



**Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Doctorado en Ingeniería en Biosistemas**

**“Aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-emisiones acústicas relacionadas a estrés hídrico en la planta *Capsicum annuum* y su descendencia”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctor en Ingeniería en Biosistemas

**Presenta**

M.C. Pablo Luis Godínez Mendoza

**Dirigido por:**

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

**Co-dirigido por:**

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

Querétaro, Qro. a 2025

**La presente obra está bajo la licencia:**  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



## CC BY-NC-ND 4.0 DEED

### Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

#### **Usted es libre de:**

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

#### **Bajo los siguientes términos:**

 **Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.

 **NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).

 **SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

#### **Avisos:**

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Ingeniería**  
**Doctorado en Ingeniería en Biosistemas**

**“Aplicación de  $H_2O_2$ -emisiones acústicas relacionadas a estrés hídrico en la planta *Capsicum annuum* y su descendencia”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctor en Ingeniería en Biosistemas

**Presenta**

M.C. Pablo Luis Godínez Mendoza

**Dirigido por:**

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

**Co-dirigido por:**

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

**Presidente: Dr. Ramón Gerardo Guevara González**

**Secretario: Dr. Luis Miguel Contreras Medina**

**Vocal: Dr. Erik Gustavo Tovar Pérez**

**Suplente: Dra. Rosalía Virginia Ocampo Velázquez**

**Suplente: Dr. Enrique Rico García**

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el consejo (Diciembre /2025)  
México

## Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada durante el periodo de doctorado.

A la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Ramón Gerardo Guevara González por su guía y apoyo durante todo este proceso, siempre apoyando cuando se requería, así como su disposición y tiempo.

Al comité evaluador por su apoyo, tiempo y compromiso para apoyarme con cualquier duda y otorgarme consejos para mejorar el desarrollo del proyecto.

A mi familia, pareja y amistades que me acompañaron en el proceso, siempre alegrando y apoyando durante este trayecto de vida.

## Índice general

Contenido	Página
Índice general .....	ii
Índice de tablas .....	v
Índice de figuras .....	vi
Resumen .....	viii
Abstract .....	ix
1. Introducción .....	1
1.1. Estresores .....	1
1.2. Tipos de estresores .....	3
1.3. Peróxido de hidrógeno .....	4
1.4. Emisiones acústicas .....	5
1.5. Epigenética .....	6
1.6. <i>Capsicum annuum</i> L .....	7
1.7. Estado del arte en estresores en <i>C. annuum</i> L .....	11
2. Justificación .....	13
3. Descripción del problema .....	15
4. Antecedentes .....	16
4.1. Elicitores .....	16
4.2. Peróxido de hidrógeno .....	17
4.3. Emisiones acústicas .....	19
4.4. Combinación de elictores .....	20
4.5. Características fenotípicas heredables .....	21
4.6. MAPquinas .....	22
5. Hipótesis .....	22
6. Objetivos .....	23
6.1. Objetivo general .....	23
6.2. Objetivos específicos .....	23

7. Metodología .....	24
7.1. Determinación de decibeles de emisiones acústicas con mayor bioestimulación en cultivo de <i>C. annuum</i> L .....	25
7.1.1. Cultivo de <i>C. annuum</i> L .....	25
7.1.2. Aplicación de emisiones acústicas .....	26
7.1.3. Medición de variables morfológicas .....	27
7.1.4. Ensayos enzimáticos .....	28
7.1.5. Cuantificación de capsaicinoides .....	30
7.1.6. Contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante .....	31
7.1.7. Cuantificación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> endógeno .....	32
7.1.8. Expresión relativa génica de <i>cawrky</i> , <i>pr1a</i> y <i>erf1</i> .....	33
7.1.9. Análisis estadístico .....	35
7.2. Efecto combinado de peróxido de hidrógeno y emisiones acústicas en cultivo de <i>C. annuum</i> L .....	35
7.2.1. Cultivo de <i>C. annuum</i> L .....	35
7.2.2. Tratamiento con peróxido de hidrógeno .....	37
7.2.3. Tratamiento con emisiones acústicas (MHAF) .....	38
7.2.4. Evaluación de variables morfológicas y físicas .....	38
7.2.5. Ensayos enzimáticos .....	39
7.2.6. Cuantificación de capsaicinoides .....	39
7.2.7. Contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante .....	40
7.2.8. Cuantificación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> endógeno .....	40
7.2.9. Expresión relativa génica .....	40
7.2.10. Análisis estadístico .....	42
7.3. Determinación de características heredables en generación F1 .....	43
7.3.1. Germinación de plántulas F1 .....	43
7.3.2. Contenido relativo de agua .....	44
7.3.3. Análisis estadístico .....	46
7.3.4. Manejo de residuos .....	46
8. Resultados y discusión .....	47

8.1. Determinación de decibeles de emisiones acústicas con mayor bioestimulación en cultivo de <i>C. annuum</i> L.....	47
8.1.1. Mediciones morfológicas.....	47
8.1.2. Actividad enzimática.....	48
8.1.3. Actividad antioxidante no enzimática.....	51
8.1.4. Contenido de Capsaicinoides y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
8.1.5. Expresión relativa de <i>cawrky</i> , <i>pr1a</i> y <i>erf1</i> .....	55
8.2. Efecto combinado de peróxido de hidrógeno y emisiones acústicas en cultivo de <i>C. annuum</i> L.....	58
8.2.1. Mediciones morfológicas.....	58
8.2.2. Actividad enzimática.....	60
8.2.3. Actividad antioxidante no enzimática.....	62
8.2.4. Contenido de Capsaicinoides y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	64
8.2.5. Expresión relativa génica.....	66
8.2.6. Análisis multivariable.....	73
8.3. Determinación de características heredables en generación F1.....	75
9. Conclusiones y perspectivas.....	77
10. Referencias.....	81
11. Anexo 1.....	105

## Índice de tablas

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Clasificación y ejemplos de estresores .....	4
Tabla 2. Respuestas en plantas al aplicar peróxido de hidrógeno .....	5
Tabla 3. Fases de cultivo de <i>Capsicum annuum</i> L con su respectiva temperatura óptima .....	8
Tabla 4. Estímulos aplicados en <i>Capsicum annuum</i> L con sus respectivos resultados .....	11
Tabla 5. Efectos de ondas acústicas en plantas .....	12
Tabla 6. Secuencias de cebadores utilizados en el estudio .....	34
Tabla 7. Secuencias de cebadores utilizados en la expresión génica relativa .....	41
Tabla 8. Cuantificación de capsaicinoides con GC-MS .....	53

## Índice de figuras

Figura	Página
Figura 1. Modelo hormético .....	3
Figura 2. Etapas de crecimiento de <i>Capsicum annuum</i> L .....	9
Figura 3. Ruta metabólica de la capsaicina .....	10
Figura 4. Efecto de elicidores .....	17
Figura 5. Producción de peróxido de hidrógeno por estrés abiótico y su procesamiento en plantas .....	18
Figura 6. Esquema general de la metodología .....	24
Figura 7. Distribución de los canales de <i>C. annuum</i> en el invernadero .....	26
Figura 8. Invernadero con pared amortiguadora de sonido .....	36
Figura 9. Esquema del invernadero con pared amortiguadora de sonido y distribución de tratamientos .....	37
Figura 10. Ensayos enzimáticos en microplaca .....	39
Figura 11. Curvas de amplificación en el termociclador de tiempo real .....	41
Figura 12. Germinación de plántulas, generación F1 .....	44
Figura 13. Plántulas F1 promedio de cada tratamiento .....	45
Figura 14. Plántulas F1 y determinación de contenido relativo de agua .....	45
Figura 15. Datos morfológicos de plantas de <i>C. annuum</i> tratadas con MHAf .....	48
Figura 16. Actividad enzimática de hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con MHAf .....	49
Figura 17. Actividad antioxidante no enzimática de hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con MHAf .....	52
Figura 18. Contenido de capsaicinoides de frutos de <i>C. annuum</i> y contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con MHAf .....	54
Figura 19. Expresión relativa genética en hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con MHAf .....	56

Figura 20. Mediciones morfológicas de plantas de <i>C. annuum</i> tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MHAF y combinación.....	59
Figura 21. Apariencia fenotípica típica de plantas de <i>C. annuum</i> para cada tratamiento evaluado.....	59
Figura 22. Actividad enzimática de hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MHAF y combinación.....	61
Figura 23. Contenido total de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante de hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MHAF y combinación.....	63
Figura 24. Contenido total de capsaicina de frutos de <i>C. annuum</i> y contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> endógeno de hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MHAF y combinación.....	65
Figura 25. Expresión relativa genética en hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MHAF y combinación.....	67
Figura 26. Expresión relativa genética en hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MHAF y combinación.....	69
Figura 27. Expresión relativa genética en hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MHAF y combinación.....	70
Figura 28. Expresión relativa genética en hojas de <i>C. annuum</i> tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MHAF y combinación.....	72
Figura 29. Análisis de componentes principales (PCA) de los tratamientos de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MHAF y combinatorio, con las variables morfológicas, bioquímicas y moleculares evaluadas en el estudio.....	74
Figura 30. Mediciones de plántulas F1 de plantas de <i>C. annuum</i> tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MHAF y combinación.....	75
Figura 31. Altura de plantas de experimento combinatorio y plántulas de la generación F1.....	77
Figura 32. Aplicación propuesta en cultivares a campo abierto e invernadero.....	80
Figura 33. Ruta putativa de los estresores MHAF y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el experimento combinatorio.....	81

## Resumen

El estrés vegetal puede afectar el metabolismo, crecimiento y desarrollo normal de una planta, sin embargo, dependiendo de la dosis del factor de estrés, este puede tener efectos positivos en el organismo generando un efecto de eustrés. Dos factores de estrés que pueden presentar efectos positivos son el peróxido de hidrógeno y emisiones acústicas relacionadas a estrés hídrico. La frecuencia de las emisiones acústicas fue obtenida a partir de plantas de *Capsicum annuum* con estrés hídrico. A pesar de que se han realizado estudios con diversos factores de estrés de forma individual, falta realizar estudios con combinación de diversos estresores, por lo cual en este proyecto se propone el uso de dos factores de estrés como el peróxido de hidrógeno y las emisiones acústicas relacionadas a estrés hídrico medio (MHAF). Los resultados muestran un efecto bioestimulante sobre las plantas de *C. annuum* en variables morfológicas, así como la regulación positiva de expresión de genes relacionados a defensa, así como la activación de MAPquinas evaluadas, especialmente en el tratamiento combinatorio de estresores. De igual manera se muestra un mayor crecimiento en plántulas F1 de parentales previamente tratados con peróxido de hidrógeno, lo cual sugiere un posible efecto epigenético. Los resultados obtenidos en este trabajo plantean el posible uso de estresores novedosos como las emisiones acústicas para mejorar el crecimiento y desarrollo de plantas de *C. annuum* de forma sencilla y segura. Aún se deben de realizar estudios para determinar efectos heredables de dichos estresores, no sólo a nivel de plántula sino de ciclo completo, así como diferentes dosis para elucidar la dosis óptima de eustrés.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, emisiones acústicas, peróxido de hidrógeno, estrés, capsaicina.

## Abstract

Stress factors can hinder plant metabolism, growth and development. However, depending in the dose of stress, the effect can be positive, making it a eustress factor. Two stressors that could have a positive effect are hydrogen peroxide and acoustic emissions related to hydric stress. The frequency of the acoustic emissions was obtained from *Capsicum annuum* plants in hydric stress. Although there have been several studies of the effect of individual stressors, there is a lack of studies regarding the combination of two or more stress factors. The purpose of this project is to study the interaction between hydrogen peroxide and acoustic emissions related to medium hydric stress (MHAF). Results show a bioestimulation effect on *C. annuum* plants over morphological variables, as well as a positive regulation of genetic expression on defence related genes and MAPquinases, especially in the combinatory treatment of stress factors. Furthermore, there was a higher growth in F1 plantlets of previously treated plants with hydrogen peroxide, this suggests a possible epigenetic effect. The results obtained from this study, propose the possible use of novel stressors such as acoustic emissions to improve *C. annuum* growth and development in an easy and safe manner. There must be further studies to determine hereditary effects of both stress factors, not only at plantlet level, but also at full plant cycle, as well as different doses to shed light into the optimal dose of eustress.

Key words: *Capsicum annuum*, acoustic emissions, hydrogen peroxide, stress, capsaicin.

## 1. Introducción.

### 1.1. Estresores.

Se ha definido como estrés vegetal a cualquier substancia o condición externa, que afecta el metabolismo, crecimiento o desarrollo normal de una planta. Dependiendo del origen de los factores de estrés (estresores), se pueden clasificar como “bióticos”, (por ejemplo, patógenos e insectos), o “abióticos” (como, por ejemplo, sequía, temperatura extrema o salinidad). El impacto de dichos estresores no es influenciado únicamente por la dosis, sino también por la duración (Lichtenthaler, 1996).

El balance entre las respuestas de la planta, como lo son el rendimiento, crecimiento, calidad, defensa o tolerancia; y la sensibilidad de la misma, determinan si el estresor es de carácter positivo, en cuyo caso se denomina “eustresor”, o si es de carácter negativo, en cuyo caso es un “distresor” (Kranner, *et al.* 2010). La naturaleza del carácter depende de varios factores, tales como intensidad del estresor y duración, entre otros.

Un ejemplo es lo reportado por Venema y Schwarz, quienes mencionan que las bajas temperaturas son distresores para el tejido vegetal de plantas vasculares, siendo incluso letal para diversas especies de plantas al bajar la temperatura por debajo del punto de congelación del agua (Venema, *et al.* 2005; Schwarz, *et al.* 2010). Es interesante observar, que bajas temperaturas en periodos cortos de tiempo, como los pulsos frescos de las mañanas, inducen el endurecimiento y tienden a mejorar el crecimiento (Kalberer, *et al.* 2006).

Tomando en cuenta esta perspectiva, un factor de estrés puede ser un eustresor si la respuesta de la planta con lo que respecta a rendimiento, crecimiento, calidad, resistencia a enfermedades o tolerancia a factores abióticos resulta ser positiva.

Dicho acercamiento es parecido al concepto de hormesis utilizado en toxicología (Calabrese, 2004), el cual se refiere a la respuesta bifásica de agentes químicos y físicos que afectan a los seres vivos, que a dosis bajas provocan efectos favorables y que a dosis altas provocan efectos adversos (Goitia & Sagredo, 2012).

En la actualidad han incrementado los estudios sobre relación dosis-respuesta tanto con sustancias químicas (como agroquímicos), como con tratamientos físicos (como temperatura). Estos estudios han demostrado que la respuesta específica de una planta depende del estresor aplicado y la variable de respuesta evaluada. Las plantas responden de tal manera que una dosis muy baja de un estresor no produce ninguna respuesta fenotípica observable, hasta que cierto nivel de dosis es superado, estimulando variables de respuesta hasta llegar a una dosis máxima de estimulación. Conforme la dosis aumenta, la respuesta estimulada disminuye hasta generar toxicidad (Agathokleous, *et al.* 2019).

La zona que se encuentra entre el punto de respuesta fenotípica observable y el punto de toxicidad es la zona de respuesta hormética (Sonmez, *et al.* 2023) tal y como se puede observar en la Figura 1. De igual manera, es posible encontrar respuestas no horméticas para variables en estudios de dosis-respuesta (Agathokleous, *et al.* 2019). Se han reportado respuestas multifásicas a compuestos alelopáticos o aleloquímicos que dependen de la duración de aplicación del estresor (Belz & Duke, 2022) o de la variable evaluada (Erofeeva, 2020). Considerando la factibilidad de respuestas horméticas, es posible que haya estresores inherentemente considerados tóxicos para las plantas debido a que no se han realizado estudios a nivel hormético en dosis específicas. Un ejemplo de esto es el glifosato, un herbicida que en un estudio se demostró que puede inducir crecimiento y tolerancia a estrés en *Chenopodium álbum* (Belz, 2020).

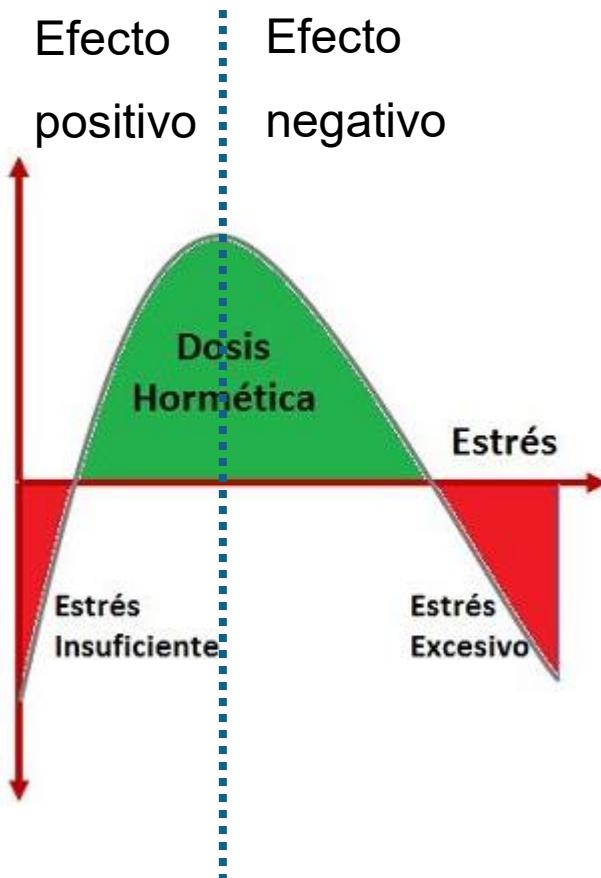


Figura 1. Modelo hormético.

## 1.2. Tipos de estresores.

Los diferentes factores de eustrés se pueden por otro lado, clasificar también en tres grupos, los bioestimulantes/licitores que son de origen biológico, los factores físicos y los estímulos químicos, los cuales mitigan el estrés biótico y abiótico en la planta (Ehsanpour & Razavizadeh, 2005; Demkura & Ballaré, 2012).

Como factores de eustrés de origen biológico se encuentran los licitores, los cuales activan defensas químicas en las plantas (Thakur & Sohal, 2013). Dichos licitores pueden ser originados en el exterior de la planta, tal y como los patrones moleculares asociados a microbios, patógenos y herbívoros (MAMP, PAMP y HAMP por sus siglas en inglés), o pueden ser originados en el interior de la planta, tal y

como ocurre con los patrones moleculares asociados a daño (DAMP por sus siglas en inglés) (Vega, *et al.* 2018). Otros factores de estresores de origen biológico son los bioestimulantes, los cuales son formulaciones de origen biológico que mejoran la productividad de la planta (Yakhin, *et al.* 2017). Estos bioestimulantes promueven el crecimiento de la planta, pero no necesariamente mejoran las defensas de la misma (Colla & Roush, 2015; du Jardin, 2015).

En la Tabla 1 se pueden observar las clasificaciones de estresores, así como ejemplos de estos:

Tabla 1: Clasificación y ejemplos de estresores (Vázquez, *et al.* 2019).

Origen no biológico		Origen biológico (bioestimulantes/elicitores)
Factores físicos	Factores químicos	Patrones moleculares
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tigmomorfogénesis</li> <li>• Ondas acústicas</li> <li>• radiación electromagnética</li> <li>• Campos magnéticos</li> <li>• Temperatura</li> <li>• Estrés hídrico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elementos esenciales</li> <li>• Sales minerales</li> <li>• Gases</li> <li>• Compuestos nanoestructurados o nanométricos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Viral</li> <li>• Bacteriano</li> <li>• Fúngico</li> <li>• Extracto de levadura</li> <li>• Polisacáridos</li> <li>• Ácidos nucleicos</li> <li>• Feromonas</li> <li>• Fitohormonas</li> </ul>

### 1.3. Peróxido de hidrógeno.

Recientemente se ha prestado atención al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) debido a su rol como molécula señalizadora y que funciona como un elicitador que, al aplicarse de forma exógena a la planta, puede inducir en la misma, defensa previa a la exposición de estrés (Parola, *et al.* 2020).

Entre las respuestas al peróxido de hidrógeno, se puede observar en la Tabla 2 diferentes resultados:

Tabla 2: Respuestas en plantas al aplicar peróxido de hidrógeno.

Respuesta por peróxido dehidrógeno	Referencia
Tolerancia cruzada a estrés biótico y abiótico	Hossain, <i>et al.</i> 2015
Mitigación de sequía (reportado en pepino, arroz y haba de soja)	Sun, <i>et al.</i> 2016 Sohag, <i>et al.</i> 2020 Ishibashi, <i>et al.</i> 2011
Enzimas antioxidantes tal y como superóxido dismutasa, catalasa, peróxido de glutatión y peroxidasa de ácido ascórbico. Reduciendo la acumulación de diferentes especies reactivas de oxígeno.	Hossain, <i>et al.</i> 2015

En un trabajo de Sáenz-de la O se reporta que la aplicación de peróxido de hidrógeno en la planta *Nicotiana tabacum* L. resulta en una menor altura de tallo, a diferencia de lo reportado en otros trabajos, posiblemente debido a que, en este trabajo, la aplicación de  $H_2O_2$  no fue únicamente por rocío foliar, sino también en las raíces mediante irrigación. También se reportó que el tratamiento con peróxido resultó en un decremento en la pérdida del contenido de agua en las hojas (Sáenz-de la O, *et al.* 2021).

#### 1.4. Emisiones acústicas.

Las emisiones acústicas por otro lado constituyen estímulos físicos que han demostrado efectos de supervivencia significativos contra sequía en plantas de

Arabidopsis y arroz, así como la inducción del metabolismo secundario, fitohormonas y compuestos volátiles (Jeong, *et al.* 2014; Kollasch, *et al.* 2020; López & Vicient, 2017). El sonido consiste en la oscilación de ondas de presión que se transmiten a través de un medio como lo son los gases, líquidos o sólidos. Conforme la onda se propaga, esta transporta energía (Chowdhury, *et al.* 2014).

El uso de frecuencias específicas de sonido ha demostrado una regulación positiva significativa de genes de respuesta al calor (*hsfa3*, *smxl7* y *athsp101*), lo que indica que el uso de dichas emisiones acústicas tiene el potencial de acondicionar los cultivos para soportar un estrés futuro (Bhandawat, *et al.* 2020).

Es posible medir y grabar la vibración generada por plantas con estrés hídrico y aplicar la vibración de forma artificial como un patrón de emisión acústica a plantas bien hidratadas, haciéndolas censar la vibración como una alarma de daño por estrés hídrico, induciendo de esta manera, ajustes en la aptitud de la planta de forma similar a la experimentada durante un verdadero déficit de irrigación. Estos patrones de emisiones acústicas vinculados a las vibraciones generadas en plantas bajo sequía pueden actuar como una señal biomecánica que genere diferentes características bioquímicas y moleculares asociadas con un déficit de agua, resultante de estrés hídrico (Caicedo, *et al.* 2021) y por lo tanto genere una mejor resistencia a sequía, comparado con algún otro patrón acústico arbitrario.

### 1.5. Epigenética.

Mantener las características obtenidas en plantas de forma transgeneracional mediante el uso de elicidores resulta de interés. Un mecanismo de regulación génica disparada en respuesta al estrés en plantas es la regulación epigenética. Esta consiste en modificaciones covalentes en el ADN y en las histonas, por lo cual la actividad transcripcional de la cromatina es alterada, manteniendo la secuencia de ADN intacta (Iwasaki & Paszkowski, 2014).

Los cambios mencionados anteriormente generan variantes de fenotipo, mas no de genotipo. Estos cambios en la expresión del ADN se deben a la metilación de este y a modificaciones en las histonas, las cuales son proteínas encargadas en empaquetar el ADN. (García, *et al.* 2012).

Debido a que los elicidores reprograman la expresión de diversos genes relacionados a metabolitos secundarios al metilar el ADN, se puede determinar el nivel epigenético de estos.

La metilación del ADN generalmente ocurre en la posición C5 de la base de citosina para formar 5-metilcitosina, el cual juega un papel importante en la regulación del desarrollo de la planta, adaptación al estrés y evolución del genoma. El perfil de metilación del ADN suele ser dinámico, debido a tres procesos, los cuales involucran metilación *de novo*, mantenimiento de la metilación y desmetilación activa. La metilación de *novo* es disparada por RNA regulado por *drm2* (por sus siglas en inglés, Domains Rearranged Methyltransferase 2). Para el mantenimiento de la metilación, se involucra *met1* (metiltransferasa 1) y cromometilasas (*cmt2*, *cmt3*). Para la remoción de la metilación se involucra un represor de silenciamiento (*ros1*) (Zhi & Chang, 2021).

#### 1.6. *Capsicum annuum* L.

Este cultivo es de gran importancia económica para México debido a que es uno de los principales productores de chile en el mundo. De igual manera, es un cultivo importante a nivel cultural por la gran variedad de usos culinarios (García- Gaytan, *et al.* 2017).

En este contexto, la planta *Capsicum annuum* L es de gran interés debido a que su fruto es fuente de diversos compuestos nutracéuticos tal y como los son los carotenoides, flavonoides, elementos minerales y compuestos bioactivos como los capsaicinoides (Naves, *et al.* 2019).

La capsaicina presente en los frutos de las plantas de chile es de interés debido a sus diversas propiedades, entre las cuales se encuentran su capacidad antimicrobiana, antioxidante, actividad quimio preventiva (estudiada principalmente *in vitro*), actividad anti diabetes (disminuye la cantidad de azúcar en la sangre e incrementa la insulina), actividad gastro protectora y anti inflamatorio (Martínez 2019). Los carotenoides resultan ser de interés debido a que son fuentes importantes de vitamina A y ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares (Rao & Rao, 2007). Otros compuestos como los flavonoides también resultan ser de importancia debido a sus propiedades anti oxidativas, anti inflamatorias, anti mutagénicas y anti carcinogénicas (Panche, *et al.* 2016).

Esta planta presenta las siguientes temperaturas óptimas en sus fases de cultivo (Tabla 3) durante sus etapas de crecimiento (Figura 2).

Tabla 3: Fases de cultivo de *Capsicum annuum* L con su respectiva temperatura óptima.

Fases de cultivo	Temperatura óptima en °C
Germinación	20 °C – 25 °C
Crecimiento vegetativo	20 °C – 25 °C (día) 16 °C – 18 °C (noche)
Floración y fructificación	26 °C – 28 °C (día) 18 °C – 20 °C (noche)

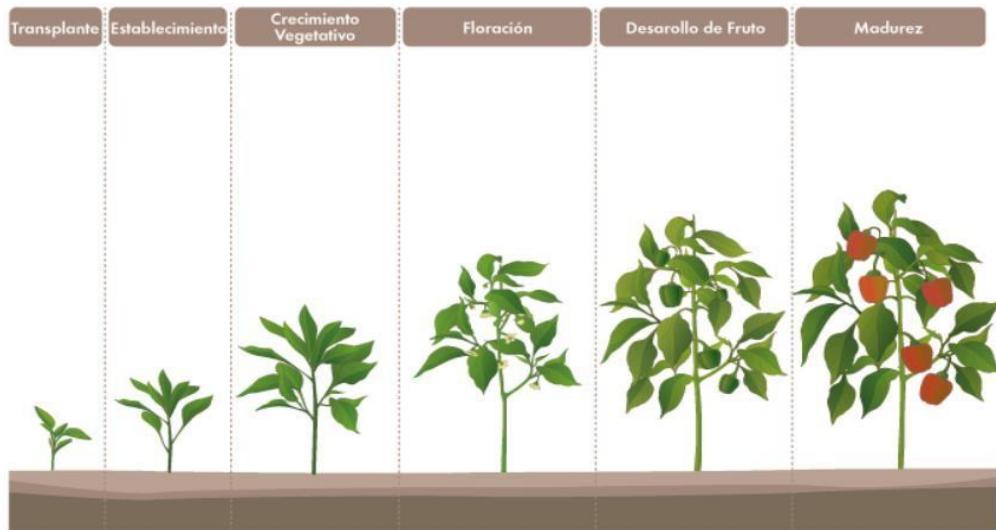
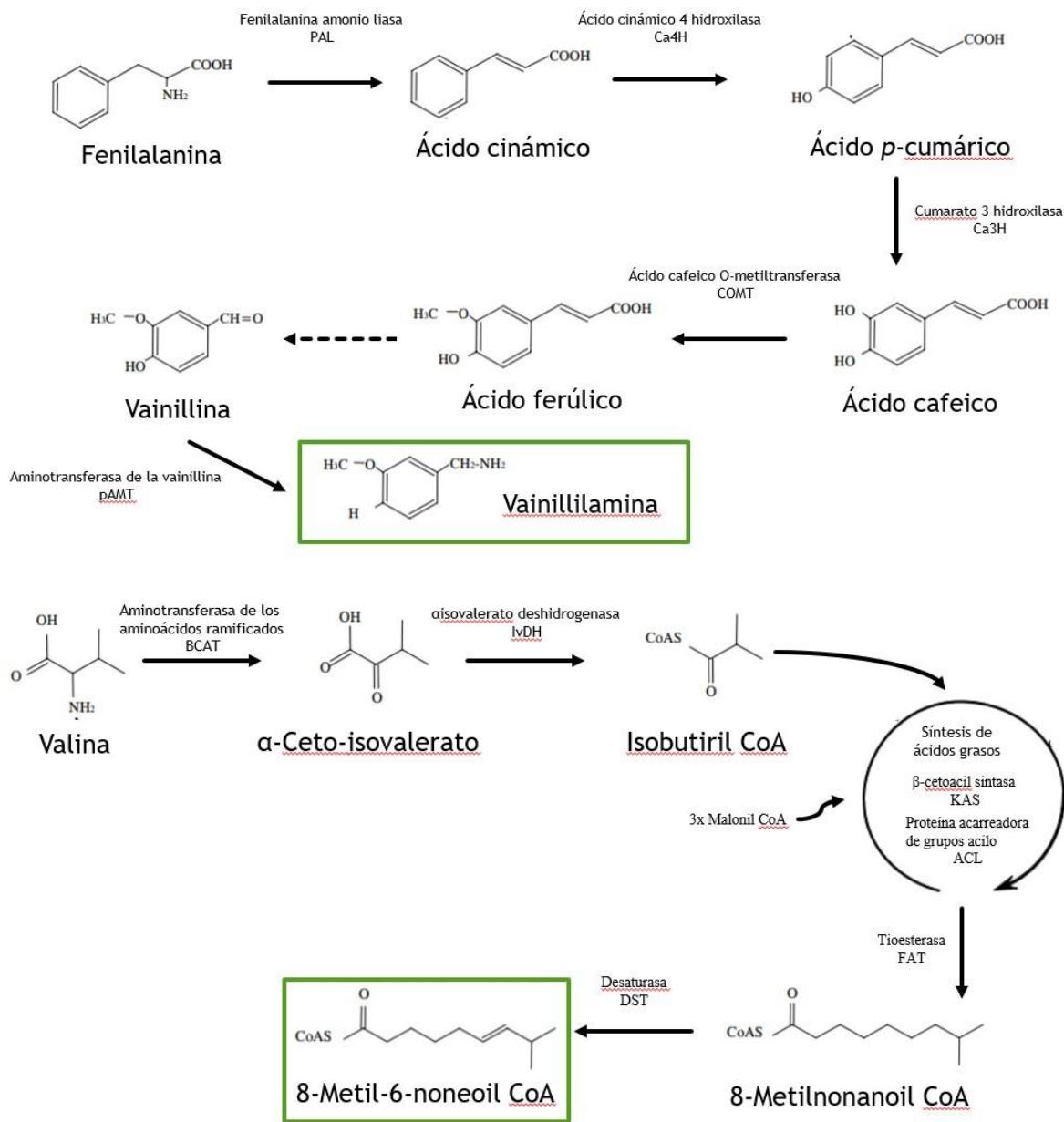


Figura 2. Etapas de crecimiento de *Capsicum annuum* L.

En México es un cultivo de alta relevancia, que usualmente se emplea en zonas con alto riesgo de sequía (Contreras, *et al.* 2018). Por ello es de interés estudiar y entender los mecanismos fundamentales que dan lugar a la tolerancia a la sequía por parte de los cultivos y en este sentido, este proyecto pretende generar conocimiento que permita acceder a alternativas de bajo costo, incluyendo aquellas que explotan la autodefensa de las plantas. Cabe resaltar que las plantas de chile incrementan la producción de capsaicinoides durante la experiencia de sequía (Phimchan, *et al.* 2012).

La capsaicina, junto con la dihidrocapsaicina son los capsaicinoides más abundantes, los cuales son producidos en los frutos de las plantas de chile. Están conformados por una porción fenólica unida a una cadena de ácido graso, en la Figura 3 se puede observar cómo se forma a partir de la ruta de la fenilalanina amonio liasa (Vázquez, *et al.* 2007).



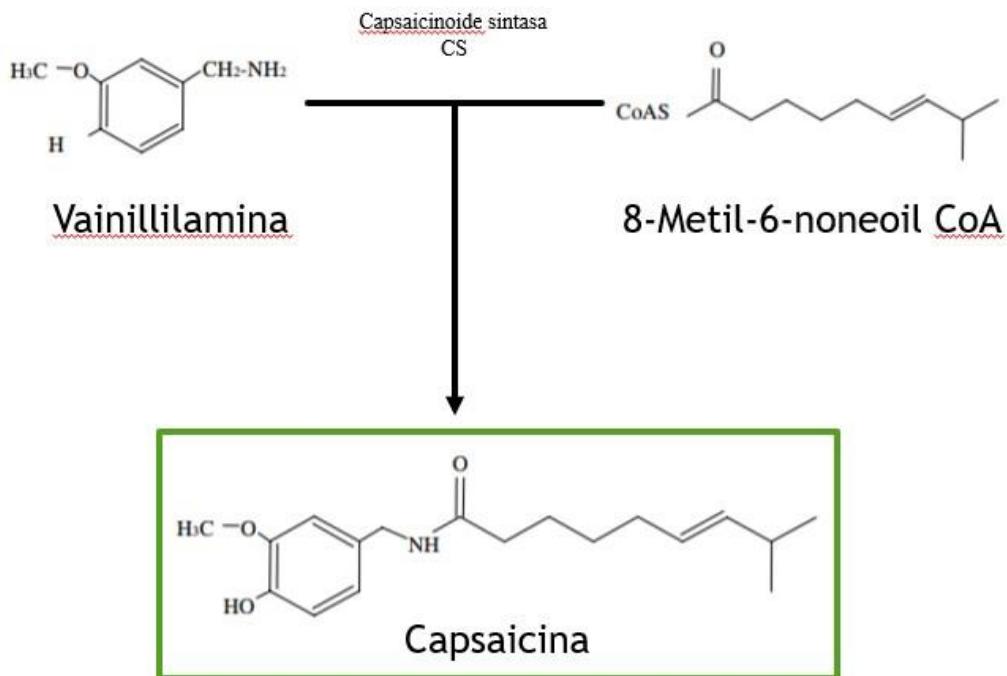


Figura 3. Ruta metabólica de la capsaicina.

### 1.7. Estado del arte en estresores en *C. annuum* L.

Se han realizado diversos estudios en *C. annuum* L para descubrir su respuesta a diferentes estímulos, como se puede observar en la Tabla 4.

Tabla 4. Estímulos aplicados en *Capsicum annuum* L con sus respectivos resultados.

Estímulo aplicado	Resultado obtenido	Referencia
Radiación UV-B.	Fructificación más rápida (1 semana antes). Aumento de contenido de flavonoides en las hojas. Aumento de expresión génica de <i>pal</i> y <i>chs</i> .	Rodríguez, et al. 2019

ADN fragmentado de patógenos de plantas.	Aumento del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. Aumento de expresión génica asociada a defensas de la planta.	Serrano, et al. 2021
Agua desinfectada con nanopartículas de Ag-TiO2.	Aumento en la eficiencia de producción del fruto.	Cordoba, et al. 2021
Emisiones acústicas relacionadas con estrés hídrico.	<p>Etapa vegetativa.</p> <p>Aumento de peroxidasa.</p> <p>Aumento de expresión génica de superóxido dismutasa y fenilalanina amoniaco liasa en estrés alto.</p> <p>Aumento de expresión génica de sintasa de chalcona en estrés medio.</p>	<p>Etapa de fructificación.</p> <p>Aumento de contenido de capsaicinas utilizando un patrón acústico relacionado a estrés por sequía.</p>

Entre los estímulos mencionados en la Tabla 4, se han realizado diversos experimentos con las emisiones acústicas, como se puede observar en la Tabla 5.

Tabla 5. Efectos de ondas acústicas en plantas.

Efecto de las ondas acústicas en plantas	Referencia
Raíces de <i>Zea mays</i> L se doblaron en dirección a las ondas acústicas.	Gagliano, et al. 2012

Diferentes emisiones acústicas afectan a la producción de poliaminas.	Qin, <i>et al.</i> 2003
Variación en diferentes enzimas antioxidantes como superoxidasa dismutasa, catalasa, peróxidasa y ascorbato peróxidasa.	Li, <i>et al.</i> 2008
Acumulación de ácido salicílico.	Choi, <i>et al.</i> 2017
Regulación positiva de genes en exposiciones prolongadas (1 a 2 horas).	Ghosh, <i>et al.</i> 2016

Además de los elicidores previamente mencionados, también se han realizado estudios con otros elicidores como campos magnéticos y eléctricos, sin embargo, aún faltan estudios para poder aplicar estos métodos de forma eficiente, además de requerir considerable equipo técnico (Dannehl, 2018).

De igual manera, el uso de agroquímicos y pesticidas para proteger los cultivos pueden causar efectos adversos al medio ambiente es preocupante, por lo cual se busca el uso eficiente de elicidores que permitan mejorar la tolerancia a sequía de los cultivos y mejorar su calidad de forma sostenible.

La intención del proyecto es aprovechar la ventaja que presentan elicidores como lo son el peróxido de hidrógeno y las ondas acústicas tal y como su fácil aplicación en cultivos, además de ser seguras para el medio ambiente, lo cual resulta en cultivos sostenibles.

## 2. Justificación.

La producción y consumo de *C. annuum* L ha incrementado a nivel mundial, resultando en una producción mundial estimada de 18-20 millones de toneladas de fruto fresco a partir de 1.5 millones hectáreas (Mardani, *et al.* 2017). Sin embargo, la limitación de suministro de agua ha afectado a diversos cultivos, en especial a *C. annuum* L. Cambios en las condiciones climáticas en los últimos años ha causado una mayor frecuencia en los periodos de exceso y déficit de agua (SEMARNAT,

2016), estas variaciones de condiciones climáticas afectan al crecimiento y rendimiento de estos cultivos y podrían tener repercusiones negativas en poblaciones nativas de plantas (Mohanta, *et al.* 2017).

La disminución de la disponibilidad de agua se ha convertido en un problema mundial, que afecta la economía global, agricultura local y el cambio climático ha causado eventos extremos como sequía. Particularmente para *C. annuum* L, un déficit mínimo de agua resulta en la reducción de rendimiento de cultivo, calidad y cantidad (Mardani, *et al.* 2017).

Aproximadamente el 70% del agua dulce a nivel global es utilizado para las actividades de agricultura. Para finales de marzo del año pasado (2021) se estimó que el 70% del territorio nacional se encontraba en estado de sequía, entre los estados mayormente afectados se encontraron los del norte y centro del país, con valores cercanos al 100% de su territorio. Encontrando a estados como Sonora y Sinaloa con un 80% y 90%, respectivamente, de superficie en estado de sequía severa y extrema (Breña, 2021).

Una sequía en 2009 resultó en una reducción del 1.6% de la superficie sembrada en comparación con el año previo, la escasez de agua resultó en la disminución de rendimiento, pasando de 15.6 toneladas por hectárea en 2008 a tan solo 14.1 toneladas por hectárea en 2009 (Flores, 2013).

Como se mencionó anteriormente, a nivel global se ha presentado una disminución de disponibilidad de agua (Mardani, *et al.* 2017). Por lo cual los niveles de producción de este cultivo se han vuelto cada vez más difíciles de mantener.

El interés y uso de estresores como elicidores ha incrementado debido a las ventajas que posee, estos pueden ser aplicados generalmente con la tecnología actual de riego, presentan menor riesgo ambiental al afectar directamente al cultivo y pueden ser una alternativa a los organismos genéticamente modificados (Thakur & Sohal, 2013).

La producción en México de *C. annuum* L ha aumentado en un 25% en la última década debido a su elevado valor comercial a nivel mundial, principalmente por sus

nutrientes y fitoquímicos, especialmente los capsaicinoides (Caicedo, *et al.* 2020). Es por ello que es de interés generar prácticas sustentables que mitiguen los efectos de sequía y que permitan a los cultivos producir una mayor cantidad de metabolitos secundarios de interés tal y como lo son las capsaicinas, carotenoides y flavonoides.

De igual manera es de interés encontrar los efectos de la combinación de elicidores y su efecto durante todo el ciclo de crecimiento del cultivo, así como elucidar si se pueden mantener las características fenotípicas de generación en generación.

### 3. Descripción del problema

La planta de *C. annuum* L. al ser una hortaliza es particularmente susceptible al déficit hídrico. Una vez que la cantidad de agua disponible disminuye más de un 30%, el cultivo comienza a disminuir su producción (Flores, 2013). De acuerdo con Ismail (2010), una disminución del 70% del riego en plantas de chile resulta en un ahorro del 85% del agua irrigada, sin embargo, también genera una disminución de la cosecha en un 40%. El ciclo del cultivo del chile normalmente es entre 100 y 120 días, en los cuales consumen aproximadamente 424 litros por planta y un potencial de rendimiento de frutos de 22.6 t/ha en promedio (Gómez, *et al.* 2010).

Se ha reportado que la aplicación de elicidores como el peróxido de hidrógeno puede resultar en la mitigación de los efectos del déficit hídrico (Sohag, *et al.* 2020) y en el incremento de la producción de enzimas antioxidantes (Hossain, *et al.* 2015). De igual manera, se ha informado que la aplicación de ondas acústicas genera un aumento en la expresión de genes relacionados a actividad antioxidante como la peroxidasa, superóxido dismutasa y fenilalanina amonio liasa; así como una mayor producción de capsaicinas y resistencia al déficit hídrico (Caicedo, *et al.* 2021).

Por otro lado, el uso de elicidores como el quitosano, ácido salicílico y cloruro de calcio de forma individual y en diferentes combinaciones, han resultado, inclusive, en un efecto sinérgico de eustrés (Ahmed, *et al.* 2021).

De igual forma, el uso de elicidores ha resultado en fenotipos transgeneracionales al generar estrés (Alonso, *et al.* 2018). Además, se ha reportado que la aplicación de elicidores como el ácido jasmónico y el virus del mosaico del tabaco producen un efecto transgeneracional que aumenta las defensas de la planta (Holeski, *et al.* 2012). Estos efectos transgeneracionales se pueden dar debido a efectos como la metilación del ADN o a la modificación de las histonas, la cual se puede dar por acetilación (Holeski, *et al.* 2012).

La combinación de diferentes elicidores en consecuencia debería generar un efecto sinérgico o aditivo en plantas como el chile para aumentar la producción de compuestos de interés y resistencia al déficit hídrico.

El reto consiste en determinar si el uso combinado de elicidores como el peróxido de hidrógeno y las ondas acústicas podría resultar en un efecto sinérgico o aditivo respecto al incremento de la producción de compuestos de interés, así como la resistencia al déficit hídrico. De igual manera, es importante determinar si se presentan características heredables en la siguiente generación.

#### 4. Antecedentes.

##### 4.1. Elicitores.

Diversos autores han descrito que las plantas responden a la presencia de elicidores mediante la activación de mecanismos de defensa en la superficie de la membrana plasmática (Figura 4). Esto incluye la inducción de proteínas relacionadas a patogenicidad y enzimas de protección a estrés oxidativo, respuestas hipertensivas, caracterizadas por una muerte celular rápida en la vecindad inmediata del lugar de exposición al patógeno, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), la activación

de la biosíntesis *de novo* de factores de transcripción, que regulan directamente la expresión de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios (Baenas, *et al.* 2014).

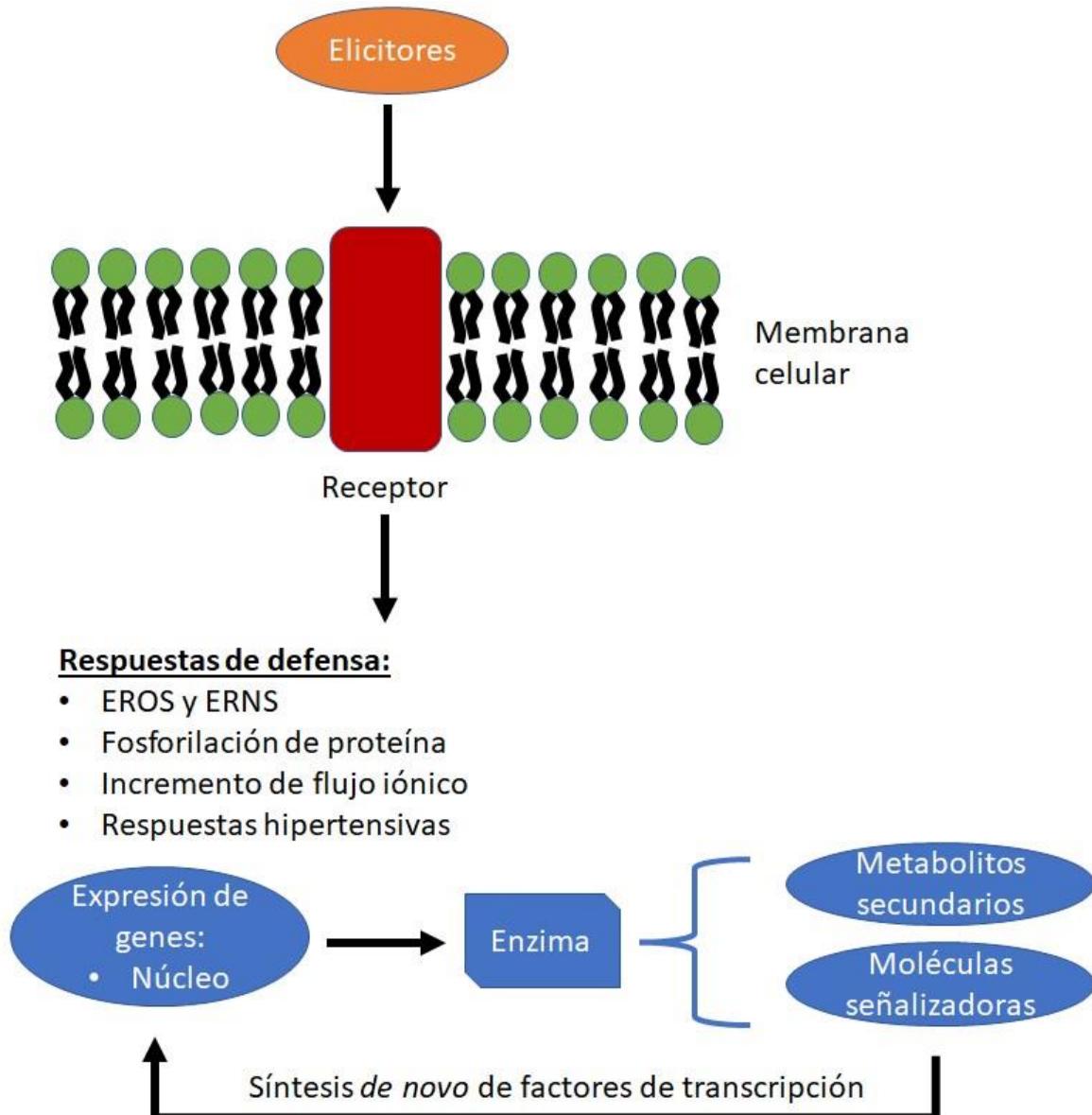


Figura 4. Efecto de elicidores (Baena, *et al.* 2014).

#### 4.2. Peróxido de hidrógeno.

En investigaciones previas se ha reportado que la aplicación controlada de peróxido de hidrógeno resulta en un aumento de tolerancia a sequía en diferentes cultivos, es posible que su aplicación en *C. annuum* L resulte en una tolerancia similar. De manera adicional, la aplicación de ondas acústicas ha demostrado el aumento del contenido total de capsaicina en los frutos.

El peróxido de hidrógeno es una molécula ERO producida durante el metabolismo aeróbico y que funciona como un señalizador de estrés oxidativo, lo cual enciende cascadas de señalización para que el organismo responda al estrés (Mejía-Teniente, *et al.* 2013). Al ser uno de los primeros compuestos producidos en respuesta a diversos estímulos y a su participación en mecanismos de tolerancia, esta molécula juega un papel importante en mecanismos de respuesta al estrés (Peralta y Volke, 2012). En la Figura 5 se puede observar cómo se genera y procesa el peróxido de hidrógeno.

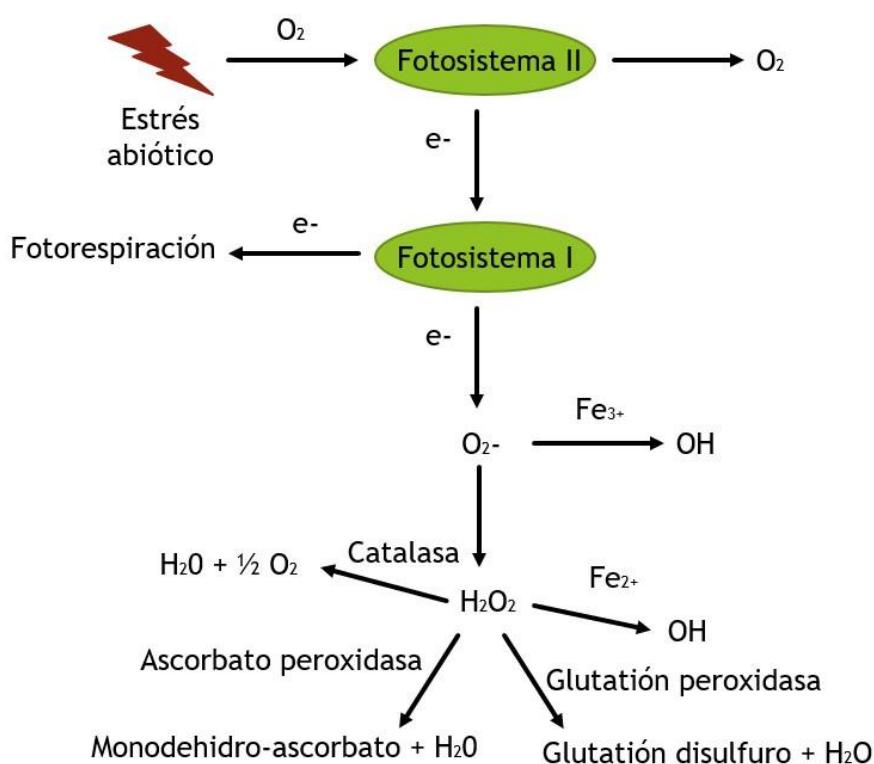


Figura 5. Producción de peróxido de hidrógeno por estrés abiótico y su procesamiento en plantas (Peralta y Volke, 2012).

En las células vegetales, entre los antioxidantes más importantes para la regulación de los ERO, se encuentran el ascorbato, el glutatión, flavonoides, carotenoides, entre otros (Apel & Hirt, 2004). Tanto los carotenoides como los flavonoides neutralizan los ERO  $H_2O_2$ , OH y  $O_2$ . El peróxido de hidrógeno aplicado de forma exógena aumenta la tolerancia a estrés abiótico en diversas plantas (Banerjee y Roychoudhury, 2019).

La aplicación de peróxido de hidrógeno exógeno a una concentración de 10 mmol resultó en la disminución de la inhibición de crecimiento inducida por sequía, a comparación de cultivos tratados con estrés hídrico, sin la aplicación de peróxido de hidrógeno. También se disminuye la concentración de  $H_2O_2$  endógeno al aplicar  $H_2O_2$  de forma exógena (Sohag, *et al.* 2020).

El  $H_2O_2$  aplicado de forma exógena, aumenta la actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de prolina, al mismo tiempo, disminuye la actividad de la prolina deshidrogenasa, la cual es una enzima clave para la degradación de la prolina, (Yang, *et al.* 2009). La prolina es utilizada por la planta para mantener un balance osmótico y contrarrestar un bajo potencial de agua. De igual manera, la prolina es indispensable para la síntesis de proteínas y para el desarrollo de la planta, así como la disminución de los efectos dañinos producidos por los ERO como el peróxido de hidrógeno (Furlan, *et al.* 2020).

#### 4.3. Emisiones acústicas.

Las plantas son capaces de incrementar su resistencia a estrés biótico como el provocado por insectos. Las vibraciones de sonido causados por insectos masticando a la planta, disparan la producción de antocianina y glucosinolato, que fungen como una defensa contra depredadores de la planta (Fernandez-Jaramillo, *et al.* 2018).

Xiujuan y colaboradores (2003) sugirieron en una investigación que genes inducidos por estrés podían ser encendidos bajo el efecto de la estimulación por sonido. De acuerdo con Gagliano (2012), a partir de 60 dB, el nivel de presión de sonido es suficiente para eliciar estructuras biológicas, sin embargo, la mayoría de los estudios realizados elicitan plantas a mayores intensidades de presión.

Las emisiones acústicas pueden ser utilizadas como indicadores de estrés hídrico en plantas en respuesta a cambios ambientales. Se ha determinado que las plantas presentan una sensibilidad selectiva de frecuencia ya que estas pueden crecer y orientarse a una fuente que genere una emisión acústica de 200 a 300 Hz. De igual manera, pueden detectar frecuencias como las de los insectos (de 500 a 2000 Hz) lo cual incrementa su contenido de glucosinolato. Estas emisiones acústicas pueden inducir diversos mecanismos de respuesta, tal y como la tolerancia a sequía y la producción de compuestos bioactivos (Caicedo, *et al.* 2021).

En otra investigación se reporta que la aplicación de ondas acústicas de baja frecuencia relacionadas a estrés hídrico medio y alto en *C. annuum* L resulta en una regulación positiva de los genes *pal* y *sod*, así como una regulación negativa de un gen de acuaporina *capip-1*. También se observó un incremento en la acumulación de prolina, así como un aumento de capsaicinas, sugiriendo que se debe a una regulación de transcripción positiva de genes esenciales para la biosíntesis de capsaicinas (*at3* y *kas*) (Caicedo, *et al.* 2021).

#### 4.4. Combinación de elictores.

Existen reportes donde se ha demostrado que la combinación de varios estímulos resulta en efectos de adición y / o sinérgicos en la acumulación de transcripción de proteínas y tolerancia a estrés. Uno de estos reportes es el mencionado por Sáenz y colaboradores, en donde se demuestra que la aplicación de radiación UV-B y peróxido de hidrógeno en la planta del tabaco resulta en plantas más pequeñas con mayor concentración de flavonoles en el tejido foliar debido a la

transcripción de chalcona sintasa. De igual manera se reportó un efecto sinérgico en la acumulación de transcripción de *nac13* y *bes1* (Sáenz-de la O, *et al.* 2021).

#### 4.5. Características fenotípicas heredables.

Las plantas responden a condiciones ambientales no sólo con cambios a su propio desarrollo y fisiología, sino también cambiando el fenotipo expresado por su descendencia. Efectos transgeneracionales adaptables pueden ser transmitidos mediante diversos mecanismos, incluyendo cambios en recursos de semilla y bioquímica, y modificaciones epigenéticas tal y como la metilación del ADN, la cual puede persistir a través de múltiples generaciones (Herman & Sultan, 2011).

En investigaciones previas se ha reportado que plantas bajo estrés sufren cambios tanto fisiológicos como genómicos. Estos cambios por respuesta al estrés pueden ser reversibles, sin embargo, en algunos casos estas modificaciones, incluyendo fenotipo y epigenética, pueden heredarse a las siguientes generaciones (Brachi, *et al.* 2012).

Investigaciones previas sugieren que cambios transgeneracionales en respuesta a estrés podrían incluir diferencia de expresión de genes involucrados en la reparación del ADN, regulación de la estructura de cromatina, y la metilación del ADN. Se ha reportado que la descendencia de plantas expuestas a estrés de sal, mostraron hipermetilación de promotores y disminuyeron la expresión de diversos genes (Bilichak, *et al.* 2012).

Se han realizado investigaciones que confirman que el peróxido de hidrógeno tiene un alto impacto en la metilación de la citosina del ADN. El impacto fue observado en genes de metabolismo energético, transporte molecular, censado, y de señalización relacionado al calcio y reparación de ADN. Lo cual indica que el peróxido de hidrógeno es un compuesto clave en el proceso biológico con una significancia molecular a nivel epigenético (Villagómez-Aranda, *et al.* 2021).

Así mismo, se han realizado investigaciones que confirman una hipometilación en plantas al aplicar una combinación de los elicidores peróxido de hidrógeno y quitosano. Esto provocó cambios en la producción de diferentes compuestos bioactivos, lo cual sugiere una relación entre el estrés causado por estos elicidores y cambios epigenéticos en el genoma de la planta. De igual manera, debido a que en ese experimento no existieron factores de inducción que causaran mutaciones en la secuencia del genoma, es altamente probable que dichos cambios en el metabolismo se deban exclusivamente a cambios en la metilación del ADN (González-Chavira, *et al.* 2018).

#### 4.6. MAPquininas.

Una red de señalización de alta importancia es la de cascada de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), la cual está comprendida en orden jerárquico por: MAPKKK, MAPKK y MAPK (Smékalová, *et al.* 2014).

Mientras existen diversas MAPquininas caracterizadas en diferentes especies de plantas, hay poca información y experimentación en *C. annuum*. Estudios han caracterizado dos MAPquininas que son inducidas al causar una herida, por UV-C y tratamientos de frío (Smékalová, *et al.* 2014).

Adicionalmente, otro grupo identificó 19 genes de MAPquininas y 5 genes de MAPquininas quinasas (MAPKK); se observaron diferentes transcripciones en diferentes órganos y en la respuesta de *C. annuum* a diferentes estresores bióticos y abióticos, significando que las MAPquininas pueden tener importancia en la regulación del crecimiento, desarrollo y respuesta a estrés de *C. annuum* (Liu, *et al.* 2015).

### 5. Hipótesis

La aplicación combinada de ondas acústicas relacionadas a estrés hídrico y de  $H_2O_2$  sobre la planta *C. annuum* L., como elicidores, producirá un efecto de eustrés reflejado en las variables de crecimiento y desarrollo, así como en la producción de capsaicina, manteniendo estas características en al menos una generación.

## 6. Objetivos

### 6.1. Objetivo general:

Determinar si la combinación de emisiones acústicas relacionadas a estrés hídrico medio (MHAF) y  $H_2O_2$  generan un efecto sinérgico o aditivo sobre el crecimiento y desarrollo, y efecto de eustrés respecto a la producción de metabolitos y expresión de genes en plantas de *Capsicum annuum* L y si este es heredable.

### 6.2. Objetivos específicos:

- a) Determinar los decibeles de emisiones acústicas que presentan aumento en las variables de crecimiento y desarrollo de *Capsicum annuum* L. en cultivo hidropónico en sustrato sólido inerte.
- b) Elucidar el efecto combinado de  $H_2O_2$  y ondas acústicas de *Capsicum annuum* L. en cultivo hidropónico en sustrato sólido inerte en las variables de crecimiento y desarrollo.
- c) Determinar si en la generación F1 de las plantas de *Capsicum annuum* L. previamente tratadas, se mantienen características de la generación F0.

## 7. Metodología

En la Figura 6 se puede observar un esquema general del cultivo que se realizó en los experimentos, con las variables a medir, adicionalmente a esto se tomaron las semillas del experimento del segundo objetivo para obtener una generación F1.

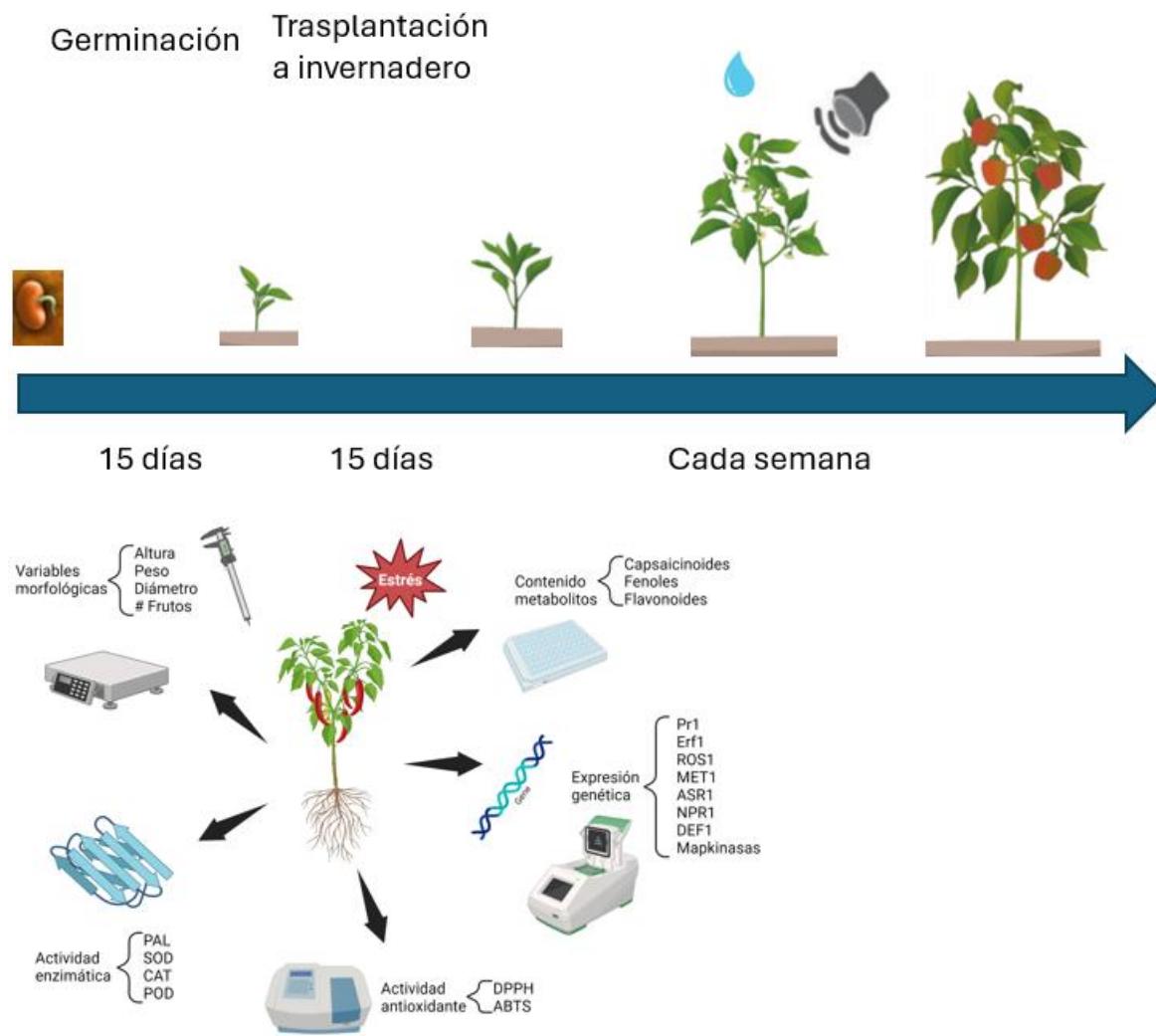


Figura 6. Esquema general de la metodología.

7.1. Determinación de decibeles de emisiones acústicas con mayor bioestimulación en cultivo de *C. annuum* L.

7.1.1. Cultivo de *C. annuum* L.

Se utilizaron semillas de chile serrano (*C. annuum*) (Starseeds, Puebla, México), las cuales se sumergieron en agua durante 24 horas antes de sembrarlas en una charola con 200 pozos. El sustrato utilizado para la siembra consistió en 70% peat-moss y 30 % vermiculita. Las semillas fueron regadas con agua hasta mantener los pozos a capacidad de campo. La charola fue cubierta con una charola vacía hasta que las semillas empezaron a germinar, para este punto, la cubierta de la charola se removió.

La charola con plántulas se colocó en un invernadero con un sistema automático de riego en donde se regaron tres veces al día. Un mes después, las plántulas se trasplantaron a bolsas individuales de plástico con un sustrato compuesto de 60% tezontle, 15% arenilla y 25% peat-moss.

Las bolsas con plántulas se transfirieron a un invernadero con tres canaletas con 20 bolsas cada una. Las canaletas estaban separadas de tal forma que cada una recibió un diferente valor de dB. El canal con el tratamiento con 72.5 dB se encontraba a 240 cm del canal de 80 dB y 120 cm del canal de 69 dB (Figura 7).

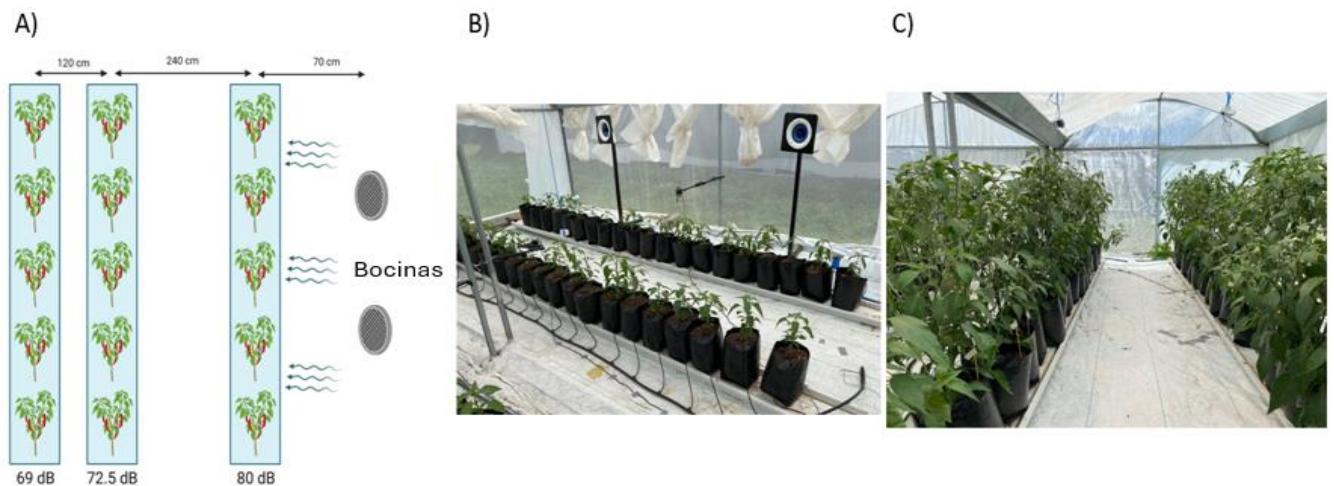


Figura 7. A) Distribución de los canales de *C. annuum* en el invernadero con las bocinas para la aplicación de tratamientos. B) Bocinas en el invernadero. C) Fenotipo típico de plantas de *C. annuum*, a la izquierda tratamiento de 72.5 dB y de 69 dB a la derecha.

El invernadero contaba con un sistema automático de irrigación en donde las plantas eran regadas con una solución Steiner (Steiner, 1961). El invernadero se ubicó en la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala, El Marqués, Querétaro, México ( $20^{\circ} 70' 55.3''$  N,  $100^{\circ} 25' 93.09''$  Q). Las condiciones ambientales registradas en el invernadero durante el estudio fueron una temperatura de  $26.7 \pm 3.7$  °C, humedad relativa de  $34.8 \pm 8.3\%$ , concentración de dióxido de carbono de  $247.2 \pm 82.6$  ppm, y radiación fotosintética de  $476 \pm 100.6$   $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

#### 7.1.2. Aplicación de emisiones acústicas.

Se colocaron dos bocinas (Yamaha, NS-IC 600) (120 W, respuesta de frecuencia 65 Hz – 28 kHz) de forma perpendicular a una de las canaletas. Se usaron dos bocinas de tal forma que se mantuviera homogénea la intensidad de la emisión acústica a lo largo de toda la canaleta (Figura 7). Se utilizó un sonómetro (EXTECH

SL510) para medir los dB recibidos en cada canaleta, así como para comprobar que el tratamiento fuera homogéneo a lo largo del canal.

Las emisiones acústicas utilizadas fueron obtenidas de un estudio realizado por Caicedo-Lopez, *et al.* (2021) y las frecuencias acústicas de *C. annuum* elegidas fueron las asociadas a estrés hídrico medio (Archivos de sonido de mayor amplitud Mp3: 240 Hz, 320 Hz, 480 Hz, 525 Hz; rango de velocidad de amplitud: 0.0254-1.13 mm . s<sup>-1</sup>). Se decidió usar estas frecuencias debido a que, en dicho estudio, fueron las emisiones acústicas con mejores resultados de respuesta de indicadores de tolerancia a estrés hídrico y respuesta a estrés en general.

Los canales se encontraban alejados de las bocinas de tal forma que el de 80 dB se encontraba a 70 cm de distancia, el de 72.5 dB a 310 cm y el de 69 dB a 430 cm de distancia (Figura 7). El ruido ambiental registrado afuera del invernadero durante el estudio se encontraba entre los 20 dB y 36 dB. Para el grupo control, cinco plantas de cada canal fueron seleccionadas aleatoriamente y removidas del invernadero durante la aplicación del tratamiento, una vez concluida la aplicación se regresaban a sus respectivos canales. La aplicación de tratamientos tuvo una duración de 20 minutos cada semana durante seis semanas a las 11:00 GMT-6.

#### 7.1.3. Medición de variables morfológicas.

Después de cada aplicación, se registraron las mediciones morfológicas de cada planta. Para la medición de la altura se utilizó una regla metálica, tomando la medida desde la base del tallo hasta la punta de la hoja más elevada de la planta. El ancho del tallo se registró con la ayuda de un Vernier digital. Al final del cultivo se registró el número de frutos de chile de cada individuo. Después de la última aplicación, se seleccionaron al azar hojas y frutos de cada planta, los cuales fueron congelados con nitrógeno líquido para resguardar las muestras a -40 °C para su posterior análisis.

#### 7.1.4. Ensayos enzimáticos.

Para la preparación de extractos enzimáticos, se maceraron muestras de hojas con un mortero y pistilo, con la ayuda de nitrógeno líquido. Posteriormente se pesaron 0.3 g de muestra macerada y se colocaron en tubos Eppendorf, uno diferente para cada muestra.

Se prepararon los extractos enzimáticos para fenil alanina amonio liasa (PAL) al añadir 1 ml de buffer de extracción (Borato 0.1 M, 0.1% v/v 2-mercaptoetanol, pH 8.8) en los tubos Eppendorf con muestra macerada como fue descrito por Toscano *et al.* (2018). Para los extractos enzimáticos de superóxido dismutasa (SOD) se añadió 1 ml de buffer de extracción (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 M, pH 7.8) a cada muestra como fue descrito por Hayat *et al.* (2018). Para la enzima catalasa (CAT) se añadió 1 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM, glicerol 20% v/v, 2-mercaptoetanol 30 mM, pH 8.0) a cada muestra como fue descrito por Afiyanti & Chen (2014).

Una vez que cada muestra se mezcló con sus respectivos buffers de reacción, los tubos se agitaron con un vortex durante dos minutos y posteriormente fueron centrifugados a 13 685 x g y 4 °C por quince minutos. Una vez concluido el proceso, el sobrenadante de cada muestra se transfirió a un tubo nuevo respectivamente y se mantuvo a 4 °C hasta su uso para el ensayo enzimático.

Se realizó una curva de calibración para el ensayo enzimático PAL utilizando ácido cinámico, utilizando una longitud de onda de 290 nm para determinar su absorbancia. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pozos, en donde se mezclaron 230 µl de buffer de reacción (Borato 0.1 M, L-fenilalanina 10 mM, pH 8.8) con 20 µl de muestra del extracto de PAL, por triplicado, y se incubó por 60 minutos a 40 °C. Posteriormente se añadieron 50 µl de HCl 1 N a cada pozo y se dejó en reposo por 10 minutos para detener la reacción. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, MULTISKAN Sky High) a una longitud de onda de 290 nm (Toscano, *et al.* 2018).

Para los ensayos enzimáticos de SOD se utilizaron tubos Eppendorf de 2 ml. Cada muestra consistió en una mezcla de 0.75 ml de buffer de reacción ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 M, pH 7.8), 0.15 ml de EDTA 0.1 mM, 0.15 ml de metionina 0.13 M, 0.15 ml de NBT 0.75 mM, 0.15 ml de riboflavina 0.02 mM, 0.075 ml de extracto enzimático de la muestra y 0.075 ml de agua destilada. Las muestras se mezclaron por inversión y se expusieron de forma homogénea a luz durante 30 minutos. Posteriormente para cada muestra se tomaron 300  $\mu\text{l}$  por triplicado y se colocaron en pozos de una microplaca, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 560 nm (Hayat, *et al.* 2018).

Se realizaron los ensayos para CAT siguiendo la metodología reportada por Hadwan (2018), con modificaciones para ser realizadas en una microplaca y una longitud de onda alternativa para el tipo de tejido vegetal que se analizó. Se prepararon y mezclaron tres soluciones para formar una solución de trabajo. La primera solución fue de cobalto (II), preparada con 253.5 mg de  $\text{CO}(\text{NO}_3)_2$  en 12.5 ml de agua destilada. La segunda solución fue una solución de sal de Graham, preparada con 125 mg de  $(\text{NaPO}_3)_6$  en 12.5 ml de agua destilada. La tercera solución (de bicarbonato de sodio) consistió en 11 250 mg de  $\text{NaHCO}_3$  en 125 ml de agua destilada. La solución de trabajo se preparado mezclando primero 6.25 ml de la solución de cobalto (II) con 6.25 ml de la solución de sal de Graham, una vez homogeneizada la mezcla, se añadieron 112.5 ml de la solución de bicarbonato de sodio. Adicionalmente se realizó una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM con un buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.0).

Para llevar a cabo los ensayos de CAT, se realizaron diferentes reacciones. Para las muestras se mezclaron 75  $\mu\text{l}$  del extracto enzimático con 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; para el estándar se mezclaron 75  $\mu\text{l}$  de agua destilada con 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; y para el blanco se usaron 225  $\mu\text{l}$  de agua destilada. Posteriormente cada tubo fue agitado en vortex y en seguida mantenido a 37 °C por 2 minutos. Posteriormente se adicionaron 900  $\mu\text{l}$  de solución de trabajo recién preparada a cada uno de los tubos, se agitaron por vortex durante 5 segundos y se mantuvieron a temperatura ambiente en oscuridad durante 10 minutos. Finalmente se transfirieron 300  $\mu\text{l}$  de cada tubo

por triplicado a los pozos de la microplaca y se obtuvieron los valores de absorbancia a una longitud de onda de 640 nm (Hadwan, 2018).

Para cada uno de los extractos enzimáticos se realizó un ensayo de proteína siguiendo el método descrito por Bradford (1976). La curva de calibración se preparó usando diferentes concentraciones de suero de albumina bovina, tomando los valores de absorbancia con una longitud de onda de 595 nm. El ensayo se llevó a cabo mezclando 20  $\mu$ l de extracto enzimático con 230  $\mu$ l de reactivo de Bradford en un pozo de microplaca, por triplicado para cada extracto enzimático. Las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 20 minutos y posteriormente se obtuvo su absorbancia a 595 nm.

#### 7.1.5. Cuantificación de capsaicinoides.

Se utilizaron dos métodos para la cuantificación de capsaicinoides, un método espectrofotométrico y otro por cromatografía de gases masas.

Para el método espectrofotométrico se siguió el método reportado por González-Zamora *et al.* (2015). La extracción de capsaicina se realizó utilizando frutos de chile recolectados de forma aleatoria de plantas de cada tratamiento y del control. Las muestras se molieron con una licuadora y posteriormente se liofilizaron. Para la extracción, se transfirieron 200 mg de muestra liofilizada para cada tratamiento a un tubo falcon de 50 ml, resuspendiendo las muestras en 10 ml de acetonitrilo. Las muestras fueron sonicadas durante 3 horas en un baño de agua a 60 °C y se agitaron en vortex cada 30 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 6082 x g por 10 minutos a 4 °C. Se filtró el sobrenadante con filtros con poros de 0.45  $\mu$ m y finalmente las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis.

Para el método de gases masas, las muestras congeladas se liofilizaron y maceraron en un mortero de cerámica con ayuda de un pistilo. Posteriormente, una masa de muestra en polvo se extrajo con acetonitrilo (1:20; p/v) y colocado en un baño ultrasónico a 30 °C durante 3 horas. Las muestras se transfirieron a una placa

con agitación orbital a 7 x g por 12 horas y posteriormente centrifugadas a 12000 x g a 10 °C por 10 minutos. Se repitió el procedimiento de extracción con acetonitrilo (1:10; p/v), y los sobrenadantes fueron recolectados y secados bajo un corriente de nitrógeno ( $N_2$ ).

Una vez secos los extractos, se resuspendieron en 200  $\mu$ l de acetonitrilo, se centrifugaron a 12000 x g a 10 °C por 10 minutos y analizaron por cromatografía de gases en un cromatógrafo Agilent 5975 equipado con un detector de masas cuádruple (Agilent, 5975C) con la energía de electrones establecida a 70 eV y un rango de masa de  $m z^{-1}$  50-700. Una columna HP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m) se utilizó para la separación. La temperatura inicial del horno fue de 90 °C y se mantuvo por 1 minuto, para aumentar la temperatura a 210 °C a una tasa de 12 °C  $min^{-1}$ , manteniéndola por 1 minuto, para volver a aumentar la temperatura hasta 290 °C a una tasa de 4 °C  $min^{-1}$ , manteniéndola por 1 minuto, finalmente se aumentó la temperatura a 310 °C a una tasa de 20 °C  $min^{-1}$ . La temperatura del inyector fue de 250 °C y el volumen de inyección fue de 2  $\mu$ l. Se utilizó helio (He) como el gas acarreador con una tasa de flujo de 1.2 ml  $min^{-1}$  y una tasa de separación de 1:1.

El espectro de masa se comparó con la base de datos de referencia estándar (NIST 11) para tentativamente identificar capsaicinoides. Se cuantificaron capsaicina y dihidrocapsaicina utilizando una curva de calibración estándar de 7 puntos con acetonitrilo como solvente. Elución de capsaicinoides cercanos fueron semi cuantificados, utilizando un factor de respuesta de dihidrocapsaicina (Malm, *et al.* 2021).

#### 7.1.6. Contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante.

Se realizaron extractos con 150 mg de muestra de hoja y macerando con ayuda de nitrógeno líquido, posteriormente se transfirió la muestra a un tubo Eppendorf y se adicionaron 1.5 ml de etanol al 80%. Las muestras se sonicaron por 3 minutos y

se centrifugaron a 9503 x g por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se mantuvo a 4 °C en oscuridad hasta su posterior análisis.

Se siguió el método de Folin-Ciocalteu descrito por Dewanto *et al.* (2002) para realizar la determinación de fenoles totales. La curva de calibración se realizó con ácido gálico, en donde se transfirieron 200 µl de las mezclas a los pozos de una microplaca, leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm.

Para la determinación de flavonoides se siguió el método descrito por Oomah *et al.* (2005). La curva de calibración se realizó con diferentes concentraciones de rutina, de 2 a 200 µg ml<sup>-1</sup>. Para el ensayo de las muestras, se mezclaron 50 µl de extracto con 180 µl de agua destilada y 20 µl de borato 2-aminoetildifenil 1% en pozos de microplaca, los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y la absorbancia se midió a 404 nm.

Se utilizaron los ensayos de DPPH y ABTS para evaluar la capacidad antioxidante de los extractos. La determinación por DPPH se realizó con la metodología descrita por Fukumoto & Mazza (2000), por lo cual se preparó la solución de DPPH sonicando por 10 minutos, 1.5 mg de DPPH en 25 ml de metanol, cubriendo la mezcla con aluminio para mantenerlo en oscuridad. El ensayo se realizó por triplicado, mezclando 20 µl de muestra con 200 µl de DPPH en los pozos de microplaca, leyendo la absorbancia a 520 nm después de 30 minutos.

El ensayo con ABTS se realizó mezclando 230 µl de ABTS, previamente preparado (12 horas antes), con 20 µl de muestra en pozos de microplaca. El ensayo se realizó por triplicado y después de 30 minutos se registró la absorbancia a 734 nm. Se siguió la metodología de Nenadis *et al.* (2004).

#### 7.1.7. Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno.

La cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Junglee *et al.* (2014). Se maceraron muestras de tejido de hoja con ayuda de

nitrógeno líquido y mortero para obtener los extractos. Se transfirieron 150 mg a un tubo Eppendorf y se homogeneizo con 1 ml de una solución conteniendo 0.25 ml de TCA (0.1% w:v), 0.5 ml de KI 1 M, y 0.25 ml de un buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM. Posteriormente se centrifugo a 12 000 x g por 15 minutos a 4 °C. Para cada muestra y por triplicado, se transfirieron 200  $\mu\text{l}$  a un pozo de la microplaca y se dejó incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. La curva de calibración se obtuvo utilizando soluciones estándar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  preparadas en 0.1% de TCA. La absorbancia de las muestras se midió a 350 nm.

#### 7.1.8. Expresión relativa génica de *cawrky*, *pr1a* y *erf1*.

Se realizó un análisis de expresión génica de los genes *cawrky*, *pr1a* y *erf1*, lo cual se determinó extrayendo ARN de tejido de hoja con ayuda del protocolo de Trizol (Thermo Fisher). Se mezclaron 100 mg de muestra, previamente macerada con nitrógeno líquido, con 1 ml de reactivo Trizol y se agitó con vortex por 2 minutos. Posteriormente se mantuvo a temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada muestra, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se agitó gentilmente por 15 segundos, manteniendo las muestras a temperatura ambiente y en reposo por 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 16 061 x g por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se mezcló con 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol frío, manteniendo las muestras a temperatura ambiente por 15 minutos para ser centrifugadas a 16 061 x g por 10 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se añadió a cada muestra 1 ml de etanol frío al 75%, se mezcló ligeramente y se centrifugó a 11 921 x g por 5 minutos a 4 °C, esto se realizó dos veces. Posteriormente se volvió a remover el sobrenadante y se dejó secar, una vez seco, se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de buffer TE y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis.

La síntesis de cADN (ADN complementario) se realizó con el kit “Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR” (Thermo Fisher). Las muestras de ARN

previamente extraídas se ajustaron para tener los mismos niveles de concentración. Se utilizaron 500 ng de muestra de ARN para la reacción. La reacción se incubó por 10 minutos a 25 °C, seguido por otra incubación de 15 minutos a 50 °C. La reacción concluyó con un calentamiento de 85 °C por 5 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Para realizar PCR cuantitativa (qPCR), se utilizó el kit “Maxima SYBR Green qPCR Master Mix Kit” (Thermo Fisher). Se mezclaron 500 ng de cADN de las muestras previamente preparadas con los reactivos mencionados por el protocolo del kit, con modificaciones al protocolo de la qPCR. La desnaturación inicial se realizó a 95 °C por 3 minutos, seguido de una desnaturación a 95 °C por 30 segundos, el paso de recocido se realizó a 58 °C por 30 segundos y la fase de extensión fue a 72 °C por 1 minuto. Los pasos de desnaturación, recocido y extensión se repitieron por 60 ciclos. La reacción se llevó a cabo con un termociclador de tiempo real (CFX96 Real-Time System Bio-Rad). Los datos obtenidos se trajeron del equipo y se transfirieron a una computadora para su posterior análisis. Los cebadores utilizados (Tabla 6) fueron sintetizados por T4 Oligo (Irapuato, México) para determinar la expresión génica relativa de *cawrky*, *pr1a* y *erf1*. Se utilizó un gen de *actina* como gen constitutivo para calcular la expresión relativa.

Tabla 6. Secuencias de cebadores utilizados en el estudio.

Nombre de cebador	Secuencia de cebador 5' – 3'
PR1a-F	GCCAAGCTATAACTACGCTAAC
PR1a-R	GCAAGAAATGAACCACCATCC
ERF1-F	CGCGTAATGGAATTAGGGTTG
ERF1-R	CCTCATTGATAATGCGGCTTG
ACTIN-F	TGCAGGAATCCACGAGACTAC
ACTIN-R	TACCACCACTGAGGCACAATGTT
caWRKY-F	AATGTTGCGTTGGTGGCTCG
caWRKY-R	AACTCCGTTCTTGTACCGC

### 7.1.9. Análisis estadístico.

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando ANOVA, seguido de una prueba de t-Student ( $\alpha=0.1$ ) para datos paramétricos, para datos no paramétricos (expresión génica relativa) se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graphpad (Prism 10.5.0).

## 7.2. Efecto combinado de peróxido de hidrógeno y emisiones acústicas en cultivo de *C. annuum* L.

### 7.2.1. Cultivo de *C. annuum* L.

Se sembraron semillas de chile serrano (*C. annuum*) (Starseeds, Puebla, México), germinaron y trasplantaron a bolsas individuales de plástico con sustrato compuesto de 60% tezontle, 15% arenilla, 25% peat-moss, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior del primer objetivo.

Se colocaron las bolsas con plántulas individuales en cuatro canaletas (20 bolsas por canaleta) dentro de un invernadero con un sistema de irrigación automático que regaba las plantas con 500 ml de solución Steiner (Steiner, 1961) de forma diaria. Se instaló una estructura 18 mm de madera triplay transversalmente y en medio del invernadero, colocando paneles de espuma sobre esta para mitigar sonido. Cada lado del invernadero dividido por la pared mitigadora de sonido contuvo 2 canaletas con plantas (Figura 8).

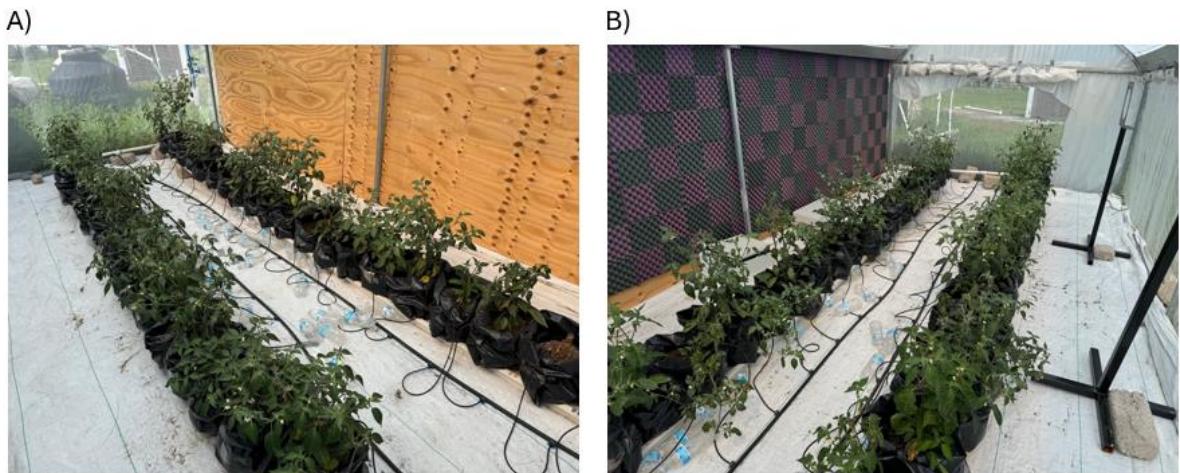


Figura 8. Invernadero con pared amortiguadora de sonido. A) Lado izquierdo del invernadero con dos canaletas con 20 plantas cada una. B) Lado derecho del invernadero con dos canaletas con 20 plantas cada una.

El invernadero se localizó en la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala, El Marqués, Querétaro, México ( $20^{\circ} 70' 55.3''$  N,  $100^{\circ} 25' 93.09''$  Q). Las condiciones ambientales registradas en el invernadero durante el experimento fueron una temperatura promedio de  $18.8^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa promedio de 64.6% y una duración de luz ( $70-85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación activa fotosintética) de 13 horas. La aplicación del tratamiento se llevo a cabo con plantas de dos meses de edad.

Los tratamientos consistieron en control, peróxido de hidrógeno, emisiones acústicas relacionadas a estrés hídrico medio (MHAF) y la combinación de ambos estresores. Cada tratamiento consistió en 20 plantas, de tal modo que cada lado del invernadero consistió en 40 plantas. Un lado del invernadero se colocaron los grupos control y peróxido de hidrógeno, del otro lado en el cual se colocaron las bocinas, se colocaron las plantas de los tratamientos de MHAF y combinación de estresores de tal forma que en medio de los dos canales las MHAF llegaran a 69 dB (Figura 9).

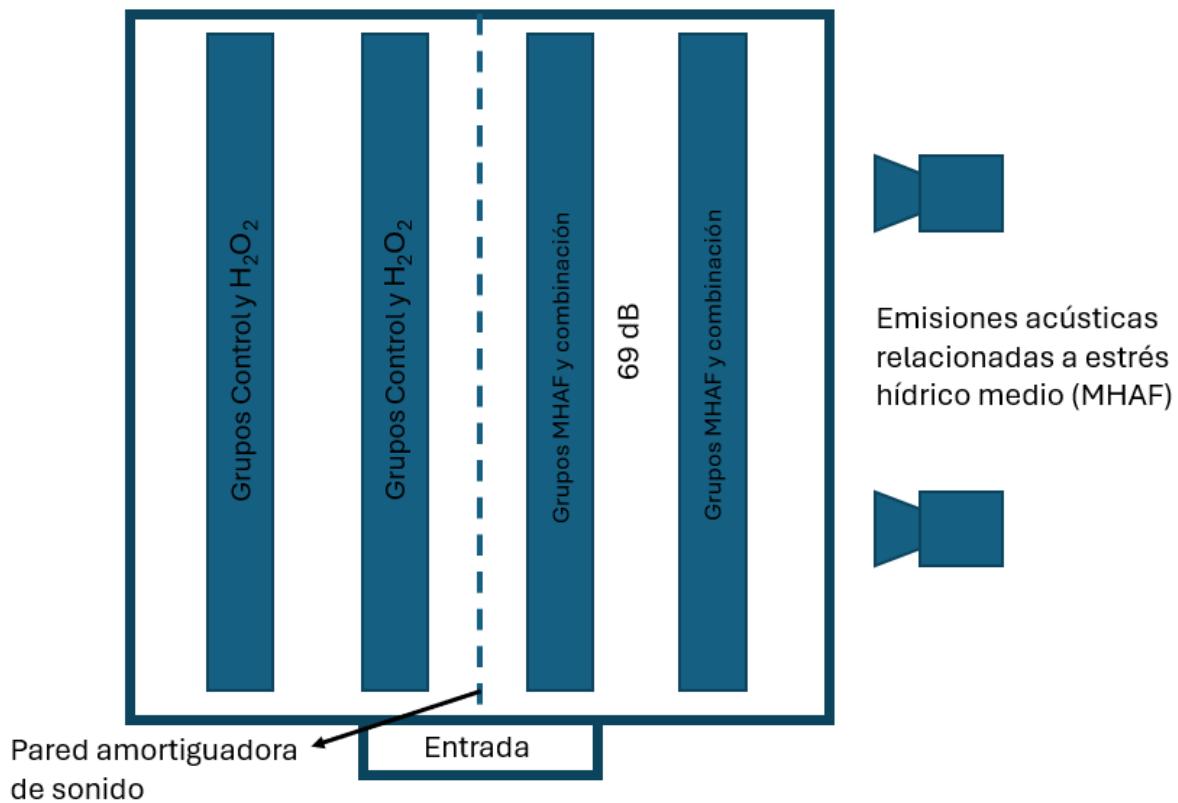


Figura 9. Esquema del invernadero con pared amortiguadora de sonido y distribución de tratamientos.

### 7.2.2. Tratamiento con peróxido de hidrógeno.

Las muestras en este experimento se trajeron con una solución de peróxido de hidrógeno, a una concentración de 50 mM siguiendo lo reportado por Mejía-Teniente, *et al.* (2019). La solución se preparó el mismo día de aplicación para evitar degradación por presencia de luz (Angole-Tierrablanca, *et al.* 2025), la aplicación se realizó mediante rociado foliar una vez cada dos semanas hasta alcanzar el punto de goteo de cada planta. Las plantas que recibieron el tratamiento individual y combinado fueron seleccionadas aleatoriamente y cuidando de no rociar las plantas adyacentes. Para el tratamiento en combinación se alternó de estresor cada semana.

### 7.2.3. Tratamiento con emisiones acústicas (MHAF).

Las muestras en este experimento se expusieron a emisiones acústicas durante 20 minutos una vez cada dos semanas. Las emisiones acústicas utilizadas se generaron siguiendo el reporte de Caicedo, *et al.* (2021); específicamente las que inducen estrés hídrico medio (MHAF) debido a que, de acuerdo con los resultados reportados en la literatura, es el patrón acústico que provocó un incremento en el total de capsaicinoides. Se utilizaron dos bocinas (Yamaha, NS-IC 600) (120 W, frecuencia de respuesta 65 Hz – 28 Hz) para emitir las emisiones acústicas MHAF (archivos de sonido de mayor amplitud Mp3: 240 Hz, 320 Hz, 480 Hz, y 525 Hz; rango de velocidad de amplitud:  $0.0254 - 1.13 \text{ mm s}^{-1}$ ), las cuales se posicionaron perpendicularmente a las canaletas.

El tratamiento se aplicó a 69 dB, considerando los resultados del primer objetivo. La medición de la intensidad de sonido se llevó a cabo con un sonómetro (EXTECH SL510), asegurando que los decibeles captados entre las dos canaletas fuera de  $69 \pm 1$  dB sobre cada canaleta. Las dos canaletas restantes colocadas del otro lado de la pared amortiguadora recibieron  $20 \pm 1$  dB menos intensidad de sonido. Las plantas que recibieron el tratamiento individual y combinado se seleccionaron de forma aleatoria.

### 7.2.4. Evaluación de variables morfológicas y físicas.

Cada semana se realizó una medición de altura y diámetro de tallo para comparar el crecimiento entre las plantas tratadas y los controles. La altura se obtuvo con la ayuda de una regla metálica, mientras que el diámetro del tallo se registró con la ayuda de un Vernier digital. Una vez terminados los tratamientos, se

removieron hojas y frutos de forma aleatoria, y se congelaron con nitrógeno líquido, posteriormente se resguardaron a -40 °C para su posterior análisis.

#### 7.2.5. Ensayos enzimáticos.

Los ensayos enzimáticos se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el experimento anterior, con la adición de la determinación de peroxidasa (POD). El ensayo de POD se realizó con una mezcla de reacción conteniendo 0.15 ml de guaiacol 16.3 mM, 0.15 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  900 mM, 2.66 ml de buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.0, y 40  $\mu\text{l}$  de extracto de muestra. La absorbancia se registró a 470 nm, realizando cada ensayo por triplicado para cada muestra (Abbas & Abdulatif, 2016) (Figura 10). Las curvas de calibración se presentan en el Anexo 1.

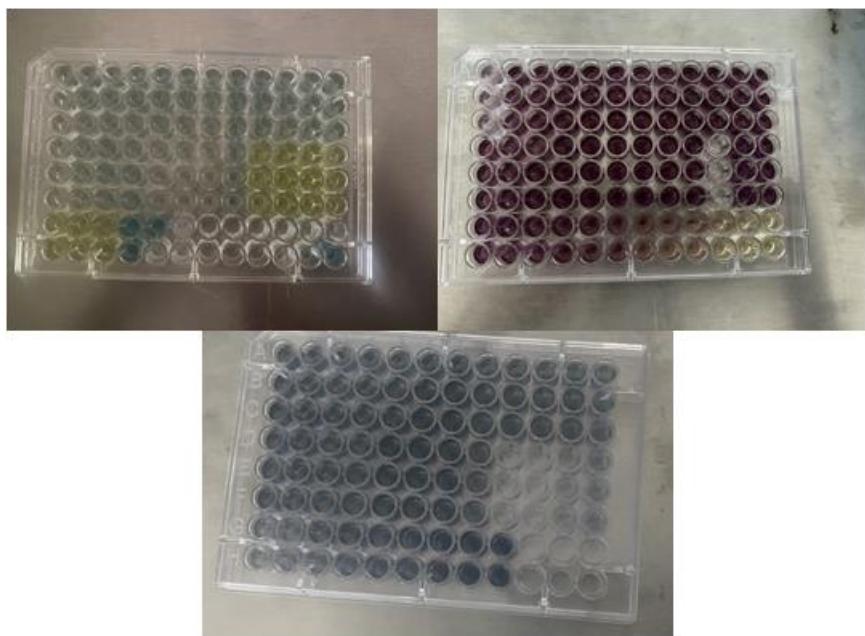


Figura 10. Ensayos enzimáticos en microplaca.

#### 7.2.6. Cuantificación de capsaicinoides.

La extracción de capsaicinoides se realizó triturando y liofilizando los frutos para posteriormente extraerlos con metanol, aplicando sonicación como se describió en la metodología del objetivo anterior. Para la trituración de los frutos se realizaron 3 grupos o “pools” por tratamiento y control, cada pool consistió en 5 plantas del mismo tratamiento elegidas de forma aleatoria. Los extractos resultantes se mantuvieron a -20 °C. La determinación del contenido de capsaicinoides se realizó mediante cromatografía de gases masas como se describió en el objetivo anterior. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

#### 7.2.7. Contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante.

Para la determinación de contenido total de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante mediante los métodos de DPPH y ABTS se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el objetivo anterior. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en microplacas y las muestras se dividieron en pools, siendo tres por tratamiento y control. Cada pool consistió en 5 plantas seleccionadas aleatoriamente, de las cuales se tomaron hojas aleatorias para realizar los extractos etanólicos.

#### 7.2.8. Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno.

Se realizó la cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno siguiendo la metodología descrita en el objetivo anterior, cuidando de realizar todo el procedimiento en oscuridad para evitar la degradación del peróxido de hidrógeno ante la luz.

#### 7.2.9. Expresión relativa génica.

Se analizó la expresión relativa de los genes *pr1a*, *erf1*, *def1*, *npr1*, *asr1*, *met1*, *ros1*, *mpk4-1*, *mpk4-3*, *mpk6-1*, *mpk6-2* y *mkk5*, los cuales son genes relacionados a defensa contra estrés biótico y abiótico. Para esto se siguió el procedimiento descrito en el objetivo anterior. El gen constitutivo utilizado para calcular la expresión relativa fue un gen de *actina*. Los experimentos se realizaron por triplicado con 3 pools para cada uno de los tratamientos y control, cada pool consistió en 5 plantas seleccionadas aleatoriamente. La amplificación genética se realizó con un termociclador de tiempo real (CFX96 Real-Time System Bio-Rad) (Figura 11). Los cebadores utilizados fueron sintetizados por T4 Oligo (Irapuato, México), las secuencias se pueden observar en la Tabla 7.

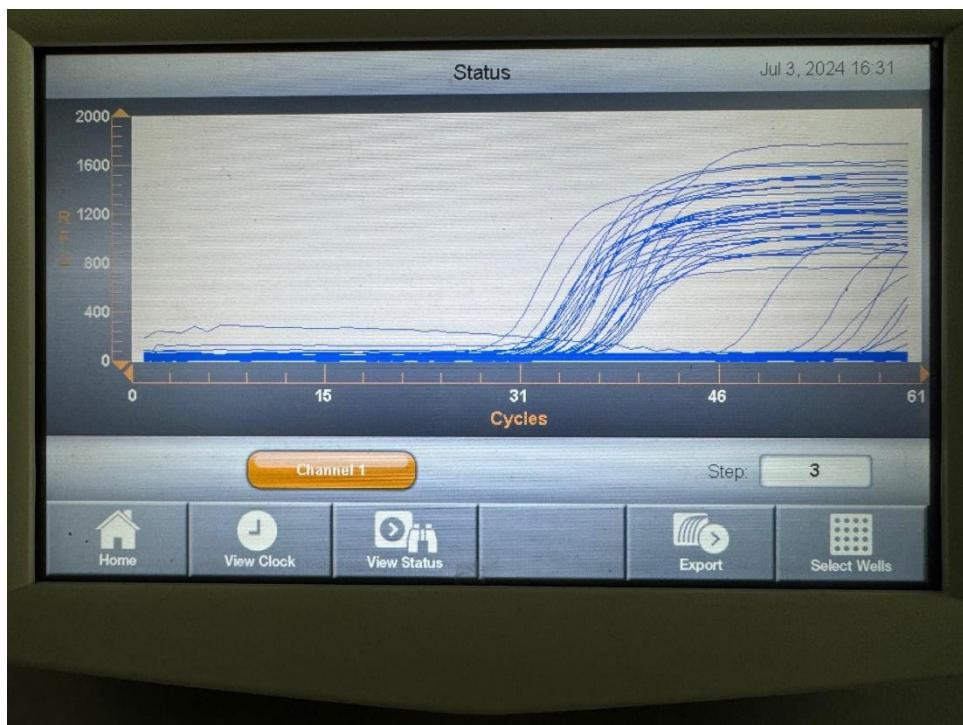


Figura 11. Curvas de amplificación en el termociclador de tiempo real.

Tabla 7. Secuencias de cebadores utilizados en la expresión génica relativa.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador 5'-3'
caMPK4-1-F	TTGACTTTGAGCAGCCATCTT
caMPK4-1-R	ACCATGAACTCGCCTCCGCTGCA
caMPK4-3-F	TGGTGCTAATGGAATGGTTG

caMPK4-3-R	TTCTTTGAGGTGGCCGTATA
caMPK6-1-F	AAAGCCTCTGTTCCCTGGTAG
caMPK6-1-R	CTCCTTCTGGGATCAAATGTC
caMPK6-2-F	CAGAGATCATGTACACCA
caMPK6-2-R	TCGCACCTGTTATTCTCCTTCTG
caMKK5-F	GATTCATTGCCTGCTGTTTG
caMKK5-R	GTGCCTGATGGACCTGATTAC
Q-CaROS1-F	GGGGAAACTAACTATGTGC
Q-CaROS1-R	GATCTCCTCCTAACCTCT
CaMET1-like1-F	CAGAAGCACAGGCAAATAGGAAATG
CaMET1-like1-R	CACTCCTAAATATGGCGTACATGAAG
CaASR1-F	ACATGTCGGAGAACTCGGTG
CaASR1-R	TATCTTGTGCCTGTGTGCGT
CaNPR1-F	ACTTCTCGCCGACGCCAAG
CaNPR1-R	GCCAACACATTCAACCAGAGCATC
CaDEF1-F	GTGAGGAAGAAGTTGAAAGAAAGTAC
CaDEF1-R	TGCACAGCACTATCATTGCATACAATT
PR1a-F	GCCAAGCTATAACTACGCTAAC
PR1a-R	GCAAGAAATGAACCACCATCC
ERF1-F	CGCGTAATGGAATTAGGGTTG
ERF1-R	CCTCATTGATAATGCGGCTTG
ACTIN-F	TGCAGGAATCCACGAGACTAC
ACTIN-R	TACCACCACTGAGCACAATGTT

#### 7.2.10. Análisis estadístico.

Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados fueron reportados como medias. El análisis estadístico de los datos se realizó con el uso

de ANOVA, seguido de una prueba de t de Student ( $\alpha=0.1$ ) para datos paramétricos. Se llevó a cabo un análisis de efecto de interacciones. En todos los casos se utilizó el software Graphpad (Prism 10.5.0). Se realizó un análisis multivariable con apoyo del software RStudio (RStudio 2025.05.1).

### 7.3. Determinación de características heredables en generación F1.

#### 7.3.1. Germinación de plántulas F1.

El tercer objetivo se llevó a cabo sembrando una generación F1 a partir de las muestras tratadas en el segundo objetivo, manteniendo de esa forma cuatro grupos: control, peróxido de hidrógeno, MHAf y combinación de estresores. La generación F1 no recibió ningún tratamiento adicional y se llevó hasta nivel de plántula (Figura 12).



Figura 12. Germinación de plántulas, generación F1, provenientes de plantas control y tratadas con peróxido de hidrógeno, MHAF y combinación de estresores.

### 7.3.2. Contenido relativo de agua.

Las plantas se sembraron y germinaron siguiendo el mismo protocolo descrito en los objetivos anteriores. Se midió la altura de las plántulas para evaluar su crecimiento y dos meses después se calculó el contenido relativo de agua de las plántulas siguiendo la metodología reportada por Basak, *et al.* (2020). Las plántulas se removieron de los pozos de la charola de germinación (Figura 13), removiendo el sustrato de forma manual, y se procedió a registrar el peso fresco con una balanza analítica. Posteriormente se secaron las muestras a 60 °C durante 48 horas (Figura 14) con lo cual se registró el peso seco con la balanza analítica. Se calculó el

contenido relativo de agua (RWC) con la ecuación  $RWC = ((Peso fresco - Peso seco) \div Peso fresco) \times 100\%$  (Basak, *et al.* 2020).



Figura 13. Plántulas F1 promedio de cada tratamiento. A) Tratamiento combinatorio de estresores. B) Tratamiento MHAf. C) Tratamiento peróxido de hidrógeno. D) Control.

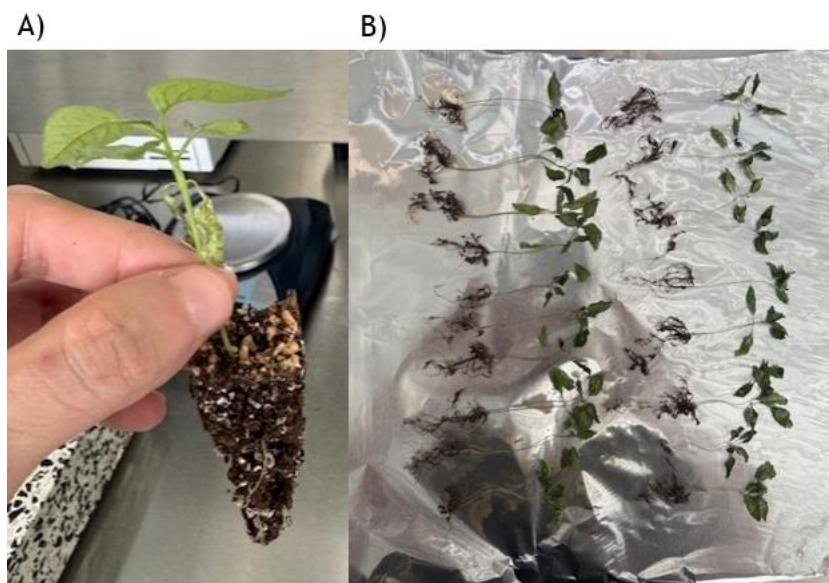


Figura 14. Plántulas F1 y determinación de contenido relativo de agua. A) Plántula removida del pozo de la charola de germinación. B) Plántulas secadas a 60 °C por 48 horas.

### 7.3.3. Análisis estadístico.

Las mediciones se reportaron como medias. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando un ANOVA, seguido de una prueba de t de Student ( $\alpha=0.1$ ) para datos paramétricos. Se utilizó el programa Graphpad (Prism 10.5.0).

### 7.4. Manejo de residuos.

Los residuos se manejaron de acuerdo con la NOM-052-SEMARNAT-2005, la cual establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y listado de residuos peligrosos. Esto con el fin de clasificar de forma correcta para su desecho los residuos obtenidos durante pruebas como los ensayos enzimáticos y de actividad antioxidante. Los puntos importantes que se siguieron de esta norma fueron los siguientes: 1) Determinar si el residuo se encontraba en alguno de los listados de la norma. 2) Determinar si se contenía algún constituyente tóxico. 3) Caracterización o análisis CRETIB (Corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico ambiental, inflamable y biológico-infeccioso) o manifestación por conocimiento científico. 4) Determinar si se presentaban características CRETIB. 5) Determinar si se consideraba un residuo peligroso o no.

De igual manera se siguieron las buenas prácticas de laboratorio tal y como: 1) Uso constante de equipo de seguridad mientras se laboró en el laboratorio, tal y como lo es la bata, guantes y zapatos cerrados. 2) Determinar si el equipo utilizado se encontraba en buenas condiciones, cumpliendo con su mantenimiento adecuado. 3) Recipientes etiquetados para el almacenamiento y clasificación de

residuos. 4) Evitando trabajar sin supervisión por si llegara a ocurrir algún percance. 5) Limpieza y orden de los reactivos y equipos del laboratorio después de su uso.

## 8. Resultados y discusión.

### 8.1. Determinación de decibeles de emisiones acústicas con mayor bioestimulación en cultivo de *C. annuum* L.

Caicedo-Lopez y colaboradores (2021) reportaron tratamientos en plantas de *C. annuum*, con emisiones acústicas ajustadas a 85 dB y aplicadas durante 60 minutos en una cámara controlada de forma diaria durante una semana, 30 días postantesis. Estos tratamientos resultaron en un incremento ligero en el diámetro de tallo y en la altura de las plantas, también promoviendo la producción de capsaicinoides. También se observó una disminución en la expresión génica relacionada con PAL y Mn-SOD, con un incremento en la expresión génica de peroxidases (POD) y chalcona sintasa (CHS).

En este estudio se realizó una aplicación de larga duración, siendo 20 minutos una vez por semana durante seis semanas después del trasplante, de estas emisiones acústicas ajustadas a 80, 72.5 y 69 dB en plantas de *C. annuum* en un invernadero.

#### 8.1.1. Mediciones morfológicas.

El crecimiento de las plantas presentó diferencias entre los tratamientos, como se puede observar en la Figura 15. Se pudo apreciar que la altura de planta del tratamiento de 69 dB fue significativamente mayor contra los demás tratamientos y el control. Respecto al diámetro del tallo, el tratamiento de 69 dB mostró valores

significativamente mayores a los demás tratamientos de MHAF, mientras que respecto al control no hubo diferencia significativa. Respecto al número de frutos obtenidos, no se presentaron diferencias significativas en ninguno de los grupos. Estos resultados sugieren que, en términos de crecimiento y desarrollo, el tratamiento de 69 dB resultó en un efecto positivo en plantas de *C. annuum*, sin costo a la producción de fruto.

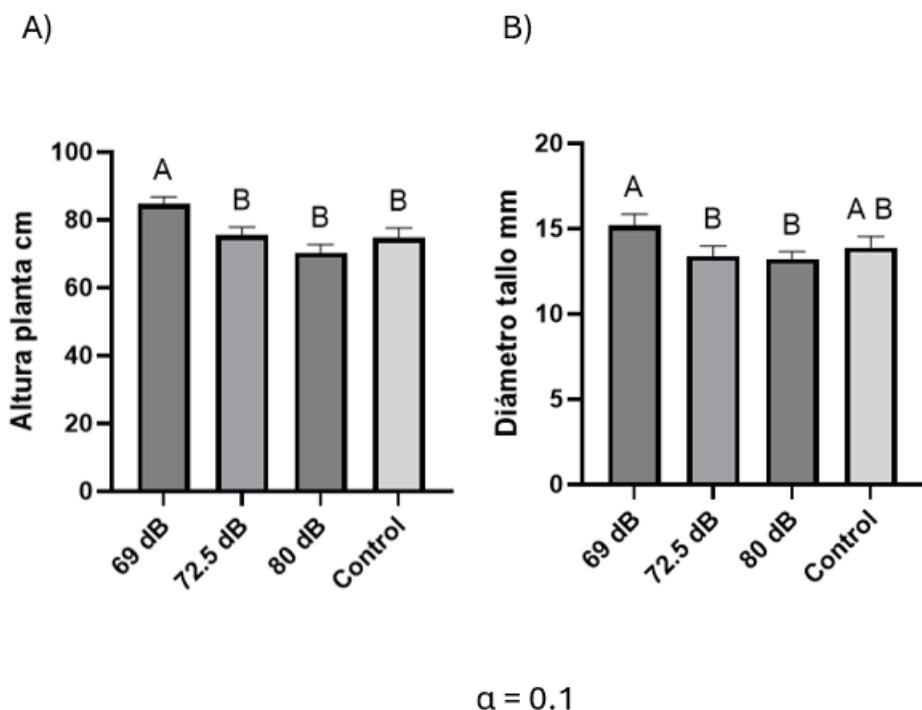


Figura 15. Datos morfológicos de plantas de *C. annuum* tratadas con MHAF. A) Altura de planta. B) Diámetro de tallo. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

Estos resultados sugieren que la aplicación de MHAF indujo bioestimulación en las plantas de *C. annuum*, resultando en un mejor desarrollo; particularmente el tratamiento de 69 dB.

#### 8.1.2. Actividad enzimática.

Los resultados de los ensayos enzimáticos se pueden observar en la Figura 16. Los datos obtenidos revelaron que la actividad de PAL presentó un incremento significativo con el tratamiento de 69 dB, comparado con los demás tratamientos y el control. Para la actividad enzimática de SOD, el tratamiento de 69 dB presentó la menor actividad, mientras que el tratamiento de 72.5 dB presentó la mayor actividad entre los grupos. En el caso de actividad enzimática de CAT, se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos, siendo el tratamiento de 80 dB el que presentó los mayores valores.

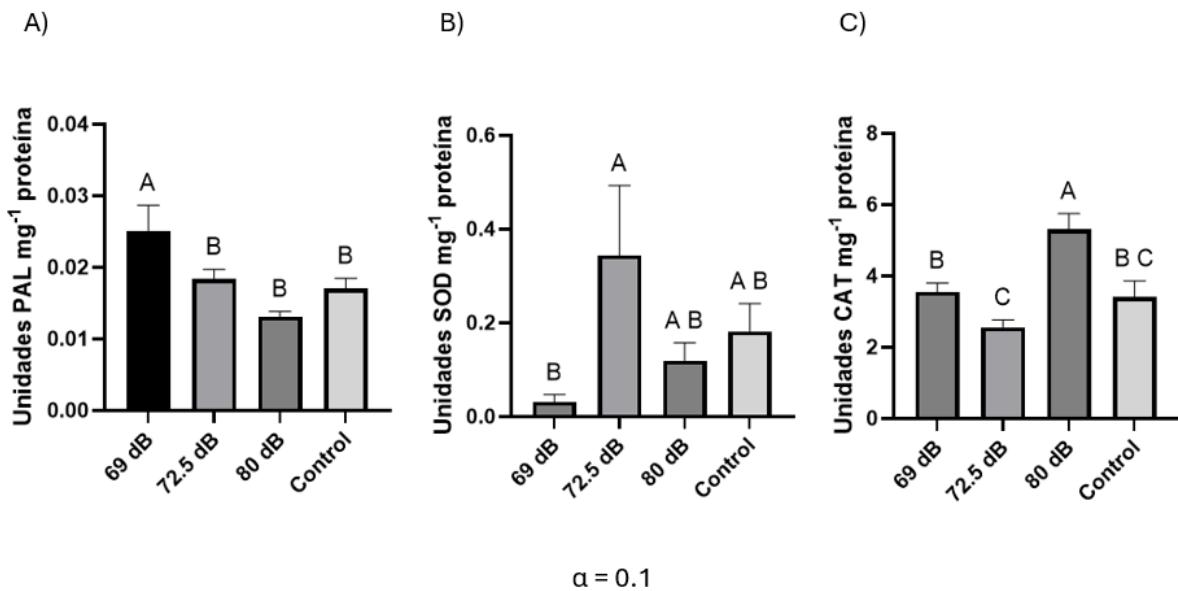


Figura 16. Actividad enzimática de hojas de *C. annuum* tratadas con MHAf. A) Actividad de PAL. B) Actividad de SOD. C) Actividad de CAT. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$

Anteriormente, Caicedo-Lopez, *et al.* (2021) demostró que los tratamientos con MHAf a 85 dB resultaron en un aumento en la expresión de PAL y SOD en plantas de chile jalapeño. En el presente trabajo, se utilizó una planta de chile diferente, siendo esta la de chile serrano, además de que la aplicación de MHAf se realizó a diferentes intensidades. En nuestro estudio se observó no sólo un incremento en la

actividad de PAL, sino también un decremento en la actividad enzimática de SOD para el tratamiento de 69 dB. Esto significa que fisiológicamente la planta puede usar más recursos hacia su crecimiento que hacia la defensa (Huang, *et al.* 2010).

Mientras que el tratamiento de 80 dB no mostró diferencias significativas contra el grupo control en el contexto de actividad enzimática de PAL y SOD, el tratamiento de 72.5 dB se caracterizó por un incremento en la actividad de SOD, sin diferencias significativas respecto a la actividad de PAL. Los resultados observados del tratamiento de 69 dB fueron consistentes con otros resultados en este estudio, debido a que PAL es la enzima principal para la producción de fenilpropanoides, y algunos de ellos son utilizados en la biosíntesis de capsaicinoides (Rasool, *et al.* 2021).

Debido a que SOD es la primera línea de defensa contra daño oxidativo en plantas, al actuar como un eficiente limpiador de especies reactivas de oxígeno (ROS), SOD se regula positivamente cuando la planta se encuentra bajo estrés (Han, *et al.* 2020). A pesar de que los tratamientos produjeron actividad de SOD al mismo nivel que el grupo control, el tratamiento de 72.5 dB fue significativamente mayor al del tratamiento de 69 dB.

El hecho de que no hubo diferencias significativas entre el grupo control y el tratamiento de 69 dB respecto a actividad de SOD, sugiere que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causada como respuesta a estrés pudo a ver sido causada por otras enzimas, como oxidases peroxisomales, oxidases apoplásticas y peroxidases (Ferruzca-Campos, *et al.* 2023).

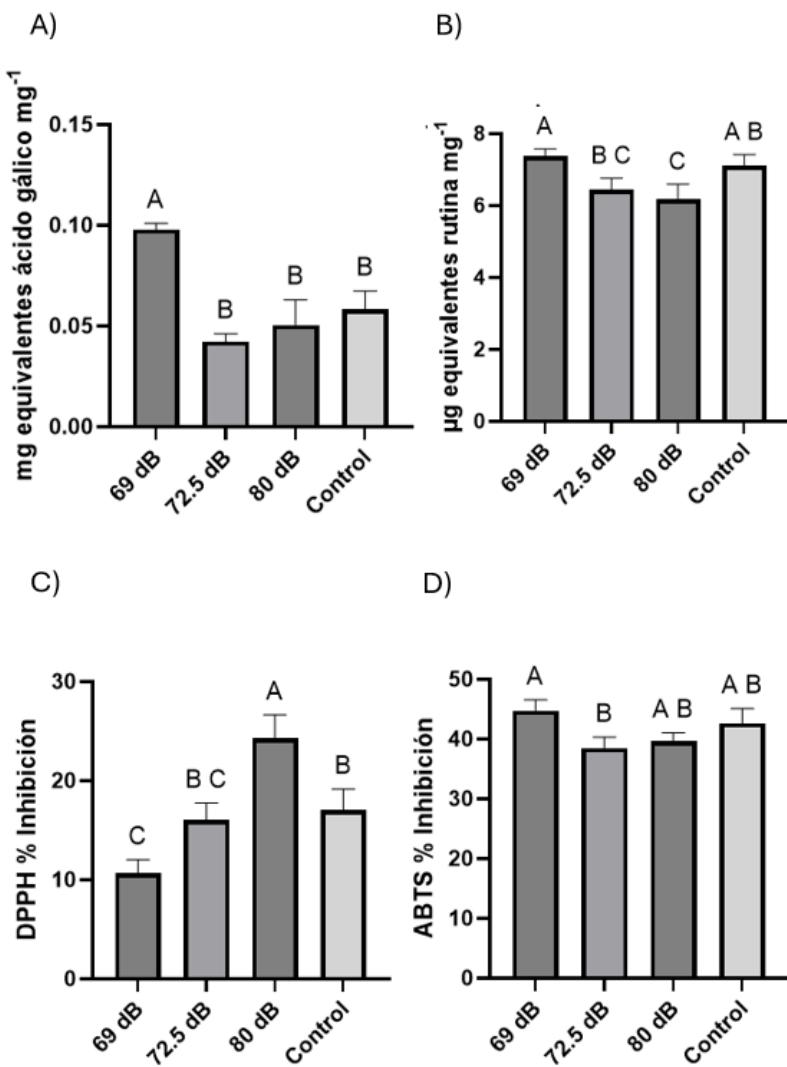
Tomando en cuenta lo mencionado anteriormente, los resultados sugieren que, a 69 dB, las plantas de *C. annuum* se encuentran a un nivel bajo de estrés o dosis de eustrés (Godínez-Mendoza, *et al.* 2023). En este caso, el tratamiento de 69 dB resultó en un bajo nivel de SOD en donde posiblemente su rol de limpiador de ROS se compensó con un sistema no enzimático de defensa antioxidante, ligado al incremento de actividad de PAL, permitiéndole a la planta dirigir sus recursos a su crecimiento y desarrollo sin cambios significativos en la producción de fruto, indicando bioestimulación (Rasool, *et al.* 2021).

Debido a que hubo un incremento en la actividad de PAL en el tratamiento de 69 dB, es posible que el incremento en el contenido total de fenoles, flavonoides y capsaicinoides resultara en actividad antioxidante suficiente para compensar los bajos niveles de actividad de SOD y CAT observados en el estudio. Además cabe mencionar que peroxidases, como la ascorbato peroxidasa (APX), el cual no fue analizado, tienen un efecto antioxidante al procesar el peróxido de hidrógeno (Mhamdi, 2023), posiblemente presentando un rol en el fenotipo bioquímico observado en el estudio.

#### 8.1.3. Actividad antioxidante no enzimática.

Para el contenido total de fenoles y flavonoides se observó (Figura 17) que el tratamiento de 69 dB tenía un contenido de fenoles totales significativamente mayor a los demás grupos. En el caso del contenido total de flavonoides, a pesar de que el tratamiento de 69 dB mostró valores significativamente mayores respecto a los demás tratamientos, no se observaron diferencias significativas respecto al control.

La actividad antioxidante obtenida a partir de extractos de hojas de *C. annuum* por los ensayos DPPH y ABTS se pueden observar en la Figura 17. Los resultados relevantes del ensayo de DPPH muestran una diferencia significativa entre los tratamientos de 80 dB y 69 dB, en donde el primero reveló una actividad inhibitoria mayor. El tratamiento de 72.5 dB no mostró diferencias significativas contra el control y el tratamiento de 69 dB. En el caso del ensayo de ABTS, la única diferencia significativa obtenida fue entre los tratamientos de 72.5 dB y 69 dB, siendo el segundo el tratamiento con mayor porcentaje de inhibición.



$\alpha = 0.1$

Figura 17. Actividad antioxidante no enzimática de hojas de *C. annuum* tratadas con MHAf. A) Contenido total de fenoles. B) Contenido total de flavonoides. C) Porcentaje de inhibición por DPPH. D) Porcentaje de inhibición por ABTS. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

El aumento en la actividad enzimática de PAL se tradujo en un mayor contenido de fenoles, flavonoides y capsaicinoides, mostrando consistencia con los resultados de Caicedo-Lopez, *et al.* (2021). De acuerdo con Mahmood, *et al.* (2021), es ampliamente aceptado que, bajo condiciones de estrés, se presenta un aumento en la actividad antioxidante en hojas y frutos de las plantas.

Mientras el tratamiento de 69 dB mostró una baja actividad antirradical en el ensayo de DPPH contra el tratamiento de 80 dB y grupo control, también se observó una mayor actividad antioxidante en el ensayo de ABTS en comparación con el tratamiento de 72.5 dB. De igual manera se observó que el tratamiento de 69 dB presentó un mayor contenido de fenoles y flavonoides respecto a los demás tratamientos. Notablemente, los resultados del ensayo de DPPH no se correlacionan con los del ensayo de ABTS, esto se debe posiblemente a que ambos ensayos presentan mecanismos de reacción diferentes entre sí (Alvarez-Parrilla, *et al.* 2011; Rumpf, *et al.* 2023).

#### 8.1.4. Contenido de Capsaicinoides y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

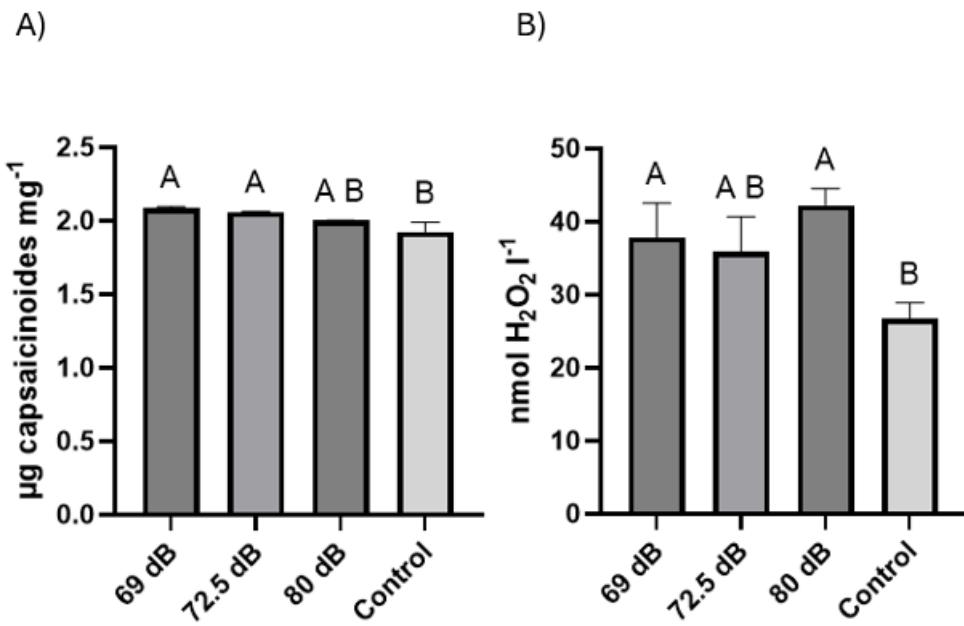
El contenido total de capsaicinoides en frutos de chile se midió por el método de espectrofotometría, en donde se observó que los tratamientos de 72.5 dB y 69 dB fueron significativamente mayores que el control (Figura 18). Sin embargo el método de cromatografía gases masas (GC-MS) permitió el análisis de capsaicinoides específicos como la capsaicina, dihidrocapsaicina, nonivamidina y capsinoides (posiblemente capsíato), como se puede observar en la Tabla 8. Los resultados demostraron que el contenido de capsaicina en el tratamiento de 69 dB fue 1.8 veces mayor que el control y 1.3 veces mayor al tratamiento de 80 dB. El contenido de dihidrocapsaicina, fue 1.6 veces mayor en el tratamiento de 69 dB comparado contra el grupo control, mientras que la nonivamidina y capsinoides, no se presentaron diferencias significativas entre grupos.

Tabla 8. Cuantificación de capsaicinoides con GC-MS. Datos expresados como media ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas.  $\alpha=0.05$ . ND=No detectable.

Tratamiento	Cuantificación de capsaicinoides y capsinoides (mg g <sup>-1</sup> )			
	Capsaicina	Dihidrocapsaicina	Nonivamidina	Capsinoides
Control	1.5350±0.31 <sup>B</sup>	1.6600±0.31 <sup>B</sup>	0.5855±0.12 <sup>A</sup>	ND

80 dB	1.9600±0.26 <sup>B</sup>	2.1200±0.16 <sup>AB</sup>	0.7798±0.18 <sup>A</sup>	0.2050±0.026 <sup>A</sup>
72.5 dB	2.1000±0.29 <sup>AB</sup>	2.2050±0.13 <sup>AB</sup>	0.7000±0.20 <sup>A</sup>	0.2200±0.023 <sup>A</sup>
69 dB	2.6800±0.44 <sup>A</sup>	2.5950±0.21 <sup>A</sup>	0.9238±0.32 <sup>A</sup>	0.2400±0.028 <sup>A</sup>

El contenido de peróxido de hidrógeno endógeno se puede observar en la Figura 18. Se pudo observar que los tratamientos de 80 dB y 69 dB presentaron valores significativamente mayores comparados contra el control.



$$\alpha = 0.1$$

Figura 18. Contenido de capsaicinoides de frutos de *C. annuum* y contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de hojas de *C. annuum* tratadas con MHAf. A) Contenido de capsaicinoides. B) Contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Datos expresados como media ± error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

El peróxido de hidrógeno funciona como una molécula señalizadora (Mhamdi, 2023) para procesos vitales como lo son el crecimiento y desarrollo, así como para la coordinación de respuestas contra estresores. Esto coincide con los resultados

obtenidos del tratamiento de 69 dB, los cuales se caracterizaron por un aumento en el crecimiento de plantas de *C. annum* en comparación con los otros tratamientos.

Una posible explicación para estos resultados para el tratamiento de 69 dB, es que basándose en el fenómeno de hormesis, mientras el estrés fue mayor al del grupo control, la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mantuvo por debajo de los niveles tóxicos, pero arriba de los niveles normales, de tal forma que se indujo un efecto bioestimulante mientras se mantuvo una planta saludable. De tal forma, el aumento de actividad de CAT para el tratamiento de 80 dB puede explicarse por su aumento en el contenido de peróxido de hidrógeno, ya que la enzima catalasa es utilizada para degradar dicha molécula (Sarker & Oba, 2018). De igual forma, el contenido de capsaicinoides totales aumentó con los tratamientos de 69 y 72.5 dB, similarmente a lo reportado por Caicedo-Lopez, *et al.* (2021).

#### 8.1.5. Expresión relativa de *cawrky*, *pr1a* y *erf1*.

La expresión relativa de los genes *cawrky*, *pr1a* y *erf1* se pueden observar en la Figura 19. Los resultados no reflejaron diferencias significativas respecto a la expresión de los genes *cawrky* y *erf1*, mientras que la expresión del gen *pr1a* mostró un incremento significativo en el tratamiento de 69 dB, siendo 70 veces mayor al tratamiento de 80 dB y al control.

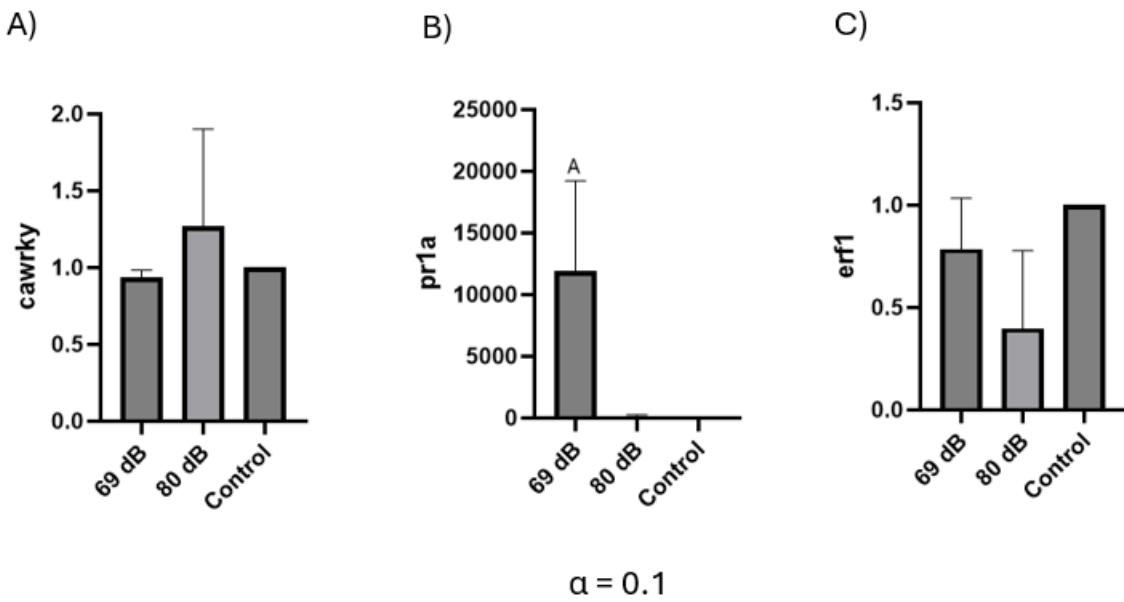


Figura 19. Expresión relativa genética en hojas de *C. annuum* tratadas con MHA. A) Expresión de *cawky*. B) Expresión de *pr1a*. C) Expresión de *erf1*. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

De los tres genes analizados en el experimento, únicamente la expresión relativa de *pr1a* con el tratamiento de 69 dB presentó diferencias significativas contra el tratamiento de 80 dB y el grupo control. Esto coincide con lo reportado por Jeum-Kyu & Byung-Kook (2005), donde mencionan que la expresión del gen *pr1a* se indujo en respuesta a estrés abiótico.

La mayoría de los factores de transcripción *wrky* son expresados durante la maduración del fruto del chile (Villa-Rivera & Ochoa-Alejo, 2021), posiblemente explicando el por qué no se presentaron diferencias significativas en su expresión debido a que las muestras se recolectaron antes de esta etapa fenológica.

A pesar de que factores de transcripción de *erf1* se encuentran asociados con la regulación del contenido de capsaicinoides (Wen, *et al.* 2022), existen otros reguladores como la enzima fenil amonio liasa (PAL) (Rasool, *et al.* 2021), la cual presentó una diferencia significativa positiva en su actividad al aplicar el tratamiento de 69 dB.

A pesar de que las MHAF utilizadas en este estudio correspondieron a las reportadas por Caicedo-Lopez, *et al.* (2021), el genotipo de las plantas de *C. annuum* utilizadas en este experimento fue diferente. Este aspecto es importante a considerar porque la respuesta a estrés puede ser asociada al genotipo del organismo (Mahmood, *et al.* 2021; Zamljen, *et al.* 2022). Esto sugiere que la aplicación de estas frecuencias de sonido en *C. annuum* L. actuó como un bioestimulante, mejorando características morfológicas, bioquímicas y moleculares, sugiriendo que dichas plantas tratadas fueron capaces de utilizar de mejor manera los nutrientes y agua aplicada en su cultivo.

Se requieren de estudios futuros para elucidar posibles efectos de tecnologías de frecuencias acústicas para plantas como herramientas para el manejo integral de cultivos, como el mejoramiento de absorción de nutrientes y su asimilación, así como el aumento en la eficiencia de uso del agua. Otro paso en el estudio sería elucidar su efectividad en un estudio a campo abierto para su posible aplicación por agricultores alrededor del mundo. Cabe mencionar que el tratamiento con mejores resultados (69 dB) respecto a efectos bioestimulantes, se encuentra a una intensidad de sonido que no es dañina para humanos (Bhandawat & Jayaswall, 2022). Debido a que los decibelios son una escala logarítmica, el sonido que fuese a alcanzar los 85 dB tendrá aproximadamente 31.6 veces más energía que un sonido a 70 dB, por ejemplo, fuerte sonido exterior como equipo de jardinería, construcción y vehículos, tienen un rango de 90 a 100 dB. En 1974, la Agencia de Protección Ambiental (EPA), calculó el nivel adecuado de sonido para salud pública para prevenir pérdida de oído. De acuerdo con la EPA, 70 dB con un promedio de periodo de 24 horas es crítico para la salud humana (Fink, 2016).

Adicionalmente, es crucial estudiar los posibles efectos de estas emisiones acústicas en organismos benéficos en la planta, especialmente porque podrían estar presentes en cultivares de campo abierto, así como en combinación con otros tipos de estresores (Godínez-Mendoza, *et al.* 2023).

Se han realizado estudios respecto a ultrasonido y sus efectos en el crecimiento, desarrollo, transcriptómica y epigenética en plantas (Király, *et al.* 2025), así como la

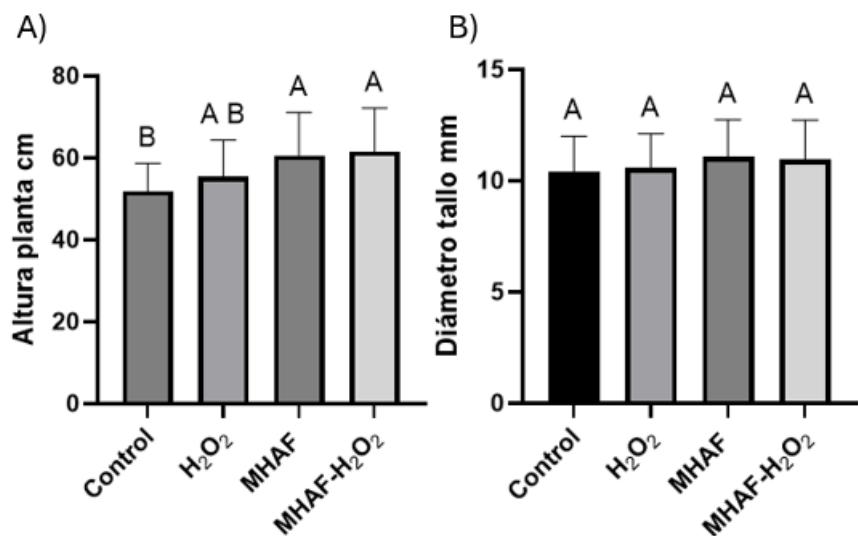
especificidad del ultrasonido emitido y su posibilidad de adaptación para tratar plantas contra factores de estrés. Como se mencionó por Gagliano, “las emisiones acústicas no son meramente un subproducto mecánico incidental únicamente atribuido a la cavitación, puede tener un valor adaptativo” (Gagliano, *et al.* 2012).

## 8.2. Efecto combinado de peróxido de hidrógeno y emisiones acústicas en cultivo de *C. annuum* L.

### 8.2.1. Mediciones morfológicas.

La altura de las plantas de *C. annuum* fue significativamente mayor en los tratamientos de MHAF y combinación respecto al control, mientras que el tratamiento de  $H_2O_2$  no presentó diferencias significativas contra los demás grupos, como puede observarse en la Figura 20. El diámetro del tallo no presentó diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos evaluados.

En la Figura 21 se puede observar una representación general de las partes aéreas y raíces de las plantas tratadas con  $H_2O_2$  y MHAF de forma individual y en combinación.



$\alpha = 0.1$

Figura 20. Mediciones morfológicas de plantas de *C. annuum* tratadas con  $H_2O_2$ , MHAF y combinación. A) Altura de la planta. B) Diámetro del tallo. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

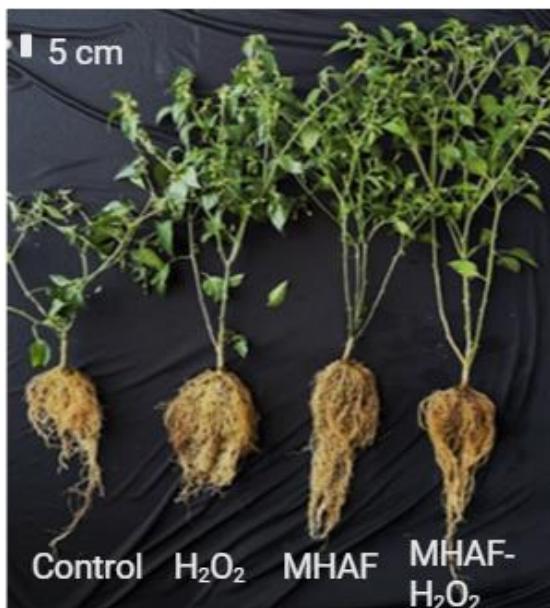


Figura 21. Apariencia fenotípica típica de plantas de *C. annuum* para cada tratamiento evaluado.

En este estudio, se obtuvo un mayor valor de altura en chile serrano, coincidiendo con los resultados reportados por Caicedo-Lopez, *et al.* (2021) en

plantas de chile jalapeño. Mientras no hubo diferencias significativas con el tratamiento de peróxido de hidrógeno, la combinación de factores de estrés, así como el tratamiento individual de MHAf, resultó en un aumento significativo respecto a la altura de *C. annuum* contra el grupo control. Estos resultados sugieren que MHAf induce crecimiento y que dicho efecto con las frecuencias obtenidas a partir de chile jalapeño, resultan al aplicarlo en chile serrano.

#### 8.2.2. Actividad enzimática.

Los resultados de los ensayos enzimáticos se pueden observar en la Figura 22. Los ensayos de PAL indicaron mayor actividad cuando las plantas fueron tratadas con MHAf y en combinación de estresores por casi tres veces respecto al control y al tratamiento de  $H_2O_2$ . En los ensayos de SOD se pudo observar que únicamente el tratamiento combinatorio presentó mayor actividad significativa contra los demás grupos, sin embargo, los tratamientos de estresores individuales resultaron en menor actividad contra el grupo control. En el caso de los ensayos de CAT, todos los tratamientos presentaron significativamente menor actividad que el grupo control, siendo los tratamientos de MHAf y combinación de estresores, los que presentaron menor actividad. Los resultados de los ensayos de POD mostraron mayor actividad del tratamiento de  $H_2O_2$ , seguido del tratamiento combinatorio respecto al grupo control. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones del experimento, la actividad de POD puede tener un rol antioxidante significativamente mayor a la actividad de CAT al aplicar estos estresores, al intentar limpiar los ROS producidos por los tratamientos aplicados en plantas de *C. annuum*.

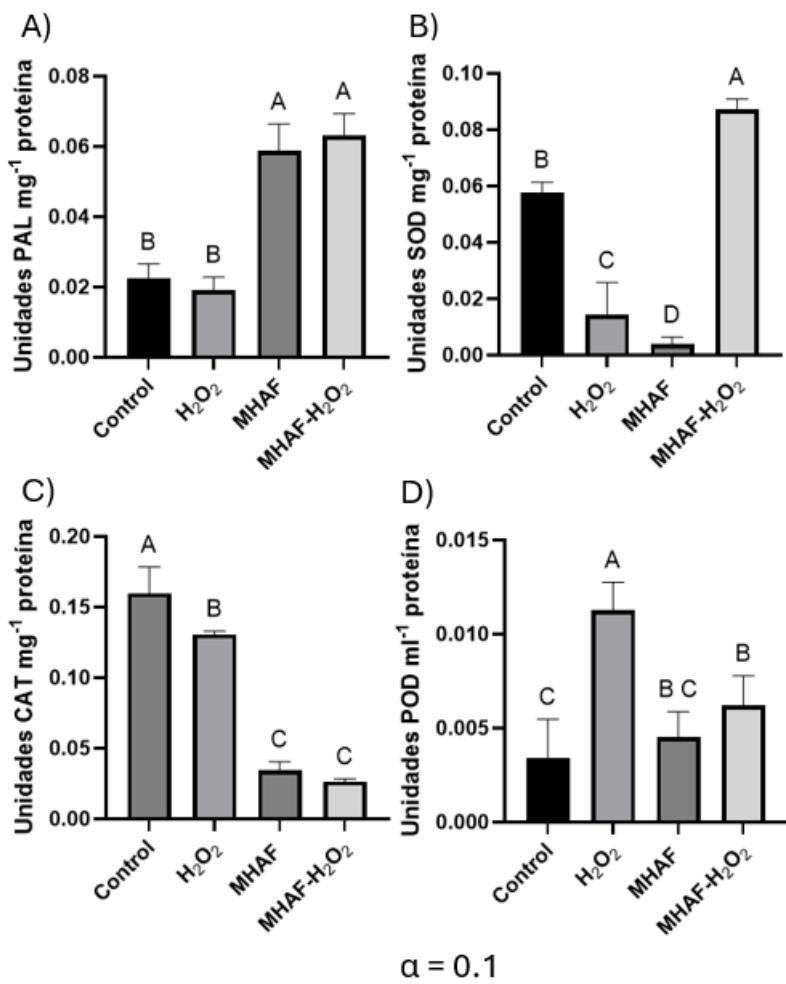


Figura 22. Actividad enzimática de hojas de *C. annuum* tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MHAF y combinación. A) Actividad enzimática PAL. B) Actividad enzimática SOD. C) Actividad enzimática CAT. D) Actividad enzimática POD. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

Notablemente, SOD, CAT y POD son enzimas antioxidantes importantes en las plantas, debido a juegan un rol importante en la eliminación de especies reactivas de oxígeno del sistema de la planta (Jin, *et al.* 2023). En el caso de ensayos enzimáticos, para el tratamiento combinatorio y el individual de MHAF se observó un incremento en la actividad enzimática de PAL. Los resultados obtenidos con el tratamiento MHAF concuerdan con lo reportado por Caicedo-Lopez, *et al.* (2021), mientras que el tratamiento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no presentó ninguna diferencia significativa respecto al grupo control; lo cual concuerda con lo reportado en un estudio por

Mejía-Teniente (Mejía-Teniente, *et al.* 2013). La enzima PAL es clave en el metabolismo de los fenilpropanoides, usualmente asociados con la resistencia a enfermedades en plantas (Vimala & Suriachandraselvan, 2009). Esto sugiere que el tratamiento de MHAF induce el sistema de defensa de la planta, por lo menos en parte por incrementar la actividad enzimática de PAL.

En el caso de SOD, ambos estresores individuales resultaron en menor actividad contra el grupo control; sin embargo, el tratamiento combinatorio resultó en una mayor actividad enzimática de SOD contra el control. Este último resultado sugiere que la interacción de ambos factores de estrés tiene un efecto sinérgico sobre la actividad enzimática de SOD en el tipo de *C. annuum* evaluado.

En el presente estudio se detectó menor actividad enzimática de CAT con todos los tratamientos evaluados comparados contra el grupo control. En contraste, se observó un incremento en la actividad enzimática de POD contra el control. Tomando esto en consideración, estos resultados sugieren que mientras la actividad de CAT fue baja, el mecanismo antioxidante enzimático protector se compensó parcialmente en el sistema de la planta al incrementar la actividad de POD y posiblemente de otros antioxidantes nos evaluados en el estudio, como por ejemplo el glutatión, el cual puede ser responsable de compensar el sistema antioxidante. Cabe mencionar que el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultó en la mayor actividad enzimática de POD, mientras que el tratamiento combinatorio resultó en valores intermedios entre ambos tratamientos individuales, sugiriendo que el tratamiento MHAF actúa de forma antagonista al tratamiento con peróxido de hidrógeno para esta variable bioquímica.

#### 8.2.3. Actividad antioxidante no enzimática.

El contenido total de fenoles y flavonoides, así como la capacidad antioxidante mediante los métodos de DPPH y ABTS se pueden observar en la Figura 23. El contenido total de fenoles no presentó ninguna diferencia significativa entre los

grupos evaluados. Respecto al contenido total de flavonoides se observó que el tratamiento con MHAF fue significativamente mayor contra el tratamiento combinatorio.

Para los ensayos de DPPH, únicamente el tratamiento combinatorio presentó diferencias significativas contra los demás grupos al tener un menor porcentaje de inhibición, significando una menor capacidad antioxidante. Los ensayos de ABTS mostraron que los tratamientos de estresores individuales presentaron mayor capacidad antioxidante que el control y el tratamiento combinatorio (Figura 23).

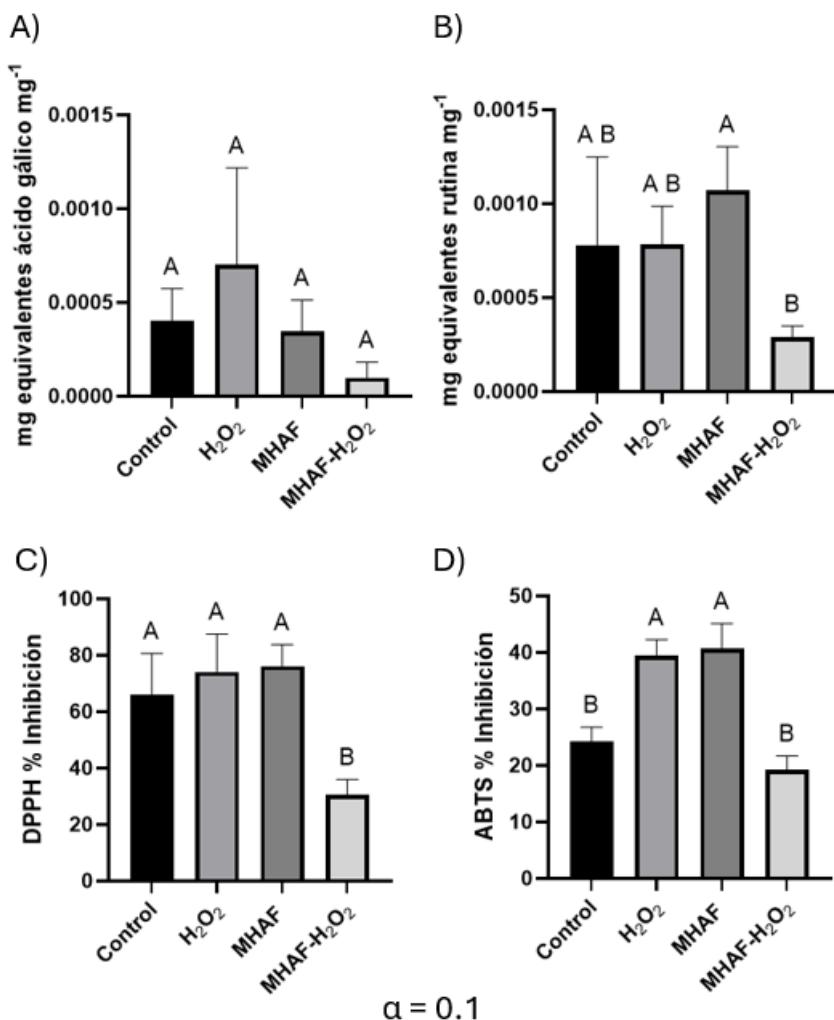


Figura 23. Contenido total de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante de hojas de *C. annuum* tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MHAF y combinación. A) Contenido de

fenoles totales. B) Contenido de flavonoides totales. C) Porcentaje de inhibición por DPPH. D) Porcentaje de inhibición por ABTS. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

A pesar de que el contenido total de fenoles no presentó ninguna diferencia significativa entre los grupos evaluados, el contenido total de flavonoides mostró un incremento significativo al aplicar el tratamiento individual de MHAf en contraste con el tratamiento combinatorio. Ambos tratamientos individuales presentaron mayores valores de contenido de flavonoides respecto al tratamiento combinatorio, sugiriendo un efecto antagonista entre ambos factores de estrés respecto a la producción de flavonoides.

Se observaron respuestas similares en la capacidad antioxidante en los ensayos de DPPH y ABTS, en donde el tratamiento combinatorio resultó un menor porcentaje de inhibición en contraste con los tratamientos individuales. Los resultados en ambos ensayos difieren en el grupo control. Mientras que en el ensayo de DPPH, no se observó diferencias significativas entre el control y los tratamientos individuales; en el ensayo de ABTS, el grupo control presentó un porcentaje de inhibición significativamente menor a los tratamientos individuales, resultando en una falta de correlación entre los ensayos, esto debido a la diferencia en la naturaleza de los mecanismos de reacción de ambos ensayos (Rumpf, *et al.* 2023; Alvarez-Parrilla, *et al.* 2011). Estos resultados sugieren que marcadores de inmunidad expresados en la presencia de estos factores de estrés, posiblemente se encuentran más relacionados a actividad antioxidante enzimática a nivel bioquímico, disminuyendo niveles de ROS generados por dichos tratamientos. Basándonos en indicadores antioxidantes, la combinación de estresores puede llevar a un daño oxidativo más severo.

#### 8.2.4. Contenido de Capsaicinoides y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El contenido total de capsaicina que se obtuvo mediante cromatografía de gases masas (GC-MS) demostró una diferencia significativa del grupo control contra los tratamientos evaluados, siendo el grupo control el que presentó mayor contenido de capsaicina. El contenido total de  $\text{H}_2\text{O}_2$  endógeno fue significativamente mayor en todos los tratamientos evaluados contra el grupo control (Figura 24). Este último resultado era esperado por la naturaleza de los tratamientos, siendo estos tipos de estresores, los cuales son conocidos por aumentar la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  endógeno.

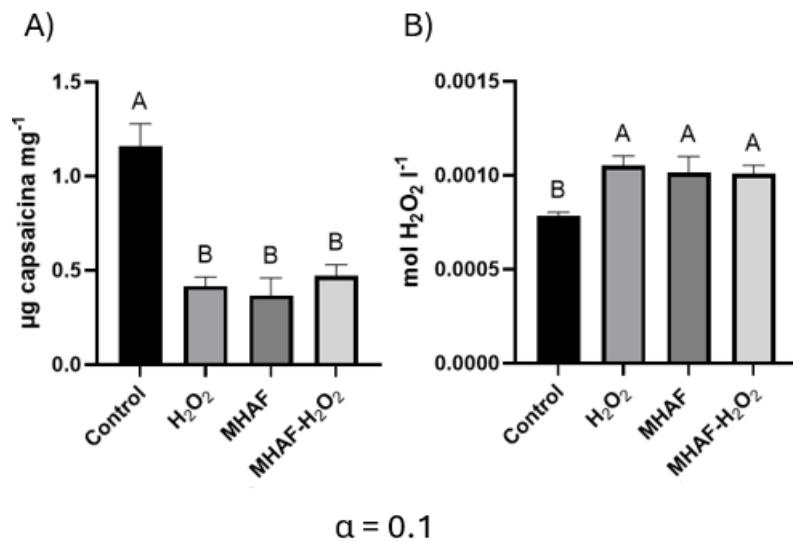


Figura 24. Contenido total de capsaicina de frutos de *C. annuum* y contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  endógeno de hojas de *C. annuum* tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MHAF y combinación. A) Contenido de capsaicina. B) Contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  endógeno. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

Una concentración de peróxido de hidrógeno endógeno significativamente mayor se observó en la aplicación de los tres tratamientos en comparación con el grupo control. Este resultado era esperado debido a que la aplicación de estresores sobre plantas genera especies reactivas de oxígeno; en este contexto,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a pesar de ser un ROS, dependiendo de su concentración, presenta una función importante de molécula señalizadora en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como ayudar a coordinar respuestas contra el estrés (Mhamdi, 2023).

En el caso del contenido total de capsaicina, se presentó una mayor concentración en el grupo control comparado con los demás tratamientos; sin embargo, el estudio realizado por Caicedo-Lopez, *et al.* (2021) reportó una mayor producción de capsaicina. La diferencia de resultados entre ambos estudios puede deberse a que son tipos diferentes de chile; otra posible explicación puede ser que la mayor actividad de POD observada en el presente estudio disminuyó el contenido de capsaicina oxidada en las muestras analizadas, como se sugiere por otros autores (González-Gordo, *et al.* 2023).

#### 8.2.5. Expresión relativa génica.

La expresión relativa de diferentes genes de MAPquininas con la aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MHAf de forma individual y combinada en plantas de *C. annuum* se puede observar en la Figura 25.

Los genes de MAPquinasa analizados fueron *mkk5*, *mpk4-1*, *mpk4-3*, *mpk6-1* y *mpk6-2*. Siendo *mkk5* una MAPquinasa quinasa, mientras que el resto son MAPquininas. Para el gen *mkk5*, el tratamiento con estresores combinados estadísticamente indujo mayor expresión en comparación con los demás grupos evaluados, sin embargo, se pudo observar una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, de mayor expresión con el tratamiento MHAf contra el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Algo similar se registró para la expresión del gen *mpk6-1*, en donde el tratamiento combinatorio presentó mayor expresión que los demás grupos, sin embargo, el tratamiento MHAf también presentó diferencias significativas respecto a mayor expresión contra el grupo control y el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La expresión génica de *mpk4-1* y *mpk6-2* fue significativamente mayor con el tratamiento combinatorio contra los demás grupos evaluados. Los tratamientos individuales y el grupo control no presentaron ninguna diferencia significativa entre ellos.

Alternativamente, la expresión génica relativa de *mpk4-3* mostró diferencias significativas entre todos los grupos, con una expresión significativamente mayor para el grupo control, mientras que el tratamiento combinatorio presentó un valor mayor contra el tratamiento individual de MHAF y menor contra el tratamiento individual de  $H_2O_2$ .

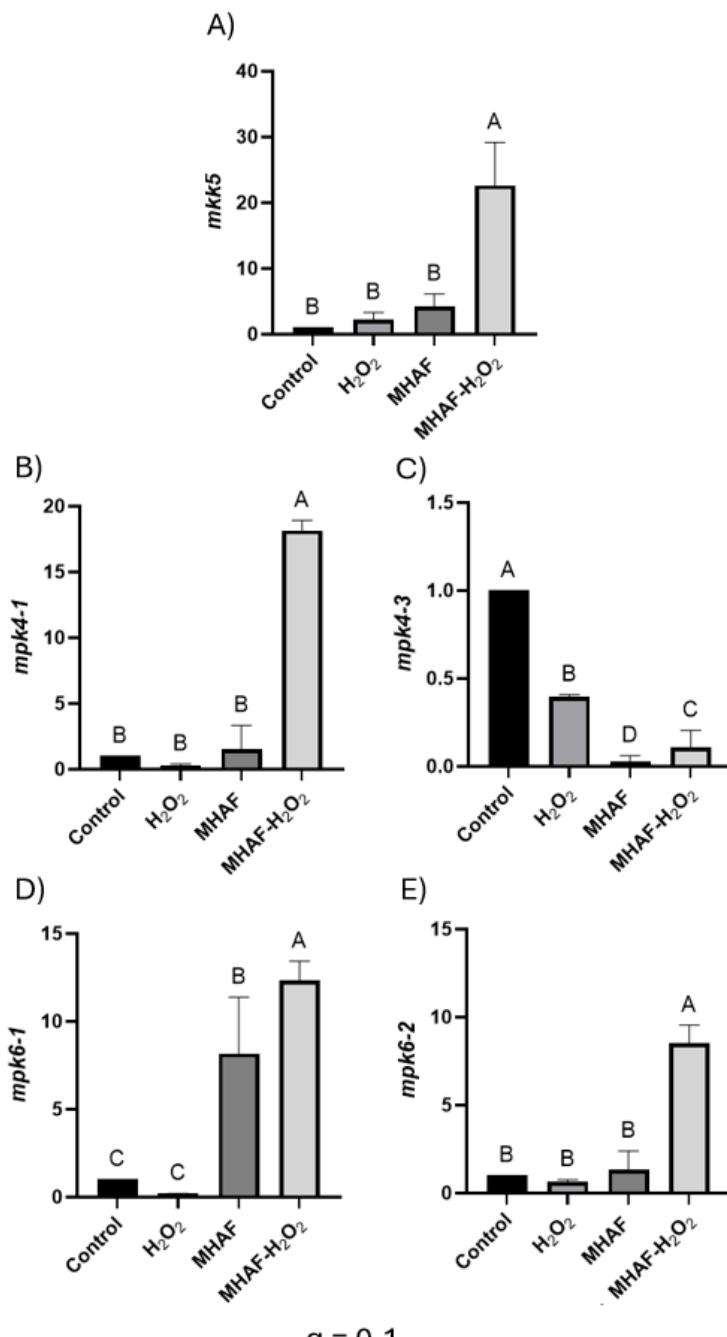


Figura 25. Expresión relativa genética en hojas de *C. annuum* tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MHAF y combinación. A) Expresión de *mkk5*. B) Expresión de *mpk4-1*. C) Expresión de *mpk4-3*. D) Expresión de *mpk6-1*. E) Expresión de *mpk6-2*. Datos expresados como media ± error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que se lleva a cabo sobre la respuesta de MAPquininas con emisiones acústicas como factores de estrés, arrojando luz sobre la ruta de cascada de señalización que responde a las emisiones acústicas evaluadas. Los resultados demostraron que los genes *mkk5*, *mpk4-1*, *mpk6-1* y *mpk6-2*, se regularon positivamente con el tratamiento combinatorio, mientras que el gen *mpk4-3* se reguló negativamente por los factores de estrés individuales, así como por el tratamiento combinatorio, sugiriendo un efecto sinérgico entre ambos estresores para la expresión de los cuatro genes regulados positivamente. Estos resultados concuerdan con Lui (Liu, *et al.* 2015), en donde la expresión de *mkk5* se relacionó con las demás MAPquininas mencionadas anteriormente. En ese estudio, diversos tratamientos de estrés se aplicaron; sin embargo, el uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MHAF no fue evaluado. Los resultados obtenidos en el estudio de esta tesis demostraron que los estresores evaluados, al ser combinados, pueden activar una ruta con *mkk5*, siguiendo las demás MAPquininas evaluadas, con excepción de *mpk4-3*, lo cual sugiere que el gen de *mpk4-3* posiblemente se enciende por otros factores de estrés, o quizás por frecuencias acústicas, nivel de decibelios y concentraciones de peróxido de hidrógeno diferentes.

Mientras estos tratamientos pueden tener diferentes efectos en especies diferentes, los resultados obtenidos con los decibelios y frecuencias aplicadas en este estudio sugieren fuertemente que el tratamiento con MHAF en combinación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede encender una ruta a través de *mkk5* antes de proceder a través de las otras MAPquininas evaluadas.

La expresión de genes marcadores de resistencia sistémica inducida (ISR) relacionados a defensa como *erf1*, *asr1* y *def1* fueron evaluados. Los resultados observados en la Figura 26 demostraron diferencias estadísticas para el gen *erf1* con el tratamiento de MHAF, seguido del tratamiento combinatorio, mientras que el

tratamiento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el grupo control no presentaron diferencias. Para el gen *asr1* se observó el mayor valor en su expresión con el tratamiento combinatorio, seguido del tratamiento de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mientras que el tratamiento de MHAF no tuvo diferencias significativas contra el grupo control. En el caso del gen *def1* se registraron diferencias significativas entre todos los grupos, siendo la menor expresión con el tratamiento combinatorio, mientras la mayor expresión se dio con el tratamiento de MHAF seguido del de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

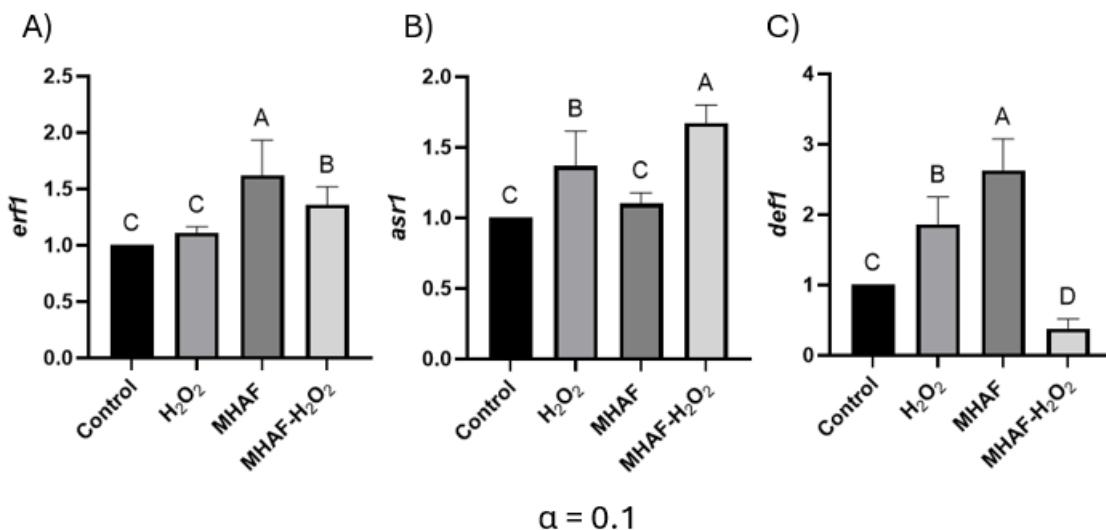


Figura 26. Expresión relativa genética en hojas de *C. annuum* tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MHAF y combinación. A) Expresión de *erf1*. B) Expresión de *asr1*. C) Expresión de *def1*. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

Los genes *erf1* y *asr1* se encuentran relacionados a la ruta de defensa de resistencia sistémica inducida (ISR), la cual ayuda a las plantas en la tolerancia de estresores bióticos y abióticos, usualmente involucrando rutas de señalización de etileno y ácido jasmónico respectivamente (Montejano-Ramírez & Valencia-Cantero, 2023; Dominguez & Carrari, 2014). Los resultados obtenidos demuestran que el gen *erf1* se regula positivamente por el tratamiento individual de MHAF seguido por el tratamiento combinatorio; sin embargo, para el gen *asr1*, la combinación de estresores seguido del tratamiento individual con  $\text{H}_2\text{O}_2$  regulan positivamente su expresión. Notablemente, el otro marcador genético ISR evaluado

(*def1*), el cual está involucrado en resistencia a daño de ADN y mantenimiento genómico (Akinniyi & Reese, 2021), presentó una regulación positiva con la aplicación de los tratamientos individuales, mientras que la combinación de estos resultó en una regulación negativa sobre su expresión, comparado con el grupo control. Esto sugiere que los factores de estrés evaluados tienen un efecto antagónico para esta variable molecular.

Se evaluó la expresión de genes marcadores de resistencia sistémica adquirida (SAR), siendo estos los genes *npr1* y *pr1a*, como puede observarse en la Figura 27. Los resultados obtenidos muestran que el gen *npr1* fue regulado positivamente por el tratamiento de MHAF así como al tratamiento combinatorio, siendo este tratamiento el que resultó en una mayor expresión. Para el caso de la expresión del gen *pr1a*, el tratamiento de  $H_2O_2$  fue significativamente mayor que el grupo control y MHAF, mientras que el tratamiento combinatorio resultó en la mayor expresión de dicho gen.

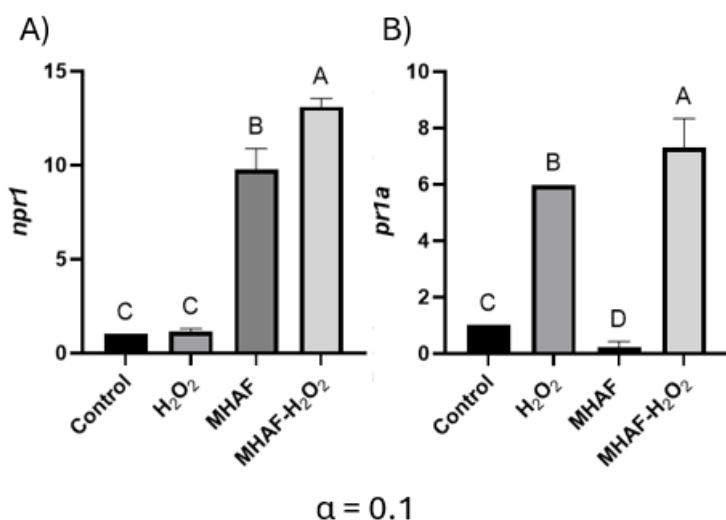


Figura 27. Expresión relativa genética en hojas de *C. annuum* tratadas con  $H_2O_2$ , MHAF y combinación. A) Expresión de *npr1*. B) Expresión de *pr1a*. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

Los genes *npr1* y *pr1a* están relacionados con la defensa de la planta, específicamente a la ruta de defensa de resistencia sistémica adquirida (SAR), la

cual es la respuesta inmune de amplio espectro contra patógenos de esta planta (Liu, *et al.* 2023; Cao, *et al.* 1997). Para el gen *npr1*, los resultados mostraron que el tratamiento individual con MHAf fue el estresor responsable de su regulación positiva. En contraste, el gen *pr1a* mostró una diferencia significativa en su expresión al aplicar el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sin embargo, el tratamiento individual con MHAf resultó en una regulación negativa contra el grupo control.

Mientras el tratamiento combinatorio fue el tratamiento que mostró los mayores valores de expresión para ambos genes, se encontró una modesta diferencia contra sus respectivos estresores individuales responsables de regulación positiva, lo cual sugiere que, para estas variables, cada uno tiene un estresor responsable diferente para su regulación. Esto también sugiere que las plantas de *C. annuum* tratadas con la combinación de estresores pueden ser más tolerantes a ataques de patógenos, lo cual es una teoría que se debería de comprobar en estudios futuros.

Los resultados de la expresión relativa de genes relacionados a la metilación y desmetilación del ADN (*ros1* y *met1*) se puede observar en la Figura 28. Los resultados obtenidos mostraron una expresión significativamente mayor en ambos genes con el tratamiento combinatorio contra los demás grupos. Mientras para el gen *ros1*, los tratamientos individuales y grupo control no presentaron diferencias significativas, para el gen *met1*, el tratamiento individual de MHAf presentó una expresión mayor contra el tratamiento individual de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y grupo control.

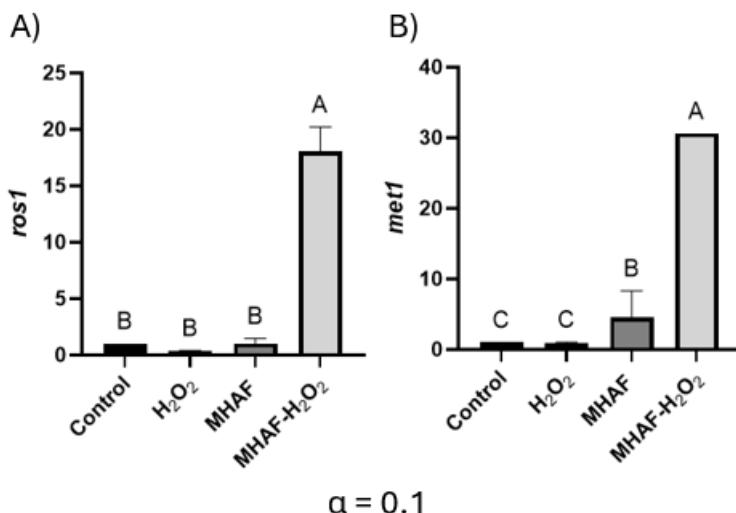


Figura 28. Expresión relativa genética en hojas de *C. annuum* tratadas con  $H_2O_2$ , MHAF y combinación. A) Expresión de *ros1*. B) Expresión de *met1*. Datos expresados como media  $\pm$  error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

La desmetilación del ADN puede llevarse a cabo por la acción del gen *ros1* (Liu & Lang, 2019). Al mismo tiempo, el gen *met1* codifica para una metiltransferasa de ADN y se encarga de llevar a cabo la metilación *de novo* para mantener la metilación del ADN (Buchmann, *et al.* 2009). Estos genes se encargan de regular la expresión del ADN al silenciar o activar la expresión de diversos genes dependiendo del estímulo ambiental. Estresores de carácter abiótico pueden afectar cambios dinámicos en la metilación del ADN; estos cambios regulan la expresión de genes relacionados a respuesta a estrés, mejorando la tolerancia a estrés de la planta (Chinnusamy & Zhu, 2009).

En este contexto, se observó que la combinación de los estresores evaluados reguló positivamente la expresión de los genes *ros1* y *met1*, sugiriendo un efecto sinérgico al combinar MHAF con  $H_2O_2$ . Estos genes juegan un rol importante en rutas de defensa en respuesta a estrés abiótico (Yang, *et al.* 2022). Cabe mencionar que el gen *ros1*, en comparación con otros genes, se regula positivamente al ser metilado, lo cual sugiere que mientras el gen *met1* silencia algunos genes, la regulación positiva de *ros1* por *met1*, podría activar o regular positivamente otros genes al aplicar uno o ambos factores de estrés evaluados. Interesantemente, en

otro estudio (Villagómez-Aranda, *et al.* 2024) llevado a cabo en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por aspersión foliar, se observó en la progenie hipometilación en genes involucrados en respuesta celular a estímulos ambientales, sugiriendo la inducción de memoria intergeneracional. De este modo, el estudio de la expresión génica de metilasas y desmetilasas de ADN, en adición de otros componentes epigenéticos en plantas, podría ayudar a desentrañar pistas sobre la memoria de estrés en plantas.

#### 8.2.6. Análisis multivariable.

Se realizó un análisis multivariable de componentes principales (PCA) para poder visualizar la correlación entre tratamientos y las diferentes variables evaluadas en el estudio (Figura 29). Adicionalmente se realizó un ANOVA para determinar el efecto de las interacciones de los dos factores de estrés evaluados. Los resultados demostraron que varios genes presentaron una tendencia hacia el tratamiento combinatorio.

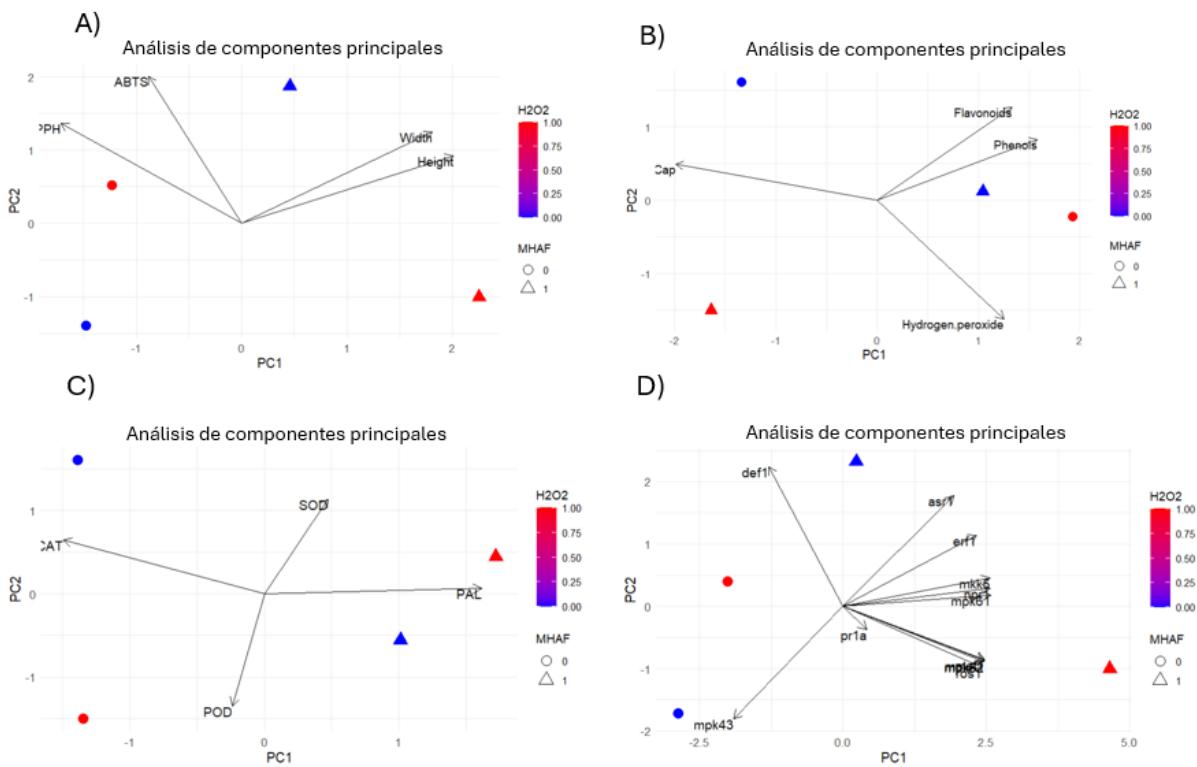


Figura 29. Análisis de componentes principales (PCA) de los tratamientos de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MHAf y combinatorio, con las variables morfológicas, bioquímicas y moleculares evaluadas en el estudio. A) Variables morfológicas y ensayos antioxidantes no enzimáticos. B) Compuestos fenilpropanoides, capsaicina y  $\text{H}_2\text{O}_2$  endógeno. C) Ensayos enzimáticos. D) Expresión relativa génica.

Para los resultados observados en el PCA, los datos sugieren que el tratamiento combinatorio presenta una mayor correlación con múltiples variables. Este tratamiento de MHAf con  $\text{H}_2\text{O}_2$  mostró correlación con variables de expresión relativa de genes como las MAPquinasas, a excepción de *mpk4-3*, así como los genes *npr1*, *ros1* y *met1*, lo cual coincide con el análisis individual de dichos genes sugiriendo un efecto sinérgico.

De igual manera, se observó una correlación entre la actividad enzimática de PAL y el tratamiento con MHAf. Para el gen *mpk4-3*, los datos indican que los tratamientos tuvieron un efecto negativo en la regulación de su expresión en contraste con el grupo control, lo que sugiere que estos factores de estrés no

activaron la ruta que sigue *mpk4-3*; sin embargo, esto fue contrario para el resto de las MAPquinas evaluadas.

Los datos del tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  sugieren relevancia hacia la actividad enzimática de POD y expresión génica de *pr1a*. Por otro lado, el tratamiento con MHAF fue relevante para la altura de la planta, actividad enzimática de PAL y expresión génica de *mpk6-1* y *erf1*. Sin embargo, para el tratamiento combinatorio, los resultados demostraron una interacción antagonista para el contenido total de flavonoides, actividad antioxidante por DPPH y ABTS, y expresión génica de *def1*; mientras se observó un efecto sinérgico para la actividad enzimática de SOD y expresión génica de *mkk5*, *mpk4-1*, *mpk6-2*, *ros1* y *met1*.

### 8.3. Determinación de características heredables en generación F1.

La altura de las plántulas F1 de plantas de *C. annuum* previamente tratadas en el experimento del segundo objetivo fue significativamente mayor para la descendencia del tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  contra todos los demás grupos. Mientras que el contenido relativo de agua entre todos los grupos no presentó diferencias significativas (Figura 30).

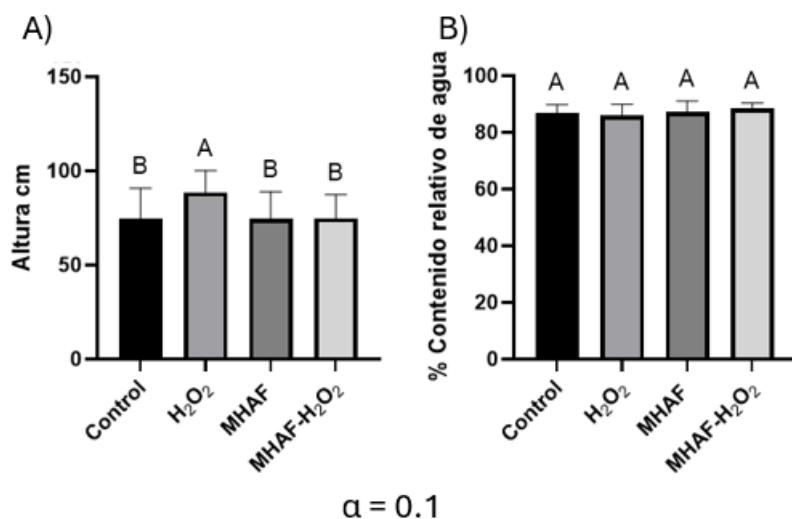


Figura 30. Mediciones de plántulas F1 de plantas de *C. annuum* tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MHAf y combinación. A) Altura de plántulas. B) Contenido relativo de agua. Datos expresados como media ± error estándar. Nivel de confianza  $\alpha=0.1$ .

En este estudio se observó que únicamente la progenie F1 de las plantas de *C. annuum* tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentó una diferencia significativa respecto a la altura de plántula en comparación con los demás grupos. Se ha revelado el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los niveles de metilación en plantas, en donde la metilación es un marcador estable sobre la herencia de cualidades epigenéticas (Villagómez-Aranda, *et al.* 2021). También es sabido que las plantas durante su crecimiento alteran su morfología, balanceo de recursos y composición química, determinando su susceptibilidad a factores de estrés (Rankenberg, *et al.* 2021). Esto sugiere que posiblemente se ve una diferencia con la progenie del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a su efecto de herencia epigenética, viéndose traducido como mayor crecimiento en esa etapa temprana de plántula. La progenie del tratamiento con MHAf y combinatorio no presentó diferencias significativas en esta etapa, sin embargo, estudios futuros para registrar su comportamiento en una etapa de crecimiento mayor, así como evaluación de variables bioquímicas podrán indicarnos si las emisiones acústicas tuvieron un efecto generacional.

Adicionalmente, comparando las primeras mediciones semanales de altura a partir del inicio de la aplicación de estresores con las mediciones semanales de altura de plántulas de F1 (Figura 31) se observa como en el experimento combinatorio únicamente el tratamiento con MHAf se mantiene arriba del control, hasta la última medición en donde el tratamiento combinatorio aumenta por encima del grupo control. En el caso de las plántulas se observa el caso contrario en el que el tratamiento con MHAf presenta una altura menor al grupo control, mientras el peróxido presenta mayor altura, esto podría indicar un efecto intergeneracional del peróxido de hidrógeno, sin embargo, más estudios se deben de realizar pasada la etapa de plántula para corroborar si se repite un efecto similar al grupo parental en donde las últimas mediciones presentaban mayor crecimiento que el control.

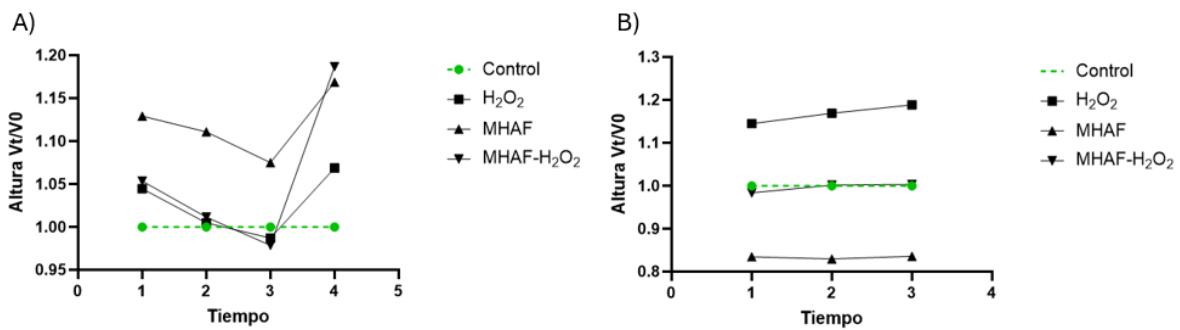


Figura 31. Altura de plantas de experimento combinatorio y plántulas de la generación F1, en donde  $V_t$  es la respuesta al tratamiento y  $V_0$  es la respuesta control. A) Experimento combinatorio con las primeras tres medidas a partir de la aplicación de estresores y el cuarto tiempo siendo la última medida registrada. B) Generación F1 con las primeras tres medidas de plántula.

Indicadores fisiológicos como el contenido relativo de agua juegan un rol importante en la tolerancia al déficit de agua en plantas (González-Espíndola, *et al.* 2024). El contenido relativo de agua, así como la concentración de especies reactivas de oxígeno, pueden ser modificados por el efecto de factores de estrés (Aroca, *et al.* 2012). Esto sugiere que la generación F1 tolera en igual medida el déficit de agua y que no se encontraban en presencia de factores de estrés que alterara este contenido de agua, sin embargo, se deberían de hacer evaluaciones posteriores de compuestos como contenido de ROS y actividad enzimática para observar alguna cualidad heredada, así como se observó con la variable de altura de plántulas con  $H_2O_2$ .

## 9. Conclusiones y perspectivas.

Las emisiones acústicas (MHAF) aplicadas a 69 dB en el genotipo de *C. annuum* estudiado podrían llegar a usarse a nivel invernadero para mejorar su crecimiento y desarrollo. Aún se deben de hacer más estudios para el incremento de contenido de capsaicinoides debido a que el primer experimento resultó en un aumento de estos, mientras que el segundo experimento mostró resultados contrarios en ese

aspecto, es posible que se deba a diferencias climáticas y de manipulación entre ambos experimentos. Sin embargo, este tipo de tratamiento luce prometedor si se perfecciona, para su uso como bioestimulante en la producción de capsaicinoides, los cuales se pueden usar en el área de nutrición animal y en salud humana como agente preventivo de enfermedades cardiovasculares, cáncer y desordenes neurológicos (Sahid, *et al.* 2020).

A pesar de obtener efectos bioestimulantes con estas frecuencias, no quiere decir que no existan otras frecuencias con efectos similares o mayores para ser aplicados en cultivares. Tal como lo son las frecuencias emitidas por insectos masticando hojas, lo cual resulta en un aumento en la producción de antocianinas y glucosinolatos que funcionan como defensa contra depredadores (Fernandez-Jaramillo, *et al.* 2018). Otra frecuencia que estudiar en *C. annum* es la aplicación por 20 minutos de emisiones acústicas a una frecuencia de 24 kHz, las cuales fueron utilizadas en floretes de brócoli para incrementar su contenido de fenoles y glucosinolatos (Aguilar-Camacho, *et al.* 2019).

En el caso de los resultados obtenidos en el experimento de combinación de estresores se concluye que el efecto combinado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MHAf presentó un posible efecto sinérgico en la actividad de SOD, así como la expresión génica relativa de *ros1*, *met1*, *mkk5*, *mpk4-1* y *mpk6-2*. De igual manera mostró un efecto antagonístico en contenido de flavonoides, el porcentaje de inhibición de radicales libres en ensayos de DPPH y ABTS y en la expresión de *def1*.

En el caso de estresores individuales, MHAf fue relevante para la estimulación de la altura de la planta, actividad enzimática de PAL y regulación positiva en la expresión de *mpk6-1* y *erf1*; mientras que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumento la actividad enzimática de POD y la regulación positiva de *pr1a*.

Siguiendo los resultados de las MAPquinasas, se concluye que la interacción de ambos estresores podría seguir esta ruta de señalización demostrada por la inducción de los genes evaluados para activar el mecanismo de defensa contra estrés. Sin embargo, aún hay estudios que deben de realizarse para confirmar este aspecto. Estudios como un western blot, ensayos de dos híbridos, entre otros para

la activación de MAPquinasas, así como la determinación de contenido de ácido salicílico y ácido jasmónico.

A pesar no tener diferencias significativas en el contenido relativo de agua, se puede concluir con esos resultados que la aplicación de  $H_2O_2$  tiene un efecto heredable epigenético y que se deben de realizar más estudios para comprobar si la aplicación de MHAf pudo tener un efecto a nivel molécula o bioquímico.

Experimentos adicionales que se puede realizar a futuro sería tomar imágenes termográficas del dosel de la planta para monitorear temperatura e índices vegetativos (Solano-Alvarez, *et al.* 2022) mediante una cámara RGB, midiendo variables fisiológicas como fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática y déficit de presión de vapor. En cuestión a respuesta a déficit hídrico, se puede usar plantas en etapa vegetativa en donde se rieguen a saturación, registrando el peso para posteriormente retirar la aplicación de agua por tres semanas hasta llegar a una capacidad de maceta del 40%, manteniendo esa capacidad con el riego necesario, pesando de forma diaria la maceta (Sáenz-de la O, *et al.* 2021)

Estos resultados demuestran potencial de usar en conjunto  $H_2O_2$  con MHAf como factores de estrés de fácil aplicación y amigables con el ambiente que pudiesen ser usados para cebar plantas como *C. annum* como bioestimulantes para mejorar su tolerancia a factores de estrés, convirtiéndolo en una nueva estrategia agrícola de manejo de estrés.

Una propuesta de aplicación de la técnica con MHAf en campo abierto e invernaderos se puede observar en la Figura 32. Consistiendo en el uso de postes con bocinas omnidireccionales, colocados entre los surcos de plantas de tal forma que reciban aproximadamente el mismo tratamiento siendo este de 69 dB (o el adecuado dependiendo de la especie, genotipo, etc.). Para la aplicación de  $H_2O_2$  se puede usar un sistema de aspersión similar al utilizado para el riego. Adicionalmente se deberían de llevar a cabo estudios respecto al efecto de estos tratamientos sobre otros organismos vivos cercanos a los cultivos de plantas, de tal forma que se pueda usar de forma efectiva esta nueva estrategia de agricultura sustentable.

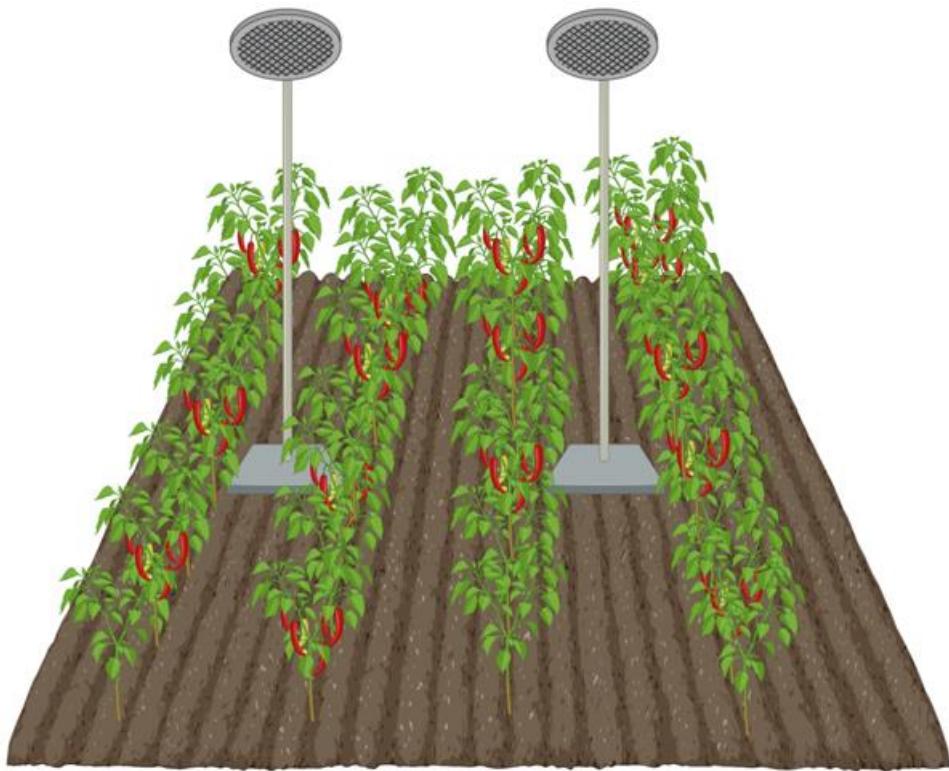


Figura 32. Aplicación propuesta en cultivares a campo abierto e invernadero con bocinas omnidireccionales entre surcos de plantas a 69 dB (creado con biorender.com).

Un resumen de las conclusiones del experimento combinatorio se puede observar en la Figura 33, en donde se muestra una ruta putativa de la ruta que toman los factores de estrés de MHAf y  $H_2O_2$ .

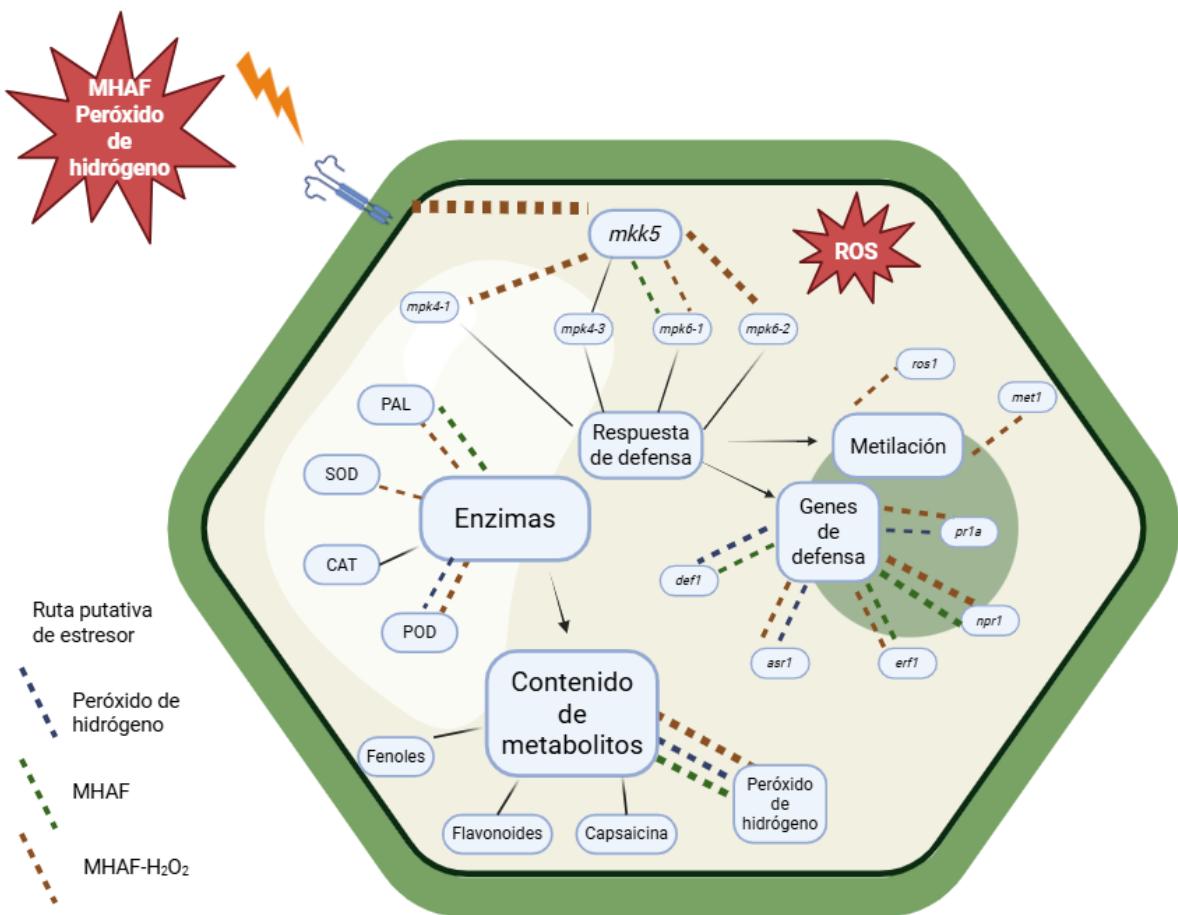


Figura 33. Ruta putativa de los estresores MHAf y  $H_2O_2$  en el experimento combinatorio.

## 10. Referencias

Abbas A. & Abdulatif M. (2016). *Determination activities of optimal conditions of peroxidase in hot Pepper and Broccoli*. Journal of Wasit for Science and Medicine. <https://doi.org/10.31185/jwsm.299>

Afiyanti M. & Chen H. (2014). *Catalase activity is modulated by calcium and calmodulin in detached mature leaves of sweet potato*. Journal of Plant Physiology. 171(2), 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.003>

Agathokleous E., Belz R., Calatayud V., De Marco A., Hoshika Y., Kitao M., Saitanis C., Sicard P., Paoletti E. & Calabrese E. (2019). *Predicting the effect of ozone on vegetation via linear non-threshold (LNT), threshold and hormetic dose-response models*. Science of the Total Environment. 649, 61-74. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.264>

Aguilar-Camacho M., Welti-Chanes J. & Jacobo-Velázquez D. (2019). *Combined effect of ultrasound treatment and exogenous phytohormones on the accumulation of bioactive compounds in broccoli florets*. Ultrasonics Sonochemistry. 50, 289-301. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.09.031>

Ahmed Z., Alblooshi S., Kaur N., Maqsood S. & Schmeda G. (2021). *Synergistic Effect of Preharvest Spray Application of Natural Elicitors on Storage Life and Bioactive Compounds of Date Palm (Phoenix dactylifera L., cv. Khesab)*. Horticulturae. Vol. 7. No. 6. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7060145>

Akinniyi O. & Reese J. (2021). *DEF1: Much more than an RNA polymerase degradation factor*. DNA Repair. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103202>

Alonso C., Ramos D. & Becker C. (2018). *The role of plant epigenetics in biotic interactions*. New Phytologist. Vol. 221. No. 2. <https://doi.org/10.1111/nph.15408>

Alvarez-Parrilla E., De La Rosa L., Amarowicz R. & Shahidi F. (2011). *Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeño and Serrano Peppers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59, 163-173. <https://doi.org/10.1021/jf103434u>

Angole-Tierrablanca J., Jiménez-Hernández A., Aguilar-Rodríguez P., Feregrino-Perez A., Rico-Chávez A., Godínez-Mendoza P., Torres-Pacheco I., Guzman-Cruz R., Nuñez-Muñoz L. & Guevara-González R. (2025). *Hydrogen Peroxide Application Based on a Hormetic Scheme Biostimulates Capsicum annuum L. Grown Under Two Fertigation Regimes*. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. [https://doi.org/10.1007/s42729-024-02161-6\(11\)](https://doi.org/10.1007/s42729-024-02161-6(11))

Apel K. & Hirt H. (2004). *Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction*. Annual Review of Plant Biology. Vol. 55. No. 1. pp: 373-399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

Aroca R., Porcel R. & Ruiz-Lozano J. (2012). *Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions*. Journal of Experimental Botany. <https://doi.org/10.1093/jxb/err266>

Bañas N., García-Viguera C. & Moreno D. (2014). *Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods*. Molecules. Vol. 19. No. 9. 13541 – 13563. doi: 10.3390/molecules190913541

Banerjee A. & Roychoudhury A. (2019). *Abiotic Stress Tolerance in Plants by Priming and Pretreatment with Hydrogen Peroxide*. Springer Nature. DOI: 10.1007/978-981-13-8625-1\_20

Basak R., Wahid K., Dinh A., Soolanayakanahally R., Fotouhi R. & Mehr A. (2020). *Rapid and Efficient Determination of Relative Water Contents of Crop Leaves Using Electrical Impedance Spectroscopy in Vegetative Growth Stage*. Remote Sensing. <https://doi.org/10.3390/rs12111753>

Belz R. (2020). *Low herbicide doses can change the responses of weeds to subsequent treatments in the next generation:metamitron exposed PSII-target-site resistant Chenopodium album as a case of study.* Pest Management Science. <https://doi.org/10.1002/ps.5856>

Belz R. & Duke S. (2022). *Modelling biphasic hormetic dose responses to predict sub- NOAEL effects using plant biology as an example.* Current Opinion in Toxicology. 29, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2022.01.003>

Bhandawat A., Jayaswall K., Sharma H. & Roy J. (2020). *Sound as a stimulus in associative learning for heat stress in Arabidopsis.* Communicative & Integrative Biology, Vo. 13. No. 1., 1-5, DOI: 10.1080/19420889.2020.1713426.

Bhandawat A. & Jayaswall K. (2022). *Biological relevance of sound in plants.* Environmental and Experimental Botany. 104919. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104919>

Bilichak A., Ilnytskyy Y., Hollunder J. & Kovalchuk I. (2012). *The progeny of Arabidopsis thaliana plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expression.* PLoS One. Vol. 7. No. 1. DOI: 10.1371/journal.pone.0030515

Brachi B., Aimé C., Glorieux C., Cuguen J. & Roux F. (2012). *Adaptive value of phenological traits in stressful environments: predictions based on seed production and laboratory natural selection.* PLoS One. Vol. 7. No. 3. DOI: 10.1371/journal.pone.0032069

Bradford M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Breña A. (2021). *Seguridad hídrica en tiempos de sequía.* Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Perspectivas IMTA. No. 14. DOI: 10.24850/b- imta-perspectivas-2021-14

Buchmann R., Asad S., Wolf J., Mohannath G. & Bisaro D. (2009). *Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation.* Journal of Virology. <https://doi.org/10.1128/jvi.01771-08>

Caicedo L., Contreras L., Guevara R., Perez A. & Ruiz A. (2020). *Effects of hydric stress on vibrational frequency patterns of Capsicum annuum plants.* Plant Signaling & Behavior. 2020 Jul 2;15(7):1770489. doi: 10.1080/15592324.2020.1770489.

Caicedo L., Guevara R., Andrade J., Esquivel A., Perez A., Torres I. & Contreras L. (2021). *Effect of hydric stress-related acoustic emisión on transcriptional and biochemical changes associated with a water deficit in Capsicum annuum L.* Plant Physiology and Biochemistry. 2021 Aug;165:251-264. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.05.011.

Caicedo L., Villagómez A., Espinoza E., Zavala C., Sáenz D. & Romero H. (2021). *Elicitors: bioethical implications for agricultura and human health.* Revista Bioética 29(1):76-86. DOI: 10.1590/1983-80422021291448.

Calabrese E. (2004). *Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine.* EMBO reports, 5 Spec No(Suppl 1), S37–S40. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400222>

Cao H., Glazebrook J., Clarke J., Volko S. & Dong X. (1997). *The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats.* Cell. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81858-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81858-9)

Cao Y., Gao Y., Sun W., Huang Y., Zhang J. & Bai J. (2013). *Role of hydrogen peroxide pretreatment in heat-induced alteration of DNA methylation in cucumber leaves.* Scientia Horticulturae. Vol. 151. pp: 173-183. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.12.025>

Chinnusamy V. & Zhu J. (2009). *Epigenetic regulation of stress responses in plants.* Current Opinion in Plant Biology. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.006>

Choi B., Ghosh R., Gururani M., Shanmugam G., Jeon J., Kim J., Park S., Jeong M., Han K., Bae D. & Bae H. (2017). *Positive regulatory role of sound vibration treatment in Arabidopsis thaliana against Botrytis cinerea infection.* Scientific Reports. Vol. 7. No. 2527. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02556-9>

Chowdhury E., Lim H. & Bae H. (2014). *Update on the Effects of Sound Wave on Plants.* Research in Plant Disease. Vol. 20 No.1. <http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.1.001>

Colla G. & Rouphael Y. (2015). *Biostimulants in horticulture*. Scientia Horticulturae. Vol. 196:1-2. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.10.044.

Contreras A., Cortés M., Costich D., Rico M., Magos J. & Maxted N. (2018). *A crop wild relative inventory for Mexico*. Crop Science, Vol. 58: 1292-1305. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.07.0452>

Cordoba A., Hernández R., Viveros I., Mendoza S., Guevara R., Feregrino A. & Esquivel K. (2021). *Effect on plant growth parameters and secondary metabolite content of lettuce (*Lactuca sativa L.*), coriander (*Coriandrum sativum*), and chili pepper (*Capsicum annuum L.*) watered with disinfected water by Ag-TiO<sub>2</sub> nanoparticles*. Environmental science and pollution research international. 28(28), 37130–37141. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13317-7>

Dannehl D. (2018). *Effects of electricity on plant responses*. Scientia Horticulturae. Vol. 234. 382 – 392. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.007>

Demkura P. & Ballaré C. (2012). *UVR8 mediates UV-B induced *Arabidopsis* defense responses against *Botrytis cinerea* by controlling sinapate accumulation*. Molecular Plant. Vol. 5, No. 3. 642-652. <https://doi.org/10.1093/mp/sss025>

Dewanto V., Wu X., Adom K. & Liu R. (2002). *Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(10), 3010-3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>

Dominguez P. & Carrari F. (2014). *ASR1 transcription factor and its role in metabolism.* Plant Signaling & Behavior. <http://doi.org/10.4161/15592324.2014.992751>

du Jardin P. (2015). *Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation.* Scientia Horticulturae. Vol. 196. 3 - 14 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>

Ehsanpour A. & Razavizadeh R. (2005). *Effect of UV-C on drought tolerance of alfalfa (Medicago sativa) callus.* American Journal of Biochemistry and Biotechnology. Vol. 1(2). 107-110. DOI: 10.3844/ajbbsp.2005.107.110

Erofeeva E. (2020). *Estimating the frequency of hormesis and other non-monotonic responses in plants experiencing road traffic pollution in urban areas and experimental pollutant exposure.* Environmental Monitoring and Assessment. 192 (7). <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08418-8>

Fernandez-Jaramillo A., Duarte-Galvan C., Garcia-Mier L., Jimenez-Garcia S. & Contreras-Medina L. (2018). *Effects of acoustic waves on plants: An agricultural, ecological, molecular and biochemical perspective.* Scientia Horticulturae. Vol. 235. 340 – 348. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.060>

Ferruzca-Campos E., Rico-Chávez A., Guevara-González R., Urrestarazu M., Cunha-Chiamolera T., Reynoso-Camacho R. & Guzmán-Cruz R. (2023). *Biostimulant and Elicitor Responses to Cricket Frass (Acheta domesticus) in Tomato (Solanum lycopersicum L.) under Protected Conditions.* Plants. 12 (6), 1327. <https://doi.org/10.3390/plants12061327>

Fink D. (2016). *What Is a Safe Noise Level for the Public?*. American Journal of Public Health. 107 (1) : 44-45. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2016.303527>

Flores D. (2013). *Acumulación de dehidrinas en chiles serranos (*Capsicum annuum* L.) bajo condiciones de estrés hídrico*. Horticultura (Maestría). <http://repositorio.aaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7071>

Fukumoto L. & Mazza G. (2000). *Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(8), 3597-604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>

Furlan A., Bianucci E., Giordano W., Castro S. & Becker D. (2020). *Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants*. Plant Physiology and Biochemistry. Vol. 151. 566-578. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.010>

Gagliano M., Mancuso S. & Robert D. (2012). *Towards understanding plant bioacoustics*. Trends in Plant Science. Vol. 17. 323-325. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.002>

García R., Ayala P. & Perdomo S. (2012). *Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana*. Revista Ciencias de la Salud. Vol. 10. No. 1.

García-Gaytán V., Gómez-Merino F., Trejo-Téllez L., Baca-Castillo G. & García-Morales S. (2017). *The Chilhuacle Chili (Capsicum annuum L.) in Mexico: Description of the Variety, Its Cultivation, and Uses*. International Journal of Agronomy. Vol. 2017. No. 5641680. <https://doi.org/10.1155/2017/5641680>

Garcia-Mier L., Jimenez-Garcia S., Guevara-González R., Feregrino-Perez A., Contreras-Medina L. & Torres-Pacheco I. (2015). *Elicitor Mixtures Significantly Increase Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, and Quality Parameters in Sweet Bell Pepper*. Journal of Chemistry. <https://doi.org/10.1155/2015/269296>

Ghosh R., Mishra R., Choi B., Kwon Y., Bae D., Park S., Jeong M. & Bae H. (2016). *Exposure to sound vibrations lead to transcriptomic, proteomic and hormonal changes in Arabidopsis*. Scientific Reports. Vol. 6. 33370. <https://doi.org/10.1038/srep33370>

Godínez-Mendoza P., Rico-Chávez A., Ferrusquía-Jimenez N., Carbajal-Valenzuela I., Villagómez-Aranda A., Torre-Pacheco I. & Guevara-González R. (2023). *Plant hormesis: Revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in a sustainable agricultural production*. Science of the Total Environment. 894 : 164883. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164883>

Goitia C. & Sagredo E. (2012). *Investigación en la literatura científica de conceptos que respaldan el principio homeopático de dosis mínima*. Revista Médica de Homeopatía. Vol. 5(3). 106–112. DOI: 10.1016/S1888-8526(12)70156-X.

Gómez A., Rojas H., Vallejo F. & Estrada E. (2010). *Determinación del requerimiento hídrico del pimentón en el municipio de Candelaria, departamento del Valle del Cauca*. Acta Agronómica. Vol. 59. No. 4. 442 – 448.

González-Chavira M., Estefania-Ojeda S., Díaz-Huacuz S., Pons- Hernández J., Guevara-González R. & Guzmán-Maldonado S. (2018). *Changes in the content of phenolic compounds, steviosides and level of methylation in Stevia rebaudiana elicited*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Vol. 9. No. 7.

González-Espíndola L., Pedroza-Sandoval A., Trejo-Calzada R., Jacobo-Salcedo M., García de los Santos G. & Quezada-Rivera J. (2024). *Relative Water Content, Chlorophyll Index, and Photosynthetic Pigments on Lotus corniculatus L. in Response to Water Deficit*. Plants. <https://doi.org/10.3390/plants13070961>

González-Gordo S., Muñoz-Vargas M., Palma J. & Corpas F. (2023). *Class III Peroxidases (POD) in Pepper (Capsicum annuum L.): Genome-Wide Identification and Regulation during Nitric Oxide (NO)-Influenced Fruit Ripening*. Antioxidants <https://doi.org/10.3390/antiox12051013>

González-Zamora A., Sierra-Campos E., Pérez-Morales R., Vázquez-Vázquez C., Gallegos-Robles M., López-Martínez J. & García-Hernández J. (2015). *Measurement of Capsaicinoids in Chiltepin Hot Pepper: A Comparison Study between Spectrophotometric Method and High Performance Liquid Chromatography Analysis*. HPC Journal of Chemistry. 709150. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/709150>

Hadwan M. (2018). *Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues.* BMC Biochemistry. 19:7.  
<https://doi.org/10.1186/s12858-018-0097-5>

Han L., Hua W., Cao X., Yan J., Chen C. & Wang Z. (2020). *Genome-wide identification and expression analysis of the superoxide dismutase (SOD) gene family in Salvia miltiorrhiza.* Gene. 742, 144603.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144603>

Hayat S., Ahmad H., Ali M., Ren K. & Cheng Z. (2018). *Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (Solanum lycopersicum).* Scientia Horticulturae. 240, 139-146.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.011>

Herman J. & Sultan S. (2011). *Adaptive Transgenerational Plasticity in Plants: Case Studies, Mechanisms, and Implications for Natural Populations.* Frontiers in Plant Science. Vol. 2. 102. doi: 10.3389/fpls.2011.00102

Holeski L., Jander G. & Agrawal A. (2012). *Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants.* Trends in Ecology & Evolution. Vol. 27. No. 11. 618-626. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.011>

Hossain M., Bhattacharjee S., Armin S., Qian P., Xin W. & Li H. (2015). *Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging.* Frontiers in Plant Science. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00420>

Huang J., Gu M., Lai Z., Fan B., Shi K., Zhou Y., Yu J. & Chen Z. (2010). *Functional Analysis of the Arabidopsis PAL Gene Family in Plant Growth, Development, and Response to Environmental Stress*. Plant Physiology. 153 : 1526-1538. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157370>

Ishibashi Y., Yamaguchi H., Yuasa T., Iwaya-Inoue M., Arima S. & Zheng S. (2011). *Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants*. Journal of plant physiology. Vol. 168. No. 13. 1562–1567. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.02.003>

Ismail S. (2010). *Influence of Deficit Irrigation on Water Use Efficiency and Bird Pepper Production (Capsicum annuum L.)*. Journal of King Abdulaziz University – Meteorology Environment and Arid Land Agriculture Sciences. Vol. 21. No. 2. 29-43. DOI: 10.4197/Met. 21-2.3

Iwasaki M. & Paszkowski J. (2014). *Epigenetic memory in plants*. The EMBO Journal. Vol. 33. No. 18. 1987 – 1998. doi: 10.15252/embj.201488883.

Jeong M., Cho J., Park S., Kim K., Lee S., Kwon T., Park S. & Siddiqui Z. (2014). *Sound frequencies induce drought tolerance in rice plant*. Pakistan Journal of Botany. Vol. 46. 2015-2020.

Jeum-Kyu H. & Byung-Kook H. (2005). *Functional Characterization of PR-1 Protein,  $\beta$ -1,3-Glucanase and Chitinase Genes During Defense Response to Biotic and Abiotic Stresses in Capsicum annuum*. The Plant Pathology Journal. 21 (3), 195 – 206. <https://doi.org/10.5423/ppj.2005.21.3.195>

Jin X., Liu Z. & Wu W. (2023). *POD, CAT, and SOD enzyme activity of corn kernels as affected by low plasma pretreatment*. International Journal of Food Properties. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2151619>

Junglee S., Urban L., Huguette S. & Lopez F. (2014). *Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide*. American Journal of Analytical Chemistry. 5(11), 730-736. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.511081>

Kalberer S., Wiesniewski M. & Aroca R. (2006). *Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants. Current understanding and emerging concepts*. Plant Science. Vol. 171. No. 1. 3-16. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.02.013>

Király A., Farkas D. & Dobránszki J. (2025). *Ultrasound in Plant Life and Its Application Perspectives in Horticulture and Agriculture*. Horticulturae. 11(3), 318. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11030318>

Kollasch A., Abdul A., Body M., Pinto C., Appel H. & Cocroft R. (2020). *Leaf vibrations produced by chewing provide a consistent acoustic target for plant recognition of herbivores*. Oecologia. Vol. 194. No. 1-2. 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04672-2>

Kranner I., Minibayeva F., Beckert R. & Seal C. (2010). *What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science*. New Phytologist. Vol. 188. No. 3. 655-673. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>

Lee K., Rahman M., Kim K., Choi G., Cha J. & Cheong M. (2018). *Overexpression of the alfalfa DnaJ-like protein (MsDJLP) gene enhances tolerance to chilling and heat stresses in transgenic tobacco plants*. Turkish Journal of Biochemistry. Vol. 42. 12-22. doi: 10.3906/biy-1705-30.

Li B., Wei J., Wei X., Tang K., Liang Y., Shu K. & Wang B. (2008). *Effect of sound wave stress on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation of Dendrobium candidum*. Colloids and Surfaces B. Biointerfaces. Vol. 63. No. 2. 269- 275. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.12.012>

Lichtenthaler H. (1996). *Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants*. Journal of Plant Physiology. Vol. 148. No. 1-2. 4-14. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80287-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80287-2)

Liu R. & Lang Z. (2019). *The mechanism and function of active DNA demethylation in plants*. Journal of Integrative Plant Biology. <https://doi.org/10.1111/jipb.12879>

Liu R., Lu J., Xing J., Xue L., Wu Y. & Zhang L. (2023). *Characterization and functional analyses of wheat TaPR1 genes in response to stripe rust fungal infection*. Scientific Reports. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30456-8>

Liu Z., Shi L., Liu Y., Tang Q., Shen L., Yang S., Cai J., Yu H., Wang R. & Wen J. (2015). *Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of mitogen-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinase kinase genes in Capsicum annuum*. Frontiers in Plant Science. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00780>

López I. & Vicient C. (2017). *Drought tolerance induced by sound in Arabidopsis plants.* Plant Signaling Behavior. Vol. 12. No. 10. doi: 10.1080/15592324.2017.1368938

Mahmood T., Rana R., Ahmar S., Saeed S., Gulzar A., Khan M., Wattoo F., Wang X., Branca F., Mora-Poblete F., Mafra G. & Du X. (2021). *Effect of Drought Stress on Capsaicin and Antioxidant Contents in Pepper Genotypes at Reproductive Stage.* Plants. 10(7), 1286. <https://doi.org/10.3390/plants10071286>

Malm L., Palm E., Souihi A., Plassmann M., Liigand J. & Kruve A. (2021). *Guide to Semi-Quantitative Non-Targeted Screening Using LC/ESI/HRMS.* Molecules. 26, 3524. <https://doi.org/10.3390/molecules26123524>

Mardani S., Tabatabaei S., Pessarakli M. & Zareabyaneh H. (2017). *Physiological responses of pepper plant (Capsicum annuum L.) to drought stress.* Journal of Plant Nutrition. Vol. 40. No. 10. 1453-1464, DOI: 10.1080/01904167.2016.1269342.

Martínez M. (2019). *Los chiles, su importancia más allá de tenerlos en la mesa.* Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. ISSN: 2395-8790

Mejía-Teniente L., Durán-Flores F., Chapa-Oliver A., Torres-Pacheco I., Cruz-Hernández A., González-Chavira M., Ocampo-Velázquez R. & Guevara-González R. (2013). *Oxidative and Molecular Responses in Capsicum annuum L. after Hydrogen Peroxide, Salicylic Acid and Chitosan Foliar Applications.* International Journal of Molecular Sciences. Vol. 14. No. 5. 10178-10196. DOI: 10.3390/ijms140510178

Mejía-Teniente L., Durán-Flores B., Torres-Pacheco I., González-Chavira M., Rivera-Bustamante R., Feregrino-Perez A., Pérez-Ramírez I. Rocha-Guzmán N., Reynoso-Camacho R. & Guevara-González R. (2019). *Hydrogen peroxide protects pepper (*Capsicum annuum L.*) against pepper golden mosaic geminivirus (PepGMV) infections*. Physiological and Molecular Plant Pathology. Vol. 106. 23 – 29. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.11.008>

Mhamdi A. (2023). *CHAPTER Two – Hydrogen peroxide in plants*. Advances in Botanical Research. 105, 43-75. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2022.11.002>

Mohanta T., Bashir T., Hashem A. & Abd-Allah E. (2017). *Systems biology approach in plant abiotic stresses*. Plant Physiology and Biochemistry. Vol. 121. 58– 73. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.019>

Montejano-Ramírez V. & Valencia-Cantero E. (2023). *Cross-Talk between Iron Deficiency Response and Defense Establishment in Plants*. International Journal of Molecular Sciences. <https://doi.org/10.3390/ijms24076236>

Naves E., de Ávila L., Sulpice R., Araújo W., Nunes A., Peres L. & Zsögön A. (2019). *Capsaicinoids: pungency beyond capsicum*. Trends in Plant Science. Vol. 24. No. 2. 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.001>

Nenadis N., Wang L., Tsimidou M. & Zhang H. (2004). *Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS.+ Assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(15), 4669-4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>

Oomah B., Cardador-Martínez A. & Loarca-Piña G. (2005). *Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris L.*)*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85, 935-942. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2019>

Panche A., Diwan A. & Chandra S. (2016). *Flavonoids: an overview*. Journal of Nutritional Science. Vol. 5. No. 47. doi:10.1017/jns.2016.41

Parola I., Tovar E., Rojas A., Luna F., Torres I. & Ocampo R. (2020). *Changes in affinin contents in *Helianthus longipes* (chilcuague) after a controlled elicitation strategy under greenhouse conditions*. Industrial Crops and Products. Volume 148. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112314>

Peralta M. & Volke T. (2012). *La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación*. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 11. No. 1. 75-88.

Phimchan P., Techawongstien S., Chanhai S. & Bosland P. (2012). *Impact of drought stress on the accumulation of capsaicinoids in capsicum cultivars with different initial capsaicinoid levels*. HORTSCIENCE. Vol. 47. No. 9. 1204–1209. DOI: 10.21273/HORTSCI.47.9.1204.

Qin Y., Lee W., Choi Y. & Kim T. (2003). *Biochemical and physiological changes in plants as a result of different sonic exposures*. Ultrasonics. Vol. 41. 407-411. [https://doi.org/10.1016/S0041-624X\(03\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0041-624X(03)00103-3)

Rankenberg T., Geldhof B., Veen H., Holsteens K., Van de Poel B. & Sasidharan R. (2021). *Age-Dependent Abiotic Stress Resilience in Plants*. Trends in Plant Science. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.12.016>

Rao A. & Rao L. (2007). *Carotenoids and human health*. Pharmacological Research. Vol. 55. No. 3. 207–216. doi:10.1016/j.phrs.2007.01.012.

Rasool F., Uzair M., Naeem M., Rehman N., Afroz A., Shah H. & Khan M. (2021). *Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) Genes Family in Wheat (Triticum aestivum L.): Genome-Wide Characterization and Expression Profiling*. Agronomy. 11(12), 2511. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122511>

Rodríguez T., Qian M., Strid A., Neugart S., Schreiner M., Torres I & Guevara R. (2019). *Effect of UV-B radiation on morphology, phenolic compound production, gene expression, and subsequent drought stress responses in chili pepper (Capsicum annuum L)*. Plant physiology and biochemistry. Vol. 134. 94– 102. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.025>

Rumpf J., Burger R. & Schulze M. (2023). *Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins*. International Journal of Biological Macromolecules. 233 : 123470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>

Sáenz-de la O., Morales L., Strid A., Torres I. & Guevara R. (2021). *Ultraviolet-B exposure and exogenous hydrogen peroxide application lead to cross-tolerance toward drought in Nicotiana tabacum L*. Physiologia Plantarum. Vol. 173. No. 3. 666– 679. <https://doi.org/10.1111/ppl.13448>

Sahid Z., Syukur M. & Maharijaya A. (2020). *Diversity of capsaicin content, quantitative, and yield components in chili (Capsicum annuum) genotypes and their F1 hybrid*. Biodiversitas. 21(5), 2251-2257. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210555>

Sarker U. & Oba S. (2018). *Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of Amaranthus tricolor*. Scientific Reports. 8 : 16496. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34944-0>

Schwarz D., Roushafel Y., Colla G. & Venema J. (2010). *Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: thermal stress, water stress and organic pollutants*. Scientia Horticulturae. Vol. 127. No. 2. 162-171. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.016>

Seddon A., Liau Y., Pace P., Miller A., Das A., Kennedy M., Hampton M. & Stevens A. (2021). *Genome-wide impact of hydrogen peroxide on maintenance DNA methylation in replicating cells*. Epigenetics Chromatin. Vol. 14. No. 1. DOI: 10.1186/s13072-021-00388-6

SEMARNAT, 2016. Secretaría De Medio Ambiente Y Recursos Naturales. *Informe De La Situación Del Medio Ambiente En México. Compendio De Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave, De Desempeño Ambiental Y De Crecimiento Verde*, edición 2015. Semarnat, México, p. 63.

Serrano L., Villordo E., González M., Guevara R. & Medina G. (2021). *Effect of Fragmented DNA From Plant Pathogens on the Protection Against Wilt and Root*

*Rot of Capsicum annuum L. Plants.* Frontiers in Plant Science. Vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.581891>

Smékalová V., Doskočilová A., Komis G. & Samaj J. (2014). Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signaling in plants. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.009>

Sohag A., Tahjib-Ui-Arif M., Brešić M., Afrin S., Sakil M. & Hossain M. (2020). *Exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide attenuate drought stress in rice*. *Plant, Soil and Environment*. Vol. 66. No. 1. 7–13. <https://doi.org/10.17221/472/2019-PSE>

Solano-Alvarez N., Valencia-Hernández J., Vergara-Pineda S., Millán-Almaraz J., Torres-Pacheco I. & Guevara-González R. (2022). *Comparative Analysis of the NDVI and NGBVI as Indicators of the Protective Effect of Beneficial Bacteria in Conditions of Biotic Stress*. *Plants*. 11(7), 932. <https://doi.org/10.3390/plants11070932>

Sonmez M., Ozgur R. & Uzilday B. (2023). *Reactive oxygen species: connecting eustress, hormesis, and allostasis in plants*. *Plant Stress*. 8, 100164. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100164>

Steiner A. (1961). *A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition*. *Plant Soil*. 15, 134-154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>

Sun Y., Wang H., Liu S. & Peng X. (2016). *Exogenous application of hydrogen peroxide alleviates drought stress in cucumber seedlings*. South African Journal of Botany. Vol. 106. 23-28. DOI: 10.1016/j.sajb.2016.05.008

Thakur M. & Sohal B. (2013). *Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review*. International Scholarly Research Notices. Vol. 2013. No. 762412. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>

Toscano S., Ferrante A., Leonardi C. & Romano D. (2018). *PAL activities in asparagus spears during storage after ammonium sulfate treatments*. Postharvest Biology and Technology. 140, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.010>

Vázquez F., Miranda M., Monforte M., Gutiérrez G., Velázquez C. & Nieto Y. (2007). *Biosynthesis of capsaicinoids, the pungent principle of peppers*. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 30. No. 4. 353-360.

Vázquez M., Parola I., Montoya L., Torres I., Schwarz D. & Guevara R. (2019). *Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables production*. Scientia Horticulturae. Vol. 250. DOI: 10.1016/j.scienta.2019.02.053

Vega I., Feregrino A., Torres I & Guevara R. (2018). *Exogenous fragmented DNA acts as damage-associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in Lactuca sativa*. Functional plant biology. Vol. 45. No. 10. 1065–1072. <https://doi.org/10.1071/FP18011>

Venema J., Linger P., van Heusden A., van Hasselt P. & Brüggemann W. (2005). *The inheritance of chilling tolerance in tomato (Lycopersicon spp.).* Plant biology. Vol. 7. No. 2. 118–130. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837495>

Villagómez-Aranda A., Feregrino-Pérez A., García-Ortega L., Rivero-Montejo S., Torres-Pacheco I. & Guevara-González R. (2024). *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> priming: Biostimulation, drought tolerance and DNA methylation profile with intergenerational impact in tobacco plant.* Environmental and Experimental Botany. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2024.105859>

Villagómez-Aranda A., García-Ortega L., Torres-Pacheco I. & Guevara-González R. (2021). *Whole-Genome DNA Methylation Analysis in Hydrogen Peroxide Overproducing Transgenic Tobacco Resistant to Biotic and Abiotic Stresses.* Plants. Vol. 10. No. 1. 178. <https://doi.org/10.3390/plants10010178>

Villa-Rivera M. & Ochoa-Alejo N. (2021). *Transcriptional Regulation of Ripening in Chili Pepper Fruits (Capsicum spp.).* International Journal of Molecular Sciences. 22(22), 12151. <https://doi.org/10.3390/ijms222212151>

Vimala R. & Suriachandraselvan M. (2009). *Induced resistance in bhendi against powdery mildew by foliar application of salicylic acid.* Journal of Biopesticides. <https://doi.org/10.57182/jbiopestic.2.1.111-114>

Xiujuan W., Bochu W., Yi J., Chuanren D. & Sakanishi A. (2003). *Effect of sound wave on the synthesis of nucleic acid and protein in chrysanthemum.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol. 29. No. 2 – 3. 99 – 102. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00152-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00152-2)

Yakhin O., Lubyanov A., Yakhin I. & Brown P. (2017). *Biostimulants in plant science: a global perspective*. Frontiers in plant science. Vol. 7. 2049. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>

Yang L., Lang C., Wu Y., Meng D., Yang T., Li D., Jin T. & Zhou X. (2022). *ROS1-mediated decrease in DNA methylation and increase in expression of defense genes and stress response genes in Arabidopsis thaliana due to abiotic stresses*. BMC Plant Biology. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03473-4>

Yang S., Lan S. & Gong M. (2009). *Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings*. Journal of Plant Physiology. Vol. 166. No. 15. 1694-1699. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.006>

Zamljen T., Medic A., Hudina M., Veberic R. & Slatnar A. (2022). *Salt Stress Differentially Affects the Primary and Secondary Metabolism of Peppers (Capsicum annuum L.) According to the Genotype, Fruit Part, and Salinity Level*. Plants. 11(7), 853. <https://doi.org/10.3390/plants11070853>

Zhi P. & Chang C. (2021). *Exploiting Epigenetic Variations for Crop Disease Resistance Improvement*. Frontiers in Plant Science. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.692328>

## Anexo 1. Curvas de calibración.

