


Autor	 <p data-bbox="657 304 1239 405">Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Ingeniería</p> <p data-bbox="526 506 1239 627">Impacto de sonidos de abejorro y agua corriendo en rendimiento, capsaicina y expresión genes relacionado con sequía en Chile Tesis</p> <p data-bbox="634 695 1138 762">Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de</p> <p data-bbox="751 783 1024 816"><u>Maestro/Doctor en</u></p> <p data-bbox="565 863 1195 890">Maestro en Ciencias línea terminal de Biosistemas</p> <p data-bbox="834 911 940 938">Presenta</p> <p data-bbox="719 953 1052 980"><u>Laura Xóchitl Cruz Cárdenas</u></p> <p data-bbox="805 1094 969 1121">Dirigido por:</p> <p data-bbox="691 1138 1078 1165"><u>Dr. Luis Miguel Contreras Medina</u></p> <p data-bbox="813 1199 963 1226">Co-Director:</p> <p data-bbox="824 1367 1256 1394">Querétaro, Qro. a _____</p>
Nombre de la tesis	
Año	

- *escudo y letras doradas*
- *pastas duras color negro, tamaño carta*



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Impacto de sonidos de abejorro y agua corriendo en
rendimiento, capsaicina y expresión genes relacionado
con sequía en Chile

por

Laura Xóchitl Cruz Cárdenas

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: IGMAC-237213-0123-123



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ingeniería en Biosistemas

Impacto de sonidos de abejorro y agua corriendo en rendimiento, capsaicina y expresión genes relacionado con sequía en Chile

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias línea terminal en Biosistemas

Presenta:

Laura Xóchitl Cruz Cárdenas

Dirigido por:

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

SINODALES

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

Presidente

Firma

Dra. Laura Helena Caicedo López

Secretario

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco

Voval

Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Sinodal

Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Sinodal

Firma

Director FI
Director de la Facultad

Director IP
Director de Investigación y Postgrado

Dr. Manuel Toledano Ayala
Jáuregui Correa

Dr. Juan Carlos Antonio

Centro Universitario
Querétaro, QRO
México.
Enero 2023

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por su apoyo en uso de instalaciones y beca.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado por 2 años para poder enfocar mi atención al 100% en este proyecto de investigación

A la facultad de Ingeniería y a toda su plantilla docente por compartir su conocimiento y su saber dirigir con respeto y apoyo total a este proyecto y a mi persona.

A mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de estos años de estudio

A mi persona por lograr encaminarse a cumplir sus sueños, aun a pesar de no ver el camino fácil ni con claridad.

Gracias.

Índice

I. Introducción.....	10
Problema	11
Justificación	12
II. Antecedentes	14
III. Hipótesis	24
IV. Objetivo General	24
V. Metodología	42
Etapa 1: Reconocimiento del espacio para experimentación	44
Etapa 2: Germinación de semillas	44
Etapa 3: Limpieza y a acondicionamiento de invernadero.....	45
Etapa 4: Grabación y obtención de audios	47
Etapa 5: Trasplante de plántula	49
Etapa 6: Aplicación de tratamientos	50
Etapa 7. Análisis	61
VI. Resultados y Discusión.....	64
VII. Conclusiones.....	87
Anexo I. Metodología de determinación de Carbohidratos totales, SOD, POD, Prolina y Capsaicina.	89
VIII. Referencias	106

Índice de Figuras

Figura 1.	Estructura de la capsaicina.	29
Figura 2.	Germinación de semillas de chile jalapeño	45
Figura 3.	Invernadero antes de limpieza y acondicionamiento.....	46
Figura 4.	Invernadero acondicionado y limpio	47
Figura 5.	Grabación del sonido de abejorro	48
Figura 6.	Diseño de Panel acústico.....	51
Figura 7.	Distribución de plantas dentro del invernadero	52
Figura 8.	Congelamiento de hoja para análisis enzimáticos	53
Figura 9.	Plantas de chile jalapeño adentro del panel acústico en tratamiento acústico.	54
Figura 10.	Flor de chile jalapeño donde muestra ubicación y tamaño del pistilo.	57
Figura 11.	Plantas de chile adentro de la caja acústica	57
Figura 12.	Curva de calibración de Capsaicina	105

Índice de gráficas

Gráfica 1. Cantidad de carbohidratos totales mg/g comportamiento por día y por tratamiento.....	67
Gráfica 2. Comparativo día 1 con día 7 en concentración de SOD, alpha: 0.05, los datos son un promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto.	71
Gráfica 3. Comparativa de actividad enzimática de POD en grupo Agua con riego, Agua sin Riego, Ruido Blanco y Control, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto.	73
Gráfica 4. Comparativa de Prolina al inicio y final de cada tratamiento de agua corriendo, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto	75
Gráfica 5. Capsaicina por g de chile seco frente a tratamiento de Agua Corriendo y de Abejorro.....	78
Gráfica 6. Capsaicina, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto por g de chile seco frente a tratamiento de Agua Corriendo, Alpha: 0.05 y p: 0.0001.	79
Gráfica 7. Capsaicina, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto por g de chile seco frente a tratamiento de Abejorro. Alpha: 0.05 y p:0.0001.....	80
Gráfica 8. Rendimiento de tratamiento de agua corriendo , promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto	81
Gráfica 9. Rendimiento de tratamiento de abejorro, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto.....	83
Gráfica 10. Fotosíntesis por día de los grupos de tratamientos de Agua Corriendo, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto.	86
Gráfica 11. Actividad SOD.....	100

Índice de tablas

Tabla 1.	Investigaciones previas del efecto del sonido en las plantas	17
Tabla 2.	Nutrición para chile jalapeño	50
Tabla 3.	51
Tabla 4.	Horas de aplicación de tratamientos de agua corriendo y ruido blanco por día	54
Tabla 5.	Horas de aplicación de tratamientos de sonido de abejorro por día	56
Tabla 6.	Datos de cosecha de tratamiento de agua corriendo. El peso total de cosecha hace referencia a peso del total de chiles jalapeños en kg.....	59
Tabla 7.	Datos de cosecha de tratamiento de abejorro. El peso total de cosecha hace referencia a peso del total de chiles jalapeños en kg.....	61
Tabla 8.	62
Tabla 9.	Resultados de análisis de cantidad de azúcares totales	64
Tabla 10.	Datos finales de actividad de SOD.....	71
Tabla 11.	Concentración inicial y final de Prolina.....	75
	75
Tabla 12.	Concentración de Capsaicina, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto por g de chile seco de todos los tratamientos.....	77
Tabla 13.	Rendimiento de tratamientos de agua corriendo, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto	80
Tabla 14.	Rendimiento de tratamientos de abejorro, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto.....	82
Tabla 15.	Datos del análisis del día 1 de fotosíntesis	85
Tabla 16.	Datos del análisis del día 4 de fotosíntesis	86
Tabla 17.	Datos del análisis del día 7 de fotosíntesis	86
Tabla 18.	86
Tabla 19.	Preparar diluciones del estándar de proteína.....	103
Tabla 20.	Concentraciones de capsaicina para curva de calibración.....	105
Tabla 21.	105

Resumen

El efecto del sonido en las plantas es un campo que va adquiriendo mayor fuerza con el paso del tiempo al tener cada vez más un mayor número de investigaciones relacionadas al tema. El sonido actúa como un elicitador físico sobre la planta y dependiendo del tiempo y de la potencia (dB) con la que se aplique se obtendrán diversos resultados, desde tolerancia a estrés hídrico, aumento de rendimiento, expresión de ciertos genes, aumento de azúcares totales, entre otros efectos reportados. Esta investigación demuestra que el chile jalapeño, expuesto al sonido de agua corriendo por 20 minutos a 80 dB por 7 días en horarios al azar ayuda a mitigar los daños causados por la falta de agua reflejado en la expresión de la Enzima Superóxido dismutasa (SOD), Peroxidasa (POD) y Prolina así mismo en su rendimiento el grupo control solo obtuvo un 10.79% más de rendimiento que el grupo con tratamiento acústico sin riego, con un total de cuatro grupos 1)Sonido de Agua con Riego, 2)Sonido de Agua sin riego 3)Ruido Blanco 4)Control. Por otro lado se usaron 5 grupos diferentes para observar el aumento de carbohidratos totales con el sonido del abejorro 1.Sonido de Vuelo, 2.Sonido de Vuelo y polinización, 3.Sonido Polinización, 4.Ruido Blanco y 5. El uso del sonido de Vuelo y Polinización fue el que logró un mayor aumento en el contenido de carbohidratos totales en comparación con los demás grupos. Con esta investigación se deja un respaldo científico para convertir el uso del sonido como un elicitador factible para uso agrícola.

Palabras clave: sonido, abejorro, agua, POD, SOD, Prolina

Abstract

The effect of sound on plants is a field that is gaining more strength with the passage of time as more and more research is being done on the subject. Sound acts as a physical elicitor on the plant and depending on the time and power (dB) with which it is applied, different results will be obtained, from tolerance to water stress, yield increase, expression of certain genes, increase of total sugars, among other reported effects. This research shows that the jalapeño bell pepper, exposed to the sound of water running for 20 minutes at 80 dB for 7 days at random times helps to mitigate the damage caused by the lack of water reflected in the expression of the enzyme Superoxide dismutase (SOD), Peroxidase (POD) and Proline as well as in its yield the control group only obtained a 10.79% more yield than the group with acoustic treatment without irrigation, with a total of four groups 1)Water Sound with Irrigation, 2)Water Sound without irrigation 3)White Noise 4)Control. On the other hand, 5 different groups were used to observe the increase of total carbohydrates with the sound of the bumblebee 1.Flight Sound, 2.Flight and Pollination Sound, 3.Pollination Sound, 4.White Noise and 5. The use of the Flight and Pollination Sound was the one that achieved the greatest increase in total carbohydrate content compared to the other groups. With this research a scientific support is left to convert the use of sound as a feasible elicitor for agricultural use.

Key words: sound, bumblebee, water, SOD, POD, Proline.

I. Introducción

La agricultura consume el 70% de las extracciones de agua dulce procedente de ríos, lagos y acuíferos (Banco Mundial, 2017) y. Se calcula que, en 2050, la población del planeta será de 10 000 millones de personas. Para alimentarlos a todos habrá que ir más allá de producir más con menos. La calidad y la diversidad serán la piedra angular que permitirá vincular la productividad y la sostenibilidad, y atajar las necesidades de la población (FAO, 2018). Sin embargo, no se han logrado resolver todos los problemas aliados al uso del agua para lograr reducir el consumo de agua en la agricultura sin afectar significativamente el rendimiento.

La productividad de *Capsicum annum* es altamente errática y limitada debido a las temperaturas extremas e inadecuada disponibilidad de agua, reduciendo la productividad del cultivo, generando pérdidas entre el 30 y 70%, durante periodos críticos de crecimiento (Rao et al., 2016)(Gunawardena & De Silva, 2015). Los requerimientos de agua para una buena producción de *Capsicum annum* L. está entre 600 y 1250 mm anuales (Pendolema Jaramillo, 2017).

Se debe reducir significativamente el consumo de agua y para ello será útil explorar las oportunidades que ofrece el uso de elicitors, incluyendo el uso del sonido. En ese sentido, un área alternativa de estudio a nivel mundial, para favorecer la optimización de la productividad y reducir el daño por la falta de agua, puede ser abordado desde el campo de la acústica y la composición sonora musical, tomando elementos naturales del entorno propio de la planta y de esta manera tener una alternativa más para el fortalecimiento de la agricultura y la seguridad alimentaria.

Estudios como el de (Gagliano et al., 2017; Jeong et al., 2014; Veits et al., 2019), entre otros, han informado sobre el desarrollo de respuestas en plantas tratadas con acústicos utilizando diversas frecuencias. Esto sugiere fuertemente la

existencia de sofisticados mecanismos moleculares para la percepción de vibraciones sonoras y la transducción de señales (Ghosh, y otros, 2016).

Por lo ya mencionado, es preciso empezar a trabajar en técnicas alternativas de cultivo para disminuir el impacto que la sequía generará, en este caso nos enfocaremos al cultivo de chile, aportando una técnica no invasiva para el fortalecimiento del *Capsicum annuum* L. en contra de la sequía.

Debido a que los abejorros son polinizadores más óptimos que las abejas (Cresso, 2012) y los sonidos de agua corriendo tienen efecto en el crecimiento de la planta (Gagliano et al., 2017) se percibe una oportunidad para determinar si su sonido puede tener también un efecto en el cultivo del chile para mejorar su respuesta al estrés ocasionado por sequía y aumentar su producción.

La incógnita científica consiste en determinar si el sonido del abejorro y de agua corriendo tienen impacto en la expresión de algunos genes que enciendan los mecanismos de defensa involucrados en la respuesta al estrés por sequía en el cultivo de chile jalapeño en cuanto a sus variables de interés y a la producción de azúcares totales en néctar floral.

Con un total de 63 plantas de chile jalapeño, aplicando 9 tratamientos, 7 plantas por tratamiento. Estos tratamientos que son patrones acústicos se aplican a 80 dB a las plantas por un tiempo de 20 minutos al día durante 7 días en horarios aleatorios.

Problema

El uso de elicitores y/o eustresores para mejorar la productividad agrícola y la resistencia a la sequía se ha visto influenciada por el uso excesivo de químicos y plantas alteradas genéticamente, por lo tanto, el introducir el sonido, como un elicitador físico, se convierte en el problema central de esta investigación, debido a la falta de información del uso del sonido como elicitador en la producción agrícola, por lo

anterior, surge la necesidad de crear la información necesaria para comprobar científicamente el efecto que tiene el sonido relacionado con los abejorros polinizadores y agua corriendo sobre el chile jalapeño.

Justificación

C. annuum L. es uno de los tres cultivos de solanáceas más importantes del mundo (Navarro et al., 2006), ubicándose como el segundo vegetal más consumido a nivel mundial por su pungencia y sabor, además de ser usado en diversas industrias como la de alimentos y la farmacéutica debido a su composición química (Shivashankara, Madhavi , Geetha, & Pavithra, 2016). No obstante este cultivo es sensible a condiciones ambientales estresantes como la sequía (Shivashankara, Madhavi , Geetha, & Pavithra, 2016).

El chile Jalapeño es uno de los principales tipos de chile que se siembran en México debido a la infinidad de usos que tiene su fruto. La superficie anual que se establece en nuestro país es de aproximadamente 30 mil hectáreas, distribuidas prácticamente en todos los estados (Granado Pérez, Juárez Ramírez, & Velazquez, 2020).

Se estima que para 2024 exista un incremento de producción de 3.68 millones de toneladas y para el 2030 incremente un 4.49 millones de toneladas. Así mismo en las exportaciones se estima un incremento de 1.49 millones de toneladas para el 2024 y 2.11 millones de toneladas para el 2030. El valor económico de estas exportaciones es de 1,487.46 millones de dólares (a precios del 2016) para 2024 y 2,109.98 millones de dólares (a precios del 2016) (SAGARPA, 2017).

El estrés de tipo abiótico que tiene una mayor incidencia sobre el rendimiento del cultivo de chile, es la sequía, que, de presentarse durante el crecimiento de la

planta, puede generar pérdidas de rendimiento desde el 30 hasta el 70 % (Shivashankara, Madhavi , Geetha, & Pavithra, 2016).

Diversos trabajos han demostrado el efecto positivo que tienen los sonidos. No obstante, se sabe que las ondas de sonido pueden tener un efecto positivo o negativo en las plantas (Chowdhury et al., 2014). Se reporta que el sonido puede incidir positivamente a la resistencia a la sequía con sonidos de abejas en flores (Veits et al., 2019), *Pisum sativum* (Gagliano et al., 2017) , en cebollas , también diversas investigaciones reportan el efecto de los sonidos en las plantas como *arabidopsis* (Ghosh et al., 2016). Otros estudios han trabajado con sonidos de agua, donde los gradientes acústicos permiten que las raíces detecten ampliamente una fuente de agua a distancia (Gagliano et al., 2017). Se demostró que las raíces jóvenes de *Pisum sativum* tienden a crecer hacia la dirección de donde provienen sonidos de agua corriendo (Khait et al., 2019).

Por lo ya mencionado, es preciso empezar a trabajar en técnicas alternativas de cultivo para disminuir el impacto que la sequía generará en el cultivo de chile, aportando una técnica no invasiva para el fortalecimiento del *Capsicum annuum* L. en contra de la sequía.

Debido a que los abejorros son mejores polinizadores que las abejas y los sonidos de agua corriendo tienen efecto en el crecimiento de la planta, se percibe una oportunidad para determinar si su sonido puede tener también un efecto en el cultivo del chile para mejorar su respuesta al estrés ocasionado por sequía y en la producción de azúcares totales.

II. Antecedentes

Los sonidos son ondas mecánicas de presión que se propagan a través de un medio de transmisión como el aire. La vibración sonora se considera una fuerza mecánica que modula el crecimiento y desarrollo de las plantas como otros estímulos mecánicos, por ejemplo, viento, lluvia, tacto y vibración (Ghosh, y otros, 2016). Varios estudios han informado respuestas de desarrollo en plantas adaptadas con un tratamiento acústico utilizando diversas frecuencias. Esto sugiere fuertemente la existencia de sofisticados mecanismos moleculares para la percepción de vibraciones sonoras y la transducción de señales (Ghosh et al., 2016).

Hoy en día ha surgido el uso de vibraciones acústicas para generar un estrés abiótico controlado en las plantas, este tipo de elicitores mejora las condiciones de crecimiento, metabolismo energético, expresión génica relacionada con el estrés, incrementa metabolitos secundarios y resistencia a enfermedades (Fernandez-Jaramillo et al., 2018).

Dado que el agua es esencial para la vida, los organismos han desarrollado una amplia gama de estrategias para hacer frente a la limitante de agua. Se descubrió que las raíces pueden localizar una fuente de agua al detectar vibraciones generadas por el agua que se movía dentro de una tubería, incluso en ausencia de humedad, lo que sugiere que los gradientes acústicos permiten que las raíces detecten ampliamente una fuente de agua a distancia. Todos los tratamientos de sonido de agua corriendo grabados se reprodujeron en bucles continuos durante la noche y el día, utilizando reproductores MP3 portátiles y pequeñas bocinas de vibración conectadas directamente a una maceta de plástico negro en la base del laberinto en el lado seleccionado al azar, a 105dB (Gagliano et al., 2017).

Una de las fuentes más relevantes de energía acústica en el entorno inmediato de una planta es la rica comunidad de artrópodos asociados a ella, incluidos los

herbívoros depredadores y parasitoides (Cocroft & Rodríguez, 2005), debido a esto se han realizado investigaciones como en la que se demostró que las flores de *Oenothera drummondii* expuestas al sonido de vibración de una abeja voladora o a señales de sonido sintético a frecuencias similares, producen un néctar más dulce en 3 minutos de exposición al sonido, lo que aumenta las posibilidades de polinización cruzada. Se descubrió que las flores vibraban mecánicamente en respuesta a estos sonidos, lo que sugiere un mecanismo plausible en el que la flor sirve como órgano sensorial auditivo, en este experimento, las plantas se expusieron a grabaciones de polinizadores, sonidos sintéticos en frecuencias de polinizadores y frecuencias más altas. El estímulo de “baja” frecuencia consistió en una señal de sonido de frecuencia modulada de 10s que se extendió desde 50 a los 1000 Hz, cubriendo el rango de frecuencia del aleteo de los polinizadores naturales. El estímulo de frecuencia “intermedio” consistió en una señal de sonido de frecuencia modulada de 10s con un barrido de 34 a 35 kHz. El estímulo de “alta” frecuencia consistió en un barrido de señal de sonido de frecuencia modulada de 10s de 158 a 160 kHz, una frecuencia que está fuera del rango del batido de las alas de los polinizadores. El estímulo “Abeja” se registró colocando un micrófono calibrado y registrando una abeja melífera individual (*Apis mellifera*) desde una distancia de 10cm. El tratamiento de control “silencio” consistió en no reproducir sonido. Las reproducciones acústicas se realizaron utilizando un altavoz Vifa, convertidos a una frecuencia de muestreo de 500 kHz (Veits et al., 2019).

Se reporta que el sonido puede incidir positivamente en la resistencia a la sequía en arroz (Jeong et al., 2014), también diversas investigaciones reportan diferentes efecto del sonido sobre las plantas como:

Autor y Año	ESPECIE	EFEECTO
Jeong et al, 2014	Arroz	Sequía
Ghosh et al., 2016	Arabidopsis	Cambios transcriptómicos,

		proteómicos y hormonales
Xiaocheng et al., 2003	<i>Actinidia chinensis callus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo energético de las células vegetales • Contenido de ATP
Newton Pe, 1971	Frijol	<ul style="list-style-type: none"> • Altura • Tasa de crecimiento • Porcentaje de germinación
Bochu et al., 1998D. Sharma et al., 2015	Zanahoria	Crecimiento de células
Bochu et al., 2003	Arroz	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de germinación • Altura del tallo • Tasa de aumento relativo del peso fresco • Capacidad de enraizamiento • Actividad del sistema radicular Penetrabilidad de la membrana celular
Yi et al., 2003	Okra y calabacín	Germinación
Hanaa F.A., 2016	Jazminum Sambac	<ul style="list-style-type: none"> • Número de flores • Aceleración de pigmentos • Mejor desarrollo de la planta

Chivukula & Ramaswamy, 2014	Rosa chinensis	<ul style="list-style-type: none"> • Elongación de los brotes • Elongación de los entrenudos • Número de flores Diámetro de las flores
(Kim et al., 2015)	Tomate	<ul style="list-style-type: none"> • Retraso de la maduración del fruto del tomate regulando negativamente la biosíntesis de etileno y los genes de señalización

Tabla 1. Investigaciones previas del efecto del sonido en las plantas

Dan Carlson estudió el efecto del sonido de la naturaleza para aumentar la productividad agrícola, utilizando estos sonidos y su nutrición se estudió la apertura estomática para la resistencia a sequía en el frijol de soya, que al ser expuesta a 4kHz pueden incrementar la tolerancia a la sequía, hasta el 75% del contenido de humedad del suelo. El rendimiento de la semilla de soja aumentó un 40,89% y el contenido de proteína de la semilla aumentó un 10,3%. (Pujiwati et al., 2018).

Otro estudio de 2007, generó plantas de arroz transgénico que albergaba un gen quimérico, en estas plantas identificaron un conjunto de genes que responden al sonido en condiciones de luz como de oscuridad, el efecto del sonido resultó favorable ya que aumentó la expresión de sbcS y ald. Lo cual podría representar una alternativa a la luz como regulador de expresión de genes. La expresión del ARNm de ald aumentó significativamente con un tratamiento sonoro de 125 a 250 Hz., mientras que los niveles disminuyeron a 50 Hz. Se propuso que en plantas transgénicas se podrían utilizar frecuencias específicas de tratamiento sonoro para

regular la expresión de cualquier gen fusionado al promotor ald (Jeong et al., 2008). Otra aplicación de emisiones acústicas es el tratamiento de ondas sonoras de baja frecuencia (1 kHz) durante 6 horas retrasa la maduración del tomate al alterar la expresión de genes importantes en la biosíntesis del etileno y las vías de señalización del etileno (Kim et al., 2015). La estimulación por ondas sonoras desencadena el contenido de la hormona endógena del callo maduro del crisantemo (Bochu et al., 2004).

Se reporta que la planta *Arabidopsis thaliana* puede identificar la vibración del sonido de un insecto alimentándose elicitando químicamente sus mecanismos de defensa. Por lo anterior, el sonido se puede considerar como una ola de presión, y por lo tanto puede considerarse como un estímulo mecánico y podría tener una influencia en el desarrollo y proceso fisiológico de las plantas (Ghosh et al., 2016).

Patentes

Tolerancia a la sequía

La patente española ES2398465T3, con título “Procedimientos para potenciar la tolerancia a la sequía en plantas y procedimientos de los mismos”, en ella se divulga una planta tolerante a la sequía la cual tiene insertada en el genoma de sus células un ADN recombinante que codifica una proteína que comprende un dominio de choque frío y que tiene al menos el 80 % de identidad sobre la longitud entera de las SEC ID N°: 1, 2, 63 ó 65, en la que la expresión de dicha proteína confiere tolerancia a la sequía a dicha planta en comparación con una planta no transformada de la misma especie, siendo la sequía simulada dando a las plantas un 95 % o menos de agua que a una planta de control y determinando diferencias en el vigor, el crecimiento, el tamaño o la longitud de las raíces.

En 2006 se hizo registro en España la patente con número ES2304304B2 titulada “Uso de la mutación en ocp3 como regulador de la resistencia a sequía en plantas”, La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la biotecnología vegetal, y en concreto se refiere al uso del gen OCP3 como regulador de la resistencia a sequía en plantas.

Por otro lado en México en 2005 se registró la patente con número MX2007011612A que lleva por título “Plantas resistentes a la sequía”. La presente invención es concerniente con la preparación de plantas transgénicas que expresan una proteína involucrada en la síntesis de citoquinina bajo el control de un promotor inducible por senescencia.

España registró en 2007 la patente con número ES2401657T3 titulada “Método para mejorar la resistencia al estrés en plantas y materiales para el mismo. Un método para obtener una planta con una mayor resistencia al estrés con respecto a una planta de tipo salvaje, donde dicha resistencia al estrés se selecciona entre resistencia a la sequía y resistencia a estreses asociados con rutas mediadas por especies de oxígeno reactivo: (a) introducir al menos una mutación o un ácido

nucleico exógeno en el genoma de una o más células vegetales, lo que da como resultado una reducción de la actividad asociada con SAL1 o uno de sus homólogos en una o más células vegetales; (b) regenerar una o más plantas a partir de dichas una o más células vegetales; y (c) seleccionar una o más plantas que tienen una mayor resistencia a la sequía y/o resistencia asociada a estreses asociados con rutas mediadas por especies reactivas de oxígeno con respecto a una planta de tipo salvaje.

La patente con número ES2646132T3 que lleva por nombre “Un procedimiento para aumentar la tolerancia a sequía en una planta” es un procedimiento para aumentar la tolerancia a sequía en una planta que comprende aplicar una composición en una cantidad efectiva para aumentar dicha tolerancia, en el que la composición comprende un cultivo aislado de *Enterobacter* sp. 638.

La patente con número MX2014009893A con título “Mejora de resistencia a la sequía en plantas: *upl3* presenta una invención se relaciona con un método novedoso para aumentar la resistencia a la sequía de una planta. El método abarca la afectación de la expresión de un gen o genes en la planta, donde en comparación con el control, las plantas exhiben una mejor resistencia contra la sequía.

La patente española “Uso de una secuencia de ácido nucleico para la generación de plantas transgénicas que tienen tolerancia a la sequía mejorada” con número ES2363980T3 menciona el uso de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 o una proteína al menos 70% idéntica a la SEQ ID NO: 3, o una proteína ortóloga para la generación de plantas transgénicas que tienen una combinación de dos o más de los fenotipos seleccionados del grupo de plantas que consisten en tener: tolerancia a la sequía mejorada, resistencia a enfermedades mejorada y estructura de raíces mejorada.

Por su lado, en México la patente MX2014005995A “Plantas tolerantes a la sequía producidas a través de la modificación del sitio *stgx* de capacidad de permanecer verde”. Permite la manipulación de una característica fenotípica denominada como

"capacidad de permanecer verde" para facilitar la adaptación a la sequía en plantas a través de métodos recombinantes, mutagénicos y/o de cultivo y selección para manipular genes StgX incluyendo Stg2, Stg3a, Stg3b y Stg4. También aquí se describen sistemas de práctica de manejo de plantas para aumentar la producción agrícola y eficiencia de cosecha en ambientes limitados de agua.

Polinización

La patente con número ES2391681A1 con título "Estación polinizadora para la regulación bioclimática de insectos polinizadores", esta estación polinizadora es utilizada para la regulación bioclimática de insectos polinizadores (E.R.B.P. (1)), tales como abejorros y protección física contra sus enemigos naturales. Esta estación (1) permite emplear insectos polinizadores en invernaderos y similares en los que se producen fluctuaciones térmicas e higrométricas del aire.

<https://patents.google.com/patent/ES2391681A1/es?q=ES2391681A1>)

Con número WO2021130662A1, registrada en 2019, la patente titulada "Polinizador motorizado y métodos de uso para polinización asistida y artificial" sostiene la invención de una maquina de polinización asistida y/o artificial en híbridos OxG de palma de aceite. Se describen también las etapas de los métodos de polinización asistida y artificial utilizando el aparato para la polinización de la invención.

"Utilización de un extracto vegetal derivado del anís como inductor de la polinización de las flores y sus aplicaciones en agricultura" patente española con número ES2607235B1. Sostiene la utilización de un extracto vegetal derivado del anís como inductor de la polinización de las flores y sus aplicaciones en agricultura que comprende el uso de un extracto de semilla de *Pimpinella anisum L.* en composiciones o formulaciones agrícolas como inductor de la polinización.

Producción agrícola

Registrada desde 2011 la patente española ES2752451T3 que lleva por título "Microbios que promueven el crecimiento de plantas y usos de los mismos" se

refiere al campo de la agricultura sostenible. Específicamente, la divulgación proporciona composiciones microbianas y procedimientos útiles para la producción de plantas de cultivo. En particular, las composiciones y procedimientos divulgados en la presente memoria son útiles para mejorar el crecimiento de las plantas y/o suprimir el desarrollo de patógenos de plantas y enfermedades patógenas.

Monitoreo Tecnológico

A lo largo del tiempo se han utilizado diferentes técnicas para mejorar los cultivos y el rendimiento de estos.

Dentro de las técnicas utilizadas para mejorar la polinización se encuentran:

- De forma manual: sacudir la planta, siempre y cuando sus flores sean hermafroditas. Otra técnica manual es arrancar los pétalos de la flor masculina y usa un pincel pequeño o un hisopo de algodón para transferir el polen al pistilo. La flor masculina sin pétalos también se puede recoger y usar para limpiar las flores femeninas.
- Mecánicamente
- Por medio de abejorros dentro del invernadero

Ciertos estudios que evalúan la polinización a través de experimentos de manipulación de la misma, muestran en prácticamente todos los casos que el incremento de la producción es siempre mayor tras una polinización natural cruzada, seguido de la polinización manual, y que la ausencia de polinización supone la ausencia de producción (Bos *et al.*, 2007; Chautá - Mellizo *et al.*, 2012; Mensah y Kudom, 2011). De esta forma, los beneficios del incremento manual de la polinización pueden ser compensados en casos en que los recursos limiten la habilidad de la planta para desarrollar semillas o el aumento de la producción de semillas se produzca a expensas de la calidad individual de cada una de ellas (Chautá - Mellizo *et al.*, 2012), mientras que la polinización natural cruzada aumenta la posibilidad de que cualquier flor reciba polen fértil y se obtenga una elevada producción final (Greenleaf y Kremen, 2006).

Llevando así el mercado a buscar una mejora en las técnicas de polinización cruzada.

Para la resistencia a la sequía se han estudiado diversas técnicas como:

- Riego por goteo
- Microrriego: una técnica de restauración de la cubierta vegetal para ambientes semiáridos. Consiste en suministrar agua a 25 cm de profundidad, empleando pequeños tubos de polietileno de 5 mm de diámetro (Sánchez et al., 2004).
- Lluvia sólida: polímero hidroabsorbente poliacrilato de potasio
- El uso de plantas modificadas genéticamente para resistencia contra sequía se convierte en la tendencia a la que se dirige el sector agrícola.

Productos comerciales relacionados

El sonido podría ser una técnica agrícola reciente y dentro de esto existe hoy en día un número limitado de empresas que comercializan esta técnica, tal es el caso del Sonic Bloom por Dan Carlson en USA, el cual por medio de sonidos de la naturaleza y una nutrición foliar ayudan a aumentar la productividad de los cultivos de un 50 a un 700%. El sonido (que esencialmente es una versión sintetizada del canto de los pájaros) hace que los estomas o agujeros de respiración bajo las hojas se abran más, permitiendo así la entrada de más dióxido de carbono y nutrientes. Se pueden obtener mejores resultados si se utiliza el pulverizador de nutrientes foliares orgánicos patentado que aprovecha los orificios de respiración abiertos para alimentar a la planta con mayor eficacia (*Sonic Bloom*, 2021).

Harvest Harmonics es otra empresa con una nueva tecnología agrícola con microtransmisores personalizados avanzados que utilizan más de 3000 ondas de radio de baja frecuencia conectados a un sistema de riego. Kyminasi Plant Booster (KPB) se activa cuando el agua pasa por primera vez. El KPB tiene un tamaño personalizado para cada granja, diseñado para trabajar con todos los cultivos plantados en tierra. No requiere ningún sistema de alimentación ni mantenimiento.

Los dispositivos de riego utilizan un avanzado sistema de señalización para impulsar la fotosíntesis y el rendimiento de los cultivos en las plantas. La tecnología Kyminasi Plants Booster [KPB] funciona como un microchip de ordenador. Como las frecuencias transmitidas corresponden a las frecuencias moleculares naturales de los suelos y las plantas, estas “instrucciones” pueden ser recibidas por ellas y cambiarán de función en consecuencia (McGreevy et al., 1999).

III. Hipótesis

El sonido del agua corriendo incrementa el rendimiento y la producción de capsaicina por el impacto en las ruta metabólicas que encienden los mecanismos de defensa en la respuesta al estrés hídrico, y reduce los efectos causados por la falta de agua, en comparación con tratamientos usando silencio y ruido blanco. Así mismo el sonido del abejorro aumenta la cantidad de azúcares totales en el néctar, en comparación a grupos sin estímulo sonoro.

IV. Objetivo General

Medir el impacto del sonido de agua corriendo en rendimiento, capsaicina y expresión de genes relacionados a sequía. Y sonidos de vuelo y polinización de abejorro en la producción de carbohidratos totales. Ambos en comparación con Ruido Blanco y un grupo Control. Bajo condiciones de invernadero.

Objetivos Específicos

1. Obtener los sonidos: el sonido de agua corriendo obtenido de una biblioteca de audios y realizar un análisis de frecuencias para confirmar la veracidad del sonido. Así mismo grabar el sonido de abejorros polinizando y volando con la finalidad de ser usados como tratamientos acústicos en el chile jalapeño, teniendo la certeza de que el tratamiento acústico es fiel a la realidad.
2. Aplicar los tratamientos acústicos a chile jalapeño en condiciones de invernadero, exponiendo a la planta al sonido dentro de una caja acústica construida específicamente para poder tener 2 o más tratamientos sonoros dentro del mismo espacio.

3. Determinar el impacto de los tratamientos en la producción de azúcares totales, expresión de genes relacionados a la sequía, realizando mediciones de SOD, POD y Prolina, así mismo mediciones de cantidad de capsaicina y rendimiento, dentro de los laboratorios del campus Amazcala.
4. Determinar el impacto de los sonidos de abejorro en la producción de carbohidratos totales dentro de los laboratorios del Campus Amazcala.

Marco Teórico

El sonido

Los sonidos son ondas mecánicas de presión que se propagan a través de un medio de transmisión como el aire. La vibración sonora se considera una fuerza mecánica que modula el crecimiento y desarrollo de las plantas como otros estímulos mecánicos, por ejemplo, viento, lluvia, tacto y vibración (Ghosh, y otros, 2016). Varios estudios anteriores y recientes informaron respuestas de desarrollo en plantas adaptadas con un tratamiento acústico utilizando diversas frecuencias. Esto sugiere fuertemente la existencia de sofisticados mecanismos moleculares para la percepción de vibraciones sonoras y la transducción de señales (Ghosh et al., 2016).

Hoy en día ha surgido el uso de vibraciones acústicas para generar un estrés abiótico controlado en las plantas, este tipo de elicitores mejoran las condiciones de crecimiento, metabolismo energético, expresión génica relacionada con el estrés, incrementa metabolitos secundarios y resistencia a enfermedades (Fernandez-Jaramillo et al., 2018).

Elicitores

Los elicitores son factores químicos o físicos de variado origen que inducen cambios fisiológicos en el organismo. Los elicitores son los compuestos que estimulan la respuesta defensiva de las plantas ante algún tipo de estrés. Son sustancias de diversas fuentes tanto inorgánicas como orgánicas que pueden inducir efectos fisiológicos y cambios como la activación de respuestas defensivas y la acumulación de fitoalexinas en el organismo al cual son aplicados (García Enciso et al., 2018).

Chile

El chile es el fruto de las plantas del género *Capsicum*. El género *Capsicum*, en el que se clasifica al chile, pertenece a un subgrupo taxonómico de la familia Solanácea, es uno de los cultivos de mayor importancia económica a nivel

mundial.(Kang et al., 2020). Durante las últimas dos décadas, la producción y el cultivo de chiles ha aumentado constantemente en todo el mundo, alcanzando 3.8 millones de hectáreas de tierra para cultivo y 40.7 millones de toneladas de chile producidos en 2017 (Kang et al., 2020).

México tiene una producción anual de 3.2 millones de toneladas y un crecimiento de 4.82 en el periodo 2003-2016. Actualmente, son cultivos importantes de exportación, ya que el 29.71% de la producción total se destina al mercado internacional. Las exportaciones mexicanas representaron un porcentaje muy significativo de las importaciones de chiles en diversos países: Estados Unidos 77.99%, Canadá 55.45% y Guatemala 52.25% (SAGARPA, 2017).

Para el 2030, se estima que el aumento en la demanda mundial pase de 6.30 a 8.10 millones de toneladas métricas (MMt), un crecimiento acumulado de 28.57%, mientras que la producción en México de chiles y pimientos tiene la capacidad de incrementarse de 3.28 a 4.02MMt, lo cual representa un crecimiento acumulado de 22.44% (SAGARPA, 2017).

La demanda internacional del chile se ha incrementado en 20 países que incluyen integrantes del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), el Acuerdo Estratégico Trans-Pacífico de Asociación Económica (TPP), el Tratado de Libre Comercio del Triángulo del Norte (TLCTN), así como del bloque de países de la Unión Europea y otros de los que México no tiene acuerdo de libre comercio (Turquía, Brasil y Hong Kong). Actualmente, México tiene uno de los grandes competidores a nivel internacional; asimismo, sus ventajas comparativas lo posicionan como un proveedor predilecto en el comercio internacional de este cultivo (SAGARPA, 2017).

El chile jalapeño es uno de los principales tipos de chile que se siembra en México debido a la infinidad de usos que tiene su fruto. La superficie anual que se establece

en nuestro país es de aproximadamente 30 mil hectáreas, distribuidas prácticamente en todos los estados (Moreno & Mendoza, 2011).

Se puede decir que en México las siembras de este cultivo se dividen en dos grandes regiones: la que cubre los estados del Golfo de México y Sureste del país y la región Centro-Norte. En la primera se ubican los estados de Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Tabasco, Campeche y Quintana Roo, y se caracteriza porque en muchas ocasiones los chiles jalapeños se producen en agricultura de temporal, se usan materiales criollos o variedades de polinización abierta, y baja aplicación de insumos, con lo que se tienen bajos rendimientos y pobre calidad comercial del producto, en tanto que en la Región Centro y Norte donde se incluyen Michoacán, Jalisco, Colima, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Baja California, Chihuahua, San Luis Potosí, Nuevo León, Tamaulipas y Coahuila, se caracteriza por el uso de alta tecnología (fertirrigación, invernaderos grandes extensiones de agricultura protegida, uso de híbridos y agroquímicos de última generación), que se refleja en el volumen de producción que aporta (Moreno & Mendoza, 2011).

Por lo anterior, las características de los jalapeños que se siembran en ambas regiones son muy diferentes: las variedades criollas y mejoradas de jalapeño utilizadas en la franja costera del Golfo de México y el Sureste provienen de materiales nativos de esta región, y se les considera como verdaderos jalapeños (Moreno & Mendoza, 2011).

Al igual que otros cultivos, el chile se ve amenazado por diversas condiciones ambientales como la sequía, debido a que disminuyen su calidad y productividad (Kang et al., 2020).

Capsaicina

La Capsaicina es el compuesto químico-capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nononamida) número CAS 404-86-4, es el componente activo de los Pimientos picantes (AcuEcuRed, 2020). Es un alcaloide de fórmula $C_{18}H_{27}O_3N$ que es sólido

a temperatura ambiente (punto de fusión 64°C). Su nombre IUPAC es (E)-N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metilnon-6-enamida. Conjuntamente con la dihidrocapsaicina (capsaicina que ha perdido el doble enlace por hidrogenación), forman el 90% de todos los compuestos responsables del picor del chile (Cedrón, 2013).

El nivel de picor o pungencia de las especies *Capsicum* dependen en un 90% de la concentración de capsaicina y otros compuestos relacionados a ésta, conocidos como capsaicinoides (compuestos fenólicos), exclusivamente sintetizados en frutos de este género.

Este compuesto bioactivo es sintetizado a través de la vía biosintética de los fenilpropanoides y la vía de los ácidos grasos. Numerosas enzimas están involucradas en la biosíntesis de la capsaicina, pero muchas de ellas no están bien caracterizadas, y la regulación de la vía no se entiende completamente (Perucka & Materska, 2001).

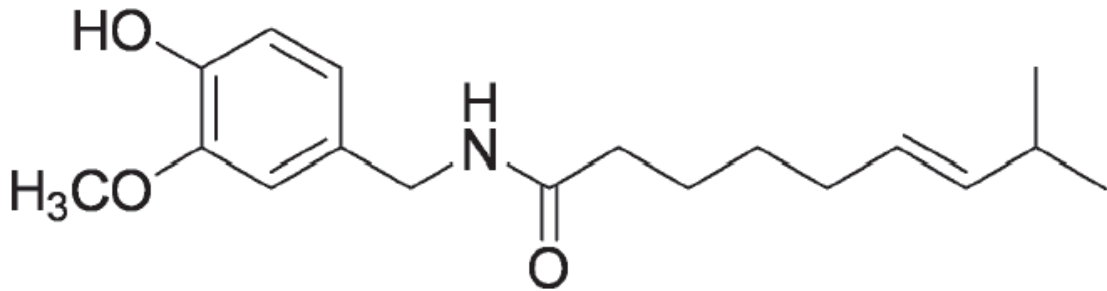


Figura 1. Estructura de la capsaicina.

Sequía

La sequía es un tipo de estrés abiótico o ambiental, el cual hace referencia a una condición de reducción de la disponibilidad de agua para las plantas durante un periodo de tiempo prolongado (Butt et al., 2017).

Alrededor de un tercio de la tierra dedicada a la agricultura a nivel mundial se ve afectada por este tipo de estrés, lo que representa una amenaza para el crecimiento de las plantas y la seguridad alimentaria (Yang et al., 2009).

En México la disponibilidad del agua para este año 2020 ha bajado en 6 por ciento con relación al 2000, y la demanda seguirá creciendo, incluso se prevé para el año 2050 incrementa en 300 por ciento. 17 de las 22 ciudades más pobladas del país se encuentran ubicadas en zonas áridas y semiáridas, lo que significa un 56 por ciento de la población (Esparza, 2014).

El estrés por sequía tiene un efecto negativo sobre diversos procesos fisiológicos de las plantas, especialmente sobre la fotosíntesis, reduciéndose su crecimiento y productividad (Osakabe et al., 2014; Pathak et al., 2014). Durante las etapas de crecimiento vegetativo, un ambiente seco reduce el tamaño de las hojas, la extensión del tallo y la proliferación de la raíz, afecta la relación agua-planta y disminuye la eficiencia del uso del agua (Farooq et al., 2009).

La sequía desencadena una amplia variedad de respuestas en las plantas que van desde el metabolismo celular hasta cambios en las tasas de crecimiento y el rendimiento de los cultivos, afectando procesos fisiológicos como: el estado hídrico de la planta, el balance de energía y las relaciones fotosintéticas (conductancia estomática) y en efecto, cambios drásticos en la energía libre de las moléculas de agua (potencial hidráulico) (Taiz and Zeiger, 2006) presentando algunas variaciones entre especies (Zhang et al., 2016).

Abejorros

Los abejorros del género *Bombus* son considerados polinizadores eficientes comparados con otras especies de abejas. Características como su gran tamaño, la capacidad de extraer polen de anteras tubulares mediante vibración de los músculos alares, su abundante pilosidad y la capacidad de tener actividad en condiciones ambientales principalmente de temperatura y luminosidad, en las que

otras especies no tienen actividad, hacen de las especies de este género polinizadores eficientes comparados con otras abejas (Pacateque, 2014).

Información taxonómica	Animalia
Reino:	
Phylum:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden:	Hymenoptera
Familia:	Apidae
Género:	<i>Bombus</i>
Especie:	<i>impatiens</i>
Nombre científico:	<i>Bombus impatiens</i> (Cresso, 2012)

Descripción de la especie

Es un abejorro que se distingue de otros por la sección amarilla extendida en el torax. Las reinas miden entre 17 y 21 mm de largo, y son más grandes que los zánganos (12-17 mm) y las obreras (8.5-16 mm). El tono de amarillo tiende a ser más pálido (grisáceo) que, en otros abejorros, con el lomo negro (Discover Life, 2015).

Distribución original

América del Norte (Canadá y Estados Unidos) desde Ontario a Maine y el sur de Florida.

Los abejorros del género *Bombus* son excelentes polinizadores que contribuyen al mantenimiento de muchos ecosistemas y a la producción de cultivos comerciales. La cría comercial de abejorros se realiza desde hace 30 años con algunas especies euroasiáticas y norteamericanas (Sheena et al., 2013).

La probabilidad que tiene la especie de continuar introduciéndose o introducirse a nuevas áreas en donde no ha sido reportada previamente. Destaca la importancia

de la vía o el número de vías por las que entra la especie. Interviene también el número de individuos y la frecuencia de introducción (Cresso, 2012).

Hay evidencia documentada de que la especie tiene alta demanda, tiene un uso tradicional arraigado o es esencial para seguridad alimentaria, tiene la posibilidad de entrar por una o más vías, el número de individuos es considerable y la frecuencia de la introducción es alta o está asociada con actividades que fomentan su dispersión o escape. No se tienen medidas para controlar la introducción de la especie al país.

Las importaciones a México son continuas, ya que la especie es utilizada para la polinización de cultivos en invernadero como jitomate, chile o pimientos. A la fecha no parece existir alguna otra alternativa comercial con un abejorro nativo, aunque *B. ephippiatus* parece ser una excelente opción (Torres-Ruiz et al., 2013). Desde 2001 Koppert de México importa *B. impatiens* de Michigan y termina de madurar las colonias en sus instalaciones de Querétaro (abierta en 2004) (Cresso, 2012).

En 1987, se observó cómo los abejorros podían ser una buena alternativa para esta actividad, consiguiéndose más eficacia en la polinización y en fructificación, que con la vibración manual y la aplicación de hormonas. Los abejorros son más efectivos porque son más grandes y pueden visitar un número mayor de plantas por vuelo, es decir, más flores por minuto, y logran un mejor contacto con el estigma y los estambres. Los abejorros no tienen tal sistema de comunicación, cuando un abejorro individual encuentra una fuente de comida atractiva en otra parte, no puede informar a sus compañeros, de manera que los otros abejorros continuarán trabajando en la cosecha en la que se requieren sus servicios (Pacateque, 2014).

La crisis mundial de polinización no solo es producida por la pérdida de polinizadores, sino también por su homogeneización, ambos procesos causados por el ser humano (Smith-Ramírez et al., 2018).

Carbohidratos totales Azúcares totales y abejorros

La actividad de forrajeo y la búsqueda de polen y néctar también se relacionan con el tamaño floral, disminuyendo enormemente a medida que el tamaño se incrementa. El polen es un importante recurso para los polinizadores, puesto que les proporciona cerca del 20% de los carbohidratos que necesitan y el total de proteínas. Por ello, su abundancia influye en las decisiones de forrajeo del polinizador y su déficit puede afectar a su actividad diaria, tal como ocurre con las abejas nodriza y sus cuidados para con las larvas. En cuanto al néctar, proporciona el 80% de los requerimientos de azúcar de los polinizadores, siendo su principal fuente de energía, y cuya calidad y concentración de azúcares influyen en las especies que forrajean sobre las distintas flores, existiendo plantas sacarosa-dominantes, glucosa-dominantes o fructosa-dominantes, y otras con un contenido balanceado de los tres azúcares. Un ejemplo de las preferencias florales según el néctar sería el caso de las abejas de la miel, que suelen forrajear sobre plantas con un contenido balanceado en azúcares, mientras que los abejorros prefieren una mezcla de los tres azúcares (Ricou et al., 2014).

Néctar floral

El néctar se compone en gran parte de azúcares (principalmente sacarosa, glucosa y fructosa) y agua, pero también contiene varios componentes menores como aminoácidos o lípidos que pueden, directa o indirectamente, tener importancia nutricional. El valor energético del néctar depende de su volumen y de la concentración de azúcares totales (Cnaani et al., 2006; Nicolson, 2011).

El néctar es una fuente principal de energía para muchos insectos, así como para las abejas, que lo mezclan con el polen y lo utilizan en su nutrición (Somme et al.,

2015). Según algunos reportes el azúcar del néctar, la concentración puede variar del 10 al 75% (Willmer, 2011).

La composición del néctar floral, especialmente lo relativo a azúcares, ha sido identificado como el principal componente del néctar floral y de la interacción planta – animal. Estudios han demostrado que las flores segregan mayor cantidad de azúcares totales en el néctar mientras haya una mayor cantidad de eventos de polinización (Palareti et al., 2016).

Polinización

La polinización, entendida como la transferencia de polen desde la parte masculina de una flor hasta la parte femenina de la misma u otra flor, es un proceso esencial para el mantenimiento de la viabilidad y la diversidad genética de las plantas con flor, además de mejorar la calidad y cantidad de semillas y frutos, así como de las características de la descendencia (Chautá-Mellizo, et al., 2012; Vergara, C.H.; Badano, 2009; Vilhena et al. 2012). Puede ser realizada de forma abiótica, mediante el transporte del polen por el viento o el agua, o biótica, empleando para ello a animales como vectores en el transporte (Bonilla, 2012; Pantoja, et al., 2014). Diversos grupos, tales como invertebrados, aves o mamíferos, pueden actuar como polinizadores, movidos por la necesidad de encontrar recursos para su alimentación, desarrollo o reproducción (Bonilla, 2012)(Bonilla, 2012).

La mayoría de las plantas que florecen son polinizadas por insectos y otros animales, y una minoría utiliza factores abióticos como el viento principalmente. La proporción global de angiospermas polinizadas por animales es de 308 006, lo que supone el 87,5% de la diversidad estimada a nivel de especie de las plantas con flores. Dada la actual preocupación por el declive de los polinizadores y los posibles impactos resultantes tanto en las comunidades naturales como en los cultivos agrícolas, estas estimaciones son vitales tanto para los ecologistas como para los responsables políticos (Ollerton et al., 2011).

La probabilidad de que un animal polinizador se acerque a una flor y polinizar, depende de varios factores como: a) la distancia entre plantas b) la distancia que tiene que viajar el polinizador c) el número de flores en la planta d) la cantidad de alimento disponible en cada flor y e) la cantidad que el animal puede coleccionar (Raw, 2000). El énfasis en la presente investigación es en el factor de la cantidad de alimento disponible para el animal polinizador, es decir, la cantidad de azúcares totales disponibles en el néctar de la flor de chile jalapeño. A diferencia de las abejas, los abejorros no tienen un sistema de comunicación entre ellos, es por ello que los abejorros visitan todas las flores cercanas a la colmena (Castillo, 2019).

Enzimas.

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores, es decir, aceleran la velocidad con la que las reacciones se llevan a cabo sin alterar el equilibrio y son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos. Desde el punto de vista fisicoquímico, y como consecuencia de su estructura proteica, la actividad catalítica de las enzimas depende del pH y de la temperatura de reacción, característica que resulta de fundamental importancia en una aplicación industrial (GARCÍA et al., 2002).

Las enzimas están constituidas por proteínas globulares que, a temperaturas cercanas a los 37 °C, aceleran la velocidad de las reacciones químicas y biológicas por un factor de 10¹² a 10²⁰ en relación con las reacciones no catalizadas. La actividad de una enzima se expresa en términos de la reacción que ella cataliza como la transformación de un micromol de sustrato en producto por unidad de tiempo. Mientras que las Unidades son una medida de una cantidad de enzima activa (FENNEMA, 2000).

Enzima Superóxido dismutasa (SOD)

Un efecto secundario al estrés por sequía es el daño oxidativo causado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que obligan a las plantas a

activar mecanismos moleculares de regulación induciendo genes que expresan enzimas desoxidantes como Superóxido Dismutasa (SOD). Estudios realizados en muchas especies vegetales, sometidas a estrés hídrico, muestran el incremento de la actividad de esta enzima, así como su relación con la resistencia al estrés. La enzima puede ser utilizada como marcador en la búsqueda de resistencia (Pulido, 2014).

La SOD pertenece a una familia de metaloenzimas, es considerada como la más eficiente de las enzimas antioxidantes intracelulares, está presente en todos los organismos aeróbicos y en todos los compartimientos subcelulares, en los cuales es posible que se generen las ROS, esto es importante en la tolerancia de las plantas a todo tipo de estrés debido a que proveen la primera línea de defensa contra los efectos de los elevados niveles de ROS (Abdulet al., 2008; Gill S. S.; Tuteja, 2010).

Es importante el estudio del papel que cumplen los sistemas de ROS y sus enzimas antioxidantes en la tolerancia de las plantas al estrés, porque con la manipulación de niveles de estas enzimas, es posible disminuir el estrés oxidativo, ofreciendo una alternativa para contrarrestar el efecto del estrés por sequía (Ramachandra, A. R., Viswanatha, K. C. & Vivekanandan, 2004). Además la respuesta enzimática puede constituir una ventaja adaptativa en la protección al déficit oxidativo (Bosrasi, O. Días, P., Agius, M. F., Valpuesta, 2001).

La enzima SOD hace parte del sistema de defensa oxidativo y tiene como función evitar la reacción de Haber-Weiss y minimizar el daño oxidativo, esta enzima dismuta rápidamente el radical superóxido (O_2^-) a Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), este producto tiene la característica de ser relativamente estable y puede ser detoxificado por la Catalasa (8CAT) y Peroxidasas (POX). Estas ENZIMAS minimalizan la reacción de Haber – Weiss manteniendo concentraciones de O_2^- y H_2HO_2 cercanas a cero (Pulido, 2014) por esto se constituye en uno de los mayores

mecanismos de defensa antioxidantes en las plantas (Muñoz I. G., Moran J. F., Becana, M. Montoya, 2005).

En estudios realizados con especies de cultivos resistentes y tolerantes a sequía, los cuales fueron sometidos a estrés hídrico, se obtuvo como resultado que las especies tolerantes presentaron una actividad más alta de enzimas antioxidantes que las especies susceptibles, esto se observó en cultivo de trigo, frijol y maíz (Chopra . & Selote D., 2007; I. Tükan, 2005).

En un estudio realizado en genotipos tolerantes y sensibles a sequía del *musfo Tortula* rurales se observó un incremento en los niveles de SOD en los genotipos tolerantes a sequía (Bowler C., Montagu M.V., 1992). En variedades de arroz resistentes a sequía y a heladas también presentó un incremento de SOD en presencia del déficit hídrico, asociando esto a un aumento en la capacidad del sistema antioxidante bajo este tipo de estrés (Guo Z.; Lu W.K.;Zhong, 2005).

En tres genotipos de *Radix astragali* planta medicinal de la china, se observó que al aplicar déficit hídrico aumento la actividad de las SOD a demás que este aumento se presentó en el genotipo más tolerante (Yong; Zongsuo L.; Honboc S.; & Feng D., 2004).

Peroxidasas (POD)

La peroxidasa es una de las enzimas que controlan el crecimiento fisiológico de las plantas, su diferenciación y desarrollo. Es bien conocido que esta enzima participa en la construcción y lignificación de la pared celular, la biosíntesis de etileno a partir del ácido aminociclopropanocar-boxílico y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la regulación de niveles de auxina, la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos, la oxidación de ácido indolacético, etc. (Farrell, et al., 1989; Krylov; Dunford, 1996; Wakamatsu, K.; Takahama, 1993). Por otro lado, hoy día existe un gran interés por la POD debido a sus múltiples

aplicaciones prácticas (industria maderera, industria de alimentos, bioquímica clínica, etc.). Actualmente cerca de un 90% de los Kits para análisis inmunoenzimático se preparan a partir de peroxidasa (F. E. Hammer, 1993; Tijssen, 1985). Además, la POD se ha venido utilizando para preparar electrodos específicos con POD inmovilizada sobre su superficie que tienen aplicación en análisis ambiental (Munteanu, F. D.; Lindgren et al., 1998).

Mecanismo de reacción: La peroxidasa es una oxidoreductasa que cataliza reacciones usando oxígeno o peróxido como aceptor de hidrógeno. Estudios señalan que los mecanismos de acción de la peroxidasa están basados en la formación de un complejo enzima donante de hidrógeno, como se observa en la siguiente reacción:



Ecuación 1. Ecuación de peroxidasa

Cataliza la reacción de ciertos compuestos dadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H_2O_2). El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peróxido (WHITAKER, 1972). La velocidad de formación del color rojo ladrillo puede ser utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias con relación al tiempo (O., 2000).

El gen POD está relacionado con la eliminación de especies de peróxido de hidrógeno y la protección de la membrana celular durante lesiones mecánicas, como las causadas por insectos o prácticas agrícolas y bajas temperaturas. Incluso el estrés mecánico que no causa heridas, debido a que se asemeja a un toque suave, puede inducir la actividad redox y la posterior activación de la peroxidasa que coincide con todos los resultados transcripcionales de emisión de patrones acústicos (Rodríguez-Calzada et al., 2019).

Prolina

La prolina comprende menos del 5 % de una mezcla de aminoácidos libres en plantas que se encuentran en condiciones normales (Shahbaz et al., 2013). Sin embargo, bajo ciertas situaciones de estrés, se ha reportado que la prolina representa alrededor del 80 % de esta mezcla de aminoácidos (Meena et al., 2019).

Durante condiciones de estrés, las plantas acumulan osmolitos como la glicina betaína, azúcares (manitol, sorbitol, trehalosa), glicerol poliaminas, L-prolina, etc. (Anjum et al., 2017; Sharma et al., 2019). Entre ellos, la prolina es el osmolito más importante bajo condiciones de estrés por sequía (Sharma et al., 2019).

Estos osmolitos los emplean las plantas para contrarrestar a dichas condiciones de estrés, a través del uso de diversos mecanismos, como el cambio de presión celular, desintoxicación de ROS, protección de la membrana plasmática y ajuste de compuestos/proteínas (Shamsul Hayat et al., 2012), confiriendo tolerancia a las células sin interferir con la maquinaria celular de la planta (Anjum et al., 2017).

En algunas investigaciones se ha observado aumento en los niveles de prolina en plantas sometidas a diversas condiciones de estrés. En condiciones de sequía, Alexieva et al., (2001) y Yamada et al., (2005) observaron acumulación de prolina en cultivos de guisantes y petunias (*Petunia hybrida*), respectivamente. Sahitya et al., (2018), estudiaron la relación entre el potencial antioxidante del extracto de semilla de chile y la tolerancia al estrés hídrico en la fase de plántulas, sometiendo diferentes genotipos de chile a tres condiciones de estrés por sequía (100, 80 y 60 % de capacidad de campo), donde encontraron que las plántulas sometidas al nivel de estrés más severo presentaron un mayor contenido de prolina, lo que sugiere que, las plantas de chile tiene una mayor tolerancia al estrés por sequía al haber una acumulación más alta de este aminoácido.

Generalmente, la acumulación de prolina aumenta en condiciones de estrés, lo que no sólo ayuda a mantener la turgencia celular, sino que también participa en el apagado de radicales libres, el mantenimiento de las estructuras subcelulares y la amortiguación del redoxpotencial celular (Anjum et al., 2017).

Análisis de crecimiento fisiológico

Los análisis del crecimiento son básicos para comprender mejor los procesos fisiológicos que determinan la producción vegetal, y así fundamentar más racionalmente las prácticas de manejo del cultivo: nutrición, riego, podas, estrategias de protección, entre otras (Barrientos 1988). El crecimiento se define como un incremento constante en el tamaño de un organismo, que está acompañado de 2 procesos: morfogénesis y diferenciación; el primero es el desarrollo de la forma o modelo de la célula u órgano y el segundo, es el proceso por el cual las células cambian estructural y bioquímicamente para formar o adquirir funciones especializadas (Lazar, 2003). Ambos procesos se pueden medir mediante la tasa absoluta de crecimiento, en función de la cantidad de materia seca en crecimiento presente y la tasa de funcionamiento de esta, en relación con la influencia del ambiente (Moorby, 1982). El peso seco es el criterio más apropiado para medir el crecimiento y la magnitud del sistema de asimilación de la planta, referido, frecuentemente, al área foliar total (Lazar, 2003), y es la medida usual del tejido fotosintetizador de área que es diferente entre las hojas jóvenes y adultas (Azofeifa & Moreira, 2004).

También menciona que los frutos son capaces de fijar carbono para su desarrollo; pero, además, los fotoasimilados son importados desde las hojas del eje principal de donde se encuentra el fruto. Estos asimilados son la principal fuente, contribuyendo en aproximadamente 7.5 veces más en carbono que el fijado por los mismos frutos, de una comunidad de plantas. Además, la cantidad de área foliar es

importante, porque esta determina la cantidad o importe de energía solar que es absorbida y convertida a materiales orgánicos (Azofeifa & Moreira, 2004).

V. Metodología

Se usaron las metodologías: aplicada, cuantitativa, estadística y descriptiva para el buen desarrollo de la investigación, la cual se llevó a cabo en el Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, con una duración de 2 años.

La población que se tomó fue el chile jalapeño, teniendo 9 grupos diferentes de 7 individuos cada uno, haciendo un total de 63 individuos.

Los tratamientos acústicos seleccionados fueron:

Sonido de agua corriendo

- Sin riego:
 - Con sonido de Agua corriendo
- Con riego:
 - Con sonido de Agua corriendo
 - Con sonido de Ruido Blanco
 - Control (sin sonido)

Abejorro (plantas bien regadas)

- Sonido de abejorro volando
- Sonido de abejorro polinizando
- Sonido de abejorro volando y polinizando
- Ruido blanco
- Control (sin sonido)

Materiales para experimentación:

Material para cultivo

- Germinadores
- Semilla de chile
- Peatmoss super terra ST1
- Sustrato para planta: 25% Peatmoss, 60%tezontle y 15%arenilla

- Bolsas de 5kg para trasplante
- Sistema de riego:
 - Bomba
 - Temporizador
 - Tubería pvc
 - Manguera
- Invernadero de 6 m x 6 m

Material para grabación de audios:

- Invernadero
- Micrófono Maono AU-A04 condensador y cardiode
- Programa de grabación y edición de audio Audacity
- Abejorros
- Computadora

Material para reproducción de sonido:

- Paneles de absorción acústica:
 - Dimensiones exteriores aproximadas: 1.03m * 1.20m * 1.00 m (a * l * h)
 - Dimensiones interiores aproximadas: 0.70m * 1.00m * 0.97 m (a * l * h)
 - Fabricada con pared acústica con el siguiente arreglo:
 - OSB 18mm
 - Relleno de Poliuretano ½” protegida con una placa de 3mm de pefocel
 - Acabado en espuma acústica perfilada de 2”
 - Tapa de cristal templado de 10 mm con sello
 - 2 altavoces JBL de 6 ½”, respuesta de frecuencias: 55 Hz – 20 KHz, impedancia 4 Ω , con tira de parcheo con conector Jack estándar
- Extensión
- Memoria USB

- Archivo de audio en formato WVA

Desarrollo del experimento:

Para el buen desarrollo de la investigación se llevaron a cabo 8 etapas distintas:

- Etapa 1: Reconocimiento del espacio asignado para el experimento
- Etapa 2: Germinación de semillas
- Etapa 3: Limpieza y Acomodo de invernaderos
- Etapa 4: Grabación de audios
- Etapa 5: Trasplante de plántula
- Etapa 6: Aplicación de tratamiento en etapa de floración
- Etapa 7 Análisis de resultados
- Etapa 8: Conclusiones

Etapa 1: Reconocimiento del espacio para experimentación

El reconocimiento del invernadero se realizó el 23 de febrero de 2021, se autorizó usar 2 invernaderos de 3 m x 6m dentro de la Facultad de Ingeniería Campus Amazcala UAQ en compañía del Dr. Luis Miguel Conteras Medina, director de la tesis y la Dra. Laura Helena Caicedo López, secretaria de la tesis.

Etapa 2: Germinación de semillas

Se germinaron 200 semillas de chile jalapeño en el campus Amazcala, colocadas en charola de unicel de 200 cavidades, se usó peat moss ST1 como sustrato y 1 semilla de chile jalapeño por cavidad, el día 14 de diciembre, 2021.

Procedimiento:

La charola de unicel se desinfectó con sales cuaternarias de amonio, una vez desinfectada y limpia se rellenó cada cavidad de peat moss húmedo a capacidad de campo, se colocó 1 semillas por cavidad, cubriéndolas con un poco de peat moss, finalmente se cubrió con vermiculita y se cubrió con un hule oscuro, guardando la charola en un lugar fresco y oscuro. La humedad de la charola se monitoreo diariamente, una vez que apareció el brote, se colocaron en un espacio donde recibió luz solar indirectamente para evitar su elongación.



Figura 2. Germinación de semillas de chile jalapeño

Etapa 3: Limpieza y a acondicionamiento de invernadero

El acondicionamiento de invernaderos se realizó a lo largo de varias semanas en las cuales se hizo limpieza de hierba y basura, cambio de plástico de las paredes del invernadero, se colocó malla antiáfido, nivelación en desnivel del suelo para evitar encharcamientos y se colocó cover en el suelo, los invernaderos se unieron removiendo la pared divisoria de en medio. Así mismo se colocó graba en todo el

perímetro de los invernaderos para evitar la entrada de insectos o animales rastreros.

Se realizó el acondicionamiento de sistema de riego instalando tubería de pvc que conecta el tinaco en la parte exterior trasera hacia el interior del invernadero, seguido de esto, se perforó la tubería pvc del interior para colocar las mangueras que conectaron con 4 canaletas, perforando 16 cavidades por línea donde se instalaron goteros, manguera y estaca de riego.

Se realizó el monitoreo del riego homogéneo de 50 ml por minuto, programando riegos de 9am a 6pm, uno cada hora, realizando, con esto, un total de 10 riegos de 50 mil durante el día.



Figura 3. Invernadero antes de limpieza y acondicionamiento



Figura 4. Invernadero acondicionado y limpio

Etapa 4: Grabación y obtención de audios

Para la grabación de los audios a utilizar se hicieron diversas investigaciones y pruebas para obtener la mejor calidad del audio a utilizar, contando con el asesoramiento del Centro Nacional de Metrología (CENAM) con el Dr. Andrés Estéban Pérez Mayzumoto y del M. en C. Aldo .Adrián García González

Audio de Abejorros:

Se observó detalladamente cómo el abejaorro llega a polinizar la flor y poder determinar el acomodo de los micrófonos y obtener un mejor sonido.

Para su grabación se utilizó un micrófono y el programa Audacity, dentro del invernadero con abejaorros polinizando flores de albahaca debido a que fue la opción más viable y eficaz para grabar el vuelo y polinización del abejaorro. Se colocó el micrófono a 3 cm de la flor de albahaca para poder obtener un sonido más fidedigno y limpio.

Se esperó a que los abejorros se acercaran a la planta para polinizarla y se grabaron varias mediciones, posteriormente analizadas por parte del CENAM para identificar el intervalo de frecuencias en el que se mueve el sonido del abejorro, teniendo como resultado lo siguiente:

Audio de Abejorros:

Una vez obtenidos los resultados del CENAM se procedió a la clasificación y edición de 3 audios distintos: 1) Polinización 2) Vuelo 3) Vuelo y polinización. Con una duración de 20 minutos cada uno dentro del programa Audacity concatenando el mismo audio por sonido para cubrir los 20 minutos.



Figura 5. Grabación del sonido de abejorro

Audio agua corriendo:

Se realizó una comparación entre diferentes bibliotecas virtuales de audios (La biblioteca que se usó fue <https://sound-effects.bbcrewind.co.uk/search?q=runing%20water&resultSize=70>) y se seleccionaron 3 audios distintos, los cuáles se enviaron al CENAM para su valoración y selección de 1 audio el cuál arrojó la siguiente información:

El audio enviado para análisis en el dominio de la frecuencia arrojó los siguientes espectros.

Grabación convertida a formato WAV 24 bits con referencia a 20 micro Pascales

Audio: river---wa_nhu9707894.

Señales en tiempo

Frecuencia de muestreo en la grabación= 44100 Hz

Número de muestras 1626624.

Análisis en Frecuencia

Intervalo de muestras analizadas 4410.

Intervalo de tiempo analizado 0.1 ms.

Intervalo de frecuencia analizado 20 Hz a 20 kHz

Ponderación Lineal

Análisis en frecuencia: Fast/0.125ms

Promediación Lineal RMS

CANALES-x1 y x2.

Debido a estos resultados se determinó el audio adecuado de sonido de agua corriendo, comparando las frecuencias entre cada uno de los audios seleccionados.

Etapas 5: Trasplante de plántula

Esta etapa se llevó a cabo el 15 de febrero, 2022. Las plántulas de chile se trasplantaron al tener 6 hojas verdaderas, con 2 meses de edad. El sustrato que se utilizó para el trasplante fue 60% tezontle, 25% peat moss y 15% arenilla, en bolsas de plástico con capacidad de 5 kg, colocando 3 kg de sustrato en cada bolsa.

Se colocaron en un invernadero de 6 m x 6 m, sobre 4 canaletas, teniendo 16 plantas por fila.

El riego se programó de 9am a 6pm un riego por hora de 50 ml. Con la siguiente nutrición mostrada en la tabla 2, ajustando el pH del agua a 6.5 en un tinaco de 800 L:

Producto	Cantidad
Ácido fosfórico	80 ml
Nitrato de calcio	1.12 Kg
Nitrato de potasio	321.98 gr
Sulfato de potasio	429.31 gr
Sulfato de magnesio	536.64 gr
Sulfato de cobre	8.58 gr
Fierro	21.48 gr
Zinc	4.29 gr
Manganeso	4.29 gr
Boro	4.29 gr

Tabla 2. Nutrición para chile jalapeño

La humedad relativa y temperatura del invernadero se monitorearon dentro del invernadero durante la duración del experimento con el equipo Elitech Log versión V6.1.0

Etapas 6: Aplicación de tratamientos

En esta etapa se aplicaron tratamientos acústicos de agua corriendo y abejorro dentro de paneles acústicos construidos específicamente para este proyecto, con fondos obtenidos a través del Fondo especial de rectoría FOPER-2021-FIN02533.

Las características físicas del panel acústico son las siguientes:

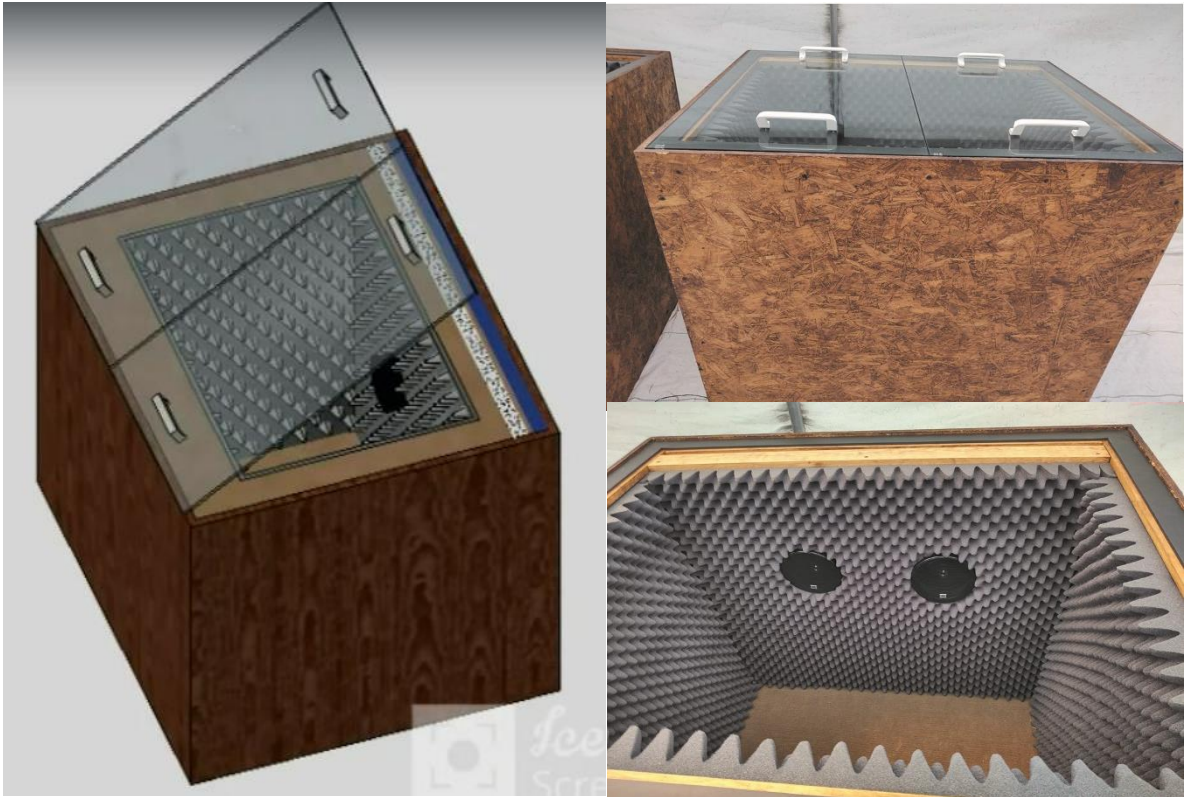


Tabla 3.

Figura 6. Diseño de Panel acústico

- Dimensiones exteriores aproximadas: 1.03m * 1.20m * 1.00 m (a * l * h)
- Dimensiones interiores aproximadas: 0.70m * 1.00m * 0.97 m (a * l * h)

Fabricada con pared acústica con el siguiente arreglo:

- OSB 18mm
- Relleno de Poliuretano ½" protegida con una placa de 3mm de perfofel
- Acabado en espuma acústica perfilada de 2"
- Tapa de cristal templado de 10 mm con sello
- 2 altavoces JBL de 6 ½", respuesta de frecuencias: 55 Hz – 20 KHz, impedancia 4 Ω , con tira de parcheo con conector Jack estándar

Tratamiento de agua corriendo:

El tratamiento de audio representativo del agua corriendo se llevó a cabo durante 7 días del 28 de marzo al 03 de abril, 2022. La aplicación del tratamiento acústico se realizó en distintos horarios cada día con el fin de aleatorizar las aplicaciones.

Para este estímulo se seleccionaron 4 grupos con 7 individuos cada uno, haciendo un total de 28 plantas de chile jalapeño distribuidas aleatoriamente dentro del invernadero.

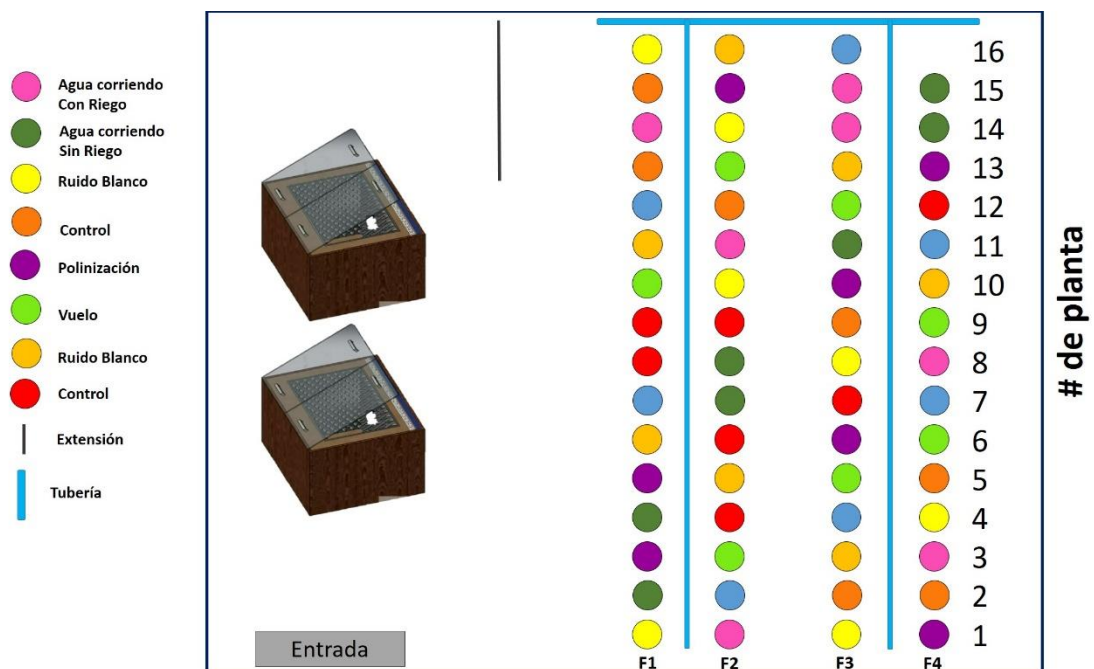


Figura 7. Distribución de plantas dentro del invernadero

Se realizaron mediciones fisiológicas con el fitomonitor (Millan-Almaraz et al., 2013), imágenes térmicas e imágenes RGB y medición de ancho de tallo los días 1, 4 y 7, a la misma hora de la aplicación del tratamiento. El día 1 y 7, al término de la aplicación del sonido, inmediatamente se realizó corte de una hoja apical para poder realizar los análisis de cambios enzimáticos en SOD, POD y osmóticos del aminoácido prolina. Una vez realizado el corte, la hoja se congeló con nitrógeno, siendo etiquetada para su análisis.



Figura 8. Congelamiento de hoja para análisis enzimáticos

Para esta etapa del experimento los tratamientos acústicos se aplicaron en un rango de 80 a 85 dB por 20 minutos, los cuales fueron:

- Agua corriendo con riego
- Agua corriendo sin riego
- Ruido Blanco
- Control (Sin sonido)

Las plantas eran colocadas dentro del panel acústico, en orden aleatorio cada vez.



Figura 9. Plantas de chile jalapeño adentro del panel acústico en tratamiento acústico.

La aplicación de tratamiento acústico se llevó a cabo de la siguiente forma:

Día	Fecha	Horario Agua Corriendo	Horario Ruido Blanco
1	28/03/22	20:15 hrs	20:45 hrs
2	29/03/22	11:00 hrs	11:36 hrs
3	30/03/22	08:14 hrs	8:44 hrs
4	31/03/22	13:50 hrs	14:24 hrs
5	01/04/22	17:22 hrs	17:52 hrs
6	02/04/22	09:22 hrs	09:55 hrs
7	03/04/22	11:42 hrs	12:12 hrs

Tabla 4. Horas de aplicación de tratamientos de agua corriendo y ruido blanco por día

Los individuos del tratamiento de agua corriendo sin riego, se les suspendió el agua por 9 días, regresándoles el riego después de su último tratamiento.

Los tratamientos se aplicaron con éxito, sin interrupciones o afecciones externas.

Tratamiento de sonido de abejorro

Para la aplicación de los tratamientos acústicos del abejorro, fue necesario esperar que las plantas estuvieran en floración para poder cortar pistilos con el objetivo de medir los azúcares totales de los mismos. Se mantuvo un continuo monitoreo de floración en las plantas, etiquetando todos los días las flores que abrían y supervisar su edad para cuando estuvieran en tratamiento, utilizar flores de la misma edad de antesis para el corte del pistilo.

La aplicación de sonidos de abejorro se realizó durante 7 días, del 18 al 24 de abril, 2022, por 20 minutos en un rango de 80 a 85 dB, aplicando el sonido en distintas horas del día, teniendo 5 tratamientos acústicos distintos con 7 individuos cada grupo haciendo un total de 35 plantas:

1. Sonido de abejorro volando
2. Sonido de abejorro polinizando
3. Sonido de abejorro volando y polinizando
4. Ruido blanco
5. Control (sin sonido)

Se realizaron mediciones fotoquímicas los días 1, 4 y 7 del tratamiento, para lo cual se hizo uso de un fitomonitor (Millan-Almaraz et al., 2013), imágenes termográficas e imágenes RGB, para obtener el índice vegetativo NDVI1, según lo reportado por (Solano-Alvarez et al., 2022).

Una vez tomadas las mediciones, las plantas se introdujeron en los paneles acústicos (Figura 10) por grupos y se aplicaron los tratamientos, después de 20 minutos de tratamiento acústico se cortó un pistilo por planta, tomando 7 pistilos por tratamiento y se deshidrataron para medir sus carbohidratos totales, usando flores

de 1 y 2 días de antesis. La figura 10 nos muestra el pistilo cortado de la flor de chile jalapeño.

Los horarios de aplicación de tratamiento fueron variados, reportándose de la siguiente forma:

Día	Fecha	Hora
1	18/04/22	18:55 hrs – 21:04 hrs
2	19/04/22	14:45 hrs – 16:00 hrs
3	20/04/22	12:27 hrs - 13:44 hrs
4	21/04/22	13:00 – 15:00 hrs
5	22/04/22	11:39 hrs – 12:54 hrs
6	23/04/22	8:10 hrs – 7:20 hrs
7	24/04/22	15:22 hrs – 17:57 hrs

Tabla 5. Horas de aplicación de tratamientos de sonido de abejorro por día

Los tratamientos se aplicaron con éxito, sin interrupciones o afecciones externas.

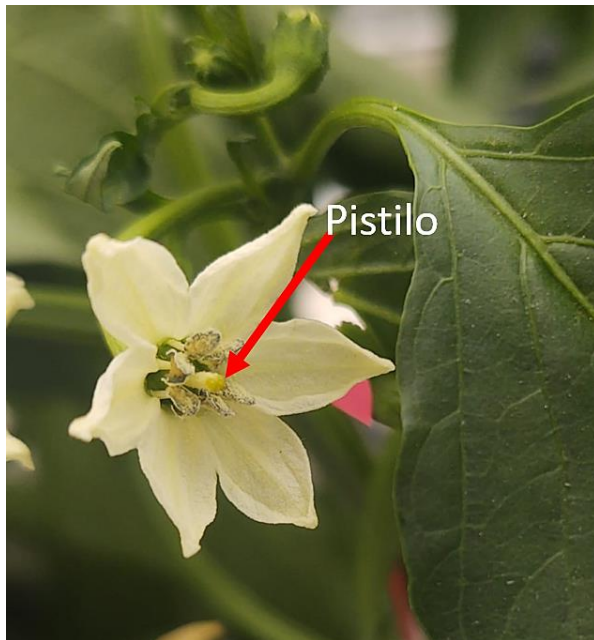


Figura 10. Flor de chile jalapeño donde muestra ubicación y tamaño del pistilo



Figura 11. Plantas de chile adentro de la caja acústica

Cosecha

La cosecha se llevó a cabo el día 19/05/2022. Se realizaron los mismos análisis que cuando se aplicó el tratamiento, imágenes RGB, termográficas y mediciones de fitomonitor. Una vez realizadas las mediciones, se procedió a realizar el corte de chiles y después se obtuvo su peso fresco pesando sobre una báscula Rhino BARR9-01139, exactitud fina II, capacidad máxima 40 kg y resolución de 100 g con alimentación 6Vcc / 600 mA.

Las plantas se enumeraron por número de planta en la fila correspondiente, ejemplo: P1F2 = Planta 1 Fila 2. Tomando en cuenta que se usaron 4 filas y 16 plantas en cada fila.

Al realizar este paso se obtuvieron los siguientes datos:

Tratamientos de agua Corriendo

Tratamiento	# planta	Peso fresco kg	Peso seco kg	Peso total de cosecha kg
Agua Corriendo sin riego	P2 F1	4.248		1.520
	P4F1	4.378		
	P7F2	4.656	2.790	
	P8F2	4.226		
	P11F3	3.994	2.686	
	P14F4	3.816		
	P15 F4	4.880	2.676	
Agua corriendo con riego	P3F4	4.070		1.680
	P8F9	5.035		

	P15F3	4.490		
	P14F3	4.690	2.712	
	P14F1	4.065		
	P8F4	3.986	2.832	
	P1F2	4.215	2.836	
Ruido blanco	P1F1	4.850	2.856	1.384
	P16F1	4.420		
	P4F4	3.944		
	P14F2	4.846		
	P1F3	4.156		
	P8F3	4.150		
	P10F2	3.918		
Control	P15F1	3.700	2.394	1.704
	P2F3	3.884	2.682	
	P5F4	4.895		
	P13F1	4.455		
	P2F4	4.040	2.766	
	P12F2	4.085		
	P9F3	4.325	2.706	

Tabla 6. Datos de cosecha de tratamiento de agua corriendo. El peso total de cosecha hace referencia a peso del total de chiles jalapeños en kg

Tratamientos abejorro

Tratamiento	# Planta	Peso fresco	Peso seco	Peso total de Cosecha
Polinización	P3F1	4.460	2.818	1.562
	P5F1	4.476		
	P15F2	4.148	2.754	
	P6F3	4.130		
	P10F3	3.892		
	P13F4	4.032	2.700	
	P1F4	4.004		
Vuelo y Polinización	P7F1	3.970		1.892
	P12F1	4.038	2.704	
	P16F3	3.684	2.690	
	P4F3	3.924		
	P2F2	4.498		
	P7F4	4.214		
	P11F4	3.980	2.708	
Vuelo	P10F1	4.064		1.702
	P3F2	4.166		
	P13F2	4.630	2.932	
	P12F3	3.876	2.688	
	P6F4	4.650	2.798	
	P9F4	3.706		
	P5F3	3.982		
Ruido Blanco	P6F1	4.004	2.624	1.586
	P11F1	4.104		
	P5F2	4.888	2.778	
	P16F2	3.748		

	P3F3	4.186	2.894	
	P13F3	4.190		
	P10F4	3.978		
Control	P8F1	4.098		2.098
	P9F1	4.296	2.790	
	P4F2	4.910	2.862	
	P6F2	4.512		
	P9F2	4.192	2.744	
	P7F3	4.226		
	P12F4	4.098		

Tabla 7. Datos de cosecha de tratamiento de abejorro. El peso total de cosecha hace referencia a peso del total de chiles jalapeños en kg

Etapas 7. Análisis

Determinación de Azúcares totales

Para el análisis de azúcares totales del pistilo se utilizó el método de Antrona en el laboratorio de Bioingeniería del Campus Amazcala, Ingeniería UAQ.

Se tomaron 7 muestras de pistilos deshidratados por cada tratamiento, los cuáles se sometieron a la siguiente metodología, dentro de la metodología se ajustó el volumen de cada reactivo al peso de cada muestra, ya que fueron distintas. El proceso de la determinación por el método de Antrona se encuentra en el Anexo I.

Determinación de Prolina

Principio

Prolina + Ninhidrina → Complejo

La concentración de prolina se determina espectrofotométricamente (λ_{510nm}) por la reacción de prolina con ninhidrina formando un producto color amarillo que puede ser detectado a 510 nm. La metodología se encuentra en el Anexo I.

Determinación enzimática

Se realizaron análisis enzimáticos de SOD (superóxido dismutasa) y POD (peroxidasa), dentro del laboratorio de la Facultad de Ingeniería, Campus Amazcala, UAQ.

Peroxidasa (POD)

Principio

La actividad POD se determina espectrofotométricamente a 25°C con un espectrómetro UV-visible a 436 a 470 nm usando guayacol como sustrato y H₂O₂ como donante de hidrógeno fue determinada por el procedimiento descrito por (Kumar, 2021; Padró et al., 2021; Ramirez, 2009) con unas modificaciones. La metodología se encuentra en el Anexo I.

Superóxido dismutasa (SOD)

Principio



La actividad de superóxido dismutasa (SOD) se determina espectrofotométricamente (λ_{560nm}) por la inhibición de la reducción de nitroazul de tetrazolio (por sus siglas en inglés NBT). La metodología se encuentra en el Anexo I.

Tabla 8.

Finalmente se realizó una cuantificación de proteínas para confirmar la actividad enzimática, la cual se llevó a cabo bajo la siguiente metodología del Método de Bradford que se encuentra en el Anexo I.

Nota: se realizó una dilución 1:10

Cuantificación de Capsaicina

Se determinó la cantidad de capsaicina total presente en chiles mediante espectrofotometría. La metodología se encuentra en el Anexo I.

VI. Resultados y Discusión

Dentro de la experimentación con el sonido de abejorro, la hipótesis sostiene que la cantidad de carbohidratos totales aumenta con el estímulo del sonido de abejorro, A continuación, se muestran los datos promedio obtenidos del análisis de azúcares totales por triplicado:

Tratamiento	Día de tratamiento	Carbohidratos totales mg/g	Carbohidratos totales %
Polinización	1	184.7448	19.0683
Vuelo	1	176.4902	18.4220
Vuelo y Polinización	1	200.6819	20.9383
Ruido Blanco	1	212.0983	22.0650
Control	1	179.5377	18.7023
Polinización	4	235.6376	24.8670
Vuelo	4	257.8666	27.8323
Vuelo y Polinización	4	219.7939	23.4720
Ruido Blanco	4	198.2189	28.4753
Control	4	254.3569	26.6093
Polinización	7	234.4359	24.6663
Vuelo	7	123.9220	17.6500
Vuelo y Polinización	7	204.3415	21.4577
Ruido Blanco	7	141.2387	19.9157
Control	7	186.5082	19.6013

Tabla 9. Resultados de análisis de cantidad de azúcares totales

Estos datos se analizaron para obtener los resultados de la cantidad de azúcares totales expresados en los pistilos de las flores de chile jalapeño.

Se realizó un análisis de datos con el programa JMP realizando un ANOVA de una vía y prueba tukey en el programa JMP lo cual arrojó la siguiente información:

Día 1 de tratamiento:

Los cortes de los pistilos se realizaron después de la excitación física del sonido, el gráfico nos muestra que el grupo Ruido Blanco y V y P obtuvieron una mayor concentración de carbohidratos totales, seguido del grupo Polinización. El grupo control y vuelo obtuvieron los índices más bajos, indicando que la planta responde al sonido después de excitarla 1 vez por 20 minutos a 80dB en un horario de 18:55 hrs a 21:04 hrs. Se realizó un análisis ANOVA y un Tukey de 1 vía con Alpha: 0.05 y p: 0.0509 (Gráfica 1).

Día 4 de tratamiento

Las plantas se sometieron a tratamiento acústico en un horario de 13:00 – 15:00 hrs, arrojando los siguientes resultados:

Los gráficos indican que después de exponer 20 minutos, 4 días consecutivos al tratamiento acústico a las flores de chile jalapeño con 1 día de antesis, el grupo con mayor cantidad de carbohidratos totales fue el grupo Ruido Blanco, seguido del grupo Vuelo teniendo una diferencia mínima de concentración. En 3er sitio se encuentra el grupo control, seguido del grupo Polinización, quedando con menor concentración el grupo Vuelo y Polinización. Indicando que la planta reacciona distinto que el 1er día de tratamientos, obteniendo una mayor concentración de azúcares al ser estimulada por el sonido. Se realizó un análisis ANOVA y un Tukey de 1 vía con Alpha: 0.05 y p: 0.0483 (Gráfica 1).

Día 7 de tratamiento

Después de 7 días de exposición al sonido, se realizó un análisis ANOVA y un Tukey de 1 vía con Alpha: 0.05 y p: 0.0029 (Gráfica 1) arroja los siguientes resultados (Gráfica 1):

Esos resultados son aún más confiables, tienen mayor significancia, debido a que hay un p: 0.0029, que nos indica mayor diferencia en los datos por tratamiento en comparación a la p del día 1 y 4.

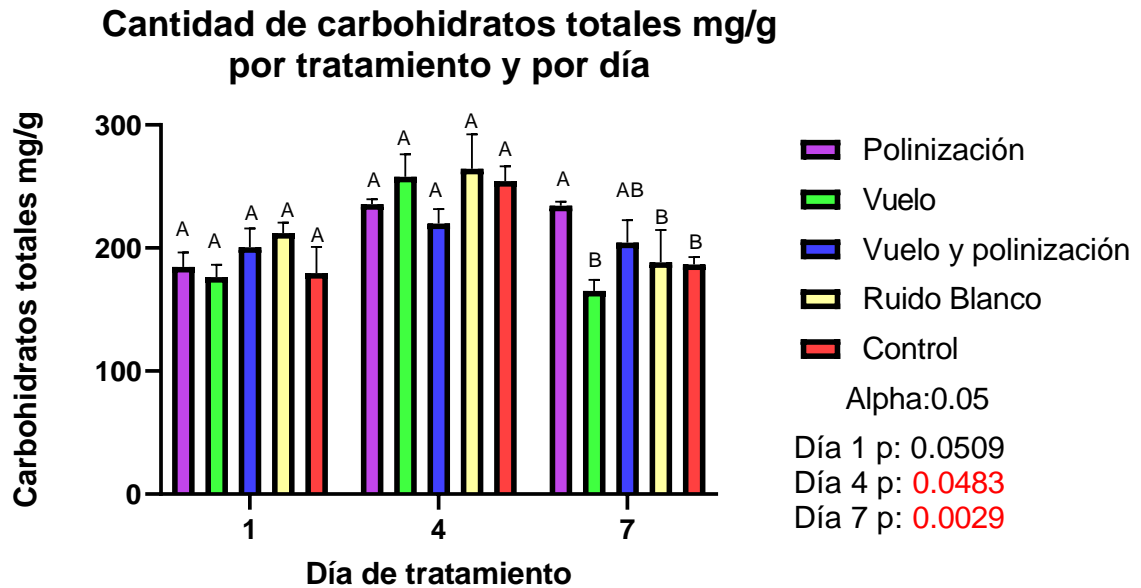
Se contempla que el grupo polinización aumentó drásticamente su concentración de azúcares totales en comparación a días anteriores y a otros tratamientos, demostrando que el sonido de polinización aumenta la cantidad de azúcares totales después de 7 días de exposición por 20 minutos diarios a 80 dB en horarios aleatorios. A pesar de que en los primeros días no exista un aumento significativo, esto probablemente indica que la planta reacciona al sonido de un abejorro polinizando en un tiempo continuo de exposición.

En 2do sitio se encuentra el grupo Vuelo y Polinización, el cual, ayuda a mantener una concentración constante de azúcares totales del día 4 al día 7 de estímulo.

El grupo de Ruido Blanco decreció su concentración de azúcares totales en la planta, del día 1 al 7, advirtiendo que, probablemente, el Ruido Blanco no es un sonido que pueda ser usado por un rango largo de tiempo ya que no favorece la concentración de azúcares totales

El grupo de Vuelo solo aumentó la concentración de azúcares totales el 1er día de tratamiento, disminuyendo del día 4 al 7 su concentración, indicando que es un sonido que no favorece la concentración de azúcares totales al ser expuesta de forma continua en la planta.

El grupo control del día 1 al día 4 aumentó su cantidad de azúcares totales sin embargo del día 4 al 7 disminuyó su concentración en comparación a los grupos con sonido.



Gráfica 1. Cantidad de carbohidratos totales mg/g comportamiento por día y por tratamiento

El Grupo Polinización incrementó sus niveles de concentración de azúcares totales del día 1 al 4 y del día 4 al 7 bajó ligeramente, sin embargo, en comparación con otros tratamientos el día 7, este grupo obtuvo una mayor concentración de azúcares totales.

El grupo Vuelo muestra un incremento de contenido de azúcares totales del día 1 al 4 sin embargo del día 4 al 7 decrece, probablemente, en un gran porcentaje su concentración. Indicando que no es un tratamiento apto para aplicación constante a más de 4 días.

El grupo Vuelo y Polinización se convierte en un tratamiento más viable para aplicación constante, del día 1 al 4 aumenta su concentración de azúcares totales y del día 4 al 7 decrece mínimamente, en comparación con otros tratamientos, el día 7 este tratamiento ocupa el 2do lugar en concentración de azúcares, siendo así el

2do tratamiento viable para aumentar la cantidad de azúcares totales en el néctar del pistilo de la flor de chile jalapeño.

El grupo de Ruido Blanco a pesar de haber sido el grupo con mayor concentración de azúcares totales el día 1 y el 4 en comparación a los demás tratamientos, de forma lineal se puede observar que incrementó su concentración del día 1 al 4, pero disminuyó de forma significativa al día 7, haciendo, probablemente, a este un sonido no viable para la aplicación continua.

Por último, el grupo control muestra que del día 1 al 4 aumenta su cantidad de azúcares totales, pero del 4 al 7 disminuye.

Estos datos demuestran que el sonido del abejorro influye en el aumento de la concentración de carbohidratos totales en el chile jalapeño, en comparación a tratamientos control como Ruido Blanco y sin exposición de sonido. Infiriendo así que las plantas se adaptan más al sonido de polinización del abejorro, logrando un aumento en concentración de carbohidratos totales y sobre todo en que se puede usar como un tratamiento continuo, haciendo creer a la planta que está siendo polinizada. Lo anterior sugiere algunos estudios que han demostrado que las flores segregan mayor cantidad de azúcares totales en el néctar mientras haya una mayor cantidad de eventos de polinización (Palareti et al., 2016). Así mismo en comparación con el trabajo “Flowers respond to pollinator sound within minutes by increasing néctar sugar concentration” (Veits et al., 2019), se confirmó que el sonido de un polinizador incrementa la cantidad de carbohidratos totales, en el estudio de Veits se utilizó el sonido de una abeja y un sonido sintetizado con las frecuencias de la abeja, el sonido de la abeja se grabó sosteniéndola de las patas, sin embargo en la investigación actual se usó el sonido del abejorro polinizando y volando alrededor de una flor, no sometiendo a la abeja a algún tipo de estrés, ambos sonidos tuvieron un efecto positivo en la producción de azúcares totales.

En la actualidad, basado en la revisión de literatura realizada, solo se cuenta con el artículo de Veits para poder comparar los resultados obtenidos en este estudio.

El rango de frecuencias (Hz) de cada sonido se muestra a continuación:

Vuelo: 88.47 Hz - 731.2 Hz

Polinización: 82.69 Hz - 215.7 Hz

Vuelo y Polinización: 97.4 Hz - 369.5 Hz

Resultados enzimáticos tratamiento de agua corriendo

SOD

Como se ha descubierto, el aumento de las SOD habla de la generación de resistencia al estrés hídrico, aumentando la cantidad de SOD en la planta, es decir, al tener producción de SOD se genera resistencia al estrés hídrico.

Los datos arrojados de los análisis fueron sometidos a un ANOVA de una vía en el programa JMP, con un Alpha de 0.05, dichos datos arrojaron que en el caso de esta investigación hubo una disminución de SOD del día inicial al día final del tratamiento ya que, probablemente, el sonido pudo evitar que el mecanismo de defensa al estrés hídrico se activara, y evitar la producción de ROS y por ende de enzimas. Ya que el sonido del agua hizo sentir a la planta en un ambiente sin estrés hídrico. Esto al exponer a la planta de chile jalapeño por 7 días al sonido de agua corriendo durante 20 minutos a 80dB en horarios al azar.

Las plantas con riego que fueron expuestas al sonido del agua corriendo obtuvieron una mayor cantidad de SOD que el grupo que no fue regado, esto deja en discusión si las plantas expresaron estrés por exceso de agua.

En comparación con el estudio "Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field

conditions” (Chopra . & Selote D., 2007) que durante el estrés hídrico leve y severo, se observó un aumento significativo en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, en hojas Moti aclimatadas, del mismo modo, las hojas aclimatadas de C306 mostraron una mayor actividad de SOD. Demostrando que el SOD aumenta durante el estrés hídrico. Y en el caso del chile jalapeño con estrés hídrico y tratamiento acústico disminuyó la cantidad.

“Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum*” demuestra que la exposición al estrés acústico genera un aumento en la cantidad de SOD en hoja, tallo y raíz. Después del tratamiento con la onda de sonido (1000 Hz a 100dB por 60 minutos), las actividades de SOD en las hojas y los tallos aumentaron rápidamente y alcanzaron el valor máximo en el día 9, mientras que en las raíces aumentaron lentamente en 6 días y luego aumentaron bruscamente para alcanzar el máximo en el día 12. Las actividades de la SOD en las hojas, los tallos y las raíces aumentaron en promedio un 26,5%, un 17,3% y un 31,2%, respectivamente, en comparación con el grupo de control, y la influencia más destacada se dio en las raíces (Li et al., 2008). Respuesta contraria al estímulo del tratamiento de agua corriendo. Posiblemente los patrones acústicos en frecuencias y a alrededor de 1000 Hz generan mayor actividad de SOD, aunque también la cantidad de decibeles y el tiempo que se aplicaron son mayores.

A continuación, se muestran los resultados y gráficas de la cuantificación de SOD por promedio de la medición por tratamiento.

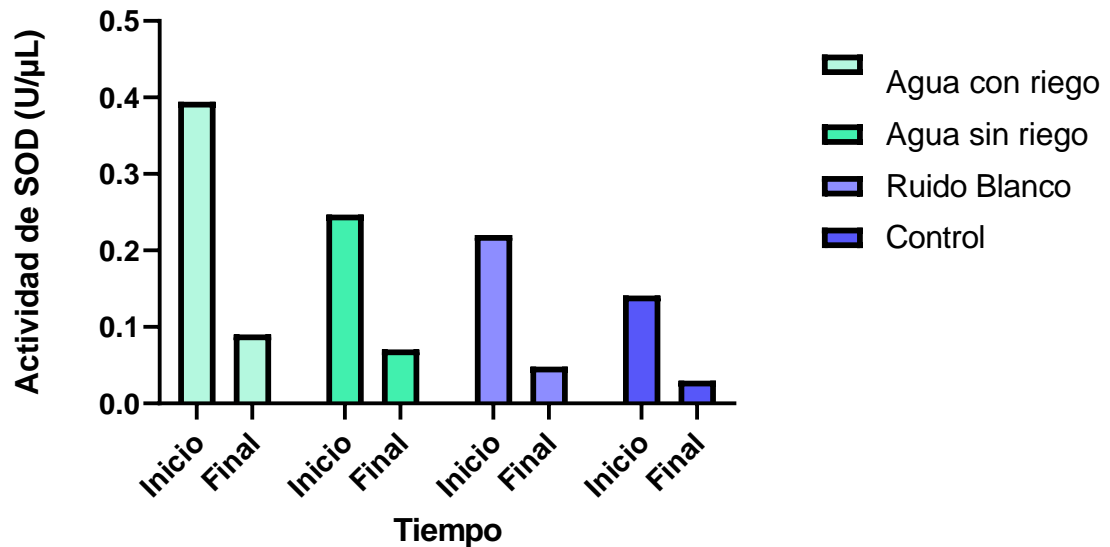
Tratamiento	Actividad de SOD (U/ μ L)
Agua con riego - Inicial	0.3944044677
Agua con riego - Final	0.09010433116
Agua sin riego - Inicial	0.2469793851
Agua sin riego - Final	0.07047625051
Ruido blanco - Inicial	0.2200961949

Ruido Blanco - Final	0.04810889806
Control - Inicial	0.1411117719
Control – Final	0.02964696493

Tabla 10. Datos finales de actividad de SOD

Los datos que se muestran en la siguiente gráfica indican una comparación del día inicial con el día final del tratamiento acústico de agua corriendo los cuales se realizaron con el promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto, al parecer los tratamientos acústicos hacen “creer” a la planta que tiene agua y por lo tanto la actividad enzimática SOD disminuye, es una posibilidad, lo cual genera nuevas preguntas de investigación, siendo una gráfica descriptiva, puede sugerir, no concluir:

Actividad de SOD (U/ μ L) entratamietos de Agua Corriendo



Gráfica 2. Comparativo día 1 con día 7 en concentración de SOD, alpha: 0.05, los datos son un promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto.

En conclusión, se sugiere que el sonido de agua corriendo no activa los mecanismos de defensa de estrés hídrico y en consecuencia la generación de SOD, por lo tanto, al menos en esta actividad enzimática no genera una resistencia al estrés hídrico, ya que a las plantas de chile jalapeño se les interrumpió el riego por 8 días.

POD

Está relacionado con la eliminación de especies de peróxido de hidrógeno y la protección de la membrana celular durante lesiones mecánicas, es decir, realizan una función de defensa y resistencia al estrés, el cual se ve referido en el tiempo como se muestra en las siguientes gráficas:

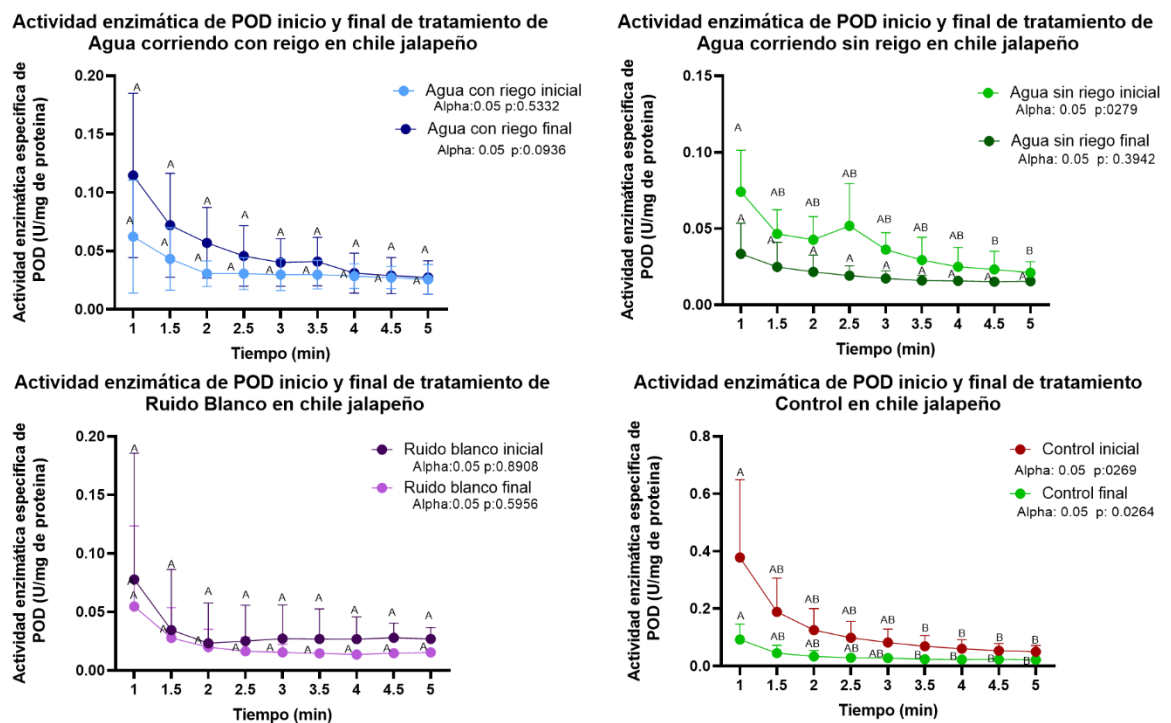
La actividad de POD en el chile jalapeño que fue expuesta al sonido de Agua corriendo con riego normal, en comparación con el inicio y el final del tratamiento acústicos muestra un incremento en su actividad (Gráfica 4), generando así la conclusión de que el sonido de agua corriendo estresa a la planta dejando en el tintero la hipótesis de haber generado un estrés por exceso de agua.

A los datos obtenidos se les realizó un análisis ANOVA de una vía y Tukey en el programa JMP, obteniendo las siguientes valores de p: Agua con riego inicial con los siguientes valores de p: 0.5332 - Agua con riego final p: 0.0936.

Las plantas del grupo de chile jalapeño sin riego con tratamiento acústico muestra una disminución de POD del día inicial al día final del tratamiento (Gráfica 3), demostrando que el sonido ayudó a no activar los mecanismos de defensa al estrés hídrico al no aumentar la actividad de POD a pesar de la falta de agua, sino por el contrario hubo una disminución en la actividad, con solo 20 minutos de exposición acústica diaria por 7 días a 80 dB.

A los datos obtenidos se les realizó un análisis ANOVA y Tukey en el programa JMP, con un Alpha de 0.05 y los valores de p por tratamiento se observan en la gráfica 3.

El grupo que estuvo expuesto al Ruido Blanco muestra una disminución en la actividad de POD del día de inicio al final (Gráfica 3), lo cual demuestra que el exponer a plantas de chile jalapeño al ruido blanco por 7 días a 80dB durante 20 minutos baja la actividad de POD, haciendo mención que las plantas tuvieron un riego normal. A pesar de ser menor su actividad de inicio a final, no es tan significativa como la del tratamiento de agua corriendo sin riego.



Gráfica 3. Comparativa de actividad enzimática de POD en grupo Agua con riego, Agua sin Riego, Ruido Blanco y Control, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto.

A los datos obtenidos se les realizó un análisis ANOVA y Tukey en el programa JMP, obteniendo las siguientes valores de p: Ruido Blanco inicial p: 0.8908 Ruido Blanco final p: 0.5956, y un Alpha de 0.05.

En cuanto al grupo control sin tratamiento acústico y con riego normal, muestra un descenso de la actividad de POD del inicio al final del tratamiento (Gráfica 3).

A los datos obtenidos se les realizó un análisis ANOVA y Tukey en el programa JMP, obteniendo los siguientes valores de p: Control p: 0.0269 Control p: 0.0264.

El estudio “Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum*” que expuso a la *Dendrobium Canpddidum* a una frecuencia de 1000 Hz a 100 dB por 1 hora durante 3, 6, 9, 12 y 15 días demostró que la actividad de la POD fue la más alta en las raíces, la segunda en los tallos y la más baja en las hojas. La actividad de la POD aumentó rápidamente cuando se trató con el estrés de las ondas sonoras y alcanzó el valor más alto en el día 9 en las hojas y las raíces, mientras que en el día 12 en los tallos. Las actividades de la POD en las hojas, los tallos y las raíces estimuladas por la onda sonora aumentaron en promedio un 26,8%, un 7,9% y un 7,7% respectivamente en comparación con el control. El cambio de la actividad POD en las hojas fue el más significativo a la estimulación. En comparación los 1000 Hz al sonido de agua corriendo, este último ayuda a disminuir la actividad de POD en condiciones de estrés hídrico.

PROLINA

Cuando la planta es sometida a estrés hídrico, la prolina aumenta, pero al llegar a su punto máximo, esta disminuye y esta disminución nos indica que hay una resistencia al estrés hídrico, debido a que probablemente las enzimas antioxidantes se activaron como POD y SOD.

El papel fisiológico de la acumulación de prolina aún no ha sido completamente determinado, sin embargo, se sabe que aparte de actuar como un “osmorregulador”, la acumulación de prolina tiene otras funciones celulares importantes. La prolina puede actuar como una fuente de N en la célula bajo condiciones de estrés, donde

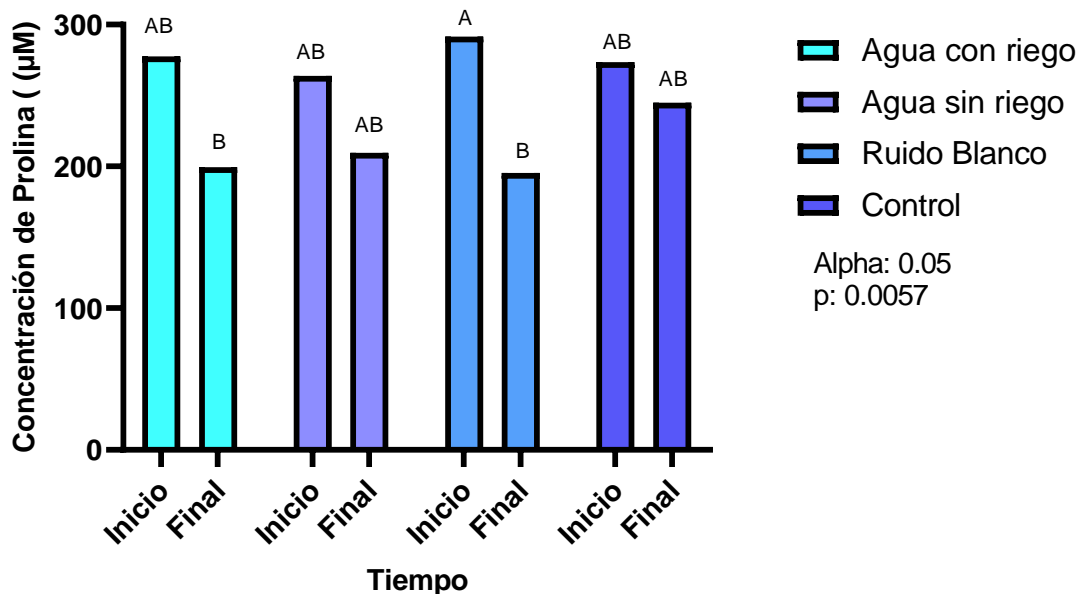
la acumulación de este compuesto nitrogenado pudiera ser utilizada como una forma de N almacenado (Colla et al., 2011).

Estos fueron los resultados de prolina en plantas de chile jalapeño al ser sometidas al tratamiento acústico de agua corriendo, los cuales fueron sometidos a un análisis ANOVA de una vía y Tukey en el programa JMP, con una p: 0.0057 y alpha de 0.05

Concentración de Prolina (μM)		
Tratamiento	Inicio	Final
Agua con riego	277.6709677	199.488172
Agua sin riego	263.7763441	209.516129
Ruido blanco	291.5462366	195.4344086
Control	273.6064516	245.0172043

Tabla 11. Concentración inicial y final de Prolina.

Concentración de prolina en tratamientos de Agua Corriendo en *Capsicum Annuum* L.



Gráfica 4. Comparativa de Prolina al inicio y final de cada tratamiento de agua corriendo, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto

Los datos iniciales nos indican el estado de la prolina después del 1er día de tratamiento de agua corriendo, los datos finales nos indican cómo se encontraba la planta en el día 7, se observó una disminución en la cantidad de prolina, lo cual indica que probablemente se generó resistencia al estrés hídrico en comparación al control al ser estimuladas con el sonido de agua corriendo.

Con lo cual se genera la suposición de que el patrón acústico hace creer a la planta que se encuentra en un espacio sin estrés hídrico.

En comparación con el estudio “Drought Induced Changes in Growth, Osmolyte Accumulation and Antioxidant Metabolism of Three Maize Hybrids” (Anjum et al., 2017) que trabajó con diversos tipos de maíz híbrido en diversas condiciones de estrés hídrico (100, 80, 60, 40 % de la capacidad de campo) menciona tener un aumento significativo en la cantidad de prolina en plantas la cuál iba en aumento dependiendo de la falta de agua de cada grupo. Podemos notar que el uso del sonido como elicitador físico ayudó a bajar los niveles de prolina a pesar de la falta de agua, caso contrario al trabajo de Anjum et al.

Así mismo investigaciones como Alexieva et al., (2001) y Yamada et al., (2005) observaron acumulación de prolina en cultivos de guisantes y petunias (*Petunia hybrida*), respectivamente bajo condiciones de sequía.

CAPSAICINA

La capsaicina es un compuesto que se encuentra de manera natural en los frutos, aunque en distintas proporciones. Así, el contenido de capsaicina en el chile suele variar entre 0,1 hasta 1% en peso (Cedrón, 2013).

Para la determinación de las gráficas se usaron los siguientes datos obtenidos de la cuantificación de capsaicina al mezclar las muestras de cada uno de los individuos por tratamiento:

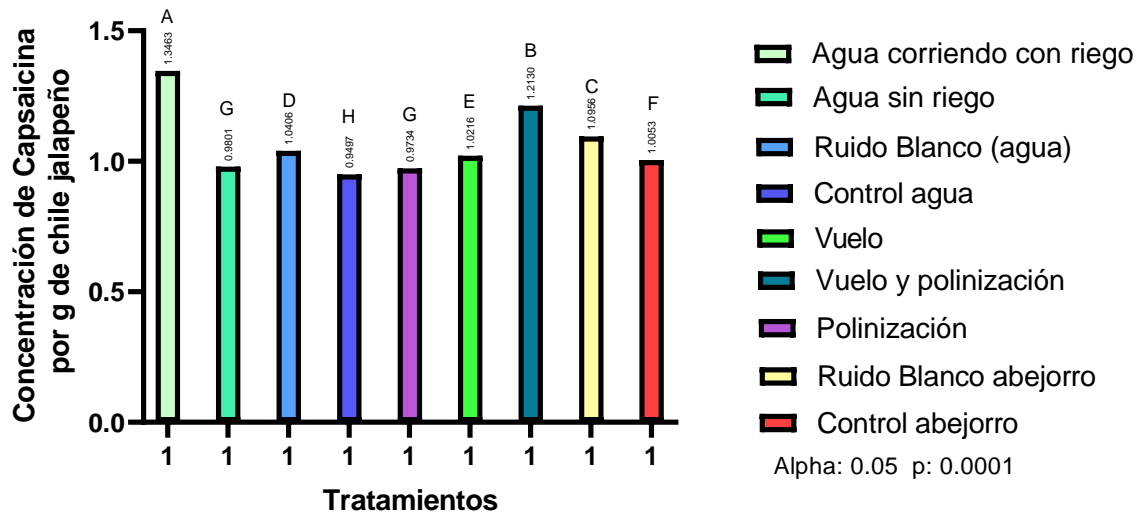
Numero de tratamiento	de Tratamiento	Capsaicina por 1 gr de chile seco
1	Agua corriendo con riego	1.346267287
2	Agua corriendo sin riego	0.980132981
3	Ruido Blanco agua corriendo	1.040578824
4	Control agua corriendo	0.949727994
5	Polinización	0.973396547
6	Vuelo	1.021643981
7	Vuelo y Polinización	1.212995128
8	Ruido Blanco abeja	1.095562693
9	Control abeja	1.00525806

Tabla 12. Concentración de Capsaicina, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto por g de chile seco de todos los tratamientos.

La Gráfica 10 nos muestra la cantidad de Capsaicina en todos los tratamientos evaluados en esta investigación, adelante se desglosa por tratamientos para tener una mayor claridad de los resultados, se hizo un análisis ANOVA de una vía y Tukey en el programa JMP con los siguientes valores de p: 0.0001 y Alpha: 0.05.

De acuerdo con la Gráfica 6 todos valores de cantidad de capsaicina se encuentran en el punto más alto que va del mínimo 0.949727994 al máximo 1.346267287.

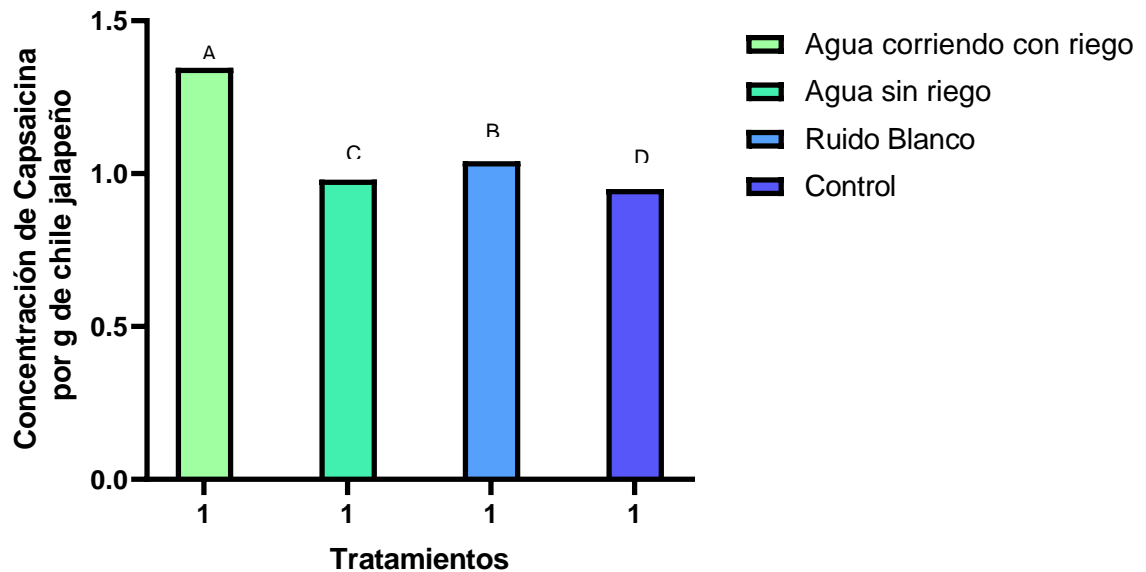
Concentración de Capsaicina por g de chile seco de todos los tratamientos



Gráfica 5. Capsaicina por g de chile seco frente a tratamiento de Agua Corriendo y de Abejorro.

La concentración de Capsaicina por g de muestra (Gráfica 5) en tratamientos de agua corriendo muestra que el tratamiento de agua corriendo con riego tiene una mayor cantidad de capsaicina con un (1.346267287), seguido del tratamiento de Ruido Blanco (1.040578824), Agua corriendo sin riego (0.980132981) y por último el grupo control (0.949727994). Se obtuvo una diferencia de un 29.45% entre el tratamiento de Agua Corriendo con riego con el grupo control, con lo cual podemos sugerir que al someter a una planta de chile jalapeño con riego normal al sonido de agua corriendo antes de floración por 20 minutos a 80 dB por 7 días, aumenta la cantidad de capsaicina en comparación con el grupo control.

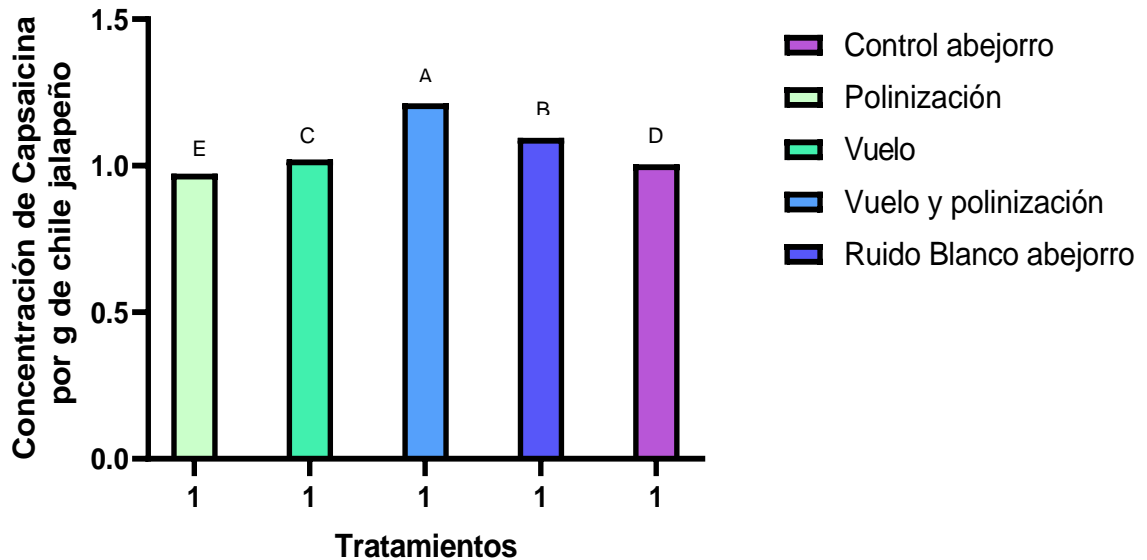
Concentración de Capsaicina por g de chile seco de todos los tratamientos de Agua Corriendo



Gráfica 6. Capsaicina, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto por g de chile seco frente a tratamiento de Agua Corriendo, Alpha: 0.05 y p: 0.0001.

La concentración de Capsaicina por g de muestra (Gráfica 6) en tratamientos de abejorro muestra que el grupo Vuelo y Polinización muestra un aumento superior en comparación con otros tratamientos, generando un 19.75 % de diferencia entre el grupo de Polinización que fue el más bajo y en comparación al grupo control generó una diferencia del 17.12%. Estos resultados sugieren que el uso del sonido de Vuelo y polinización aumenta la cantidad de capsaicina en el chile jalapeño estimulándola en etapa de floración por 20 minutos a 80 dB durante 7 días.

Concentración de Capsaicina por g de chile seco en tratamientos de abejorro



Gráfica 7. Capsaicina, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto por g de chile seco frente a tratamiento de Abejorro. Alpha: 0.05 y p:0.0001.

RENDIMIENTO

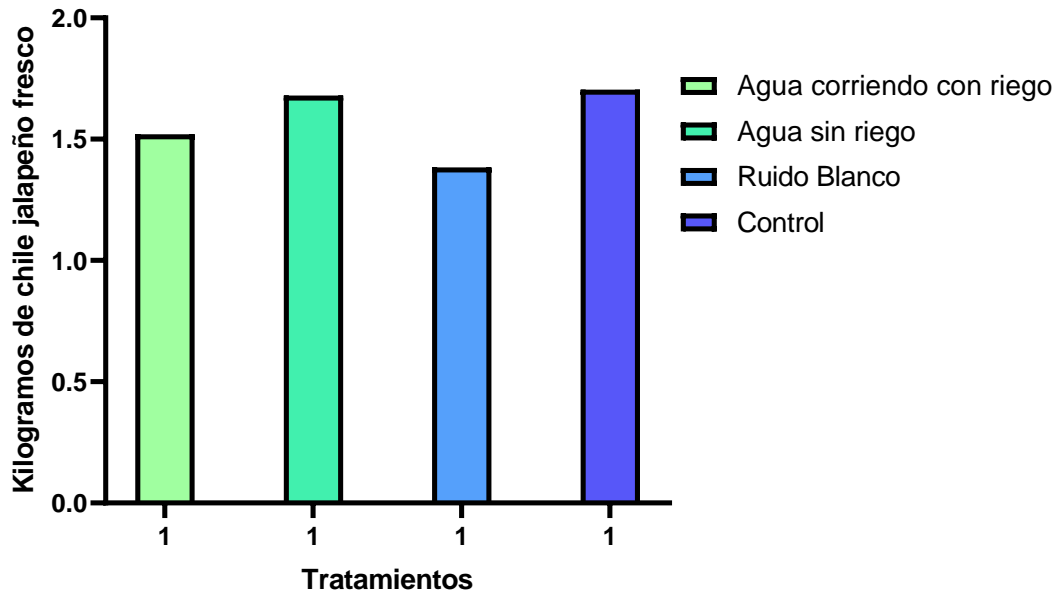
Al realizar la cosecha se pesó en kilogramos la cantidad de fruto por tiramiento, donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Tratamiento	Rendimiento kg
Agua corriendo sin riego	1.520
Agua corriendo con riego	1.68
Ruido blanco	1.384
Control	1.704

Tabla 13. Rendimiento de tratamientos de agua corriendo, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto

Con lo cual obtenemos la siguiente gráfica:

Rendimiento en tratamientos de Agua Corriendo



Gráfica 8. Rendimiento de tratamiento de agua corriendo , promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto

Se logra observar que el grupo control obtuvo un mayor rendimiento con 1.704 kg, sin embargo, se esperaría que la diferencia con el tratamiento de agua corriendo sin riego fuera significativa por el estrés hídrico al cual se expuso este grupo, haciendo solo una diferencia de 0.184 kg (10.79%) lo cual sugiere que el tratamiento acústico ayuda a tener un buen rendimiento a pesar de la falta de agua.

El grupo de agua corriendo con riego solo tiene una diferencia de 0.024 kg, esto indica que probablemente el sonido de agua corriendo no afecta el rendimiento.

El grupo de Ruido blanco obtuvo el menor rendimiento con 1.384 kg con 0.320 kg de diferencia con el grupo control.

En conclusión, esto indica que el sonido de agua corriendo probablemente apoya el rendimiento del chile jalapeño con estrés hídrico y que no afecta al mismo exponiendo a la planta por 20 minutos a 80 dB en horarios esparcidos a lo largo del día por 7 días.

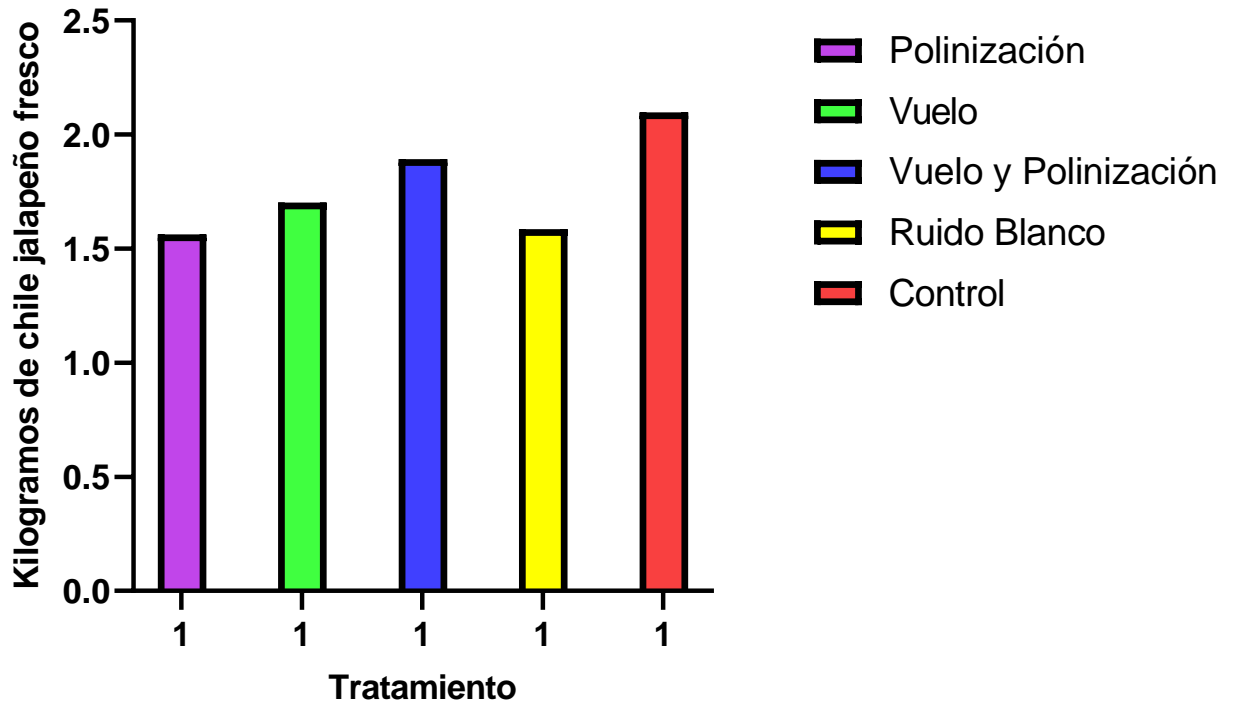
Rendimiento tratamiento de Abejorro

El rendimiento de los tratamientos de abejorro se tomó a partir de la cantidad de kg de fruto cortado, sin embargo, dentro del invernadero no se contaba con la polinización de abejorros, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Rendimiento tratamiento de abejorro	
Tratamiento	Rendimiento
Polinización	1.562
Vuelo	1.702
Vuelo y Polinización	1.892
Ruido Blanco	1.586
Control	2.098

Tabla 14. Rendimiento de tratamientos de abejorro, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto

Rendimiento en kg de tratamientos de Abejorro



Gráfica 9. Rendimiento de tratamiento de abejorro, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto.

El mayor rendimiento lo obtuvo el grupo control con 2.098 kg, seguido del grupo de Vuelo y polinización con 1.892, en 3er sitio se encuentra el grupo de vuelo con 1.702 kg, seguido del grupo de ruido blanco y polinización, con solo 0.024 kg de diferencia.

Estos resultados indican que el grupo que no fue afectado por sonido obtuvo un mayor rendimiento, sin embargo, el grupo control obtuvo una menor cantidad de carbohidratos totales comparado con el grupo Polinización, Vuelo y Vuelo y Polinización. Lo cual deja en el tintero una futura investigación de si el abejorro es capaz de identificar plantas con mayor cantidad de carbohidratos totales generados por el sonido de polinización y así aumentar el rendimiento del cultivo.

Análisis fisiológico

Fotosíntesis

Proceso en el cual la energía de la luz se convierte en energía química en forma de azúcares. En un proceso impulsado por la energía de la luz, se crean moléculas de glucosa (y otros azúcares) a partir de agua y dióxido de carbono, mientras que se libera oxígeno como subproducto.

En las gráficas 30 y 31 podemos observar el comportamiento fotosintético de las plantas de chile jalapeño que se sometieron a tratamiento acústico de sonido de Agua, se observa que los grupos de agua con riego y Agua sin riego fueron los que mantuvieron una actividad fotosintética en comparación con los otros dos tratamientos (Control y Ruido blanco).

El grupo control muestra una actividad menor en comparación de todos los tratamientos. Sugiriendo que el sonido de Agua Corriendo y Ruido Blanco estimulan la actividad de fotosíntesis en las plantas de chile jalapeño.

Estos fueron los datos arrojados del análisis de datos a los cuales se les realizó un ANOVA de una vía y Tukey:

DÍA 1			
Nivel	P:0.0341		Pn ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)
Agua sin riego	A		122.46148
Agua con riego	A	B	98.76847
Control	A	B	67.06318
Ruido Blanco		B	64.76952

Tabla 15. Datos del análisis del día 1 de fotosíntesis

DÍA 4		
Nivel	p:0.7722	Pn ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)
Agua sin riego	A	60.914218
Agua con riego	A	60.843691
Ruido Blanco	A	52.914452
Control	A	42.046799

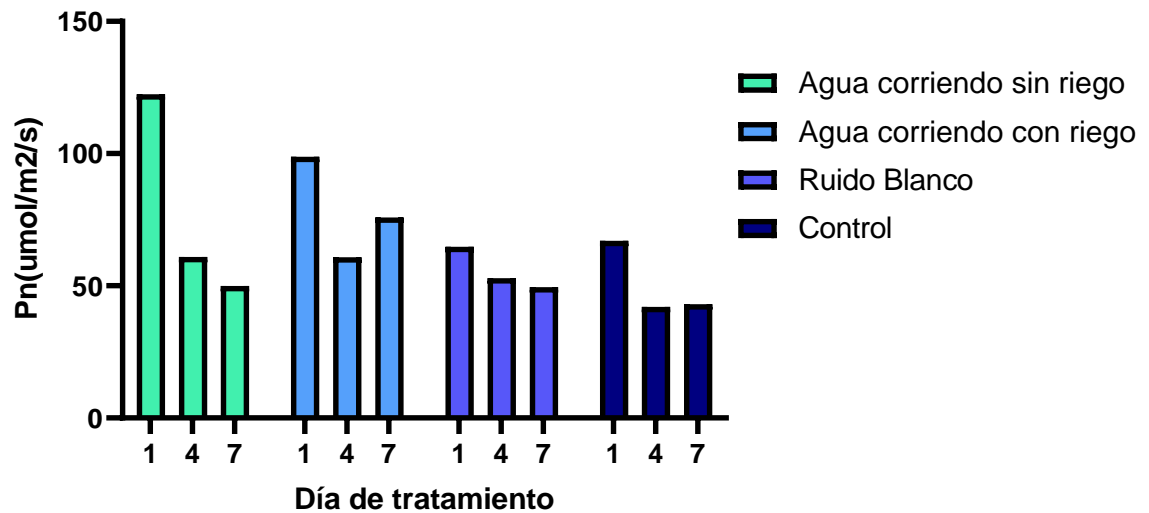
Tabla 16. Datos del análisis del día 4 de fotosíntesis

DÍA 7		
Nivel	P.0.0764	Pn ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)
Agua con riego	A	75.853221
Agua sin riego	A	49.995912
Ruido Blanco	A	49.494128
Control	A	43.043939

Tabla 17. Datos del análisis del día 7 de fotosíntesis

Tabla 18.

Comportamiento de Fotosíntesis en tratamientos de Agua



Gráfica 10. Fotosíntesis por día de los grupos de tratamientos de Agua Corriendo, promedio de la medición de cada tratamiento en conjunto.

VII. Conclusiones

Esta investigación concluyó que el sonido de abejorro aumenta la cantidad de carbohidratos totales en flor de chile jalapeño, de una manera que podría aumentar las posibilidades de una polinización cruzada y que las flores pueden funcionar como órganos sensores de sonido. Las frecuencias utilizadas de una grabación de un abejorro polinizando podrían crearse de forma sintética y exponer a las flores a estas frecuencias para corroborar que son frecuencias específicas las que estimulan la producción de carbohidratos totales o si es necesario un sonido más “natural”.

Al comparar los resultados de esta investigación con lo de Veits “Flowers respond to pollinator sound within minutes by increasing nectar sugar concentration”, donde demuestra que el sonido de una abeja aumenta la cantidad de azúcares totales después de exponer 3 minutos a la flor *Oenothera drummondii*. Existe una similitud en el rango de frecuencias entre su tratamiento más eficaz de 50 a 1000 Hz a 95dB y el del tratamiento de Vuelo con un rango de 88.47 a 731.2 Hz a 80dB. Con la diferencia del tiempo, de 3 minutos a 20 minutos, dejando como posibilidad el estudio de la cantidad de tiempo que la planta puede ser expuesta al sonido, esto, dependiendo del objetivo de la investigación.

Los resultados hasta ahora obtenidos sugieren que es necesario realizar una investigación directamente en producción con polinización de abejorro *Bombus impatiens* y determinar si el abejorro detecta los Carbohidratos totales producidos con el sonido como elicitador físico y en consecuencia aumentar el rendimiento. Así mismo observar si el sonido del abejorro llega o no a afectar el comportamiento del animal polinizador.

Respecto al sonido de agua corriendo en aumento de rendimiento y resistencia al estrés hídrico, se determinó que el sonido no afecta el rendimiento en los grupos

sometidos al sonido de agua ya que, al ser grupos en estrés, se espera que su rendimiento sea mucho menor al del control. Se concluye que el sonido de agua corriendo se puede convertir en una técnica para que cultivos con estrés hídrico no disminuyan en gran porcentaje su producción y poder disminuir la cantidad de agua usada en la agricultura, creando una nueva línea de investigación con el objetivo de conocer qué porcentaje de agua se puede ahorrar al no regar y usar el sonido de agua como estímulo y determinar cuántos días podría soportar la planta sin agua sin afectar su producción. Así mismo se sugiere que el sonido puede aumentar la cantidad de Capsaicina en plantas de chile jalapeño con un riego normal dejando otra investigación posterior para determinar el aumento de capsaicina con el sonido y aportar a la industria farmacéutica.

El análisis enzimático y de prolina, concluyen que la planta probablemente no activa sus mecanismos de defensa al ser estimulada con el sonido de agua corriendo. La etapa que podría seguir después de esta investigación es ver hasta qué punto una planta puede estar sin agua con el tratamiento sonoro.

El análisis de las imágenes por NDVI1 soporta el hecho de que el uso de un elicitor físico como el sonido no afecta la salud de la planta.

El sonido como elicitor en la agricultura protegida se acerca a ser una opción real con fundamentación científica para su aplicación en producción.

Perspectivas

Dentro de la forma particular que tiene los abejorros de ver las flores, una futura investigación podría llevarse a cabo experimentando el color de las flores tratadas con sonido de abejorro, en comparación con otras que no con el objetivo de determinar su coloración y conocer su relación con la cantidad de azúcares totales disponibles para el polinizador.

Anexo I. Metodología de determinación de Carbohidratos totales, SOD, POD, Prolina y Capsaicina.

Método de Antrona

1. Objetivo: Determinación de la cantidad de azúcares totales en muestra de alimentos y mediante el método de Antrona
2. Alcance: Forrajes, alimentos procesados, residuos agroindustriales, etc.
3. Principio de la determinación: La Antrona reacciona con las pentosas, hexosas y sus derivados (azúcares reductores y no reductores), generando un producto coloreado, mientras que no lo hace con aminoazúcares, trisomas y tetrasas.

Los disacáridos son primeramente hidrolizados en azúcares simples por el medio ácido, los monosacáridos resultantes, como la glucosa, en medio ácido y a altas temperaturas son deshidratados a furfurales hidroximetilos. Este compuesto forma con la Antrona un producto de color azul – verde, con un máximo de absorción a 630 nm. La reacción se debe realizar en frío para evitar la caramelización.

4. Responsabilidades: es responsabilidad del analista portar el equipo de protección como bata, lentes, guantes de nitrilo y zapatos de seguridad. Es responsabilidad del encargado de laboratorio supervisar el desarrollo de la metodología y del resultado emitido.
5. Material: tubos de ensaye con tapón de rosca, pipetas graduadas de 5 ml, matraces aforados de 100 ml, micropipeta 100 – 1000 µl, puntas para micropipeta 1 ml y espátula
6. Equipo: Balanza analítica (BZ-2014-001), termobañero (Felisa), centrifugadora (CF-2015-001) Y ESPECTRÓMETRO UV-Vis (Genesys código)
7. Reactivos y soluciones
 - 7.1 Reactivos: Antrona (319899, sigma Aidrich o similar). Ácido sulfúrico al 96% (J T BAKER o similar), Ácido clorhídrico al 37.3% (9535-02 J T

Bkaer), Agua destilada (Ecopura o similar), estándar de glucosa (Hycel o similar) y carbonato de sodio anhidro (S2125-05, Jaimek o simila).

7.2 Soluciones:

7.2.1 Soluciones de Antrona 0.2%.

- Poner a enfriar 110 ml de H₂SO₄ al 96% (A2825-14, J T Baker) en un frasco ámbar con taparosca.
- Pesar 0.2 g de Antrona (319899) y colocarlos en matraz anforado de 100 ml . Agregar H₂SO₄ al 96% previamente para disolver y aforar.

NOTA: La solución debe ser preparada al momento y conservarse a 4°C al resguardo de la luz en un frasco ámbar.

7.2.2 HCl 2.5N

- Poner un poco de agua destilada (Ecopura) en un matraz volumétrico.
- Tomar 20.53 ml de HCl al 37% (9535-02) y colocarlos en el matraz volumétrico de 1000 ml y aforar con agua destilada.

7.2.3 Estándar de la glucosa 1 mg/ml

Pesar 1 g del estándar de glucosa, colocar en un matraz volumétrico de 1000 ml y aforar con agua destilada

8. Tratamiento previo de la muestra: la muestra se seca

9. Descripción de la técnica

9.1 Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración se debe realizar por triplicado cada vez que se prepare una nueva solución de Antrona. La curva de calibración no requiere de digestión previa.

Para cada punto de la curva de calibración se toman los ml descritos en la tabla 7 de la solución preparado del estándar de glucosa descrito en el punto 7.2.3. y se diluyen con agua destilada.

9.2 Determinación de carbohidratos totales

1. Pesar 100 mg de cada muestra previamente molida en tubos de ensaye con tapón de rosca (10 x 110) y anotarlo en la hoja de registro para la determinación de azúcares totales (REG-BR-006). Al mismo tiempo preparar un blanco de reacción
2. Para la hidrólisis, se coloca a cada tubo 5 ml de HCl 2.5N
3. Después se colocan a baño maría y se dejan enfriar a temperatura ambiente
4. Transcurrido el tiempo se saca el baño maría y se dejan enfriar a temperatura ambiente
5. Para neutralizar, a cada tubo se le agrega carbonato de sodio anhidro hasta que la efervescencia cese
6. Trasvasar el contenido de cada tubo de ensaye a matraces volumétricos de 100ml previamente identificados
7. Arrastrar el residuo de cada tubo con agua destilada hacia su correspondiente matraz volumétrico. Aforar cada matraz volumétrico con agua destilada, tapar y mezclar ligeramente
8. Tomar una alícuota de 15 ml de cada matraz volumétrico y colocarla en un tubo falcon previamente identificado
9. Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos. Ver instrucción de operación de la centrifuga (IOBR-004)
10. Colectar el sobrenadante de cada tubo falcon, tomar un alícuota de 1 ml y colocarla en un tubo de ensaye con tapón de rosca 10 x 110 identificado
11. Colocar los tubos de ensaye en un baño frío y agregar lentamente a cada uno 4 ml de la solución Antrona y mezclar cuidadosamente
12. Sacar los tubos del baño frío

13. Los tubos de ensaye se colocan en un baño maría a ebullición durante 8 minutos. Transcurrido el tiempo se saca del baño maría y se enfrían rápidamente
14. De cada tubo de ensaye se toma una alícuota y se coloca en una celda de cuarzo
15. Las muestras y la curva de calibración se leen a 630 nm en un periodo menor a 1 hora. Seguir la instrucción del espectrofotómetro UV/VIS (IO-BR-008)
16. De la curva de calibración se calcula la ecuación de la regresión lineal
17. El valor obtenido de la absorbancia de cada muestra, blancos y la curva de calibración se registran en la hoja de registro para la determinación de azúcares totales (REG-BR-006). Con la ecuación obtenida de la curva de calibración se calcula el valor de la concentración de azúcares totales en las muestras
18. Los valores obtenidos de la concentración de azúcares totales de cada muestra es revisado por el responsable del laboratorio, mismo que delibere al cliente.

Métodología de Prolina.

Determinación espectrofotométrica de prolina de acuerdo al método reportado por (Lee et al., 2018).

Condiciones

T = 100°C; pH_{ácido}; t = 60 min

Reactivos

- Ácido sulfosalicílico
- Ácido acético
- Ninhidrina
- Prolina

Preparación de Soluciones

1. *Solución de ácido sulfosalicílico al 1% (p/v)*. Disolver 1 g de ácido sulfosalicílico en 80 mL de agua destilada. Posteriormente, aforar a un volumen final de 100 mL.
2. *Solución de Ninhidrina (1.25% p/v)*. Disolver 1.25 g de ninhidrina en 80 mL de ácido acético. Posteriormente, aforar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.
3. *Solución Stock de prolina (200 μ M)*. Disolver 0.0023026 g de prolina en 60 mL de solución de ácido sulfosalicílico al 1% (p/v). Posteriormente, aforar a un volumen final de 100 mL con la misma solución.
4. *Extracto de la muestra*. Pesar 0.03 g de la muestra vegetal y realizar la extracción por homogeneización en 1 mL de solución de ácido sulfosalicílico (1% p/v).

Procedimiento Curva patrón

1. Pipetear de la solución Stock de prolina 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, y 100 μ L en tubos eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetados.
2. Añadir 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300, y 400 μ L de solución de ácido sulfosalicílico (1% p/v), respectivamente.
3. Agitar en vortex durante 10 segundos.
4. Añadir 600 μ L de la solución de ninhidrina.
5. Incubar en baño María a 100°C durante 60 min.
6. Colocar en hielo durante 10 min (para detener la reacción).

7. Dejar reposar 5 min a temperatura ambiente.
8. Medir la absorbancia a $\lambda_{510\text{nm}}$ (calibrando el espectrofotómetro con la solución de ácido sulfosalicílico (1% p/v).

Ensayo para determinación de prolina (microplaca)

1. En tubos eppendorf de 1.5 mL agregar 300 μL del extracto de la muestra y 600 μL de la solución de ninhidrina, previamente etiquetados.
2. Incubar en baño María a 100°C durante 60 min.
3. Colocar en hielo durante 10 min (para detener la reacción).
4. Dejar reposar 5 min a temperatura ambiente.
5. Colocar cada muestra determinada en una microplaca de 96 micropocitos de UV 300 μL de cada muestra a determinación de absorbancia.
6. Medir la absorbancia a $\lambda_{510\text{nm}}$ (calibrando el espectrofotómetro con la solución de ácido sulfosalicílico al 1% p/v).
7. Elaborar un blanco de reacción, en el cual se sustituye el extracto de la muestra por solución de ácido sulfosalicílico (1% p/v).

Cálculos

A partir de la curva patrón de concentración de prolina (μM) *versus* absorbancia ($\lambda_{510\text{nm}}$):

$$y=mx+b$$

Ecuación 2. Curva de patrón de concentración de prolina

Donde:

y = Absorbancia ($\lambda_{510\text{nm}}$)

x = Prolina (μM)

Despejar x

$$x=(y-b)/m$$

Sustituir el valor obtenido de absorbancia (y) en la ecuación (2) y calcular la concentración de prolina en la muestra.

La determinación de prolina se realizó sin inconvenientes dentro de la metodología

Métodología POD

La determinación espectrofotométrica de la actividad de POD se realiza de acuerdo con el método reportado por Kumar (2021), con modificaciones.

Condiciones experimentales

Temperatura: 25 °C

pH: 6.5

Definición de unidad enzimática

La actividad enzimática se expresa como un cambio de 0.01 absorbancia $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Reactivos

Búfer de fosfato - potasio (PPB) (50 mM, pH 6.5)

Peróxido de hidrógeno, solución al 0.2 % (p/p)

Guayacol 1 %

Preparación de soluciones

Búfer de fosfato (Fosfatos potásicos 50 mM, pH 6.5 a 20 °C). Disolver 0.7054 g de fosfato de potasio monobásico y 3.46 g de fosfato de potasio dibásico en 150 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6.5 (con ácido o base, según sea el caso). Aforar a 250 mL.

Solución de peróxido (25 mM). Añadir 58.4 μL (0.0584 mL) de peróxido de hidrógeno (50 % de pureza) en 25 mL de agua destilada, homogenizar la mezcla y después aforar a 50 mL.

Nota: Preparar diluciones frescas para el control y la muestra, y almacenar la solución en un vial tapado en hielo para reducir la exposición al aire.

Solución de guayacol (20 mM). Añadir 112 μL de guayacol en 40 mL de agua destilada, mezclar homogéneamente. Posteriormente, aforar a 50 mL.

Procedimiento

Preparación del extracto enzimático

Pesar 0.1 g de muestra vegetal en un tubo eppendorf de 1.5 mL, después añadir 500 μL de búfer de extracción a 4 °C, y homogenizar la mezcla.

Posteriormente, agregar 500 μL de búfer de extracción y homogenizar completamente.

Después agitar en vortex durante 2 min.

Centrifugar la mezcla a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C.

Separar el sobrenadante (extracto enzimático) y almacenar a 4 °C.

Ensayo de actividad enzimática (en microplaca)

Colocar 300 μL de búfer de reacción (fosfatos potásicos 50 mM, pH 6.5 a 20 °C) en cada uno de los pocitos de la microplaca.

Después, añadir 5 μL de Guayacol 20 mM, 10 μL de peróxido de hidrogeno 25 mM y 10 μL del extracto enzimático.

Para el blanco, se deberá añadir 5 μL de Guayacol 20 mM, 10 μL de peróxido de hidrogeno 25 mM y 10 μL de agua destilada.

Medir la absorbancia a λ_{436nm} y λ_{470nm} en el Multiscaner SkyHigh durante un periodo de 20 min tomando un registro de la absorbancia cada 30 segundos.

La lectura de la reacción comenzó cuando la absorbancia de la reacción fue de 0,05 y se detuvo cuando alcanzó una absorbancia de 0,1. La actividad enzimática fue determinada por el nivel de producción de tetraguayacol. Los resultados se expresaron en proteína U/mg.

Metodología SOD.

Determinación espectrofotométrica de actividad de SOD de acuerdo al método reportado por Hayat *et al.* (2018) (Sikandar Hayat et al., 2018).

Condiciones

T_{ambiente}; pH 7.8; t = 30 min

Definición de unidad enzimática (U)

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (SOD) que inhibe el 50% de la reducción de NBT por superóxido generados, bajo las condiciones del ensayo.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (SOD) que realiza el 50% de la reducción de radicales superóxidos, bajo condiciones del ensayo.

Reactivos

- Fosfato de potasio monobásico
- Fosfato de potasio dibásico
- EDTA-Na₂ (ácido etilendiaminotetraacético-disodio)
- L-Metionina
- NBT (Nitroazul de tetrazolio)

- Riboflavina

Preparación de soluciones

Búfer de extracción (Fosfato de potasio 50 mM, pH 7.8). Disolver 0.7054 g de fosfato de potasio monobásico y 3.46 g de fosfato de potasio dibásico en 150 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.8 (con ácido o base, según sea el caso). Posteriormente, aforar a un volumen final de 250 mL con agua destilada.

Búfer de reacción (Fosfato de potasio 50 mM, pH 7.8). Disolver 0.7054 g de fosfato de potasio monobásico y 3.46 g de fosfato de potasio dibásico en 150 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.8 (con ácido o base, según sea el caso). Posteriormente, aforar a un volumen final de 250 mL con agua destilada.

Solución de EDTA- Na_2 0.1 mM. Disolver 0.0033621 g en 60 mL de agua destilada y aforar a un volumen final de 100 mL.

Solución de Metionina 0.13 M. Disolver 1.93973 g de metionina en 60 mL de agua destilada y aforar a un volumen final de 100 mL.

Solución de NBT 0.75 mM. Disolver 0.061323 g de NBT en 60 mL de agua destilada y aforar a un volumen final de 100 mL (almacenar en frasco oscuro y 4 °C).

Solución de Riboflavina 0.02 mM. Disolver 0.00075272 g de riboflavina en 60 mL de agua destilada y aforar a un volumen final de 100 mL (almacenar en frasco oscuro y 4 °C).

Procedimiento

Preparación del extracto enzimático

- Pesar 0.1 g de muestra vegetal en un tubo eppendorf de 1.5 mL, después añadir 500 μL de búfer de extracción a 4 °C, y homogenizar la mezcla.
- Posteriormente, agregar 500 μL de búfer de extracción y homogenizar completamente.

- Después agitar en vortex durante 2 min.
- Centrifugar la mezcla a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C.
- Separar el sobrenadante (extracto enzimático) y almacenar a 4 °C.

Ensayo de actividad enzimática (en microplaca)

1. Colocar 750 μL de búfer de reacción en un tubo de eppendorf de 1.5 mL.
2. Añadir 150 μL de EDTA- Na_2 0.1 mM, 150 μL de Metionina 0.13 M, 150 μL de NBT 0.75 mM, 150 μL de Riboflavina y 150 μL del extracto enzimático.
3. Para el blanco, se deberá añadir 150 μL de EDTA- Na_2 0.1 mM, 150 μL de Metionina 0.13 M, 150 μL de NBT 0.75 mM, 150 μL de Riboflavina y 150 μL de agua destilada.
4. Mezclar por inversión de los tubos eppendorf.
5. Exponer los tubos a luz fluorescente durante 15 min (desarrollo de color).
6. Mezclar nuevamente por inversión de los tubos eppendorf.
7. Colocar 300 μL de cada muestra de cada tratamiento con su réplica y blanco correspondiente de manera ordenada en cada uno de los pocitos de la microplaca y medir la absorbancia a $\lambda_{560\text{nm}}$ en el Multiscaner SkyHigh.

Cálculos

Calcular el % de reducción de NBT, utilizando la siguiente ecuación (1):

$$\% \text{Inhibición} = (1 - A/B) \times 100$$

Ecuación 3 % de inhibición

Donde:

A = $A_{\lambda_{560\text{nm}}}$ de la muestra de reacción

B = $A_{\lambda_{560\text{nm}}}$ del blanco de reacción

A partir de la curva patrón de % de inhibición de reducción de NBT versus actividad de SOD

$$y = 8.6026 \ln(x) + 55.836 \text{ (ecuación 2)}$$

Donde:

y = % Inhibición

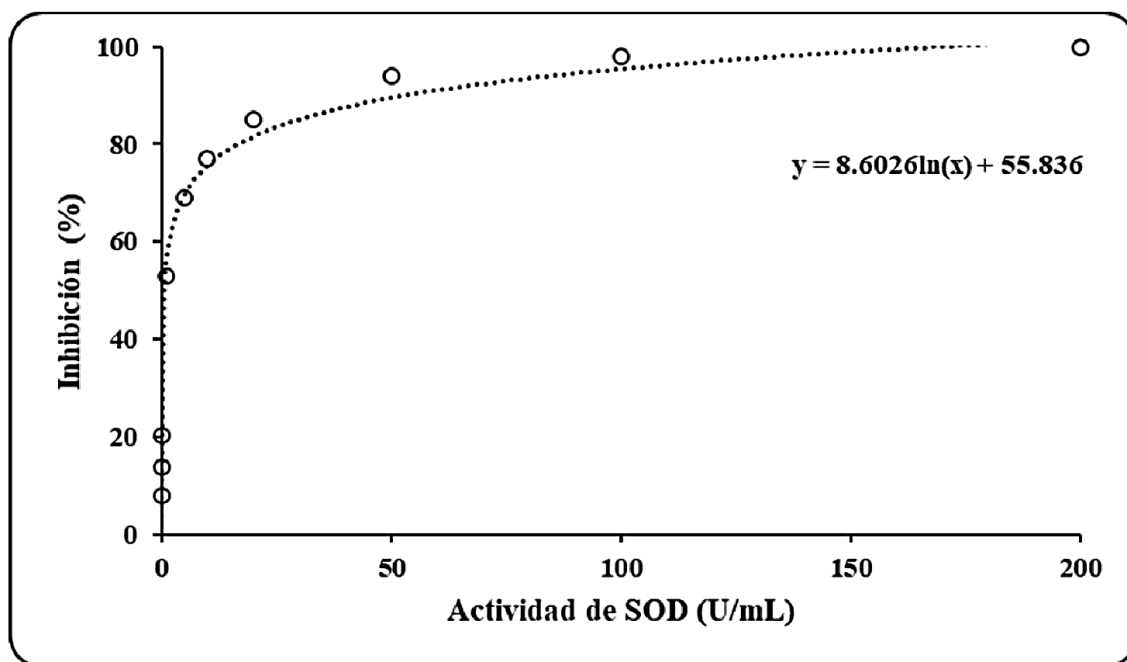
x = Actividad de SOD (U/mL)

Despejar x

$$x = e^{\frac{y-55.836}{8.6026}} \text{ (ecuación 3)}$$

Ecuación 4. Calcular la actividad de SOD

Sustituir el valor de % inhibición (y) obtenido de la ecuación (1) en la ecuación (3) y calcular la actividad de SOD (x)



Gráfica 11. Actividad SOD

Método de Bradford

Principio:

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford consiste en la cuantificación de la unión de un colorante (Azul de Coomassie G-250), a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de proteína estándar (Albúmina de Suero Bovino “BSA”).

Cuantificación:

La cuantificación de proteína por este método se hace por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 595 nm, y tomando como referencia una curva de calibración de la proteína estándar.

Reactivos:

1. Colorante Azul Brillante de Coomassie G-250
2. Reactivo de Bradford (2-8 °C)
3. Agua destilada
4. Estándar de proteína (BSA 0.25 mg/mL) (-20°C)
5. Buffer TrisHCl 1 M (pH 6.8)

Preparación del buffer de extracción (TrisHCl 1 M, pH 6.8)

$$m \text{ Tris - HCl} = 1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} * 157.56 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * 0.025 \text{ L} = 3.939 \text{ g}$$

Ecuación 5 Preparación de buffer de extracción

1. Pesar 3.939 g de Tris-HCl y disolver en 15 mL de agua destilada.
2. Ajustar pH a 6.8.
3. Aforar a 25 mL.

Extracción de proteína

1. Homogeneizar 100 mg de muestra foliar en 0.5 mL de buffer TrisHCl 1 M (pH 6.8).
2. Centrifugar a 13,000 rpm durante 20 min, 4 °C.

Preparación de solución estándar de proteína (BSA 0.25 mg/mL)

1. Pesar 2.5 mg de BSA y disolverlo en 10 mL de agua destilada.

Preparación de reactivo de proteína “Bradford” (100 mL)

1. Pesar 10 mg del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 y disolver en 5 mL de etanol (95 %).
2. Adicionar 10 mL de ácido fosfórico al 85 % (p/v).
3. Cuando se haya disuelto, agregar la solución a 50 mL de agua destilada.
4. Aforar a 100 mL.
5. Filtrar con papel filtro Whatman N°1.
6. Mantener en botella de color ámbar a temperatura ambiente.

Las concentraciones finales son: 0.01 % Azul Brillante de Coomassie G-250, 4.75 % etanol, 8.5 % ácido fosfórico.

El reactivo de Bradford debe ser de color marrón claro. Si aparece coloración azul se debe filtrar nuevamente. Este reactivo es estable durante varias semanas.

Curva de calibración

1. Preparar una solución estándar de proteína (Albúmina de Suero Bovino) a 0.25 mg/mL (250 µg/mL).
2. Preparar diluciones del estándar de proteína (0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 y 250) en microtubos eppendorf de 2 mL, por duplicado. El volumen de las disoluciones es de 1.5 mL.

N°	Concentración Albúmina Suero Bovino ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de la solución estándar de proteína "BSA" (0.5 mg/mL) (μL)	Buffer TrisHCl 1 M (μL)	Reactivo Bradford (1250 μL)
1	0	0	250	1250
2	0.5	0.5	249.5	1250
3	1	1	249	1250
4	5	5	245	1250
5	10	10	240	1250
6	15	15	235	1250
7	20	20	230	1250
8	25	25	225	1250
9	50	50	200	1250
10	75	75	175	1250
11	100	100	150	1250
12	250	250	0	1250

Tabla 19. Preparar diluciones del estándar de proteína

3. A cada microtubo adicionar 1250 μL del reactivo de Bradford, mezclar con agitador vórtex e incubar la reacción durante 2 min a temperatura ambiente. El volumen final es de 1.5 mL.
4. Medir la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro, en un plazo no mayor de 1 h.
5. Realizar la curva de calibración graficando la A_{595} vs la concentración de proteína estándar.

Ensayo cuantificación de proteína (microplacas)

1. A 50 μL del extracto adicionar 250 μL del reactivo de Bradford.

2. Mezclar e incubar la reacción durante 2 min a temperatura ambiente.
3. Medir la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro, en un plazo no mayor de 1 h.

Metodología Cuantificación de Capsaicina.

Para la obtención de los extractos, se pesaron 0.1 g de muestra de fruto de chile liofilizado en una balanza analítica serie 321 LS (Precisa, Suiza) con 1 mL de metanol al 100 % (v/v) (J.T. Baker; Xalostoc, México); la extracción se realizó protegiéndose de la luz. La mezcla se incubó durante 2 h en un baño de sonicación Branson 1510R-MT **Ultrasonic Cleaner** (Branson Ultrasonics Corporation, México), con una frecuencia de 42 kHz. Los extractos se centrifugaron a 15,000 rpm durante 15 min, en una *Microcentrífuga Velocity 15 μ* (Dynamica, Reino Unido). Para la cuantificación de capsaicina, se realizaron diluciones de cada extracto con metanol (1:10) y se midió su absorbancia a una longitud de onda (λ) de 280 nm en un espectrofotómetro UV-vis Halo XB-10 (Dynamica, Reino Unido), en celdas de cuarzo (Cerón-carrillo et al., 2015). Para realizar la curva de calibración se preparó una solución stock de capsaicina con una pureza ≥ 95 % (Sigma-Aldrich, Canadá) (1 mg/mL) y a partir de esta se prepararon concentraciones estándar de capsaicina desde 0 hasta 0.1 mg/mL, para un volumen de 1 mL, como se presenta en la tabla 17.

Concentración de capsaicina (mg/mL)	de Cantidad de stock (μL)	de solución Cantidad de metanol (μL)
0	0	1000
0.005	10	990
0.01	20	980
0.015	30	970
0.02	40	960
0.025	50	950

0.03	60	940
0.035	70	930
0.04	80	920
0.045	90	910
0.05	100	900
0.1	200	800

Tabla 20. Concentraciones de capsaicina para curva de calibración.

Tabla 21.

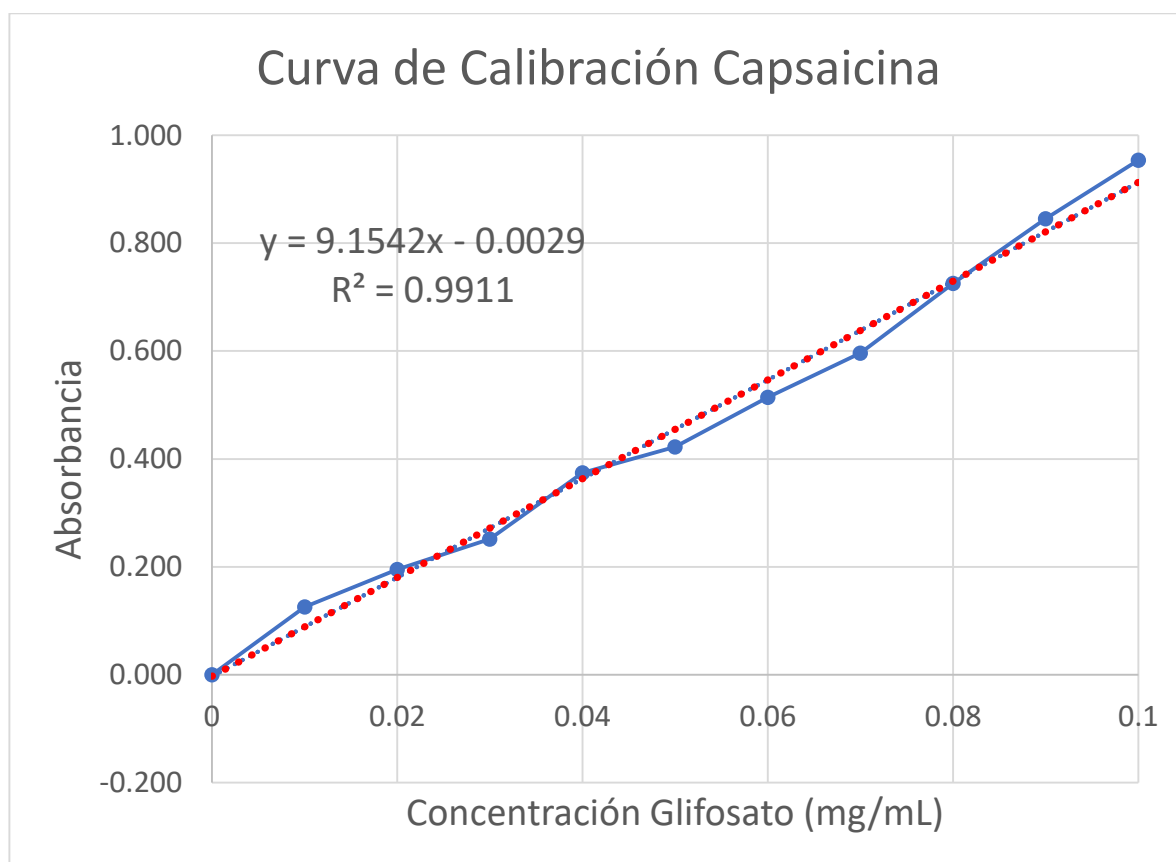


Figura 12. Curva de calibración de Capsaicina

VIII. Referencias

- Abdul C. B., Sankar, P. V. , Murralli M.; Gomathinayagam, G.M.A & Lakshmanan, R. P. (2008). water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*, 62, 105–111.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24(12), 1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Anjum, S. A., Ashraf, U., Tanveer, M., Khan, I., Hussain, S., Shahzad, B., Zohaib, A., Abbas, F., Saleem, M. F., Ali, I., & Wang, L. C. (2017). Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Frontiers in Plant Science*, 8(FEBRUARY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00069>
- Azofeifa, Á., & Moreira, M. A. (2004). Análisis de crecimiento del chile jalapeño (*Capsicum annum* L. cv. Hot), en Alajuela, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*.
- Banco Mundial. (2017). *El agua en la agricultura*. <https://www.bancomundial.org/es/topic/water-in-agriculture>
- Bochu, W., Jiping, S., Biao, L., Jie, L., & Chuanren, D. (2004). Soundwave stimulation triggers the content change of the endogenous hormone of the *Chrysanthemum* mature callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 37(3–4), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.03.004>
- Bonilla, M. A. (2012). *La polinización como servicio ecosistémico. En: Iniciativa colombiana de polinizadores (ICPA), Capítulo I: abejas*. Universidad Nacional de Colombia, Instituto Humboldt.
- Bosrasi, O. Días, P., Agius, M. F., Valpuesta, V. & M. J. (2001). Water stress

generate and stress oxidative through the induction a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. *Plant Science*, 161, 757–763.

Bowler C., Montagu M.V., I. (1992). Superoxide Dismutase and stress tolerance. *Plant Physiology*, 43, 83–116.

Butt, Y. N., Fatima, Q., Nasar, S., Ikram, J., & Akram, S. (2017). *Drought Tolerance In Plants : A Review*. 5(4).

Castillo, P. (2019). Polinizadores efectivos : ¿ Abejas vs . Abejorros ? *Biocontrol*.

Cedrón, J. C. (2013). La Capsaicina. *Revista de Química PUCP*, 27, 816–824.

<http://revistas.pucp.edu.pe/quimica>

Cerón-carrillo, T., Munguía-pérez, R., García, S., & Santiesteban-lópez, N. A.

(2015). Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*capsicum*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, July 2014.

Chautá-Mellizo, A.; Campbel, S.A.; Bonilla, M. A. . T., & J.S.; Poveda, K. (2012).

Effects of natural and artificial pollination on fruit and offspring quality. *Basic and Applied Ecology*, 13:, 524–532.

<https://doi.org/10.1016/j.baae.2012.08.013>

Chopra . & Selote D. (2007). Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 276–283.

Chowdhury, M. E. K., Lim, H.-S., & Bae, H. (2014). Update on the Effects of Sound Wave on Plants. *Research in Plant Disease*, 20(1), 1–7.

<https://doi.org/10.5423/rpd.2014.20.1.001>

Cnaani, J., Thomson, J. D., & Papaj, D. R. (2006). Flower choice and learning in foraging bumblebees: Effects of variation in nectar volume and concentration. *Ethology*, 112(3), 278–285. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2006.01174.x>

- Cocroft, R. B., & Rodríguez, R. L. (2005). The behavioral ecology of insect vibrational communication. *BioScience*, 55(4), 323–334.
[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0323:TBEOIV\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0323:TBEOIV]2.0.CO;2)
- Colla, G., Roupael, Y., Mirabelli, C., & Cardarelli, M. (2011). Nitrogen-use efficiency traits of mini-watermelon in response to grafting and nitrogen-fertilization doses. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(6), 933–941. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000325>
- Cresso. (2012). *Bombus impatiens* Cresson, 1863. 1–10.
- Esparza, M. (2014). La sequía y la escasez de agua en México. Situación actual y perspectivas futuras. *Secuencia*, 89, 195.
<https://doi.org/10.18234/secuencia.v0i89.1231>
- F. E. Hammer. (1993). Oxidoreductases. Enzytnes in Food Processing. *Academic Press*, 221.
- FAO. (2018). Transformar la alimentación y la agricultura para alcanzar los ODS. In *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*.
- Farooq, M., A.Wahid, Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Review article Plant drought stress : effects , mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev*, 29, 185–212.
- Farrell, R. L.; Murtagh, K. E. . T., & M.; Mozuch, M. D.; Kirk, T. K. (1989). Physical and enzymatic properties of lignin-peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 322.
- Fernandez-Jaramillo, A. A., Duarte-Galvan, C., Garcia-Mier, L., Jimenez-Garcia, S. N., & Contreras-Medina, L. M. (2018). Effects of acoustic waves on plants: An agricultural, ecological, molecular and biochemical perspective. *Scientia Horticulturae*, 235(March), 340–348.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.060>

- Gagliano, M., Grimonprez, M., Depczynski, M., & Renton, M. (2017). Tuned in: plant roots use sound to locate water. *Oecologia*, *184*(1), 151–160. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3862-z>
- García Enciso, E. L., Robledo Olivo, A., Benavides Mendoza, A., Solís Gaona, S., & González Morales, S. (2018). Efecto de elicitors de origen natural sobre plantas de tomate sometidas a estrés biótico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *20*, 4211–4221. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.991>
- Ghosh, R., Mishra, R. C., Choi, B., Kwon, Y. S., Bae, D. W., Park, S. C., Jeong, M. J., & Bae, H. (2016). Exposure to sound vibrations lead to transcriptomic, proteomic and hormonal changes in arabidopsis. *Scientific Reports*, *6*(March), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep33370>
- Gill S. S.; Tuteja. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*, 909–930.
- Gunawardena, M. D. M., & De Silva, C. S. (2015). Identifying the Impact of Temperature and Water Stress on Growth and Yield Parameters of Chilli (*Capsicum annum* L.). *OUSL Journal*, *7*(0), 25. <https://doi.org/10.4038/ouslj.v7i0.7306>
- Guo Z.; Lu W.K.;Zhong. (2005). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, *44*, 828–836.
- Hayat, Shamsul, Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling and Behavior*, *7*(11), 1456–1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Hayat, Sikandar, 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*(December 2016), 139–146.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.011>

- I. Tükan, F. Ö. & H. K. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168, 223–231.
- Jeong, M. J., Cho, J. Il, Park, S. H., Kim, K. H., Lee, S. K., Kwon, T. R., Park, S. C., & Siddiqui, Z. S. (2014). Sound frequencies induce drought tolerance in rice plant. *Pakistan Journal of Botany*, 46(6), 2015–2020.
- Jeong, M. J., Shim, C. K., Lee, J. O., Kwon, H. Bin, Kim, Y. H., Lee, S. K., Byun, M. O., & Park, S. C. (2008). Plant gene responses to frequency-specific sound signals. *Molecular Breeding*, 21(2), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9122-x>
- Kang, W. H., Sim, Y. M., Koo, N., Nam, J. Y., Lee, J., Kim, N., Jang, H., Kim, Y. M., & Yeom, S. I. (2020). Transcriptome profiling of abiotic responses to heat, cold, salt, and osmotic stress of *Capsicum annuum* L. *Scientific Data*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0352-7>
- Khait, I., Obolski, U., Yovel, Y., & Hadany, L. (2019). Sound perception in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 92(March), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.03.006>
- Kim, J. Y., Lee, J. S., Kwon, T. R., Lee, S. I., Kim, J. A., Lee, G. M., Park, S. C., & Jeong, M. J. (2015). Sound waves delay tomato fruit ripening by negatively regulating ethylene biosynthesis and signaling genes. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.015>
- Krylov, S.N.; Dunford, H. B. (1996). Reaction of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid. Plant Peroxidases. *Lant Peroxidases. Biochemistry and Physiology, Univ. Agriculture*, 49.
- Kumar, P. (2021). Stress amelioration response of glycine betaine and Arbuscular

- mycorrhizal fungi in sorghum under Cr toxicity. *PLoS ONE*, 16(7 July), 1–22.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253878>
- Lazar, T. (2003). Taiz, L. and Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. *Annals of Botany*, 91(6), 750–751. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Lee, M. R., Kim, C. S., Park, T., Choi, Y. S., & Lee, K. H. (2018). Optimization of the ninhydrin reaction and development of a multiwell plate-based high-throughput proline detection assay. *Analytical Biochemistry*, 556, 57–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.06.022>
- Li, B., Wei, J., Wei, X., Tang, K., Liang, Y., Shu, K., & Wang, B. (2008). Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63(2), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.12.012>
- McGreevy, K., Zlatos, C., Scales, J., & Elliot, P. (1999). Introduction and dedication. *Reference Librarian*, 30(64), 1–7.
https://doi.org/10.1300/J120v30n64_01
- Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Zehra, A., Shukla, V., Yadav, M., & Upadhyay, R. S. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, 5(12), e02952.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
- Millan-Almaraz, J. R., Torres-Pacheco, I., Duarte-Galvan, C., Guevara-Gonzalez, R. G., Contreras-Medina, L. M., Romero-Troncoso, R. de J., & Rivera-Guillen, J. R. (2013). FPGA-based wireless smart sensor for real-time photosynthesis monitoring. *Computers and Electronics in Agriculture*, 95, 58–69.
<https://doi.org/10.1016/j.compag.2013.04.009>
- Moorby, F. L. M. J. (1982). *Introducción a la fisiología de los cultivos* (p. 272).
<https://isbn.cloud/9789505042326/introduccion-a-la-fisiologia-de-los-cultivos/>

- Moreno, L. L., & Mendoza, H. V. (2011). Los chiles de México y su distribución. In *Revista Fitotecnia Mexicana* (Vol. 34, Issue 1).
- Muñoz I. G., Moran J. F., Becana, M. Montoya, G. (2005). The Crystal structure of an eukaryotic iron superoxide dismutase suggests intersubunit cooperation during catalysis. *Protein Science*, 14, 387–394.
- Munteanu, F. D.; Lindgren, A. . E., J.; Gorton, L.; Ruzgas, T. ., Csoregi, E.; Ciucu, A. . vanHuystee, R. B.; Gazaryan, I. G.; Lagrimini, L., & M. (1998). Bioelectrochemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases. *Anal. Chem*, 70, 2596.
- Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C., & Martinez, V. (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*, 96(1), 66–73.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.057>
- Nicolson, S. W. (2011). Bee food: The chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46(2), 197–204.
<https://doi.org/10.3377/004.046.0201>
- O., F. (2000). *Química de los Alimentos. 2a ed.*
- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3), 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5(MAR), 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Pacateque, J. (2014). *Comportamiento y eficiencia de polinización del abejorro Bombus atratus (Hymenoptera: Apidae) en plantas de pimentón (Capsicum annum) sembrado bajo invernadero.* 43.

- Padró, M. D. A., Caboni, E., Morin, K. A. S., Mercado, M. A. M., & Olalde-Portugal, V. (2021). Effect of *Bacillus subtilis* on antioxidant enzyme activities in tomato grafting. *PeerJ*, 9, 1–28. <https://doi.org/10.7717/peerj.10984>
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., & Tosetto, A. (2016). Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Pantoja, A.; Smith-Pardo, A.; García, A.; Sáenz, A., Rojas, F. (2014). Principios y avances sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y El Caribe. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura-FAO*.
- Pathak, M. R. o., Teixeira da Silva, J. A., & Wani, S. H. (2014). Polyamines in response to abiotic stress tolerance through transgenic approaches. *GM Crops & Food*, 5(2), 87–96. <https://doi.org/10.4161/gmcr.28774>
- Pendolema Jaramillo, W. A. (2017). *Determinación de requerimientos hídricos del cultivo de pimiento (Capsicum annum L.), con la aplicación de láminas de agua calculadas por tres métodos matemáticos*. 74. <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/5031/1/TE-UTB-FACIAG-ING AGRON-000114.pdf>
- Perucka, I., & Materska, M. (2001). Phenylalanine ammonia-lyase and antioxidant activities of lipophilic fraction of fresh pepper fruits *Capsicum annum L.* *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2(3), 189–192. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(01\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(01)00022-4)
- Pujiwati, I., Guritno, B., Aini, N., & Sakti, S. P. (2018). Examining Use of Sonic Bloom Technology on the Stomata Opening of Drought-Stressed Soybean. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 15(4), 861–869. <https://doi.org/10.13005/bbra/2695>

- Pulido, S. Y. P. (2014). *Especies Reactivas De Oxígeno Y La Enzima Superóxido Dismutasa como defensa de las plantas al estrés hídrico*. 269–278.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5590920>
- Ramachandra, A. R., Viswanatha, K. C. & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161, 1189–1202.
- Ramirez, C. (2009). Estudio Experimental de la Desactivación de la Enzima Peroxidasa Durante el Proceso de Escaldado de Papas (*Solanum tuberosum*) y el Almacenamiento a -18°C. *Universidad Austral De Chile*, 1, 62.
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/far173e/doc/far173e.pdf>
- Rao, N. K. S., Shivashankara, K. S., & Laxman, R. H. (2016). Abiotic stress physiology of horticultural crops. *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*, 1–368. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2725-0>
- Raw, A. (2000). Foraging behavior of wild bees at hot pepper flowers (*Capsicum annuum*) and its possible influence on cross pollination. *Annals of Botany*, 85(4), 487–492. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1090>
- Ricou, C., Schneller, C., Amiaud, B., Plantureux, S., & Bockstaller, C. (2014). A vegetation-based indicator to assess the pollination value of field margin flora. *Ecological Indicators*, 45, 320–331.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.03.022>
- Rodríguez-Calzada, T., Qian, M., Strid, Å., Neugart, S., Schreiner, M., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (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*, 134(June), 94–102.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.025>
- SAGARPA. (2017). Agrícola Nacional. *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*,

/(1), 1–14.

- Sahitya, U. L., Krishna, M. S. R., Sri Deepthi, R., Shiva Prasad, G., & Peda Kasim, D. (2018). Seed Antioxidants Interplay with Drought Stress Tolerance Indices in Chilli (*Capsicum annuum* L) Seedlings. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1605096>
- Sánchez, J. S., Oller, R. O., Muñoz, M. H., Ruiz, F. M. P., Pugnaire, F. I., & Idoala, D. (2004). Microirrigation : A technique for vegetal cover restoration in semiarid environments. *Cuad. Soc. Esp. Cien. For*, 17(december 2001), 109–112.
- Shahbaz, M., Mushtaq, Z., Andaz, F., & Masood, A. (2013). Does proline application ameliorate adverse effects of salt stress on growth, ions and photosynthetic ability of eggplant (*Solanum melongena* L.)? *Scientia Horticulturae*, 164, 507–511. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.001>
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Bhardwaj, R., & Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/biom9070285>
- Sheena, S., Natalia, A., Estela, S., & Ciro, I. (2013). (Hymenoptera , Apidae) Artificial Breeding of Native Bumblebees *Bombus atratus* y *Bombus bellicosus* (Hymenoptera , Apidae). *Agrociencia Uruguay*, 17, 75–82.
- Smith-Ramírez, C., Vieli, L., Barahona-Segovia, R. M., Montalva, J., Cianferoni, F., Ruz, L., Fontúrbel, F. E., Valdivia, C. E., Medel, R., Pauchard, A., Celis-Diez, J. L., Riesco, V., Monzón, V., Vivallo, F., & Neira, M. (2018). Las razones de por qué Chile debe detener la importación del abejorro comercial *Bombus terrestris* (Linnaeus) y comenzar a controlarlo. *Gayana (Concepción)*, 82(2), 118–127. <https://doi.org/10.4067/s0717-65382018000200118>
- Solano-Alvarez, N., Valencia-Hernández, J. A., Vergara-Pineda, S., Millán-

- Almaraz, J. R., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (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). <https://doi.org/10.3390/plants11070932>
- Somme, L., Vanderplanck, M., Michez, D., Lombaerde, I., Moerman, R., Wathelet, B., Wattiez, R., Lognay, G., & Jacquemart, A. L. (2015). Pollen and nectar quality drive the major and minor floral choices of bumble bees. *Apidologie*, 46(1), 92–106. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0307-0>
- Sonic bloom*. (2021). <https://dancarlsonsonicbloom.com/about>
- Tijssen, P. (1985). *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*, Elsevier. *Amsterdam*.
- Torres-Ruiz, A., Jones, R. W., & Barajas, R. A. (2013). Present and potential use of bees as managed pollinators in Mexico 1. *Southwestern Entomologist*, 38(1), 133–147. <https://doi.org/10.3958/059.038.0102>
- Veits, M., Khait, I., Obolski, U., Zinger, E., Boonman, A., Goldshtein, A., Saban, K., Seltzer, R., Ben-Dor, U., Estlein, P., Kabat, A., Peretz, D., Ratzersdorfer, I., Krylov, S., Chamovitz, D., Sapir, Y., Yovel, Y., & Hadany, L. (2019). Flowers respond to pollinator sound within minutes by increasing nectar sugar concentration. *Ecology Letters*, 22(9), 1483–1492. <https://doi.org/10.1111/ele.13331>
- Vergara, C.H.; Badano, E. I. (2009). Pollinator diversity increases fruit production in Mexican coffee plantations: The importance of rustic management systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 129, 117–123.
- Vilhena, A.M.; Rabelo, L.; Bastos, E.M.; Augusto, S. C. (2012). Acerola pollinators in the savanna of Central Brazil: temporal variations in oil-collecting bee richness and a mutualistic network. *Apidologie*, 43, 51–62.
- Wakamatsu, K.; Takahama, U. (1993). Changes in peroxidase activity and in

peroxidase isoenzymes in carrot callus. *Physiol. Plants.*, 88, 167.

WHITAKER, J. (1972). *Principles of enzymology for the Food Sciences*. (Editorial & M. Dekker (Eds.)).

Willmer, P. (2011). *Pollination and Floral Ecology*.

<https://princeton.universitypressscholarship.com/view/10.23943/princeton/9780691128610.001.0001/upso-9780691128610>

Yamada, M., Morishita, H., Urano, K., Shiozaki, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Yoshida, Y. (2005). Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1975–1981. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri195>

Yang, Z., Wu, Y., Li, Y., Ling, H. Q., & Chu, C. (2009). OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, 70(1–2), 219–229. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9466-1>

Yong; Zongsuo L.; Honboc S.; & Feng D. (2004). Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzyme and osmoregulation among three different genotypes of Radiz Astragali at seeding stage. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*, 49, 60–65.

Zhang, Z. X., Zhao, S. N., Liu, G. F., Huang, Z. M., Cao, Z. M., Cheng, S. H., & Lin, S. Sen. (2016). Discovery of putative capsaicin biosynthetic genes by RNA-Seq and digital gene expression analysis of pepper. *Scientific Reports*, 6(September). <https://doi.org/10.1038/srep34121>