y 90 min (Tabla XXI). La longitud de raíz no exhibió diferencias significativas entre temperaturas ($p \geq 0.075$), pero si en la interacción temperaturas \times tiempos ($p \leq 0.003$) y en tiempos de exposición ($p \leq 0.00013$). Para temperaturas, las plantas cuyo origen de la semilla fue tratada con 60 °C y el control presentaron longitud de raíz mayor, mientras que las tratadas con 40 °C, mostraron lo contrario. En los tiempos de exposición, la longitud de raíz fue mayor en plantas de semilla expuesta a 30 y 60 min (Tabla XX). En la interacción, las plantas de semilla del grupo control y las tratadas con 60 °C a 60 min mostraron longitud de raíz mayor, mientras que las plantas de semilla tratada con 40 °C y 90 min mostraron lo contrario (Tabla XXI).

Tabla XX. Tiempos de exposición al acondicionamiento térmico en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en variables morfométricas de plantas *P. belbahrii*.

Tiempo(min)	Peso seco parte aérea (g)**	Peso seco raíz (g)**	Peso fresco parte aérea (g)**	Peso fresco raíz (g)**	Longitud parte aérea (cm)**	Longitud raíz (cm)**
30	0.74a	0.48a	10a	5.4a	21.8a	24.1a
60	0.72a	0.50a	10a	6.1a	22.3a	24.4a
90	0.30b	0.19b	4.3b	2.3b	13.6b	14.9b

*Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$).**Tabla XXI.** Interacción del acondicionamiento térmico \times tiempos de exposición en semillas de *O. basilicum* L. y su efecto en variables morfométricas de plantas *P. belbahrii*.

Temp. (°C)	Tiempo(min)	Peso seco parte aérea (g)**	Peso seco raíz (g)	Peso fresco parte aérea (g)**	Peso fresco raíz (g)	Longitud la aérea (cm)**	Longitud de parte raíz (cm)**
Control		1.08a	0.57ns	13.15a	6.7ns	27.5a	27.4a
	30	0.74ab	0.22ns	10.1ab	4.8ns	22.9abc	23ab
40	60	0.70ab	0.91ns	8.6ab	3.7ns	19.1abcd	26ab
	90	0.25b	0.77ns	3.9b	1.3ns	11.6de	8.2c
	30	0.47ab	0.86ns	7.6ab	3.0ns	17.10bcde	20.2abc
50	60	0.34ab	0.84ns	5.4b	2.9ns	17.6bcd	18.4abc
	90	0.49ab	0.86ns	5.8b	3.2ns	20.6abc	21.2ab
	30	0.68ab	0.98ns	9.69ab	5.8ns	20.4abcd	25ab
60	60	0.76ab	1.06ns	13a	8.2ns	25.4ab	26.6a
	90	0.27b	0.83ns	4.45b	2.1ns	14cde	13.8bc

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $p=0.05$). Control= 25°C.

7.4.3 Incidencia de *Peronospora* en plantas de albahaca

En la variable de incidencia se presentaron diferencias significativas entre temperaturas ($p \leq 0.03$), pero no en los tiempos de exposición ($p \geq 0.20$), ni en la interacción de temperatura x tiempo ($p \geq 0.50$). En la temperatura, se observó que el tratamiento a 60 °C mostró el menor porcentaje de incidencia (84 %) con respecto a los tratamientos de 40 °C (91%), 50°C (93%) y el grupo control (100 %). En los tiempos de exposición, los tratamientos fueron iguales estadísticamente, sin embargo, el tiempo de 60 minutos presentó un menor porcentaje de incidencia de la enfermedad (86 %), más no así para el tiempo de 30 min donde se observó el mayor valor (96 %). En la interacción de los factores, aunque no se presentaron diferencias significativas, se observó que numéricamente los tratamientos de 50 y 60 °C a 60 min de exposición presentaron el menor porcentaje de incidencia (80 %), mientras que el resto de los tratamientos mostraron el mayor valor en esta variable (Fig. 17 y 20).

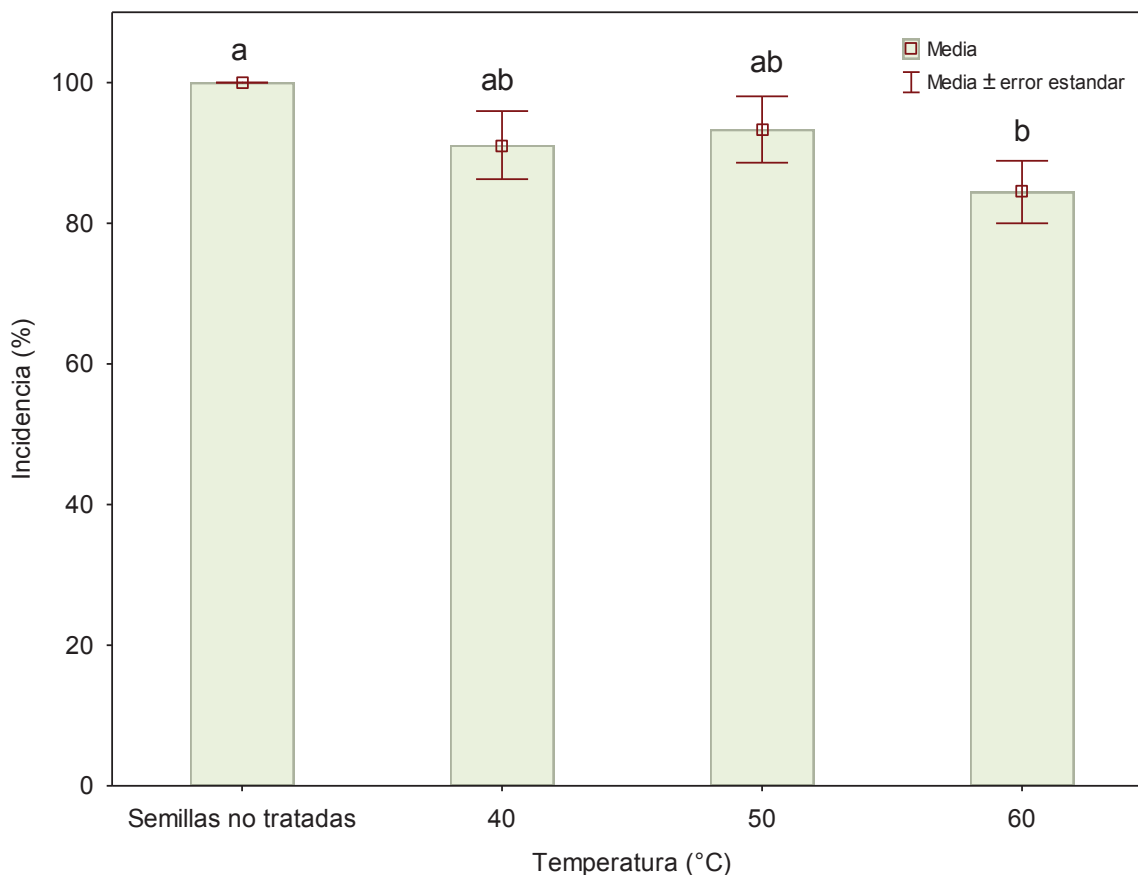


Figura 17. Porcentaje de incidencia de *P. belbahrii* en plantas de albahaca derivadas de semillas sometidas a tratamiento térmico con temperaturas de 40, 50 y 60 °C, así como semillas sin tratar (control). Literales diferentes refieren diferencias estadísticas (Tukey $p \leq 0.05$). Las barras verticales indican el error estándar de la media.

7.4.4 Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)

Se observó que después de 15 días de que las plantas se expusieron a la infección natural de *P. belbahrii*, el grupo control presentó los primeros síntomas de amarillamiento y esporulación, al mostrar un 5 % de incidencia, principalmente en las hojas superiores cercanas al meristemo apical de la planta. Dicho progreso de la infección continuó de forma ascendente a través de los días principalmente en el tratamiento control y en el de la temperatura a 40 °C. El tratamiento a 60 °C en los tiempos de 30, 60 y 90 min de exposición mostró el menor porcentaje de incidencia en cada evaluación realizada. Los tratamientos de 40 °C a 90 min y

50 °C a 60 min le siguieron en orden de menor porcentaje de incidencia de la enfermedad (Fig. 18).

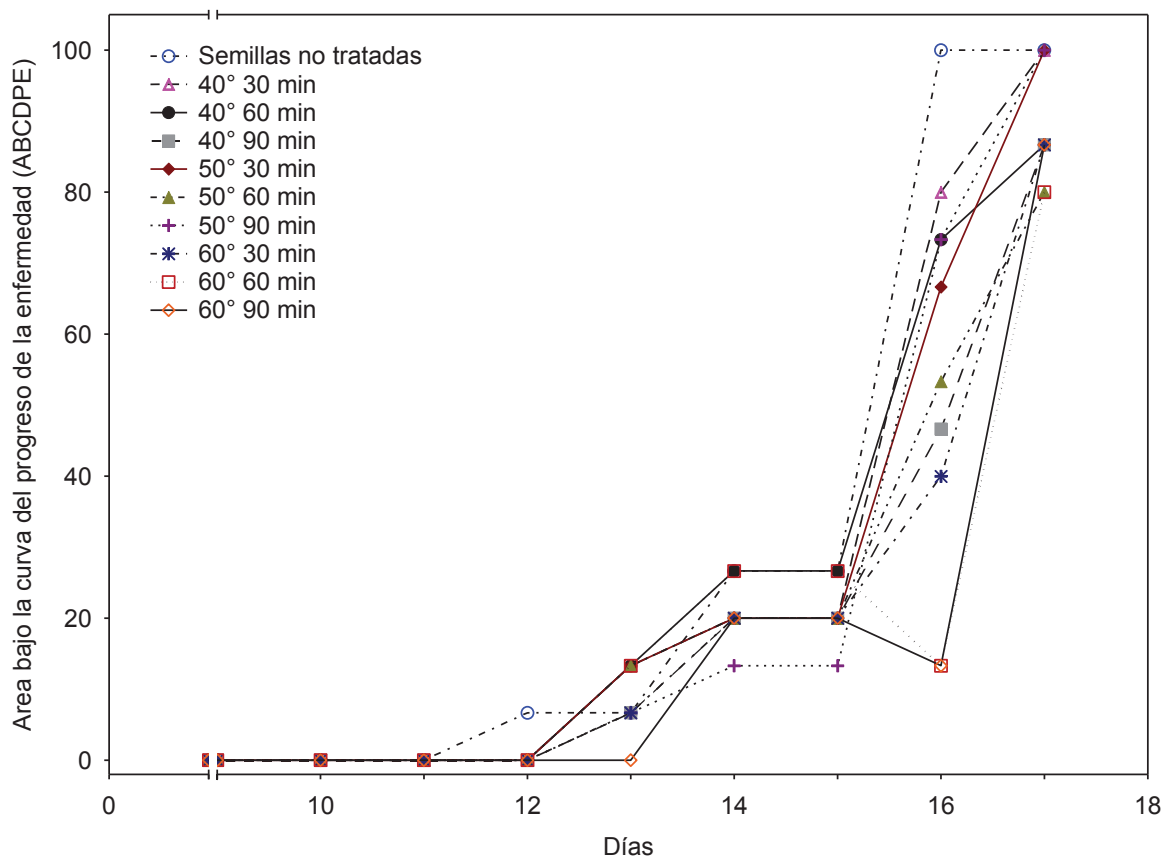


Figura 18.- ABCPE en plantas de albahaca infectadas naturalmente con *Peronospora belbahrii* y bajo tratamientos de acondicionamiento térmico con temperaturas de 40, 50 y 60 °C y tiempos de exposición a 30, 60 y 90 minutos, así como semillas sin tratar (control).

7.4.5 Sobrevivencia del patógeno

Se presentaron diferencias significativas en el factor de temperatura ($p \leq 0.000014$), no en la interacción de temperaturas x tiempo ($p \geq 0.1751$) ni en el factor tiempo ($p \geq 0.7809$). Al término del experimento, el tratamiento a 60 °C mostró el menor porcentaje de hojas con esporulación (13 %), mientras que el tratamiento a 40 °C (28 %) fue mayor esta variable seguido del tratamiento control (22 %). Para los tiempos de exposición los datos fueron iguales estadísticamente presentando en orden descendente al tiempo de exposición de 30, 60 y 90 min

(20, 20 y 21 % respectivamente). Para la interacción temperatura x tiempo el tratamiento a 60°C con 60 min de exposición mostró el menor porcentaje de hojas con esporulación (11 %), mientras que el tratamiento a 40 °C a 30 y 60 min de exposición se presentó los porcentajes más altos en esta variable (30 %), comparado con el grupo control (22 %) (Fig. 19).

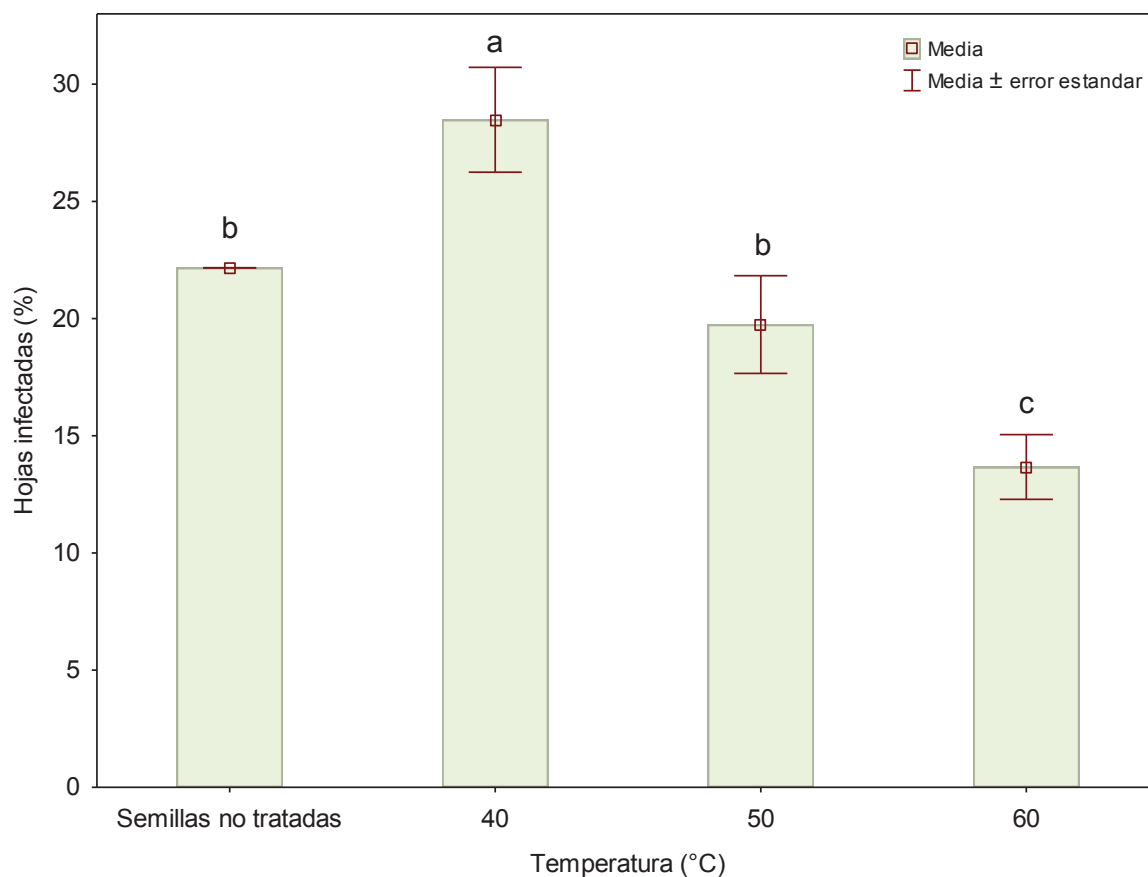


Figura 19. Diferencias en el porcentaje de hojas infectadas por *P. belbahrii* en plantas de albahaca. Semillas sometidas al acondicionamiento térmico con temperaturas de 40, 50 y 60 °C durante 30, 60 y 90 minutos de exposición, así como de semillas sin tratar (control). Literales diferentes refieren diferencias estadísticas (Tukey $p \leq 0.05$). Las barras verticales indican el error o desviación estándar de la media.

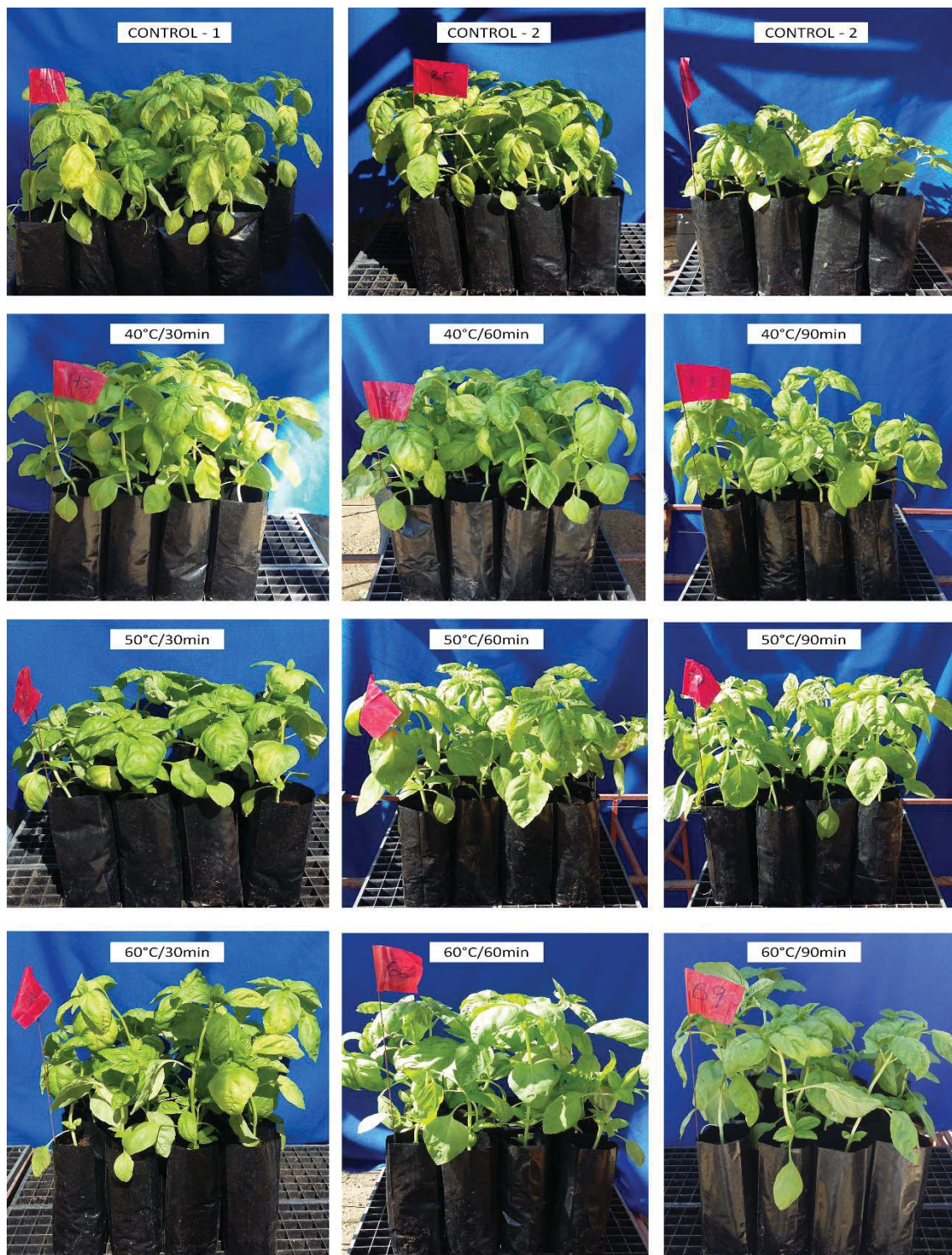


Figura 20. Tratamientos con presencia de síntomas típicos de *P. belbahrii* en las plantas de albahaca. Relación del vigor de planta con la resistencia a la enfermedad del mildiu vellosa.

8 DISCUSIÓN

8.1 Identificación de la especie de *Peronospora* presente en áreas agrícolas de Baja California Sur.

Las pruebas realizadas mediante PCR de las regiones ITS del ADN ribosomal (ADNr) demostraron que el agente causal del mildiu en zonas productoras de albahaca, en sitios muestreados en Baja California Sur, corresponde a *P. belbahrii*, un hongo de importancia mundial, debido a que puede llegar a causar el 100% de pérdidas en la producción. *P. belbahrii* se ha reportado en diferentes países a través del mundo. Sin embargo, este es el primer reporte sobre la presencia de *P. belbahrii* en México. Esta información es relevante a nivel nacional, debido a que una vez, conocido de manera precisa el agente causal de la enfermedad del mildiu veloso, se deberán establecer estrategias de sanidad y regulación de la importación de semilla proveniente de países, donde este problema sea recurrente. Actualmente la sintomatología causada por este patógeno indica que lo más probable es que se encuentre en todo el Estado, provocando pérdidas cuantiosas para los productores, los cuales han llegado a disminuir la superficie de siembra del cultivo de albahaca, debido a que, a pesar del alto valor económico que presenta el producto, ya no consideran redituable su producción y han optado por otro tipo de cultivos.

8.2 Determinación del efecto de la exposición de semillas de albahaca a diferentes gradientes de temperatura y tiempos de exposición en el vigor de plántulas en las etapas germinación, emergencia y la fase vegetativa inicial, así como la respuesta morfo-fisiológica de la semilla

8.2.1 Germinación y emergencia

Los efectos del acondicionamiento térmico de las semillas fueron evidentes en la inhibición de la germinación en semillas tratadas a 70 °C. Los resultados de éste trabajo coinciden con lo encontrado por Iloh *et al.* (2014), quienes evaluaron el efecto de diferentes gradientes de temperatura (40, 42, 45 y 50 °C) en la germinación y emergencia de semillas de cereales, observando una disminución en el porcentaje de germinación conforme los rangos de temperatura

incrementaron. Asimismo, Wahid *et al.* (2007) mencionan que las temperaturas altas provocan la desnaturalización de proteínas, el incremento de la fluidez de la membrana y la inactivación de enzimas claves en el proceso de la germinación. Otro efecto asociado a la inhibición de la germinación se debe a la inducción alterada del ácido ascórbico, donde se ha demostrado que una sobreproducción de este compuesto induce muerte celular en los tejidos (Essemine *et al.*, 2010). El 50 % de las plántulas germinadas a 70 °C, lograron un desarrollo como plántula presentando los valores menores de vigor I y II, siendo consistentes con los resultados de Iloh *et al.* (2014), Kumar *et al.* (2004) y Piramila *et al.* (2012) en *Phaseolus aureus*.

Respecto a los resultados obtenidos en el experimento de emergencia, Bruce *et al.* (2007) mencionan que en algunos casos, los efectos del acondicionamiento de la semilla ocurren después de la germinación, es decir, son más visibles en estados de crecimiento avanzados, como la emergencia y/o el desarrollo vegetativo, lo que se observó en este trabajo. Los resultados obtenidos en este estudio donde la temperatura a 60 °C por 30, 60 y 90 min de exposición fue el mejor tratamiento para las variables de porcentaje de emergencia y caracteres morfométricos obtenidos, son consistentes con los realizados por Gashaw y Michelsen (2002) quienes reportan resultados similares a temperaturas de 60 y 90 °C con tiempos de exposición de 1 a 5 min, en 5 de 15 especies de bosques y pastizales de sabana. La variación en los resultados encontrados en este estudio en el porcentaje de germinación y emergencia, desarrollo de plántulas y vigor, cuyas semillas fueron pre-acondicionadas con tratamientos térmicos en diferentes tiempos, es consistente con los resultados de investigaciones que explican que las variaciones son debidas en un alto grado a las especies y variedades estudiadas que responden de forma diferente (Gashaw y Michelsen 2002; Zinn *et al.*, 2010; Melander y Kristensen, 2011). A diferencia de la albahaca donde se encontró que a partir de la temperatura de 40 °C se observaron cambios en el crecimiento de la planta, donde la temperatura de 60 °C independientemente del tiempo de

exposición, estimuló mayormente el desarrollo de la misma, se registran especies como *Corchorus olitorius* cuya germinación, emergencia y vigor en tres variedades se inició a una temperatura de 80 °C, mientras que el rango óptimo de temperatura fue de 120 °C por un tiempo de exposición de 5 minutos (Denton *et al.*, 2013). Este tipo de respuestas diferenciales demuestran que existen diferentes mecanismos de acuerdo a la fisiología que las plantas poseen para poder contrarrestar el efecto de agentes externos y continuar con un desarrollo pleno. En el caso del cultivo de la albahaca, se pudo determinar que las temperaturas altas como el caso de 60 °C, impactó de manera positiva en la estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal, ambos consideradas características esenciales en el vigor de la planta para llevar a cabo un óptimo establecimiento dentro de ambientes estresantes tanto biótico como abiótico.

8.2.2 Etapa vegetativa

Las diferencias encontradas en el desarrollo de los órganos de las plantas originadas, de las semillas que se sometieron a una combinación de tratamientos de temperatura y tiempos de exposición, permitieron determinar los mejores tratamientos para la estimulación del crecimiento, como lo fue el caso del tratamiento de 60 °C, el cual fue consistente su efecto, tanto en el factor temperatura como en la interacción entre la temperatura y tiempo de exposición. Curiosamente el tratamiento de 70 °C, en esta etapa de evaluación de la planta, mostró resultados similares a la temperatura de 60 °C, donde se observó que estimuló el crecimiento vegetal. Dentro de las posibles razones de esta estimulación se ha reportado la activación de procesos metabólicos que provocan la división y el crecimiento celular debido a procesos termodinámicos (Parent *et al.*, 2010). Sin embargo, el desarrollo vegetativo es influido por la respuesta fisiológica de la planta debido a las condiciones ambientales en donde se desarrolla. En este trabajo fue evidente que los tratamientos de pre-acondicionamiento térmico determinan las estrategias fisiológicas de las plantas, relacionadas con los mecanismos de la fotosíntesis que siguieron durante esta etapa de desarrollo como respuesta a su ambiente. Lo anterior se demuestra en la

diferencia que presentaron los tratamientos en la relación entre el cierre estomático, la disminución de la transpiración, la tasa fotosintética y la concentración de carbono en la cavidad sub-estomática de los tratamientos de 60 y 70 °C, donde la primera temperatura presentó una disminución en la acción de la mayoría de estas características, mientras que la segunda temperatura provocó un incremento de éstas. Esta relación se ha estudiado y permite una adaptación de las plantas al incremento en las temperaturas ambientales y de la hoja, reduciendo la pérdida de agua de la planta para que lleve a cabo su metabolismo (Tardieu *et al.*, 2011). El crecimiento mayor, la producción mayor de peso fresco y seco de las plantas en tratamientos de pre-acondicionamiento térmico de la semilla, comparadas con las semillas no tratadas mostraron un efecto positivo. Lo anterior se logró mediante diferentes estrategias fisiológicas presentadas por las plantas como respuesta a los tratamientos de la semilla. Las plantas obtenidas de semillas tratadas con temperaturas de 40 °C y 60 °C disminuyeron su conductividad estomática seguida de una disminución en la transpiración, lo cual se ha estudiado como una respuesta a altas temperaturas y déficit hídrico que se presentan tanto de forma diurna, como estacional o como un estrés abiótico en zonas áridas (Kirschbaum, 2004; Ruelland y Zachowski, 2010). La pérdida de agua disminuye con el cierre estomático, la planta conserva durante más tiempo el agua en su interior permitiendo llevar a cabo los procesos metabólicos, en algunos de los casos el costo de esta estrategia fisiológica es la disminución en la entrada de CO₂ asociada a una tasa fotosintética baja (Yamori *et al.*, 2012; Kirschbaum, 2004). A diferencia de lo anterior, en este estudio la tasa fotosintética se mantuvo en los tratamientos de 40 °C y 60 °C pese al cierre estomático. Lo anterior se ha observado como una estrategia de adaptación haciendo más eficiente la respuesta de la planta en sus procesos metabólicos específicamente en los procesos de carboxilación, la regulación y niveles de la expresión enzimática (Sassenrathcole *et al.*, 1994). En plantas de semillas tratadas con 60 °C y 90 min fue más evidente esta estrategia ya que las plantas procedentes de esta semilla, presentaron cierre estomático mayor conservando la tasa fotosintética. Otra de las estrategias

fisiológicas observadas la presentaron plantas cuya semilla se pre-acondicionó con 50 °C, a diferencia de los tratamientos mencionados arriba, donde la producción de biomasa vegetal mayor de sus órganos, principalmente el aumento de tallo y hojas con respecto al control parece asociarse a la concentración de carbono-sub-estomático (Ci), más que a la tasa fotosintética. Las plantas en estos tratamientos no presentaron diferencias en las variables fisiológicas con respecto al grupo control, excepto en la concentración de carbono sub-estomático. Similar a la eficiencia que se relaciona con la tasa fotosintética, una mayor concentración de Ci conlleva a una mayor concentración de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa–oxygenasa (RuBisCO) (la primera enzima dentro del ciclo Calvin), la cual incrementa la fijación del carbono inorgánico en orgánico dentro de los cloroplastos en el tejido del mesófilo de la hoja (Raines *et al.*, 1999; West *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2014). Consecuentemente la producción de biomasa fue mayor con respecto al grupo control. Por el contrario, la temperatura de 70 °C a los 30 y 60 min de exposición, presentó una apertura mayor de estomas, ocasionando un efecto superior en la transpiración, tasa fotosintética y contenido de carbono sub-estomático. En principio, esto favoreció una producción mayor de biomasa foliar y de tallo a menor tiempo de exposición (30 y 60 min). Sin embargo, con un mayor tiempo de exposición (90 min) esta tendencia se revirtió. Los primeros efectos asociados al daño de las altas temperaturas observados en plantas es una disminución en el flujo de carbono en el estroma del cloroplasto y en la membrana del tilacoide (Wise *et al.*, 2004), así como la modificación del flujo a nivel molecular, que ocasiona un funcionamiento negativo de los compuestos involucrados en la fotosíntesis, tales como la inhibición de RuBisCO (Medlyn *et al.*, 2002) o en la producción de enzimas clave para regular el sistema de la planta durante los cambios de temperatura ambiental (Berry y Borman, 1980). Uno de los factores relevantes como parámetro de calidad y vigor en las plantas aromáticas es el color de las hojas (Gazula *et al.*, 2005). En el caso de la albahaca, es determinante en su comercialización a nivel mundial, por lo que es importante que los tipos de pigmentos a y b que forman parte de la clorofila total de los vegetales

que proporcionan las diferentes tonalidades de verdes, se encuentren estables para su óptimo funcionamiento. En los resultados del experimento, se observó una ligera tendencia a disminuir en el contenido de clorofila b en los diferentes gradientes de temperatura con respecto al control, respuesta contraria a lo que propone Erge *et al.* (2008), quienes mencionan que la clorofila b es más estable al calor que la clorofila a. El presente estudio coincide con lo determinado por Gazula *et al.* (2005) que mencionan que la temperatura modula las concentraciones de estos dos tipos de pigmentos.

8.2.3 Efecto de las temperaturas en el contenido total de carbohidratos, lípidos y proteínas.

Los carbohidratos, lípidos y proteínas, son las principales fuentes de almacenamiento de la semilla. Estos se encuentran generalmente distribuidos en el endospermo, embrión y cotiledones (Bewley y Black, 1994). Durante el experimento, la respuesta sobre la concentración de estos tres tipos de compuestos mostró un incremento en sus contenidos durante el primer día, con excepción del tratamiento testigo. Sin embargo, este contenido disminuyó al segundo día de evaluación. Estudios recientes han mostrado que la concentración de azúcares tales como la sacarosa, glucosa y fructosa presenta un papel esencial en el metabolismo de la planta. Estos sirven como sustrato para la respiración, ya que pueden proveer fuentes de carbono para la producción de una amplia variedad de metabolitos, incluyendo aminoácidos, lípidos, proteínas, y carbohidratos más complejos como celulosa, almidón, clorofila, carotenoides y fitohormonas (Silva *et al.*, 2011). Recientemente se les ha atribuido a los azúcares el papel de moléculas de señalización, las cuales pueden interactuar con diferentes fitohormonas y causar alteraciones a nivel celular (Mishra *et al.*, 2009).

En el caso de los lípidos, se observó un incremento inicial considerable en los rangos de calor correspondiente a 50 °C y 70 °C, donde se presentó una producción elevada de este compuesto durante los diferentes tiempos de exposición, sin embargo, este disminuyó drásticamente en ambos al día siguiente.

Los tratamientos de 40 °C y 60 °C expresaron menor contenido de lípidos, pero éste se mantuvo en el segundo día de evaluación. Lo que lleva a considerar que en estos dos últimos tratamientos, se desarrolló un nivel de respuesta potencializada para optimizar un equilibrio en el uso de los lípidos, los cuales juegan un papel importante como fuente de energía en el desarrollo de tejidos vegetales, así como en la integridad de la membrana (Iloh *et al.*, 2014). La variabilidad obtenida en el contenido de los lípidos y carbohidratos en el presente estudio de todos los tratamientos de calor, son similares con los presentados por Ghanbari *et al.* (2013), quienes evaluaron el efecto del acondicionamiento de la semilla de albahaca sobre sus características morfológicas y fisiológicas en estrés salino y determinaron que la disminución en los caracteres de largo de tallo, raíz, peso fresco y seco se relaciona con el contenido de carbohidratos y lípidos. Suda y Giorgini (2000) demostraron que cuando se somete una semilla a temperaturas de 30 °C, en luz u oscuridad, suceden cambios bioquímicos en el endospermo, donde inicia la degradación de lípidos inmediatamente después de la imbibición, por lo tanto se lleva a cabo una rápida disminución de reservas de aceite dentro de un tiempo de 72 a 96 h.

Los resultados obtenidos en la producción de proteínas, mostraron que el contenido de éstas, se incrementó al primer día pero posteriormente disminuyó al día dos. El tratamiento de 50 °C, destacó entre los rangos de temperatura que estimularon la producción de este tipo de sustancias, similar a los lípidos. Sin embargo, en el caso del tratamiento de 60 °C se mantuvo dicha concentración en ambos días. Generalmente, las semillas contienen diferentes tipos de proteínas que presentan distintas funciones y la sobreproducción de éstas es activada a nivel celular para protegerse mediante la acción de un factor estresante. Investigaciones han revelado que las proteínas a nivel celular en las semillas son clasificadas de acuerdo a su solubilidad dentro de albuminas (solubles en agua), globulinas (solubles en solución salina), prolaminas (solubles en alcohol) y glutelinas (solubles en ácidos) (Osborne, 1924). Su función y degradación en los

tejidos de almacenamiento de la semilla durante la germinación ocurre en sitios específicos tales como la región micropilar antes de que ocurra la emergencia (Días *et al.*, 1993). Otra respuesta en la disminución del contenido de proteínas en las semillas, es que éstas se degradan a aminoácidos, los cuales se transforman en otra fuente de azúcar en el endospermo. Este proceso es conocido como gluconeogénesis y fue comprobado en la germinación de semillas de frijol (Stewart y Beevers, 1967). Este mecanismo explica en parte la respuesta de la variabilidad en el contenido de proteínas y el aumento en el contenido de carbohidratos en semillas de albahaca sometidas a tratamientos de temperatura como método de acondicionamiento durante dos días de evaluación en relación al grupo control. Además, dicho mecanismo podría estar asociado a lo observado en los tratamientos de acondicionamiento térmico que presentaron mayor porcentaje de emergencia como fue el caso de la temperatura de 60 °C, el cual probablemente estimuló de manera significativa la producción de proteínas y su posterior degradación a aminoácidos ayudó a la activación incrementada de hormonas relacionadas a la división y alargamiento celular, tales como auxinas y citocininas.

8.3 Vigor de las plantas de albahaca procedentes de semillas tratadas con diferentes gradientes de temperatura y tiempos de exposición ante el mildiu veloso (*Peronospora* spp.)

8.3.1 Incidencia de *P. belbahrii* en plantas de albahaca infectadas naturalmente.

La inducción de resistencia en plantas hospederas susceptibles a amplio espectro de patógenos, está emergiendo rápidamente como una alternativa potencial al uso de plaguicidas químicos (Sharma *et al.*, 2002). El acondicionamiento de semillas mediante diferentes fuentes, parece ser una técnica útil, ya que además de estimular el vigor de la planta también induce la resistencia en ella (Chen *et al.*, 2000; Niranjana *et al.*, 2004; Chandrashekhara *et al.*, 2010). En general, el acondicionamiento de la semilla presenta muchas ventajas con respecto a otros métodos y se ha reportado que mitiga el estrés fisiológico y patológico. Esta técnica promueve la movilización, activación y la mejora e incremento de varias

respuestas celulares de defensa, resultando en la inducción de resistencia (Niranjan *et al.*, 2004). En este estudio, el acondicionamiento térmico de semillas de albahaca mediante la exposición a diferentes gradientes de calor seco, y tiempos de exposición, produjo resultados deseables tanto en la estimulación del vigor de la planta como la inducción de resistencia al mildiu vellosa. Sin embargo, la respuesta entre los tratamientos de calor varió considerablemente. La efectividad del acondicionamiento térmico fue evidente en la longitud de raíz, tallo, así como en la biomasa seca del tratamiento de 60 °C principalmente.

Dentro de las características fisiológicas, en la evaluación del factor temperatura, solo existieron diferencias significativas en las variables de temperatura de la hoja, Concentración de CO₂, transpiración, conductividad estomática y tasa fotosintética, excepto en el contenido de clorofila. Pero durante la interacción temperatura x tiempo solo la variable de Concentración de CO₂ fue diferente significativamente al resto de los tratamientos. En dichos resultados se observó que el tratamiento de 60 °C a 60 minutos de exposición fue el único diferente al resto de los tratamientos, el cual presentó una reducción significativa en la mayoría de las variables evaluadas. Se ha establecido que la temperatura es uno de los principales factores que afectan la tasa fotosintética de la planta y que si ésta disminuye, se reducen también los procesos relacionados al metabolismo vegetal lo que se refleja en la alteración de la morfología de la planta (Maroufi *et al.*, 2011).

En el caso del tratamiento a 60 °C y 60 minutos de exposición, aunque se redujo la acción de varios mecanismos fisiológicos relacionados a la fotosíntesis, se observó que durante la interacción temperaturas x tiempo, éste fue el que provocó el mejor incremento en el peso fresco y seco de raíz y parte aérea, así como el aumento en la longitud de estas dos variables. El incremento en el crecimiento de la planta, se debió probablemente a la promoción de un mejor desarrollo de raíz, el cual se ha establecido que eficiencia la absorción de agua y nutrientes en comparación con aquellas plantas con pobre sistema radicular (Conrath *et al.*,

2002). En la incidencia, porcentaje de hojas infectadas y la curva del progreso de la enfermedad del mildiu veloso, se observó que el tratamiento a 60 °C presentó un mayor porcentaje de reducción en esta variable (16%) con respecto a los tratamientos de 40 °C (9 %), 50 °C (7 %) y el grupo control (0 %). Probablemente durante el acondicionamiento de la semilla se estimularon procesos bioquímicos como la sobreproducción de azúcares y proteínas (Pal *et al.*, 2015), dentro de los cuales, algunos están relacionados a ser precursores de compuestos con acción de señalización para contrarrestar factores causantes de estrés como la infección de patógenos (Sing *et al.*, 2008), y de esta manera regular de forma efectiva su sistema fisiológico sin sufrir daño alguno en su metabolismo (Worral *et al.*, 2012).

8.3.2 Variables morfométricas

El efecto de la promoción de crecimiento vegetal y la inducción de resistencia mostrados en este estudio, son consistentes con los realizados por Niranjan *et al.* (2004), Sharathchandra *et al.*, (2004) y Chandrashekhara *et al.* (2010), los cuales acondicionaron la semilla de *Pennisetum glaucum* mediante tratamientos a base de extractos acuosos de *Viscum álbum*, *Chitosan* y *Pseudomonas fluorescens* y observaron un incremento significativo en el crecimiento de las plantas y también en la inducción de la resistencia contra el mildiu veloso (*Sclerospora graminícola*). Sus resultados mostraron que este tipo de acondicionamiento fue eficaz en la reducción de la incidencia de la enfermedad, al proporcionar un porcentaje de protección del 62 %. Además se incrementó la calidad de los parámetros morfológicos de las plantas, tales como la germinación y el vigor de la plántula, mediante el aumento de la longitud de la raíz y la parte aérea. En los resultados obtenidos del presente experimento, se observó que el acondicionamiento térmico disminuyó las variables de incidencia y estimuló el desarrollo vegetativo de las plantas, principalmente en el tratamiento de 60 °C. Por otra parte, Gilardi *et al.* (2013), comprobaron la efectividad de diferentes tipos de inductores de resistencia a base de microorganismos benéficos y extractos de plantas, comparados con fungicidas sintéticos para el manejo de *P. belbahrii* en albahaca. Donde también determinaron la biomasa de la planta como peso fresco a menudo reflejada como

el grado de incidencia de la enfermedad. En nuestro experimento se observó que de la misma forma el daño de *P. belbahrii*, se relacionó con el contenido de biomasa vegetal, al determinar el porcentaje de hojas infectadas y la proporción de peso fresco en la incidencia de la enfermedad. En el caso de la resistencia a las enfermedades en plantas, se ha determinado que éste fenómeno está asociado con la activación de una amplia variedad de respuestas de defensa que sirven para prevenir la infección del patógeno. Estos mecanismos incluyen barreras físicas y químicas preexistentes, las cuales se activan después de la infección de un patógeno (Shivakumar *et al.*, 2003). La respuesta de resistencia a *P. belbahrii*, probablemente se debió a que el acondicionamiento de calor provocó en la planta una respuesta potencializada de defensa mediante una explosión oxidativa temprana, la incorporación de varios compuestos fenólicos y polímeros para la pared celular, así como la secreción de fitoalexinas (Conrath *et al.*, 2002). Dichos procesos se pueden relacionar con el incremento de biomasa de las plantas derivadas de semillas tratadas mediante acondicionamiento térmico, la cual a su vez está determinada por la producción de diferentes tipos de moléculas, tales como proteínas, hormonas, azúcares relacionados a la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectina). Así mismo, se ha determinado que las altas concentraciones de CO₂ tienen un efecto significativo en la incidencia y severidad del mildiu vellosa ya que este favorece el crecimiento del patógeno al incrementar el suministro de azúcares y reducir el estrés por agua, el cual puede incrementar la esporulación fúngica (Mahatma *et al.*, 2009; Gilardi *et al.*, 2015). Los resultados de nuestro experimento mostraron lo contrario, ya que el tratamiento de 60 °C, provocó una mayor producción de CO₂ en la cavidad sub-estomática, sin embargo, la incidencia de la enfermedad fue menor en las plantas. Esta respuesta se debió tal vez que el cierre de estomas en este tipo de tratamientos, fue mayor lo que evitó la penetración del patógeno al interior de la planta.

En el caso del tratamiento a 60 °C, aunque no existieron diferencias significativas en esta variable con el resto de los tratamientos, se pudo observar que éste

presentó numéricamente el mayor valor respecto a la concentración de CO₂, lo que podría estar relacionado con la respuesta de menor incidencia y % de esporulación en las hojas de albahaca. En la longitud y biomasa de la planta, se observó que éste tratamiento mejoró dichas características. Pal *et al.* (2015), mencionan que el acondicionamiento de la semilla asegura la protección de la planta contra enfermedades sin comprometer su crecimiento y desarrollo normal, debido a una sobre expresión de proteínas relacionadas al metabolismo de la glucosa. Así mismo, esta respuesta coincide con lo señalado por Van *et al.* (2006), quienes mencionan que el acondicionamiento de la planta optimiza el crecimiento de la misma, sin que éste sea afectado por la activación directa de la defensa de la planta, la cual está asociada con el crecimiento reducido de la misma, debido a un costo ecológico que ésta tiene que sufrir.

9 CONCLUSIONES

Basado en los síntomas del hospedero, características morfológicas y datos moleculares, el patógeno fue identificado como *P. belbahrii* para los dos sitios de muestreo realizados en campos agrícolas del estado de Baja California Sur.

Durante la germinación, emergencia y etapa vegetativa el tratamiento de 70 °C, presentó una influencia negativa al inhibir el desarrollo de la planta y consecuentemente un bajo vigor. Numéricamente el tratamiento de 60 °C a 60 min de exposición mostró un mayor vigor mostrando una respuesta diferencial en las variables morfométricas tales como peso fresco y seco de parte aérea y raíz, longitud de plántula y raíz, así como en el índice de vigor I y II. En emergencia el tratamiento de 60 °C y el grupo control, presentaron el mayor índice porcentaje y tasa de emergencia, peso fresco y seco de parte aérea y raíz, longitud de plántula y raíz e índice de vigor I y II.

En etapa de crecimiento vegetativo inicial, los tratamientos de 50 y 70 °C mostraron el mayor valor respecto a temperatura de la hoja, concentración de CO₂, transpiración, conductividad estomática y tasa fotosintética. Mientras que el tratamiento de 60 °C presentó el menor índice en estas variables.

La concentración de carbohidratos, lípidos y proteínas, no varió significativamente entre temperaturas y tiempos de exposición, pero si respecto a los días de evaluación 1 y 2, donde se observó que esta variable disminuyó al segundo día de la exposición al calor.

Durante las evaluaciones fisiológicas de plantas infectadas naturalmente con mildiu veloso, se pudo destacar al tratamiento de 60 °C, mostrando el menor valor en la temperatura de la hoja, concentración de CO₂, transpiración, conductividad estomática y tasa fotosintética. Este mismo tratamiento presentó el mayor valor

respecto a peso fresco y seco de parte aérea y raíz y longitud de planta y raíz del resto de los tratamientos y grupo control.

En la incidencia de la enfermedad, se determinó que el tratamiento de 60 °C a 60 min de exposición, presentó el menor porcentaje de incidencia del mildiu veloso en las plantas evaluadas.

Dentro del porcentaje de hojas con esporulación de *P. belbahrii*, donde se determinó la sobrevivencia del patógeno, las plantas del tratamiento de 60 °C presentaron el menor índice en esta variable. El acondicionamiento térmico en semillas de albahaca incrementó significativamente el vigor de las plantas estimulando el desarrollo vegetativo y procesos fisiológicos que ayudaron a optimizar la inducción de resistencia al mildiu veloso, haciendo de este el primer reporte sobre la relación del vigor de la planta respecto a la disminución de la infección del hongo *P. belbahrii*.

La técnica de acondicionamiento de la semilla a base de calor es efectiva en el manejo de la enfermedad de la planta y segura para el medio ambiente, lo que la hace un importante componente dentro del manejo integrado de enfermedades para la agricultura.

10 LITERATURA CITADA

Ahn, I.P., S. Kim, Y.H. Lee, S.C. Suh. 2007. Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 143: 838-848.

Abdul, B.A.A., J.D. Anderson. 1970. Viability and leaching of sugars from germinating barley. *Crop Sci.*, 10: 31-34.

Adhikary, P., P. Tarai. 2013. Effects of Temperature and Gibberellic Acid (GA3) on seed Germination of *Vicia sativa*, *Chenopodium album* and *Physalis minima*. *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology*, 6(4): 629-632.

Adigüzel, A., M. Güllüce, M. Sengül, H. Ödütçü, F. Pahin, Ý. Karaman. 2005. Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract. *Turk Journal Biology*, 29: 155-160.

Agrios, G.N. 1988. *Plant Patology*, 3rd Ed Academic Press Inc., San Diego USA. P 528.

Agrios, G.N. 1998. *Fitopatología*. 2da. Edición. Ed. LIMUSA, Noriega editores, México. P 821.

Agrios, G.N. 1997. How plants defend themselves against pathogens. In: *Plant pathology*. San Diego: Academic Press. P 93-114.

Alarcón-Miranda, V., B. Murillo-Amador, A. Moreno-Reséndez, J.S. Carrillo-Amaya, L.G. Hernández-Montiel, J.L. Puente-Manríquez. 2014. Caracterización química proximal de variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en sistemas de producción con manejo orgánico. *Agricultura Orgánica, séptima parte 8*: 141-157.

Babadoost, M. 1992. *Vegetable Seed Treatment. Report on Plant Disease*. Department of Crop Sciences University of Illinois at Urbana-Champaign, RPD No. 915.

Baysal, O.A., E.M. Soyly, S.B. Soyly. 2003. Blackwell Publishing Ltd. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis*. *Plant Pathol.*, 52: 747-753.

Bazzi, C.C., L. Messina, E. Tortoreto, F. Stefani, A. Bini, C. Brunelli. 2003. Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-Ca. *European Journal of Horticultural Science*, 68: 108-114.

Beckerman, J. 2009. Diseases of landscape plants, downy mildew. Department of botany and plant pathology, Purdue University. P 2.

Beckers, J.M.G., U. Conrath. 2007. Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 425-431.

Belbahri, L., G. Calmin, J. Pawlowski, F. Lefort. 2005. Phylogenetic analysis and Real Time PCR detection of a presumably undescribed *Peronospora* species on sweet basil and sage. *Mycology Research*, 109: 1276-1287.

Benavides, A., R.E.M. Hernández, H. Ramírez, A. Sandoval. 2010. Tratado de botánica económica moderna. Plantas útiles sin fines alimentarios. Departamento de Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. P 332.

Ben-Naim, Y., L. Falach, Y. Cohen. 2015. Resistance against basil downy mildew in *Ocimum* Species. The American Phytopathological Society. *Genetics and Resistance*, 105 (6): 778-785.

Bewley, J.D., M. Black. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. New York: Plenum. Press. P 392.

Bewley, J.D., J.K. Bradford, H.W.M. Hilhorst, H. Nonogaki. 2013. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd Edition. Springer New York, Heidelberg Dordrecht London. P 407.

Berry, J., O. Borman. 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 491-543.

Bittencourt, M.L.C., D.C.F.S. Dias., L.A.S. Dias. 2005. Germination and vigour of primed asparagus seeds. *Science Agriculture*, 62: 319-324.

Blank, A.F., J.L.S.F. Carvalho, A.L.N Santos, P.B. Alves, M.F. Arrigoni-Blank, R. Silva-Mann, M.C. Mendonça. 2004. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de manjeriço e alfavaca. *Horticultura Brasileira*, 22: 113-116.

Bonas, U., T. Lahaye. 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion Microbiology*, 5: 44-50.

- Bohlmann, J., G. Meyer-Gauen, R. Croteau. 1998. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings National Academy Sciences of USA*, 95: 4126-4133.
- Bock, C.H., T.B. Brenneman, M.W. Hotchikiss, B.W. Wood. 2012. Evaluation of a phosphite fungide to control pecan scab in the southeastern USA. *Crop Protection*, 36: 58-64.
- Boller, T., G.A. Felix. 2009. Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology*, 60: 379-406.
- Braccia, A., M. Villani, L. Immerdal, C.L.L. Niels, B.T. Nyström, G.H. Hansen, E. Michael. 2003. Danielsen microvillar membrane microdomains exist at physiological temperature. Role of galectin-4 as lipid raft stabilizer revealed by "superrafts". *Journal Biology Chemical*, 278: 15679-15684.
- Bruce, T.J.A., M.C. Matthes, J.A. Napier, J.A. Pickett. 2007. Stressful "memories" of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, 173: 603-608.
- Bruinsma, J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Photochemistry and Photobiology*, 2: 241-249.
- Buriro, M., F.C. Oad, M.I. Keerio, S. Tunio, A.W. Gandahi. 2011. Wheat seed germination under the influence of temperature regimes. *Sarhad Journal of Agriculture*, 27: 539-543.
- Cabrera, M.G., G. Vobis, R.E. Alvarez. 2010. Powdery mildew on *Salvia officinalis* in Corrientes Argentina. *Mycosphere*, 1(4): 289-291.
- Capanoglu, E. 2010. The potential of priming in food production. *Trends in Food Science and Technology*, 21: 399-407.
- Castillo, G.H., Q.F. Santibañez. 1987. Efecto de la temperatura sobre la fenología del trigo (cultiva aurifera). *Agricultura técnica*, 47(1): 29-34.
- Cervantes, E. 2000. Seedling vigour: An approach from analysis of biodiversity in the germplasm bank of local varieties of pea. *Workshop Disease Evaluation*, 25-32.
- Chandrashekhara, S., S.R. Niranjan, G. Manjunath, S. Deepak, S. Shetty. 2010. Seed treatment with aqueous extract of *Viscum album* induces resistance to pearl millet downy mildew pathogen. *Journal of Plant Interactions*, 5: 283-291.

Chen, C., R. Belanger, T.C. Paulitz. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56: 13-23.

Cohen, Y., M. Vaknin, Y. Ben-Naim, A.E. Rubin, M. Galperin, D. Silverman, S. Bitton, U. Adler. 2013. First report of the occurrence and resistance to mefenoxam of *Peronospora belbahrii*, causal agent of downy mildew of basil (*Ocimum basilicum*) in Israel. *Plant Disease*, 97: 692-692.

CONAGUA. 2014. Comisión Nacional del Agua. Reporte del clima en México. Reporte anual 2014. Coordinación General del Servicio Meteorológico Nacional. Gerencia de Meteorología y Climatología. Subgerencia de Pronóstico a Mediano y Largo Plazo. P 27.

Conrath, U., C.M.J. Pieterse, B. Mauch-Mani. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Sciences*, 7: 210-216.

Dangl, J.L., R.A. Dietrich, M.H. Richberg. 1996. Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell*, 8: 1793-1807.

Denancé, N., A. Sánchez-Vallet, D. Goffner, A. Molina. 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. Review Article, *Frontiers in Plant Science*, 155(4): 1-12.

Denton, O.A., K.O. Oyekale, C.C. Nwangburuka, D.S. Daramola, J.A. Adeyeye, O.O. Olukayode. 2013. Influence of high dry heat temperature on seed germination, seedling emergence and seedling vigour of three cultivars of *Corchorus olitorius* seeds. *American Journal of Research Communication*, 1(5): 98-114.

Erge, H.S., F. Karadeniz, N. Koca, Y. Soyer. 2008. Effect of heat treatment on chlorophyll degradation and color loss in green peas. *GIDA* 33: 225-233.

Essemine, J., S. Ammar, S. Bouzid. 2010. Impact of heat stress on germination and growth in higher plants: Physiological, biochemical and molecular repercussions and mechanisms of defense. *Journal Biology Science*, 10: 565-572.

Farahani, H.A, P. Moaveni, K. Maroufi. 2011. Effect of Thermopriming on Germination of Cowpea (*Vigna Sinensis* L.). *Advances in Environmental Biology*, 5(7): 1668-1673.

Farahani-Kofoet, R.D., P. Romer, R. Grosch. 2012. Systemic spread of downy mildew in basil plants and detection of the pathogen in seed and plant samples. *Mycology Progress*, 4(11): 961-966.

Francescangeli, M.O. 2013. Té de compost como control de Mildiu Lanoso (*Peronospora belbahrii*) y suplemento nutricional en Albahaca Dulce (*Ocimum basilicum* var. Genovese). Tesis, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. P 45.

Fuster, M.D., D. García-Puig, A. Ortuño, J.M. Botía, F. Sabater, I. Porras. 1995. Selection of Citrus highly productive in secondary metabolites of industrial interest. Modulation of synthesis and/or accumulation processes. In C. Garcia-Viguera, M. Castañer, M. I. Gil, F. Ferreres, & F. A. Tomás-Barberán, Madrid (Eds.) Current trends in fruit and vegetable phytochemistry, 81-85.

Gang, R.D., J. Wang, N. Durakeva, K.H. Namm, J.E. Simon, E. Lewinsohn, E. Pichersky. 2001. An Investigation of the Storage and Biosynthesis of Phenylpropenes in Sweet Basil. *Plant Physiology*, 125: 539-555.

García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México, México. P 98.

García, A.P., G. Jakab, F. Mauch, M.A. Newman, C.M.J. Pieterse, B. Poinssot, M.J. Pozo. 2006. Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 19: 1062-1071.

Garibaldi, A., M.L. Gullino, G. Minuto. 1997. Diseases of basil and their management. *Plant Disease*, 81: 124-132.

Garibaldi, A., A. Minuto, G. Minuto, M.L Gullino. 2004. First report of downy mildew of basil (*Ocimum basilicum*) in Italy. *Plant Disease*, 88:312.

Garibaldi, A., A. Minuto, M.L Gullino. 2005. First report of downy mildew caused by *Peronospora* spp. on basil (*Ocimum basilicum*) in France. *Plant Disease*, 89: 683.

Garibaldi, A., D. Bertetti, M.L. Gullino. 2007. Effect of leaf wetness duration and temperature on infection of downy mildew (*Peronospora* sp.) of basil. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114: 6-8.

Garibaldi, A., G. Gilardi, C. Bertoldo, M.L. Gullino. 2011. First report of leaf spot of sweet basil (*Ocimum basilicum*) caused by *Alternaria alternata* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93: 54-71.

Gashaw, M., A. Michelsen. 2002. Influence of heat shock on seed germination of plant from regularly burnt savanna woodlands and grasslands in Ethiopia. *Plant Ecology*, 159: 83-93.

Ghanbari, A., M.A. Najafi, M. Al-Athar, F. Mohajeri. 2013. Effect of priming on morphological characteristics, proline, carbohydrate and essential oil contents of

basil seed (*Ocimum basilicum*) under salt stress. *International Journal of AgriScience*, 3: 308-315.

Gil, A., E. de la Fuente, A. Lenardis, C. Ghersa, H.C.B. Van, L.P. Leo, S. Suarez, P.M. Lopez. 1998. Yield and composition of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oils related to soil environment and weed competition. In: Proc annual conference new crops and new uses: biodiversity and sustainability, 8-11.

Gilardi, G., S. Demarchi, A. Garibaldi, M.L. Gullino. 2013. Management of downy mildew of sweet basil (*Ocimum basilicum*) caused by *Peronospora belbahrii* by means of resistance inducers, fungicides, biocontrol agents and natural products. *Phytoparasitica*, 41: 59-72.

Gilardi, G., M. Pugliese, W. Chitarra, I. Ramon, M.L. Gullino, A. Garibaldi. 2015. Effect of elevated Atmospheric CO₂ and temperatura increases on the severity of basil downy mildew caused by *Peronospora belbahrii* under phytotron conditions. *Journal of Phytopatology*, 164: 114-121.

Gazula, A., M.D. Kleinhenz, J.G. Streeter, A.R. Miller. 2005. Temperature and cultivar effects on anthocyanin and chlorophyll b concentrations in three related Lolla Rosso lettuce cultivars. *HortScience*, 40: 1731-1733.

Goellner, C., U. Conrath. 2008. Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal Plant Pathology*, 121: 233-242.

Grieve, M.A. 1971. *Modern Herbal; The Medicinal, Culinary, Cosmetic and Economic Properties, Cultivation and Folk-Lore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs, & Trees with All Their Modern Scientific Uses*. New York: Dover Publications. P 87.

Guest, D., B. Grant. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Review*, 66: 159-187.

Hacisalihoglu, G., Z. Ross. 2010. The influence of priming on germination and soil emergence of non-aged and aged annual ryegrass seeds. *Seed Science Technology*, 38: 214-217.

Haigh, A.M., E.W.R. Barlow, F.L. Milthorpe, P.J. Sinclair. 1986. Field emergence of tomato, carrot and onion seeds primed in an aerated salt solution. *Journal American Society HortScience*, 111: 660-665.

Hansford, C.G. 1933. Annual report of the mycologist. *Review Applied Mycology*, 12: 421-422.

Hammerschmidt, R. 2009. Systemic acquired resistance. In L.C. Van Lood (Ed.), *Plant innate immunity. Advances in Botanic Research*, 51: 173-222.

Hammond-Kosack, K.E., J.E. Parker. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion Biotechnology*, 14: 177-193.

Hampton, J., W. Cookson, A. Grama, J. Rowarth, C. McGill, M. Hill, K. Cameron. 2000. Temperature and time variables for accelerated ageing testing of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) seed lots; *Seed Science and Technology*, 28: 861-863.

Hausbeck, K.M., R.B. Harlan. 2012. Controlling downy mildew on impatiens and basil. Great Lakes Fruit, Vegetable & Farm Market EXPO Michigan Greenhouse Growers EXPO, 1-4.

Holub, E.B. 2008. Natural history of *Arabidopsis thaliana* and oomycete symbioses. *European Journal of Plant Pathology*, 122(1): 91-109.

Horbowicz, M., P. Brenac, R.L. Obendorf. 1998. Fagopyritol B1, O-a-D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-d-*chiro*-inositol, a galactosylcyclitol in maturing buck wheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta*, 205: 1-1.

Homa, K., W.P. Barney, D.L. Ward, C.A. Wyenandt, J.E. Simon. 2014. Evaluation of fungicides for the control of *Peronospora belbahrii* on sweet basil in New Jersey. *Plant Disease*, 98: 1561-1566.

Horbach, R., A.R. Navarro-Quesada, W. Knogge, H.B. Deising. 2011. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal Plant Physiology*, 168: 51-52.

Hussian, I., R. Ahmad, M. Farooq, A. Rehmar, M. Amin, A.M. Bakar. 2014. Seed priming: a tool to invigorate the seeds. *Scientia Agriculture*, 7(3): 122-128.

Iijima, Y., D.R. Gang, E. Fridman, E. Fridman, E. Lewinsohn, E. Pichersky. 2004. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiology*, 134(1): 370-379.

Iloh, A.C., G. Omatta, G.H. Ogbadu, P.C. Onyenekwe. 2014. Effects of elevated temperature on seed germination and seedling growth on three cereal crops in Nigeria. *Scientific Research and Essays*, 9: 806-813.

ISTA. 1996. International rules for seed testing. *Seed. Scientia Technology*, 13: 299-513.

Javanmardi, J., A. Khalighi, A. Kashi, H.P. Bais, J.M. Vivanco. 2002. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used

in traditional medicines in Iran. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5878-5883.

Jiang, R.H., B.M. Tyler. 2012. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. *Annual Review Phytopathology*, 50: 295-318.

Kamoun, S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review Phytopathology*, 44: 41-60.

Karthikeyan, M., V. Jayakumar, K. Radhika, R. Bhaskaran, R. Velazhahan, D. Alice. 2005. Induction of resistance in host against the infection of leaf blight pathogen (*Alternaria palandui*) in onion (*Allium cepa* var *aggregatum*). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 6(42): 371-377.

Kessmann, H., T. Staub, C. Hofmann, T. Maetzke, J. Herzog, E. Ward, S. Uknes, J.A. Ryals. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review Phytopathology*, 32: 439-459.

Knigh, A.J., A. Shauna, M.A. Rawle. 1972. Chemical basis of the sulfo-phosphovainillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical chemistry*, 18(3): 199-202.

Koroch, R.A., S.T. Villani, M.R. Pyne, E.J. Simon. 2013. Rapid staining method to detect and identify downy mildew (*Peronospora belbahrii*) in Basil. *Applications in Plants Sciences*, 1(7): 1-4.

Kúc, J. 1987. Translocated signals for plant immunization. *Annual New York Academy Science*, 494: 221-223.

Kumar, S., K.K. Singh, L.K. Rai. 2004. *In vitro* propagation of an endangered sikkim himalayan rhododendron (*R. maddenii*) from cotyledonary nodal segments. *Journal American Rododendrons Society*, 58(2): 101-105.

Kumar, R., S. Sharma. 2012. Effect of light and temperature on seed germination of important medicinal and aromatic plants in north western Himalayas. *International Journal of Medical Aromatic Plants*, 2: 468-475.

Kirschbaum, M.U.F. 2004. Direct and indirect climate change effects on photosynthesis and transpiration. *Plant Biology*, 6: 242-253.

Leadbeater, A., U. Gisi. 2010. The challenges of chemical control of plant diseases. In U. Gisi, I. Chet, M.L. Gullino (Eds). *Recent Developments in Management of Plant Diseases*, USA, Dordrecht. P 17.

Lebeda, A., J. Dagmar, L. Lenka. 1999. Enzymes in fungal plant pathogenesis. *Phyton (Austria) Special issue, Plant Physiology*, 1(39): 51-56.

Lee, G.J., N. Pokala, E. Vierling. 1995. Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *Journal Biology and Chemistry*, 270: 10432-10438.

Lefort, F., V. Gigon, B. Amos. 2003. Le mildiou s'étend. Déjà détecté dans des nombreux pays européens, *Peronospora lamii*, responsable du mildiou de basilic, a été observé en Suisse dans la région lémanique. *Réussir Fruits et Légumes*, 223: 60-66.

Little, T.M., F.J. Hills. 1989. *Statistical methods in agricultural research*. Version en español. *Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura*. Ed. Trillas, México. P 270.

López-Delgado, H., J.F. Dat, C.H. Foyer, I.M. Scott. 1998. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *Journal Experiment of Botany*, 49: 713-720.

Lu, J., D. Tan, J.M. Baskin, C.C. Baskin. 2010. Fruit and seed heteromorphism in the cold desert annual ephemeral *Diptychocarpus strictus* (Brassicaceae) and possible adaptive significance. *Annals of Botany*, 105: 999-1014.

Mahatma, M.K., R. Bhatnagar, P. Dhandhukia, V.R. Thakkar. 2009. Variation in metabolites constituent in leaves of downy mildew resistant and susceptible genotypes of pearl millet. *Physiology Molecular Biology Plants*, 15: 249-255.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Science*, 2: 176-177.

Makri, O., S. Kintzios. 2007. *Ocimum* sp. (basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 13(3): 123-150.

Maroufi, K., H.A. Farahani, O. Moradi. 2011. Effects of Thermo Priming on Seedling Growth. In *Basil (Ocimum Basilicum L.)*. *Advances in Environmental Biology*, 5(11): 3672-3675.

Martínez-de la Parte, E., L. Pérez-Vicente, B. Bernal, D. García. 2010. First report of *Peronospora* sp. on sweet basil (*Ocimum basilicum*) in Cuba. *Plant Pathology* 59: 800

Mishra, A.K., C.H. Liu, C.H.B. He, R. Tan. 2000. Biological control progress. *International Pest Control*, 42: 131-137.

Mazid M., T.A. Khan, F. Mohammad. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants.): *Frontiers in Life Sciences: Basic and Applied, Biology and Medicine*, 3(2): 232-249.

McCaskill, D., R. Croteau. 1995. Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita*) rely exclusively on plastid derived isopentenyl diphosphate. *Planta*, 197: 49-56.

McGrath, M.T. 2011. Expect and prepare for downy mildew in basil. Cornell University, Long Island Horticultural Research and Extension. Vegetable MD Online, 1-6.

McGrath, M.T. 2013. Expect and prepare for downy mildew in basil. Department of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology, Cornell University. Long Island Horticultural Research, 1-6.

Medlyn, B.E., E. Dreyer, D.E. Ellsworth, M. Forstreuter, P.C. Harley, M.U.F. Kirschbaum, X. Leroux, D. Loustau, P. Montpied, J. Strassmeyer, A. Walcroft, K.Y. Wang. 2002. Temperature response of parameters of a biochemically-based model of photosynthesis. II. A review of experimental data. *Plant, Cell and Environment*, 25: 1167-1179.

Melander, B., J.K. Kristensen. 2011. Soil steaming effects on weed seedling emergence under the influence of soil type, soil moisture, soil structure and heat duration. *Annals of Applied Biology*, 158: 194-203.

Melo, I.S., J.L. Faull. 2004. Scanning electron microscopy of conidia of *Thichoderma stromaticum*, a biocontrol agent of witches broom disease of cocoa. *Brazileira Journal Microbiology*, 35: 330-332.

McIntosh, C. 1853. *The Book of the Garden*. Edinburgh and London: W. Blackwood. P 753.

Muenschler, W.C., M.A. Rice. 1978. *Garden Spice and Wild Pot-Herbs*. Ithaca, NY: Cornell University Press. P 209.

Mukherjee, M., A.K. Datta. 2005. Secondary Chromosome Associations in *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. *Cytologia*, 70: 149-152.

Nagy, G., A. Horvath. 2011. Occurrence of downy mildew caused by *Peronospora belbahrii* on sweet basil in Hungary. *Plant Disease*, 95: 1034-1034.

Nieto-Garibay, A., E. Troyo-Diéguez, J.L. García-Hernández, B. Murillo-Amador, E.F.H. Ruiz, B.E. Pimienta. 2009. Soil water stress effect during emergence and seedling stage in *Capsicum frutescens* L. and *Capsicum annum* L. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10: 405-413.

Niranjan, S., N.P. Shetty, S. Shetty. 2004. Seed bio-priming with *Pseudomonas fluorescens* isolates enhances growth of *pearl millet* plants and induces resistance against downy mildew. International Journal of Pest Management, 50: 41-48.

Ojeda-Silvera, C.M., A. Nieto-Garibay, I.M. Reynaldo-Escobar, E. Troyo-Diéguez, F.H. Ruiz-Espinoza, B. Murillo-Amador. 2013. Tolerance to water stress in varieties of basil (*Ocimum basilicum* L.). Terra Latinoamericana, 31: 145-154.

Osborne, T.B. 1924. The vegetable proteins. 2nd edition. Monographs on Biochemistry. London. 17(43): 440.

Oostendorp, M., W. Kunz, B. Dietrich, T. Staub. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. European Journal of Plant Pathology, 107: 19-28.

Pal, A., P. Melvin, N. Shilpa, M.N. Gandhi, M. Jadhav, H. Ali, K.R. Kini. 2015. Proteomic analysis of elicitation of downy mildew disease resistance in pearl millet by seed priming with β -aminobutyric acid and *Pseudomonas fluorescens*. Journal of proteomics, 120: 58-74.

Parent, B., O. Turc, Y. Gibon, M. Stitt, F. Tardieu. 2010. Modelling temperature-compensated physiological rates, based on the co-ordination of responses to temperature of developmental processes. Journal of Experimental Botany, 61: 2057-2069.

Pinna, S.M., E. Mattana, M.E. Cañadas, G. Bacchetta. 2014. Effects of pre-treatments and temperature on seed viability and germination of *Juniperus macrocarpa* Sm. C. R. Biologies, 337: 338-344.

Piramila, B.H.M., A.L. Prabha, V. Nandagopalan, A.L. Stanley. 2012. Effect of heat treatment on germination, seedling growth and some biochemical parameters of dry seeds of black gram. International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research, 1: 194-202.

Phippen, B.W., E.J. Simon. 1998. Anthocyanins in basil. Journal agricultural Food Chemistry, 46: 1734-1738.

Ponce de León I., M. Montesano. 2013. Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants. International Journal of Molecular Sciences, 14: 3178-3200.

Prisco, J.T., J.W. O'Leary. 1970. Osmotic and toxic effects of salinity on germination of seeds. *American Journal of Botany*, 33: 278-285.

Rafiqi, M., J.G. Ellis, V.A. Ludowici, A.R. Hardham, P.N. Dodds. 2012. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Current Opinion Plant Biology*, 15: 477-482.

Raines, C.A., J.C. Lloyd, T.A. Dyer. 1999. New insights into the structure and function of sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase; an important but neglected Calvin cycle enzyme. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1-8.

Randhir, R., P. Shetty, K. Shetty. 2002. DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitor's process. *Biochemicals*, 37: 1247-1256.

Reyes-Pérez, J.J., B. Murillo-Amador, A. Nieto-Garibay, E. Troyo-Diéguez, I.M. Reynaldo-Escobar, E.O. Rueda-Puente, J.L. Cuervo-Andrade. 2013. Crecimiento y desarrollo de variedades de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en condiciones de salinidad. *Terra Latinoamericana* 1(32): 35-45.

Roberts, P.D., R.N. Raid, P.F. Harmon, S.A. Jordon, A.J. Palmateer. 2009. First report of downy mildew caused by a *Peronospora* sp. On basil in Florida and the United States. *Plant Disease*, 93(2): 199.

Roe, J.H., J.M. Bailey, R.R. Gray, J.N. Robinson. 1961. Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *The Journal of Biological Chemistry*, 236(5): 1244-1246.

Roth U., A. Friebe, H. Schnabl. 2000. Resistance induction in plants by a brassinosteroid-containing extract of *Lischnis viscaria* L. *Biosciences*, 55: 552-559.

Ruelland, E., A. Zachowski. 2010. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 69: 225-232.

Sam, O., L. Matilde, L. Barroso. 2002. Caracterización anatómica de las hojas de la albahaca blanca (*Ocimum basilicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 2(23): 39-42.

Sambrook, J., D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Fourth edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. P 1881.

SAGARPA. 2014. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. www.siap.gob.mx (Consulta: Enero 2014).

Sánchez-Verdugo, C., J.M. Lucero-Flores. 2012. Nichos de mercado de especies aromáticas orgánicas tipo gourmet. CIB. La Paz, Baja California Sur, México. P 84.

Sassenrathcole, G.F., R.W. Pearcy, S. Steinmaus. 1994. The role of enzyme activation state in limiting carbon assimilation under variable light conditions. *Photosynthesis Research*, 41: 295-302.

Selvarani, K., R. Umarani. 2011. Evaluation of seed priming methods to improve seed vigour of onion (*Allium cepa* cv. *aggregatum*) and carrot (*Daucus carota*). *Journal of Agricultural Technology*, 7(3): 857-867.

Sharathchandra, R.G., S. Niranjan, N.P. Shetty, K.N. Amruthesh, H.S. Shetty. 2004. A Chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection*, 23: 881-888.

Sharma, H.C., J.H. Crouch, K.K. Sharma, N. Seetharama, C.T. Hash. 2002. Applications of biotechnology for crop improvement: prospects and constraints. *Plant Science*, 163: 381-395.

Shivacumar, P.D., H.M. Geetha, H.S. Shetty. 2003. Peroxidase activity and isozyme analysis of pearl millet seedlings and their implications in downy mildew disease resistance. *Plant Science*, 164: 85-93.

SIAP. 2011. (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera). Resumen Nacional de la Producción Agrícola y Resumen Nacional por cultivo. <http://www.siap.gob.mx/>.

Siemens, D.H., S.H. Garner, T. Mitchell-Olds, R.M. Callaway. 2002. Cost of defense in the context of plant competition: *Brassica rapa* may grow and defend. *Ecology*, 83(2): 505–517.

Silva, B.L.T., M.S.A. Ferreira, O.L.E. Mota, A.J. Sotero. 2011. Metabolism of carbohydrates during the development of seeds of the brazilian rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss) Muell.- Arg.]. *Acta Physiology Plant*, 33: 211-219.

Simon, E.W. 1984. Early events in germination. In: D.R. Murray (ed.) *Seed physiology. Germination and reserve mobilization*. Academic press, Orlando, FL. (2): 77-115.

Simon, J.E., R.M. Morales, B.W. Phippen, F.R. Vieira, Z. Hao. 1999. Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and hornamental herb. *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, 499-505.

Simon, J.E., A.F. Chadwick, L.E. Craker. 1984. Herbs: an indexed bibliography. The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Archon Books: Hamden, 1971-1980.

Singh, K.K., S. Kumar, A. Pandey. 2008. Soil treatments for improving seed germination of rare and endangered sikkim Himalayan rhododendrons. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(2): 288-296.

Singh, A., A.H. Abubakar, H.G. Ahmed, U. Aliyu, M.B. Sokoto, J. Alhassan, M. Musa, R.B. Singh. 2011. Seed hydropriming effects on germination, emergence and growth of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Trends Advanced Science*, 1(3): 37-42.

StatSoft® Inc. 2011. Statistica. System reference. StatSoft Inc. Tulsa, Oklahoma, USA. P 1098.

Steel, G.D., J.H. Torrie. 1995. Bioestadística. Principios y procedimientos. Ed. McGraw, Hill, México. P 622.

Stennis, M.J. S. Chandra, C.A. Ryan, P.S. Low. 1998. Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. *Plant Physiology*, 117: 1031-1036.

Stewart, C.R., H. Beevers. 1967. Gluconeogenesis from amino acids in germinating cadtor been endosperm and its role in transport to the embryo. *Plant Physiology*, 42: 1587-1595.

Sticher, L., B. Mauch-Mani, J.P. Me'traux. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology*, 35: 235-270.

Stobart, T. 1982. Herbs, Spices, and Flavorings. Woodstock, NY: The Overlook Press, 51-55.

Strange, N.R., R.P. Scott. 2005. Plant disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review Phytopathology*, 43: 83-116.

Suda, C.N.K., J.F. Giorgini. 2000. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12: 226-245.

Tardieu, F., C. Granier, B. Muller. 2011. Water deficit and growth. Coordinating processes without an orchestrator? *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 283-289.

Thines, M., S. Telle, S. Ploch, F. Runge. 2009. Identity of the downy mildew pathogens of basil, coleus, and sage with implications for quarantine measures. *Mycological Research*, 113: 532-540.

- Thines, M. 2014. Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes a global overview. *European Journal Plant Pathology*, 138: 431-447.
- Tilsner, J., K.J. Oparka. 2010. Tracking the green invaders: advances in imaging virus infection in plants. *Journal Biochemicals*, 430: 21-37.
- Uchida, J. 2011. Basil Downy Mildew. College of Tropical Agriculture and Human Resources. University of Hawaii at Mânoa, 1-2.
- Upchurch, R.G., M.E. Ramírez. 2010. Defense-related gene expression in soybean leaves and seeds inoculated with *Cercospora kikichii* and *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. *Physiology Molecular Plant*, 75: 64-70.
- Van, L.C.L. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 753-765.
- Van L.C.L., P.A.H.M. Bakker, C.M.J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483.
- Van, H.M., M. Pelsler, L.L.C. Van, C.M.J. Pieterse, J. Ton. 2006. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 103: 5602-5607.
- Vega, G., M.C. Escandón, R. Soto, A. Mendoza. 2012. Instructivo técnico del cultivo de la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en Cuba. En: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/5178/albahaca.pdf>
- Viuda-Martos, M., Y. Rúaiz-Navajas, J. Fernández-López, J.A. Perez-Alvarez. 2011. Spices as functional foods. *Critical Review Food Science*, 51: 13-28.
- Voglmayr, H. 2003. Phylogenetic relationships of *Peronospora* and related genera based on nuclear ribosomal ITS sequences. *Mycology Research*, 107: 1132-1142.
- Wahid, A., S. Gelani, M. Ashraf, R.M. Foolad. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 199-223.
- Walters, D., J. Harman, R. Craig, R. Mumma. 1991. Effect of temperature on glandular trichome exudate composition and pest resistance in geraniums. *Entomology Experiment Applied* 60: 61-69.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand H, Sninsky JS, White TJ, (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press. P 315-322.

Wise, R., A. Olson, S. Schrader, T. Sharkey. 2004. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown pima cotton plants at high temperature. *Plant Cell and Environment*, 27: 717-724.

West, E.M.J., A.J.C. Smith, K. Winter. 2011. Photosynthesis, reorganized. *Science*, 332: 311-312.

Worrall, D., G.H. Holroyd, P.J. Moore, M. Glowacz, P. Croft, E.J. Taylor, D.N. Paul, R.M. Roberts. 2012. Treating seeds with activators of plant defense generates long lasting priming of resistance to pests and pathogens. *New Phytologist*, 193: 770-778.

Wyenandt, A.C., E.J. Simon, T.M. McGrath, L.D. Ward. 2010. Susceptibility of Basil Cultivars and Breeding Lines to Downy Mildew (*Peronospora belbahrii*). *HortScience*. 45(9): 1416-1419.

Wyenandt, A.C., E.J. Simon, R.M. Pyne, K. Homa, T.M. McGrath, S. Zhang, R.N. Raid, L.J. Ma, R. Wick, L. Guo, A. Madeiras. 2015. Basil downy mildew (*Peronospora belbahrii*): Discoveries and challenges relative to its control. *Phytopathology*, 105: 885-894.

Xie, Z. 2007. Investigation of plant specialized metabolism (secondary metabolism) using metabolomic and proteomic approaches. Thesis doctor of philosophy. Department of Pharmaceutical Sciences. University of Arizona. P 293.

Yamori, W., C. Masumoto, H. Fukayama, A. Makino. 2012. Rubisco activase is a key regulator of non-steady-state photosynthesis at any leaf temperature and, to a lesser extent, of steady-state photosynthesis at high temperature. *The Plant Journal*, 71: 871-880.

Yari, L., M. Aghaalikani, F. Khazaei. 2010. Effect of seed priming duration and temperature on seed germination behavior of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 5(1): 1-6.

Yu, X., G. Zheng, L. Shan, G. Meng, M. Vingron, Q. Liu, X.G. Zhu. 2014. Reconstruction of gene regulatory network related to photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science. Plant Systems Biology*, 5: 1-9.

Zhang, Y.L., D.W. Li, Z.H. Gong, J.E. Wang, Y.X., J.J. Ji. 2013. Genetic determinants of the defense response of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici* (Oomycetes; Pythia- ceae). *Genetic Molecular Research*, 12: 3605-3621.

Zimmerli, L., G. Jakab, J.P. Métraux, B. Mauch-Mani. 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by β -aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97: 12920-12925.

Zinn, K.E., O.M. Tunc, J.F. Harper. 2010. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of Experimental Botany*, 6: 1959-1968.

Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review Plant Biology*, 53: 247-273.