

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

**Aplicación de emisiones acústicas (EA) como inductores de
tolerancia a sequía y producción de capsaicinoides en plantas
Capsicum annum L.**

Tesis

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

Presenta:

M en C. Laura Helena Caicedo López

Dirigido por:

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

Codirector

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Querétaro, Qro. a septiembre, 2022



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



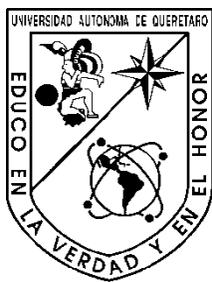
Aplicación de emisiones acústicas (EA) como
inductores de tolerancia a sequía y producción de
capsaicinoides en plantas *Capsicum annuum* L.

por

Laura Helena Caicedo López

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGDCC-255309



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

Tesis

Aplicación de emisiones acústicas (EA) como inductores de tolerancia a sequía y producción de capsaicinoides en plantas *Capsicum annuum* L.

Presenta

M en C. Laura Helena Caicedo López

Dirigido por:

Dr. Luis Miguel Contreras Medina
Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Dr. Luis Miguel Contreras Medina Universidad
Autónoma de Querétaro
Presidente

Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Universidad Autónoma de Querétaro
Secretario

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco Universidad
Autónoma de Querétaro Vocal

Firma

Dr. Andrés Pérez Matsumoto Centro Nacional
de Metrología Suplente

Firma

Dra. Aurea Ramírez Tecnológico de
Monterrey Suplente

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad de Ingeniería

Dra. Ma Guadalupe Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Fecha de aprobación por el consejo Universitario (noviembre, 2018)

Dedicatoria

Dedico esta experiencia académica a Dios, a mis padres, hermanos, amigos, compañeros de viaje, maestros, tutores, profesores y compañeros que enriquecieron este camino de aprendizaje.

Agradecimientos

A Dios por las posibilidades, a la vida por permitirme profundizar brevemente en el conocimiento de la naturaleza con amor y curiosidad. A la ciencia y sus integrantes por abrirme la oportunidad de crear, hacer preguntas y buscar respuestas. A México por abrir las puertas del conocimiento a sus países hermanos, por adoptar estudiantes y llenar de hospitalidad y abrigo los anhelos extranjeros. A la comunidad académica en general por ser un espacio de crecimiento intelectual con lecciones personales que duran la vida entera.

Índice

| | |
|--|----|
| Dedicatoria | 3 |
| Agradecimientos..... | 3 |
| Resumen | 8 |
| I. Introducción | 10 |
| II. Antecedentes y fundamentación teórica..... | 12 |
| II.1 Fenómeno acústico y su relación con las plantas | 12 |
| II.2 Fenómeno acústico y su relación con las plantas | 14 |
| II.3 Principios mecánicos de la fitoacústica. | 15 |
| II.4 Emisiones acústicas y la expresión de genes y proteínas..... | 17 |
| II.5 Emisiones acústicas y metabolitos secundarios..... | 18 |
| II.6 Emisiones acústicas y cambios en las variables fisiológicas..... | 19 |
| II.7 Metodologías de aplicación en los tratamientos acústicos | 19 |
| II.8 Características de la sequía y estrés hídrico..... | 22 |
| II.9 Modelo biológico: <i>Capsicum annuum</i> L. generalidades e importancia | 24 |
| II.10 Restricción de riego e incremento de capsaicinoides..... | 25 |
| II.11 Aplicación de sonido y su efecto en tolerancia a sequía y acumulación de metabolitos secundarios..... | 26 |
| III. Hipótesis | 28 |
| IV. Objetivo general..... | 28 |
| V. Objetivos específicos..... | 28 |
| VI. Materiales y Métodos..... | 28 |
| VI.1 Material biológico | 28 |
| VI.2 Identificación de características asociadas al estrés hídrico para medición de patrones vibratorios. | 29 |
| VI.3 Selección de metodología para detección de señales acústicas | 29 |
| VI.4 Medición y selección de señales de frecuencia y amplitud por vibración mediante el uso de vibrómetro laser | 30 |
| VI.5 Identificación de la primera frecuencia natural..... | 31 |
| VI.7 Preparación de muestras foliares para pruebas moleculares de respuesta antioxidante en plantas <i>C. annuum</i> L. | 33 |
| VI.8 RT-qPCR de enzimas antioxidantes y gen de acuaporina en tejido foliar, precursores de capsaicinoides en fruto de <i>C. annuum</i> L. | 33 |
| VI.9 Exposición de plantas de <i>C. annuum</i> L. a 60 minutos de EA en condiciones de invernadero. | 35 |
| VI.10 Exposición consecutiva de plantas <i>C. annuum</i> L. a 60 minutos de EA por 2 semanas mediante el uso de cajones reverberantes. | 35 |
| VI.11 Preparación de extractos para cuantificación de Capsaicinoides | 35 |
| VI.12 Estimación de porcentaje de sobrevivencia | 36 |
| VI.13 Medición de la transpiración | 36 |
| VI.14 Estimación de índice de salud | 37 |
| VI.15 Cuantificación de ácidos fenólicos libres totales y Flavonoides | 37 |
| VI.16 Determinación de capacidad antioxidante | 37 |
| VI.17 Imágenes de termografía | 37 |

| | | |
|---------|--|----|
| VI.18 | Determinación de índice de vegetación normalizada (NDVI) como indicador de cambios espectrales | 37 |
| VII. | Diseño experimental y análisis estadístico | 38 |
| VIII. | Resultados y discusión | 38 |
| VIII.1 | Caracterización de 3 niveles de estrés hídrico en plantas <i>Capsicum annuum</i> L. | 38 |
| VIII.2 | Frecuencia natural en las plantas <i>C. annuum</i> L. con estrés hídrico..... | 38 |
| VIII.3 | Identificación de señales de frecuencia en <i>Capsicum annuum</i> L..... | 41 |
| VIII.6 | Influencia de la exposición breve (20 min) de plantas <i>C. annuum</i> L. a EA en lo genes <i>Mn-sod</i> , <i>pod</i> , <i>pal</i> , <i>chs</i> y <i>caPIP-1</i> | 42 |
| VIII.7 | Influencia de la exposición prolongada (60 min) a los tratamientos EA en cambios morfológicos, bioquímicos de plantas <i>C. annuum</i> L..... | 45 |
| VIII.8 | Tolerancia a la sequía y productividad de biomasa como respuesta de recuperación después de EA y rehidratación | 53 |
| VIII.9 | Diferencias entre la respuesta del metabolismo primario y secundario a la tolerancia a la sequía después de los EA..... | 62 |
| VIII.10 | Efecto multivariante de los tratamientos con EA en la respuesta del metabolismo primario y secundario de las plantas de <i>C. annuum</i> L. | 64 |
| VIII.11 | Aportes finales de la investigación | 66 |
| IX. | Conclusión | 66 |
| X. | Perspectivas | 66 |
| XI. | Financiamiento otorgado para el desarrollo de la investigación | 66 |
| XII. | Referencias..... | 67 |

Índice de cuadros

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Aplicación de sonido en plantas..... | 21 |
| Cuadro 2. Cebadores transcripcionales para estimaciones moleculares..... | 34 |
| Cuadro 3. Clasificación del estrés hídrico en plantas <i>Capsicum annuum</i> L. con respecto a potencial mátrico y días sin riego. | 39 |
| Cuadro 4. Selección de frecuencias de vibración usadas para conversión a sonido en forma de EA..... | 42 |
| Cuadro 5. Porcentaje de representatividad de los principales componentes que influyen en la respuesta de las EA..... | 51 |
| Cuadro 6. Aplicación de EA y porcentaje de sobrevivencia..... | 53 |
| Cuadro 7. Efecto de las EA en el desarrollo morfológico de <i>C. annuum</i> 2 etapas fenológicas..... | 55 |
| Cuadro 8. Diferencias morfológicas de <i>C. annum</i> L. después de tratamientos con EAs en diferentes estados fenológicos..... | 57 |
| Cuadro 10. Efecto de la aplicación consecutiva de EA en contenido total de fenoles, flavonoides libres totales y capacidad antioxidante de <i>C. annuum</i> L..... | 62 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Configuración experimental de mediciones laser Doppler en plantas de chile jalapeño <i>C. annuum</i> L. | 30 |
| Figura 2. Método de estimulación mecánica y posterior registro de señal y primera frecuencia natural. | 32 |
| Figura 3. Espectros de la frecuencia de vibración en el dominio de tiempo para plantas <i>C. annuum</i> L..... | 40 |
| Figura 4. Perfil de transcripción de genes. A) Peroxidasa (<i>Pod</i>), B) acuaporina de ají (<i>CaPIP1-1</i>), C) fenilalanina amoniacal-liasa (<i>pal</i>), D) Mn-superóxido dismutasa (<i>Mn-sod</i>) y, E) Chalcona sintasa (<i>Chs</i>), F) Escala de color de expresión..... | 44 |
| Figura 5. Efectos morfológicos y fisiológicos de la aplicación de EA en plantas sanas de <i>C. annuum</i> L. | 46 |
| Figura 6. Efecto de los tratamientos EA en la acumulación de prolina en hojas de <i>C. annuum</i> L..... | 47 |
| Figura 7 Efecto de los tratamientos EA en el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina..... | 48 |
| Figura 8. Efecto de los tratamientos EA en la expresión de los genes <i>kas</i> y <i>at3</i> asociados a la biosíntesis de capsaicinoides en frutos de <i>C. annuum</i> L..... | 50 |
| Figura 9. Efecto de los EA en la respuesta integral de metabolismo primario y secundario de <i>C. annuum</i> L..... | 52 |
| Figura 10. Efecto de los tratamientos EA en la biomasa de <i>C. annuum</i> L..... | 54 |
| Figura 11 Efecto de EA sobre la conductancia estomática y el rendimiento de cultivo de <i>C. annuum</i> L. campo..... | 55 |
| Figura 12. Efecto de EA sobre la conductancia estomática y el rendimiento de cultivo de <i>C. annuum</i> L. campo..... | 56 |
| Figura 13. Efecto de EA sobre el contenido de clorofila en diferentes estados fenológicos de <i>C. annuum</i> L. | 58 |

| | |
|--|----|
| Figura 14. Efecto de EA sobre la expresión de acuaporinas CaPIP-1 en diferentes estados fenológicos de <i>C. annuum</i> L..... | 59 |
| Figura 15. Efecto de EA sobre la acumulación de prolina en hojas y raíces bajo diferentes estados fenológicos de <i>C. annuum</i> L..... | 61 |
| Figura 16. Efecto de las EA en la acumulación de capsaicinoides totales en <i>C. annuum</i> | 62 |
| Figura 17. Efecto de la aplicación consecutiva de tratamientos EA en la variación de imágenes NDVI en <i>C. annuum</i> L. | 63 |
| Figura 19. Análisis de componentes principales en plantas de <i>C. annuum</i> después de 14 días de tratamiento sonoro con EAs..... | 64 |

Abreviaturas y siglas

EA: Emisiones acústicas

EA: Siglas del inglés acoustic emission patterns / Emisiones acústicas provenientes de un patrón vibracional

Cc: Capacidad de campo

LHS: Estrés hídrico bajo

MHS: Estrés hídrico medio

HHS: Estrés hídrico alto

WN: Ruido blanco

CAPs: Capsaicinoides

Cap: Capsaicina

Dcap: Dihidrocapsaicina

Chs: Chalcona sintasa

Sod: Superóxido Dismutasa

JA: ácido jasmónico

Pal: Fenilalanina amoniaco liasa

Chs Chalcona sintasa

Mn-sod: Para la presión oxidativa (superóxido dismutasa de manganeso mitocondrial

Pod: Peroxidasa

BF: floración

MF: Madurez y fructificación

Resumen

Las plantas que experimentan falta de riego sufren estrés hídrico, lo que provoca la modificación de sus propiedades mecánicas. Estos cambios incluyen una compleja red de señales químicas y físicas derivadas de ajustes estructurales e hidráulicos. Dichos micro movimientos suceden a diferentes frecuencias, así como las generadas por insectos y el zumbido de las abejas. Por lo tanto, las frecuencias han sido utilizadas como un tipo de estresor físico en plantas, abriendo un campo de investigación para la selección de frecuencias con mayor potencial para ejercer cambios metabólicos en las plantas. Este trabajo tuvo como objetivo obtener y aplicar patrones de vibración, a través de emisiones acústicas relacionadas con vibraciones características del estrés hídrico bajo (LHS), estrés hídrico medio (MHS) y estrés hídrico alto (HHS) para evaluar su efecto en plantas sanas y regadas en dos etapas de desarrollo. En esta investigación se midieron señales de vibración de plantas con estrés hídrico, identificadas como patrones vibratorios, con vibrometría laser. Asimismo, se generaron sonidos creados a partir de frecuencias vibratorias identificadas en las plantas, bajo la hipótesis de que, el sonido se transporta a través de aire mediante cambios de presión en el mismo que, al impactar algún tejido o cuerpo, tienen potencial para comunicar información sobre la condición fisiológica de la planta,. En la etapa vegetativa, se evaluó la expresión de genes relacionados con las respuestas antioxidantes. Los tratamientos acústicos LHS, MHS y HHS regularon al alza la peroxidasa (*Pod*) (~ 2,8, 1,9 y 3,6 veces el cambio, respectivamente). Los genes de superóxido dismutasa (*Mn-sod*) y fenilalanina amonio liasa (*pa*) fueron regulados positivamente por HHS (~ 0,23 y ~ 0,55 veces de cambio, respectivamente). El gen de la chalcona sintasa (*chs*) fue inducido por MHS (cambio de ~ 0,63 veces). En la etapa de fructificación, el tratamiento con MHS indujo un aumento significativo de capsaicina (incrementó 5,88 veces), probablemente a través de la activación de los genes *pat3* y *kas*. Se demostró que la respuesta de las plantas a las emisiones acústicas es sensible a sus propias frecuencias de vibración naturales, sugiriendo que, las señales de vibración, aplicadas mediante sonidos, tienen potencial para aplicaciones agrícolas.

Palabras clave: Estrés hídrico, frecuencias, Fito acústica, frecuencias, capsaicinoides.

Abstract

Plants that experience a lack of irrigation suffer hydric stress, which causes the modification of their mechanical properties. These changes include a complex network of chemical and physical signals derived from structural and hydraulic definitions. These micro-movements happen at different frequencies, as well as those by insects and the buzzing of bees. Therefore, frequencies have been used as a type of physical EU stressor in plants, opening a field of research for the selection of frequencies with the greatest potential to exert metabolic changes in plants. This study aimed to obtain and apply vibration patterns, through acoustic emissions related to vibrations characteristic of low water stress (LHS), medium water stress (MHS), and high-water stress (HHS) to evaluate their effect on healthy plants and irrigated in two stages of development. In this research, vibration signals of plants with water stress, identified as vibration patterns, were measured with laser vibrometry. Likewise, sounds created from vibratory frequencies identified in plants were generated, under the hypothesis that sound is transported through the air through pressure changes in it that, when impacting any tissue or body, have the potential to communicate information on the physiological condition of the plant, such as water stress. In the vegetative stage, the expression of genes related to antioxidant and hydric responses to stress was evaluated. LHS, MHS, and HHS acoustic treatments upregulated peroxidase (*Pod*) (~2.8, 1.9, and 3.6-fold change, respectively). Superoxide dismutase (*Mn-sod*) and phenylalanine ammonia-lyase (*pal*) genes were upregulated by HHS (~0.23 and ~0.55-fold change, respectively). The chalcone synthase (*Chs*) gene was induced by MHS (~0.63-fold change). At the fruiting stage, MHS treatment induced a significant increase in capsaicin (increased 5.88-fold), probably through the activation of *At3* and *Kas* genes. The response of plants to acoustic emissions is found to be sensitive to their natural vibrational frequencies, suggesting that sound-enforced vibration signals have the potential for agricultural applications.

Keywords: Hydric stress, frequencies, Phyto- acoustic, frequencies, capsaicinoids.

I. Introducción

Uno de los principales factores que afectan la supervivencia de una planta es la sequía que aparece cuando el suministro de agua a las raíces es limitado o la pérdida de agua por efecto de su propia transpiración es muy alta. No obstante, el estrés vegetal es parte del ciclo de vida de la planta, pero también conduce a pérdidas de cultivos y el 75% es debido al estrés ambiental (Ghosh et al., 2017). En el caso de la sequía, los daños causados son impredecibles debido a los cambios en los patrones de lluvia, la capacidad variable de retención de humedad del suelo y el posible aumento de las pérdidas de agua por evapotranspiración (Fahad et al., 2017; Pandey et al., 2017). En este sentido, la situación de escasez global de agua, el crecimiento de la población y el cambio climático, hacen que conservar el agua y asegurar la producción de cultivos sea un tema de interés en la investigación relacionada a la fisiología vegetal (Mardani et al., 2017).

México ha sufrido episodios críticos de sequía severos que han afectado hasta el 40% de la productividad agrícola (Velasco, 2014). Por esta razón, el manejo de los cultivos ha generado interés desde la agricultura de precisión y el manejo de los biosistemas, entendiéndose que un cultivo se comporta como un sistema biológico complejo que presenta múltiples interacciones con su entorno.

Para resolver problemáticas que involucran la respuesta fisiológica de las plantas a determinadas condiciones de estrés ambiental, es preciso abordar fenómenos implicados en diferentes áreas del conocimiento, ya que esta información puede contribuir a entender mecanismos de tolerancia naturales de las plantas y aprovechar los mismos como estrategias de bioestimulación de manera innovadora y resiliente.

Entre los factores ambientales circundantes al entorno de la planta, intervienen características físicas, tal como el contacto directo y el sonido transmitido a través del aire. Con respecto a estos, se ha sugerido que, las ondas vibratorias emitidas a través de altavoces tienen efectos de mayor supervivencia a la sequía en plantas *Arabidopsis thaliana* y arroz (Jeong et al., 2014). También se demostró que el sonido induce la activación del metabolismo secundario y subsecuente producción de fitohormonas, compuestos orgánicos volátiles (VOC) por sus siglas en inglés (López-Ribera and Vicient, 2017; Kollasch et al., 2020). Recientemente, el uso de frecuencias acústicas específicas demostró una regulación positiva de los genes sensibles al calor (*hsfa3*, *smxl7* y *athsp101*), sugiriendo que la vibración ejercida por sonidos (SV) y las emisiones acústicas (EA) podrían tener un efecto positivo para acondicionar los cultivos contra futuras tensiones ejercidas por el calor (Bhandawat et al., 2020). Eso implica también que, el sonido podría generar una forma de aprendizaje asociativo, definido como un componente esencial del comportamiento adaptativo de las plantas (Gagliano et al., 2016), desencadenando la expresión de genes de estrés por calor, como se reportó para la planta *Arabidopsis* (Kim et al.,

2020). Por lo anterior, si las plantas pueden distinguir el sonido típico de los herbívoros provocando la activación de sus mecanismos de defensa, existe evidencia de su capacidad para diferenciar e identificar sonidos y tacto. Todo esto a través de la mecanopercepción y otros mecanismos complejos a los que se le atribuyen “cognición” (Mishra y BEA, 2019).

Por otro lado, la literatura sugiere que pequeñas dosis externas de estrés, pueden conferir tolerancia a las plantas a través de la estimulación de los sistemas de protección. Así se ha propuesto también que, los sonidos ejercen efectos en las plantas al causar cambios de presión en el aire, impactando el tejido vegetal ejerciendo un estímulo mecánico ligero y no visible. Por ejemplo, la sobreproducción de metabolitos secundarios como moléculas señalizadoras involucradas en la regulación de reacciones bioquímicas y síntesis de compuestos con función protectora (Vázquez-Hernández et al., 2019).

En este sentido, patrones específicos de vibración podrían actuar como ondas mecánicas y funcionar como señal física entre planta-planta y medio ambiente-planta. Así, de acuerdo con la literatura, el sonido tiene potencial generar respuestas de adaptabilidad fisiológica ante factores de estrés. Por lo tanto, es necesario generar investigaciones que permitan medir y asociar estados fisiológicos en términos de vibración, así como validar la aplicación de ciertos sonidos elaborados a partir de señales obtenidas de las plantas y así evaluar su efecto en cambios fisiológicos, bioquímicos y/ moleculares, de tal manera que sea posible obtener beneficios agronómicos o biotecnológicos mediante la aplicación de dichos sonidos. Asimismo, conviene establecer la experimentación en modelos biológicos de importancia económica para la agricultura.

Las plantas de chile jalapeño, *Capsicum annuum* L. cuya importancia agrícola a nivel mundial y relevancia para la agricultura mexicana, ha incrementado un 25% la última década, esto se debe a su alto valor nutricional y contenido de fitoquímicos exclusivos de la especie, principalmente capsaicinoides (Mardani et al., 2017b; Roberto E. Rosales, 2017). Estos compuestos son reconocidos por sus aplicaciones farmacéuticas en animales y humanos y aprobados por la administración de alimentos y medicamentos (FDA y EFSA) (Basith et al., 2016). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue dilucidar la respuesta bioquímica y fisiológica de plantas de chile sanas, a patrones acústicos generados a partir de patrones de frecuencias de vibración detectados en plantas de chile bajo diferentes niveles de estrés hídrico.

II. Antecedentes y fundamentación teórica

Diversos organismos utilizan las ondas de sonido o las vibraciones para orientarse y comunicarse. La evidencia de que las plantas tienen a su disposición una gran variedad de modalidades sensoriales ha sido reportada y discutida en la literatura (Karban, 2015). Algunos trabajos sugieren que la comunicación entre las plantas, además de darse en forma de señales químicas al igual que los animales, es también dependiente de la propagación de ondas, tal como las ondas de luz, ondas acústicas y electromagnéticas. Así, la recepción y procesamiento de la energía alojada en dichas ondas, permite obtener información sobre el entorno cercano o distante (Khait et al., 2019). En efecto, para percibir vibraciones sonoras y / o mecánicas, las plantas, han demostrado tener una particular forma de percepción, aunque se desconoce un órgano específico en ellas que sea capaz de percibir el sonido. A pesar de esto, desde el 2013 se replanteó la investigación de los mecanismos biofísicos y fisiológicos involucrados en la capacidad de las plantas para detectar y utilizar sonidos como una habilidad sensorial, ya fueran en forma de vibraciones propagadas por medio del sustrato de crecimiento o sonidos transmitidos a través del aire (Gagliano, Mancuso, et al., 2012; Gagliano, Renton, et al., 2012).

II.1 Fenómeno acústico y su relación con las plantas

Los estímulos físicos a los que se someten las plantas de forma natural son variados. Específicamente, las EA se pueden describir como ondas elásticas y transitorias que se generan a partir de la tensión de energía liberada cuando se producen cambios microestructurales en un material determinado, el cual es comúnmente el aire (Gholizadeh et al., 2015).

Cabe resaltar que las características físicas de los sonidos le atribuyen un gran potencial biológico de señalización para transportar “información” con relevancia ecológica, ya que algunos trabajos dan indicios de que dichas señales físicas indicarían a la planta el estado del entorno inmediato, el cual es vital para el desarrollo de esta.

Las ondas mecánicas están naturalmente presentes en el medio ambiente y conllevan datos del entorno circundante, como, por ejemplo, la presencia de polinizadores, herbívoros, condiciones climáticas y recursos como el agua e incluso, la escasez de ésta (Khait et al., 2019). Recientemente se retomó el campo de investigación que involucra el cuestionamiento directo sobre si las plantas pueden percibir y/o, como algunos autores lo mencionan, “escuchar” el sonido. En este sentido se ha delimitado aún más el término bioacústica, a uno específico en las plantas, la fitoacústica (I. Khait et al., 2019) [Haga clic o pulse aquí para escribir texto.](#)

Se ha propuesto en diversos estudios que, las EA y su aplicación en forma de tratamientos sonoros, podrían tener un valor significativo y sofisticado de adaptabilidad, reconocimiento y aprendizaje del entorno. Incluso, algunos trabajos han reportado el aporte de beneficios a sistemas de producción agrícola (Hassanien

et al., 2014; Jung et al., 2018).

Asimismo, la evidencia sugiere que las plantas son capaces de procesar las propiedades del soporte mecánico que tienen para adaptar su estructura en función de la disponibilidad de agua y luz. Además, están dotadas de una forma de percepción que suscribe un comportamiento anticipatorio y dirigido a objetivos (Ceccarini et al., 2020). Todo lo anterior justifica el interés en los efectos del sonido en las plantas, ya que, en el conocimiento de sus mecanismos de respuesta converge el interés agrícola y biotecnológico por su potencial como elicitador / estresor (Alvarado et al., 2019; Ramirez-Estrada et al., 2016).

Se ha sugerido que el uso de factores de estimulación exógena en diversos cultivos es una tendencia que pretende adaptar estrategias enfocadas a aumentar la resiliencia de los cultivos y con el menor impacto ambiental posible y generando alimentos que tengan mayor aceptación por parte de los consumidores (Caicedo-Lopez et al., 2021; Fernandez-Jaramillo et al., 2018).

Por otro lado, las EA también se han considerado como una señal que la misma planta es capaz de generar debido a un proceso dinámico, tal como la mecánica involucrada en sus procesos de ajustes hídricos, en los que tiene lugar el transporte de agua y masa. Este movimiento responde un flujo que abarca todo el tejido vegetal (Geitmann et al., 2019; Niklas et al., 2006). De hecho, las EA se consideran como una variable decisiva en el comportamiento fisiológico de las plantas y han sido utilizadas para investigar el estrés de las plantas inducido por la sequía (De Roo et al., 2016).

No obstante, existe una amplia inconsistencia en los dispositivos utilizados para medir EA en plantas, así como en los instrumentos y emisores de señales conocidos como actuadores que, son utilizados para la aplicación de tratamientos sonoros. Distintas publicaciones presentan una alta variabilidad en la ubicación del instrumento de medición con el que se ha pretendido descifrar diversas señales en las plantas. Así también, el tiempo de medición, como el uso de filtros de anchos de banda para bloquear el ruido experimental, la definición de condiciones ambientales, entre otras. Todo esto limita la reproducibilidad de las mediciones y la obtención de resultados similares, en cuanto a la exploración del comportamiento de algunas especies de interés. De esta manera, muy pocos estudios sobre aplicaciones de sonido justifican la relevancia biológica de utilizar algunos patrones acústicos, constituidos por una o varias frecuencias, siendo que las plantas, en su ambiente natural, están bajo el entorno de sonidos compuestos por múltiples frecuencias. Por lo anterior, se abre la oportunidad a un campo de estudio detallado en el que pudiesen explorarse la relación entre los patrones acústicos, intensidades de nivel de presión acústica y los cambios consecuentes asociados a un estado fisiológico de interés. Asimismo, muy pocos estudios sobre aplicaciones de EA conocen patrones o las componentes específicas de frecuencias y amplitudes

generadas debido a un estado fisiológico asociado.

II.2 Principios mecánicos de la fitoacústica. sustrato de crecimiento o sonidos transmitidos a través del aire (Gagliano, Mancuso, et al., 2012; Gagliano, Renton, et al., 2012).

II.2 Fenómeno acústico y su relación con las plantas

Los estímulos físicos a los que se someten las plantas de forma natural son variados. Específicamente, las EA se pueden describir como ondas elásticas y transitorias que se generan a partir de la tensión de energía liberada cuando se producen cambios microestructurales en un material determinado, el cual es comúnmente el aire (Gholizadeh et al., 2015).

Cabe resaltar que las características físicas de los sonidos le atribuyen un gran potencial biológico de señalización para transportar “información” con relevancia ecológica, ya que algunos trabajos dan indicios de que dichas señales físicas indicarían a la planta el estado del entorno inmediato, el cual es vital para el desarrollo de esta.

Las ondas mecánicas están naturalmente presentes en el medio ambiente y conllevan datos del entorno circundante, como, por ejemplo, la presencia de polinizadores, herbívoros, condiciones climáticas y recursos como el agua e incluso, la escasez de ésta (Khait et al., 2019). Recientemente se retomó el campo de investigación que involucra el cuestionamiento directo sobre si las plantas pueden percibir y/o, como algunos autores lo mencionan, “escuchar” el sonido. En este sentido se ha delimitado aún más el término bioacústica, a uno específico en las plantas, la fitoacústica (Khait et al., 2019).

Se ha propuesto en diversos estudios que, las EA y su aplicación en forma de tratamientos sonoros, podrían tener un valor significativo y sofisticado de adaptabilidad, reconocimiento y aprendizaje del entorno. Incluso, algunos trabajos han reportado el aporte de beneficios a sistemas de producción agrícola (Hassanien et al., 2014; Jung et al., 2018).

Asimismo, la evidencia sugiere que las plantas son capaces de procesar las propiedades del soporte mecánico que tienen para adaptar su estructura en función de la disponibilidad de agua y luz. Además, están dotadas de una forma de percepción que suscribe un comportamiento anticipatorio y dirigido a objetivos (Ceccarini et al., 2020). Todo lo anterior justifica el interés en los efectos del sonido en las plantas, ya que, en el conocimiento de sus mecanismos de respuesta converge el interés agrícola y biotecnológico por su potencial como elicitador / estresor (Alvarado et al., 2019; Ramirez-Estrada et al., 2016).

Se ha sugerido que el uso de factores de estimulación exógena en diversos cultivos es una tendencia que pretende adaptar estrategias enfocadas a aumentar la resiliencia de los cultivos y con el menor impacto ambiental posible y generando

alimentos que tengan mayor aceptación por parte de los consumidores (Caicedo-Lopez et al., 2021; Fernandez-Jaramillo et al., 2018).

Por otro lado, las EA también se han considerado como una señal que la misma planta es capaz de generar debido a un proceso dinámico, tal como la mecánica involucrada en sus procesos de ajustes hídricos, en los que tiene lugar el transporte de agua y masa. Este movimiento responde un flujo que abarca todo el tejido vegetal (Geitmann et al., 2019; Niklas et al., 2006). De hecho, las EA se consideran como una variable decisiva en el comportamiento fisiológico de las plantas y han sido utilizadas para investigar el estrés de las plantas inducido por la sequía (De Roo et al., 2016).

No obstante, existe una amplia inconsistencia en los dispositivos utilizados para medir EA en plantas, así como en los instrumentos y emisores de señales conocidos como actuadores que, son utilizados para la aplicación de tratamientos sonoros. Distintas publicaciones presentan una alta variabilidad en la ubicación del instrumento de medición con el que se ha pretendido descifrar diversas señales en las plantas. Así también, el tiempo de medición, como el uso de filtros de anchos de banda para bloquear el ruido experimental, la definición de condiciones ambientales, entre otras. Todo esto limita la reproducibilidad de las mediciones y la obtención de resultados similares, en cuanto a la exploración del comportamiento de algunas especies de interés. De esta manera, muy pocos estudios sobre aplicaciones de sonido justifican la relevancia biológica de utilizar algunos patrones acústicos, constituidos por una o varias frecuencias, siendo que las plantas, en su ambiente natural, están bajo el entorno de sonidos compuestos por múltiples frecuencias. Por lo anterior, se abre la oportunidad a un campo de estudio detallado en el que pudiesen explorarse la relación entre los patrones acústicos, intensidades de nivel de presión acústica y los cambios consecuentes asociados a un estado fisiológico de interés. Asimismo, muy pocos estudios sobre aplicaciones de EA conocen patrones o las componentes específicas de frecuencias y amplitudes generadas debido a un estado fisiológico asociado.

II.3 Principios mecánicos de la fitoacústica.

Una reciente revisión describió la mecánica de las interacciones fluido-estructura en las plantas, además de la relación entre la mecánica, la estática. El reporte describió la mecánica de las interacciones fluido-estructura en las plantas, además de la relación entre la mecánica, la estática y la dinámica en las interacciones planta-fluido. Así, esta información indica las fuerzas a las que están expuestas las plantas por el flujo de agua o el movimiento del viento (Gosselin, 2019). En este sentido, para establecer los fundamentos implicados en la percepción del sonido, conviene considerar que, en la percepción de determinadas ondas o estímulos mecánicamente ligeros, convergen en fenómenos aún poco analizados. La razón podría implicar la alta diversidad de modelos biológicos en la naturaleza y el sin fin

de condiciones que afectan las propiedades biomecánicas de los mismos. Por otro lado, también es posible referir algunos estudios que han profundizado en dichos fenómenos. Por ejemplo, en cuanto a la frecuencia de vibración de las plantas, se identificó por medio de vibrometría laser que, las plantas vibran a una velocidad de desplazamiento de acuerdo su estado hídrico, demostrando que, el agua presente en el tejido afecta los modos de vibración y la frecuencia natural de las plantas (Caicedo-Lopez et al., 2020). Dichos resultados fueron teórica y experimentalmente modelados matemáticamente en hojas de *Brassica rapa var. perviridis* (Sano et al., 2015).

Otro estudio se enfocó en la vibración como una herramienta de fenotipificación por medio de imágenes, utilizando plantas excitadas mediante cortos pulsos de aire (normalmente 100 ms). El movimiento resultante es grabado por una cámara de video de alta velocidad (100 fotos por segundo) para probar el comportamiento mecánico de la planta en varias direcciones y su correlación de espacio y tiempo, para plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana* K.), trigo (*Triticum EAstivum* L.) y álamo (*Populus* sp.). En el tabaco se demostró que el estrés hídrico disminuyó la frecuencia libre en un 15%, mientras que en trigo detectaron variaciones de menos de 1 g en la masa de espigas (De Langre et al., 2019) .

En tal sentido, resulta de interés explicar la interacción entre las leyes físicas y las propiedades biológicas de la planta. Además, podría ser fundamental para descifrar porqué existe una mayor respuesta fisiológica, genética y metabolómica bajo la exposición de algunos sonidos y no a otros, tal como sucede en los procesos de polinización. ¿Podría existir un fenómeno de resonancia entre el zumbido de los insectos y las flores? Aunque no se ha planteado en estos términos, en el cuadro 1, se muestran reportes destacados de los efectos del sonido en las plantas.

Recientemente, un aporte de esta relación entre el sonido y los cambios en plantas indicó que las flores de (*Oenothera drummondii* H.) podrían servir como un órgano sensorial, debido a una relación entre la vibración y la producción de néctar. Los autores utilizaron señales de sonido artificiales y grabaciones reales de abejas (*Apis mellifera*), encontrando que las grabaciones del sonido natural del aleteo incrementaban significativamente el contenido de azúcares en la flor, así como también lo hacía la exposición a bajas frecuencias (Veits et al., 2019).

Recientemente se reportó que las algas producen un sonido particular durante la fotosíntesis, sugiriendo que, el ruido resulta de la formación de oxígeno y liberación de oxígeno proveniente de los filamentos de las algas. La burbuja crea una fuente de sonido monopolar que se distribuye en el tejido. Esta explicación es útil para la cuantificación de oxígeno en algas. Los resultados muestran que las algas pueden producir sonido en circunstancias normales y que el sonido se produce en la banda de 2 a 20 kHz (Cai et al., 2016; Frongia et al., 2020).

Autores también han propuesto que las plantas pueden emitir sonidos en rangos

ultrasónicos (36 a 51 kHz) de forma remota o esporádica, de acuerdo con condiciones específicas de estrés como: corte, sequía, entre otros (Itzhak Khait et al., 2018). No obstante, algunos estudios hacen referencia a unidades no reconocidas desde el área acústica, tal como el número de picos de sonido y en intensidad de la señal sin especificar una asociación entre lo biológico y lo acústico. De tal manera que, existe una amplia incertidumbre sobre la validez de la instrumentación utilizada para mediciones de sonidos “emitidos” por las plantas. También, la generación de señales dependerá de la especie y sus respectivas características geométricas en cuanto a masa y rigidez, por lo que se cree que la caracterización de señales acústicas podría presentar altas variaciones entre individuos de distintas especies. Por otro lado, se considera que al igual que el tacto, el sonido es una fuerza mecánica externa que interactúa únicamente con la superficie de la planta (López-Ribera and Vicent, 2017).

Con respecto a los diversos fenómenos que implica la emisión y recepción de señales, otros trabajos de revisión han mencionado que el fenómeno de “resonancia” podría jugar un papel relevante en las interacciones biológicas de organismos como la planta y su medio de desarrollo. Esto se abordó en la revisión de (Gosselin, 2019), en la que se hace referencia a dicho fenómeno en los órganos de la planta. Por lo tanto, es posible que la acción de las algas y las olas podría relacionarse por resonancia si su frecuencia (ω) está cerca de una de las frecuencias naturales de la planta.

Cabe resaltar que la información revisada sugiere que, si la frecuencia de resonancia de un objeto está dictada por las propiedades del material, la geometría y la masa, estas propiedades biofísicas podrían contemplarse para aplicar tratamientos acústicos específicos que generen un efecto de resonancia con mayor potencial para respuestas de interés en las plantas.

II.4 Emisiones acústicas y la expresión de genes y proteínas

La explicación que existe entre la aplicación de sonido y su efecto en el contenido de proteínas en las plantas sugiere que las EA pueden resultar debido a un cambio de presión en el aire, semejante al contacto ligero con la pared celular de la hoja lo que se traduce en una cascada de señalización que involucra la síntesis de proteínas. Por ejemplo, la modificación estructural de proteínas asociadas a la membrana celular. Se reportó una fuerte inducción de xiloglucanos e hidrolasas después de la exposición de 50 Hz durante 30 minutos. (Zhao et al., 2003).

No obstante, aunque los fenómenos de sonido y contacto pueden estar relacionados, se ha demostrado que el efecto de ambos estímulos es diferente en plantas tratadas con EA, con respecto a plantas sometidas a acción mecánica, debido a una diferencia significativa en la expresión génica de canales de membrana (MSL3 y MCA) encargados del transporte de iones de calcio y potasio (Gosh et al 2017).

El modelo físico – biológico propuesto hasta ahora para explicar la interacción entre las ondas acústicas y las plantas, presenta una posible vía de señalización que contempla tanto la emisión como la recepción de señales derivadas de fenómenos vibratorios que originan el sonido (Jung *et al.*, 2018).

Otro estudio investigó el efecto de la estimulación de la síntesis de proteínas deshidrinas (DHN), asociadas al estrés hídrico. Su modelo biológico fue en semillas de *Pisum sativum*, cultivadas en condiciones de estrés hídrico. Dicha investigación utilizó estimulación acústica dirigida a partir de secuencias acústicas obtenidas a partir del cálculo la masa de cada aminoácido que conforma las proteínas de interés. Aunque no reportan las frecuencias de sonido utilizadas (en patente), determinan un efecto de estimulación de la síntesis de las DHN (37kDa), además de alargamiento del brote e incremento en peso fresco (Prévost *et al.*, 2020). Ver cuadro 1.

II.5 Emisiones acústicas y metabolitos secundarios

Un estudio reportó que la concentración de ácido salicílico (SA) incrementa en las plantas tratadas con sonido generado por la vibración de patógenos. En contraste, el nivel de ácido jasmónico (JA) en las plantas tratadas con grabaciones de dichas vibraciones permaneció estable pero más bajo que las plantas control. Dichos hallazgos, sugirieron que el tratamiento de SV vigoriza el sistema de defensa de la planta regulando el efecto de protección mediado por SA, promoviendo en consecuencia la resistencia inducida por SV en *Arabidopsis* contra el hongo *Botrytis cinérea* (Choi *et al.*, 2017).

Resultados reportados por Kim *et al.*, 2020 demostraron que los tratamientos con ondas sonoras alteran el contenido total de flavonoides dependiendo de las etapas de crecimiento, la especie, la frecuencia de la señal aplicada y el tiempo de exposición a las ondas. Los tratamientos para alfalfa (250 Hz), brotes de brócoli (800 Hz) y brotes de rábano rojo joven (1 kHz) aumentaron el contenido total de flavonoides en un 200%, 35% y 85%, respectivamente, en comparación con el control no tratado. El análisis molecular indicó que el sonido induce la expresión de genes asociados a la biosíntesis de flavonoides y mejora significativamente la el potencial antioxidante de los brotes (Kim *et al.*, 2020).

Otro estudio con plantas expuestas a señales de vibraciones (SV) de 10 kHz mostró una modificación significativa del gen *H3K27me3* en las regiones promotoras de la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos y genes de señalización de citoquininas, indicando que las SV inducen transcripcionales que promueven la inmunidad. También, se redujo la expresión de *miR397b*, activando tres transcritos de *laccase* diana, reconocidas por ser mediadoras del refuerzo de la pared celular a través de la acumulación de lignina (Bacete & Hamann, 2020; Jung *et al.*, 2020).

En conjunto, SV desencadena la modificación epigenética de genes implicados en

la biosíntesis de metabolitos secundarios, la señalización de la hormona de defensa y la defensa preformada en *Araïdopsis thaliana*, lo que lleva a la activación de la inmunidad de las plantas contra *R. solanacearum* (Jung et al., 2020).

II.6 Emisiones acústicas y cambios en las variables fisiológicas

Se ha mencionado que la fitoacústica resulta punto de inflexión en la investigación que asocia los fenómenos físicos acústicos y su relación con el reino vegetal (Allievi et al., 2021). También ha replanteado el concepto, no solo de la percepción del sonido en las plantas (Khait et al., 2019), sino del potencial biotecnológico de las ondas sonoras como regulador del crecimiento (Mohanta, 2018); cambios en los perfiles transcriptómicos que podrían ser indicadores de biomarcadores específicos para la percepción del sonido (Kim et al., 2018). Evidencia adicional ha sido reportada para los efectos fisiológicas generados por los sonidos en plantas, más allá de los desencadenantes químicos (Jung et al., 2018).

En estos trabajos se exponen características ya demostradas sobre las respuestas y los mecanismos eco fisiológicos de las plantas y el sonido, en las que se incluyen lo siguiente: la activación de iones a través de canales mecanosensibles (Monshausen & Haswell, 2013; Peyronnet et al., 2014), la comunicación de célula a célula mediante la propagación de especies de calcio y oxígeno reactivo (Kurusu et al., 2013), expresión de genes inducibles por contacto (Braam & Braam, 2004) y cambios fitohormonales (Chehab et al., 2009).

La percepción de las ondas sonoras en las plantas también podría desempeñar un papel fundamental en la configuración ecológica y evolutiva. La percepción de señales sonoras podría tener potencial para afectar el crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas. Por lo tanto, el tratamiento de ondas sonoras se puede utilizar como inductor /regulador del crecimiento. Sin embargo, aún se desconoce el receptor molecular específico del sonido, aunque se han propuesto los mismos canales iónicos mecano-sensibles al tacto, presentes en la membrana plasmática, esto tiene cierto sentido, ya que el sonido es un cambio de presión en el aire que, al impactar en una superficie, en este caso la planta, actúa como toques sutiles a diferentes frecuencias. No obstante, la expresión puede variar con respecto a la amplitud y frecuencias del sonido. Por tal razón, el sonido podría afectar la señalización que ejerce el calcio en las plantas y regulación que ejerce éste en las moléculas involucradas en el crecimiento, alto de tallo, ancho de talla, número de hojas, dosel, fotosíntesis, transpiración conductancia estomática, entre otras variables fisiológicas como rendimiento de biomasa y otras variables de interés en la producción agrícola (Mishra & BEA, 2019; Sparke & Wünsche, 2020).

II.7 Metodologías de aplicación en los tratamientos acústicos

Los desafíos de la investigación del sonido aplicado en plantas se deben a las variaciones y posibles fuentes sonoras que tienen lugar en campo abierto.

Adicionalmente, se consideran posibles interacciones biológicas con otros seres vivos que podrían ocasionar “contaminación acústica” de riesgo para otros organismos en caso de sobrepasar límites de ruido.

Las EA y sus respectivas frecuencias e intensidades tienen mayor potencial de uso en cultivos intensivos y controlados. Considerando también que ciertos sonidos podrían ser beneficiosos para unos organismos, mientras que podría no serlo para otros. En tanto que, podrían inducir efectos negativos para el crecimiento y desarrollo de otras plantas o interferir en la ecolocalización de insectos y/o aves, lo cual requiere profundizar en la investigación.

Finalmente, se sugiere que podría ser mejor aplicar ciertas frecuencias y quizás restringir otras en los tratamientos con ondas sonoras. Para esto, se muestran algunos reportes recientes en la tabla 1. Las bandas de frecuencia del sonido naturalmente audible pueden dividirse en los siguientes rangos sugeridos por (Allievi et al., 2021).

- Bandas de baja frecuencia, de 20 Hz a 200 Hz
- Bandas de frecuencia media-baja, de 200 Hz a 1 kHz
- Bandas de frecuencia media-alta de 1 kHz a 5 kHz
- Bandas de alta frecuencia de 5 kHz a 20 kHz

A continuación, se muestra el cuadro 1. Con resultados actualizados que asocian los fenómenos acústicos y su efecto en las plantas.

Cuadro 1. Aplicación de sonido en plantas

| Sistema biológico | Órgano | Frecuencia de sonido (Hz) - Nivel de presión acústica (decibelios) | Tiempo de exposición | Distancia de la fuente de sonido | Efectos en cambios biológicos | Referencia |
|--|-------------------------------|---|--------------------------|----------------------------------|---|--|
| <i>Chrysanthemum</i> | Callo | 1000 Hz 100dB | 60 min - 3 días | 0.2 m | Mejoramiento de la actividad enzimática PMTH+ y ATPasa | (Xiujuan et al., 2003) |
| <i>Dendrobium candidum</i> | Tejido foliar, tallo y raíces | 1000 Hz 100dB | 60 min – 9 días | Ns | Las actividades de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX) incrementaron en diferentes días en todos los tejidos | (Li et al., 2008) |
| Diversas frutas y hortalizas | | Sonido de baja frecuencia con tecnología (PAFT) con 0.08-2kHz | Ns | Ns | Los rendimientos de pimiento, pepino y tomate incrementaron 63,05%, 67,1% y 13,2%, respectivamente. La incidencia de enfermedad en tomate tratada disminuyó en 6, 8, 9, 11 y 8 para araña roja, pulgones, moho gris, tizón tardío y enfermedades víricas. | (Hou et al., 2009) |
| Fresa | Fruto | QGWA-03 plant audio apparatus /Ns | 3 horas | Ns | Incremento en el crecimiento (área foliar y tasa fotosintética), resistencia a enfermedades | (Qi et al. 2010) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Tejido foliar | 250 Hz y 500 Hz 80 dB | 1 hora 8- 24 horas | Ns | Incremento en la expresión de genes y proteínas relacionadas a la fotosíntesis, defensa al estrés y metabolismo del nitrógeno | (Kwon et al., 2012) |
| <i>Fragaria ananassa</i> | Fruto | Plant acoustic frequency technology (PAFT) 100 dB | 180 min - Diariamente | Ns | Incremento en el número de hojas, flores y calidad del rendimiento. resistencias a enfermedades | (Meng et al., 2012) |
| Frijol | Fruto | 1000–1500Hz, 1500– 2000Hz , and 2000–2500Hz-80dB, 90dB , 100 | 72 horas | Ns | Las ondas sonoras pueden reducir el período de germinación del frijol Mungo y aumentar el crecimiento con frecuencia e intensidad distintas. | (W. Cai et al., 2014) |
| Planta de arroz <i>Arabidopsis thaliana</i> | Tejido foliar | 0, 0.25, 0.5, 0.8 , 1.0, 1.5 kHz-100dB Ruido blanco a 100 dB | 24 horas 10 horas | Ns | Incremento en Peróxido de hidrógeno y tolerancia a sequía Incremento del 24.8% de sobrevivencia en tolerancia a sequía | (Jeong et al., 2014; López-Ribera & Vicient, 2017) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | | 500, 1000 y 3000 Hz - 100 dB. | 3 horas -10 días | Ns | Aumente el ácido indol acético (IAA) -Auxina, Ácido de giberelina (GA), aumento de glucosinolatos, antocianinas. | (Appel & Cocroft, 2014) |
| Diversas frutas y hortalizas | Tejido foliar y Fruto | 100-100 Hz – 70 ± 5 dB | 3 horas | 0.20 m | Aumentó el rendimiento de pimiento dulce, pepino y tomate en 30.05, 37.1 y 13.2%, respectivamente | (Hassanien, HOU, et al., 2014) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Brote | 500 Hz – 80 dB | 1 hora - 10 días | Ns | Incremento en la expresión de genes de defensa, incremento en expresión de genes de homeóstasis en procesos de oxidorreducción | (Choi et al., 2017) |
| <i>Oenothera drummondii</i> | Flores | Baja frecuencia: 50- 1000 Hz-75 dB Frecuencia Intermedia: 35- 34 kHz Alta frecuencia:160 a 158 kHz | 3 minutos-10 centímetros | Ns | Respuesta rápida al sonido asociado a polinizadores e incremento en el contenido de azúcares en néctar de flores | (Veits et al., 2019) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Tejido foliar | Aplicación de grabación de vibraciones a una amplitud de 2.5 mm/s | Ns | Ns | Cambios en el perfil de compuestos volátiles y fitohormonas (ácido metil salicílico y ácido metil jasmónico) | (Body et al., 2019; Kollasch et al., 2020) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Tejido foliar | Vibración de sonido (SV) 0.2, 1, 5, 10, 15 y 20 kHz - 90 dB | 3 horas - 10 días | Ns | Modificación epigenética de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, señalización de hormonas de defensa y la activación de la inmunidad vegetal contra <i>R. solanacearum</i> . | (Jung et al., 2020) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Raíces | Vibración de sonido (SV) 0.2, 1, 5, 10 , 15, and 20 kHz – 90 dB | 3 h – 10 días | Ns | Modificación epigenética de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, la señalización hormonas de defensa activando la inmunidad de las plantas contra <i>Ralstonia solanacearum</i> . | (Jung et al., 2020) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | semillas | Sonido de música clásica, aves, insectos y agua – 50 dB | 40 minutos | Ns | | (Bhandawat et al., 2020) |
| <i>Capsicum annuum</i> L. | Tejido foliar y frutos | Multitono en Hz LHS: 50, 360, 480,600,1700 MHS: 240, 320, 480, 525 HHS: 240, 291, 445, 570 | 1 - 3 horas - 7 días | 1.2 m | Los tratamientos acústicos LHS, MHS y HHS regularon a la peroxidasa (<i>Pod</i>), superóxido dismutasa (<i>Mn-sod</i>) y fenilalanina amoniaco-liasa (<i>Pal</i>) positivamente. El tratamiento MHS incrementó el contenido de capsaicinoides 5,88 veces. | (Caicedo-lopez et al., 2021) |

Ns: No especificado; En negrita, datos con efectos destacados

Información obtenida de literatura citada y organizada por el autor

II.8 Características de la sequía y estrés hídrico

El aumento de fenómenos climáticos afecta el sector agrícola, dada la dependencia que tiene la producción de alimentos de las condiciones climáticas. La sequía es uno de los factores que más amenaza la seguridad alimentaria (Bruinsma, 2017; FAO, 2018).

El crecimiento y el rendimiento de los cultivos se ven afectados negativamente por un suministro de agua sub-óptimo y temperaturas anormales, causando daños físicos, alteraciones fisiológicas y cambios bioquímicos (Fahad et al., 2017). La sequía desencadena una 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. Fisiológicamente al ocurrir un desbalance del estado hídrico de la planta, se afecta el balance de energía, las relaciones fotosintéticas y conductancia (Fernandez-Marin et al., 2020).

Lo anterior se explica también porque los cambios drásticos en la energía libre de las moléculas de agua, no sólo modifican el potencial hidráulico sino que existen destacadas variaciones de éste fenómeno entre especies (Taíz and Zeiger, 2006), Para soportar el estrés por sequía, las plantas cierran sus estomas para garantizar la turgencia y mantener el metabolismo celular. En la medida que estos se cierran, se reduce la tasa fotosintética, las plantas deben ajustar de forma constante su conductancia estomática para permitir suficiente entrada de CO₂ y evitar pérdidas de agua innecesarias durante el estrés. En consecuencia, las plantas deben sentir permanentemente el déficit hídrico (Prasch & Sonnewald, 2015). Aunque el estrés por sequía es uno de los problemas más severos que afecta la producción agrícola, el progreso en el desarrollo de cultivares resistentes es limitado, así como el mantenimiento homogéneo de un nivel de producción permanente.

Para tener información sobre el nivel de tolerancia a este tipo de condiciones ambientales, se han utilizado índices como el índice de tolerancia al estrés (STI), la productividad media geométrica (GMP) y el índice de estabilidad del rendimiento (*yield stability index*)(YSI), entre otros (Khalili et al., 2016; Hatfield et al., 2019)).

Se ha recomendado que el STI pudiese utilizarse mejor en los programas de fitomejoramiento. También el índice, criterio de selección integrado (CSI), que proporciona una estimación de la resistencia al estrés por sequía basada en el rendimiento de grano y características agronómicas relacionadas, y por lo tanto sería útil para identificar genotipos superiores resistentes a la sequía en programas de mejoramiento (Hatfield et al., 2019)

Para determinar el efecto del estrés hídrico en las plantas, se caracterizan morfológicas, fisiológicas, metabólicas, entre otras. Por ejemplo, los sistemas de intercambio de gases por medio de diversos sensores, principalmente de CO₂, determinan la pérdida de vapor de agua a partir de la cual se calculan la transpiración y el intercambio de CO₂. También se puede utilizar el contenido de

clorofila como un indicador indirecto o en combinación con el intercambio de gases, para evaluar la competencia fotosintética (Hideg et al., 2003).

Para establecer la tolerancia a la sequía, es indispensable contemplar las características del sustrato o suelo como el medio "natural" de desarrollo, en tanto no se presenten problemas de aireación en las raíces. La sequía ocasiona una absorción de agua insuficiente para equilibrar la pérdida de agua experimentada por la planta en un período prolongado de tiempo. Con el cese del riego, el agua se elimina del suelo a un ritmo que depende de la cantidad total de agua perdida por la planta a la atmósfera (la de la superficie del suelo es relativamente pequeña y generalmente se ignora) (Wasaya et al., 2018).

La tasa de transpiración y la conductancia cuticular están determinadas en gran medida por la superficie epidérmica. Esto puede resultar importante cuando las estomas están cerradas, los tricomas y otras estructuras en la superficie pueden afectar la conductancia de la capa límite / superficial de la planta y alterar la temperatura de la hoja (Berry et al., 2019).

A pesar de la importancia conocida de estos factores en las relaciones hídricas y que pueden afectarse otras características, la tasa de suministro de agua del suelo a la planta influye en el agotamiento del agua del suelo. Esto depende en parte de la cantidad de agua disponible en el suelo, del volumen de suelo explotado por las raíces, ignorando el transporte de agua desde fuera de la zona de las raíces, ya que es no aplicable en estudios con muestras pequeñas pero importante en el campo (Qiu et al., 2023).

Se ha prestado poca atención a estos aspectos en los estudios de plantas genéticamente modificadas, ya que se asume que las raíces explotan completamente el suelo y no limitan el suministro de agua. Sin embargo, se ha prestado mucha atención a los cambios metabólicos, por ejemplo, en metabolitos como la prolina que pueden alterar la condición osmótica de la planta y así como las acuaporinas que pueden afectar la conductancia al flujo de agua. El marchitamiento tardío y otros síntomas de estrés hídrico son causados por una tasa lenta en la pérdida total de agua, aunque algunos estudios consideran que la planta puede retener agua incluso cuando el agua del suelo se agota (Ishibashi et al., 2011).

A partir de la revisión bibliográfica, es posible inferir que la definición precisa del "estado del agua" en diferentes partes del sistema suelo-planta para la formulación y prueba de cualquier hipótesis mecanicista rigurosa asociada al estrés hídrico, aún requiere profundización y consenso.

Sumado a lo anterior, la medición del "estado hídrico" es indicador de un estado fisiológico que otorga confiabilidad de las estimaciones que se reportan en las publicaciones, es necesario caracterizar y conocer los intervalos que confieren funcionalidad al sistema biológico objeto de estudio.

Características asociadas como la relación morfológica con las dimensiones del tallo y la raíz, son variables morfológicas predictoras de ciertos comportamientos. Por ejemplo, un mayor diámetro de raíz principal puede indicar mayor crecimiento debido a su relación directa con la absorción de agua. Mientras que, las raíces finas son más permeables y se cree que tienen mayor capacidad para absorber agua, principalmente en plantas herbáceas. Estos niveles de agua en diferentes tejidos proporcionan información útil para el manejo de cultivo (Wasaya et al., 2018).

Al medir el estado hídrico del suelo, es útil distinguir la causa y el efecto del déficit hídrico. Generalmente, las tensiones subyacentes en el sistema; el estado hídrico de las hojas, entre otros, es el resultado del déficit hídrico del suelo (Jones., 2007).

Las medidas disponibles del estado hídrico del suelo o de las plantas se pueden dividir ampliamente en aquellas basadas en (i) la cantidad de agua o en (ii) su estado energético. Los principios y la práctica subyacentes a la cuantificación y medición del estado hídrico del suelo y de las plantas han sido bien descritos en la literatura (Slatyer, 1967; Boyer, 1995; Nobel, 1999; Mullins, 2001; Kirkham, 2004).

Para soportar el estrés por sequía, las plantas cierran sus estomas para garantizar la turgencia y mantener el metabolismo celular. En la medida que estos se cierran, se reduce la tasa fotosintética, las plantas deben ajustar de forma constante su conductancia estomática para permitir suficiente entrada de CO₂ y evitar pérdidas de agua innecesarias durante el estrés. De tal modo que, la variación y dinámica en la conductancia hidráulica dentro de las hojas, puede contribuir a las respuestas adaptativas de la planta (Buckley., 2019).

Como se ha mencionado, la sequía desencadena una amplia variedad de respuestas en las plantas que van desde el metabolismo celular hasta cambios en las tasas de crecimiento, el rendimiento de los cultivos y afectando procesos fisiológicos de balance de energía y relaciones fotosintéticas (conductancia estomática). Todo esto reduce el crecimiento y rendimiento de los cultivos, afectando negativamente la producción de alimentos (Fahad et al., 2017).

II.9 Modelo biológico: *Capsicum annuum* L. generalidades e importancia

El pimiento o fruto de chile (*Capsicum* spp.) es un miembro de la familia de las solanáceas (Parson et al. 2013). La especie que corresponde a *Capsicum annuum* L. es una de las más diversas entre las solanáceas y en la actualidad, el interés en las distintas variedades y ejemplares se acentúa en la búsqueda de estrategias que permitan un manejo resiliente del cultivo, aumentar su rendimiento y la calidad de los frutos (Paran y Van der Knaap, 2007). El cultivo del chile es más destacado en países cálidos y semiáridos donde el agua suele ser un factor limitante para la producción. Esto requiere una mejor gestión del riego (Dorji et al., 2005).

El chile junto con el tomate son las hortalizas de mayor importancia económica en

México. El chile aporta el 20.2% en la producción de hortalizas a nivel nacional. Para 2019, el SIAP (2020) reporta una producción nacional de 3,238,244.81 toneladas de chile. En los últimos 15 años la superficie destinada al cultivo de chile ha incrementado de 40 mil hectáreas hasta 147 mil hectáreas anuales del cultivo en el país. Sin embargo, no hay suficiente información sobre su cultivo en tierras altas. Por ejemplo, los cambios fisiológicos y químicos que se producen en chile debido a diversos déficits hídricos han sido reportados previamente bajo distintos niveles de riego. La investigación sugirió un crecimiento normal en el control al 100% de riego). Las plantas con 50% de riego se vieron menos afectadas que las del tratamiento al 25% de riego, mostrando notables síntomas de estrés como marchitamiento de las hojas, reducción del crecimiento, desarrollo y reducción del rendimiento (Deveci and Pitir, 2016).

II.10 Restricción de riego e incremento de capsaicinoides

Las rutas metabólicas de las plantas son complejas y la demanda de metabolitos secundarios resulta de una respuesta al estrés durante el estrés abiótico. En cuanto al estrés por sequía, se sabe que el déficit hídrico puede hacer que las plantas experimenten ajustes como: Incremento en la producción de ácidos fenólicos y flavonoides, otros compuestos antioxidantes como glutatión, ácido g-aminobutírico (GABA), terpenoides, compuestos orgánicos volátiles (VOC), entre otros (Yeshi et al., 2021). En el caso del fruto *Capsicum*, el metabolito secundario característico y de biosíntesis exclusiva en la especie es la capsaicina y sus derivados, los capsaicinoides (Naves et al., 2019). El primer estudio que propuso que la escasez de agua podía inducir un incremento del metabolismo y la acumulación de capsaicinoides, se reportó hace más de 20 años (Estrada et al. 1999). Otros autores han sugerido que el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina (CAPs) en los frutos de chile, incrementa hasta ~ 3,6 veces el contenido al exponer las plantas a estrés hídrico. Estos autores sugirieron que los resultados observados se derivan de la competencia entre la biosíntesis de CAP y otros metabolitos fenilpropanoides (Okunola et al., 2017).

Sung et al. 2005 encontraron resultados similares en tratamientos de déficit hídrico. Sus muestras alcanzaron un contenido máximo de CAP a los 30 días después de la floración (DAF), 3,84 veces más alto que los controles. Además, en el pericarpio, la concentración de capsaicina alcanzó un contenido máximo a 50 DAF y fue 4,52 veces mayor que en el tratamiento de control (Sung et al. 2005).

Se demostró que el efecto de la sequía podría incrementar el contenido de capsaicinoides en plantas de chile y cultivares poco picantes o de baja pungencia (170% a 721%), mientras que los cultivares de pungencia media incrementaron entre el 113% y el 141%. El contenido de capsaicinoides de las plantas estresadas por la sequía en los cultivares de alta pungencia disminuyó ligeramente (3% a 8%)

(Phimchan et al. 2012). Sin embargo, aunque la restricción de riego puede inducir incremento de los capsaicinoides, el riego suficiente es fundamental para obtener crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo chile.

Por lo tanto, una disminución en el rendimiento de la planta es una consecuencia del estrés por sequía y debe considerarse que, un estrés hídrico aproximado del 75% de la capacidad del campo (CC) puede afectar el rendimiento del cultivo y reducir las características agronómicas y fisiológicas (Honorata DP, 2017).

Aunque diferentes estudios han sugerido que el estrés hídrico puede aumentar el contenido de CAPs, también se ha mencionado que un nivel de estrés hídrico severo puede reducir la acumulación de capsaicinoides. Por ejemplo, recientemente se indicó que el contenido de capsaicinoides y el rendimiento de frutos de cultivares de alto contenido de capsaicinoides o alta pungencia, variedad BHG1719, presentaron menor susceptibilidad a cambios bioquímicos debido a la exposición a sequía (Jeeatid et al. 2018).

Otra investigación demostró que la influencia del riego para dos especies de *Capsicum* (*Capsicum annuum* L.) “Chili-AS Rot” y *Capsicum Chinense* Jacq “Naga Morich”) presentaron una respuesta no lineal en la acumulación de capsaicinoides con respecto al riego. Los autores reportan que la CC al 100% y una menor CC (50%) puede considerarse déficit hídrico, dónde observaron que el fruto Chili-AS Rot aumentó el contenido de capsaicinoides de 8.8 a 28.8 mg / 100g de materia fresca, mientras que el cultivar Naga Morich disminuyó su contenido de capsaicina de 2750.4 a 1808 mg / 100g de materia seca (MS) (**Zamljen et al., 2020**).

II.11 Aplicación de sonido y su efecto en tolerancia a sequía y acumulación de metabolitos secundarios

Las ondas sonoras se caracterizan por frecuencia (Hz), intensidad (dB) y timbre. La velocidad de propagación del sonido depende de las características del medio; en particular, es directamente proporcional a la elasticidad e inversamente proporcional a la densidad.

Todos los objetos vivos y no vivos tienen frecuencias de resonancia y están asociados con sus frecuencias naturales. Las frecuencias naturales de un objeto dependen de su masa, rigidez y estructura. Esas frecuencias son aquellas en las que el objeto oscila con mayor amplitud tras un estímulo mecánico externo que perturba su posición inicial (Bidhendi & Geitmann, 2019). La primera frecuencia natural de un objeto se llama frecuencia fundamental. En el caso de los objetos vivos, como las plantas, su masa y rigidez definen sus frecuencias naturales, y son afectados por el estado fisiológico que, en parte, puede modificarse por su estado hídrico.

Por otro lado, las emisiones acústicas inducen la producción fitohormonas como el

etileno, ácido abscísico (ABA), auxina, brasinoesteroides (BR), óxido nítrico (NO) y jasmonatos (JA), los cuales también están implicados en la mecano estimulación (Chehab et al., 2009; Mishra & BEA, 2019). Esta respuesta se ha asociado a la sensibilidad que tiene la membrana celular a la vibración que pueden percibir las plantas y cuyo origen puede ser el viento, el tacto con otro tejido vegetal, polinizadores e insectos.

Se ha sugerido que las plantas al ser tratadas con EA pueden reducir la conductancia de sus estomas y así activar el uso de vapor de agua, aumentar la apertura de canales del xilema, lo que podría estar involucrado en una vía de señalización que converge con la percepción mecánica. La emisión de VOC transmitidas a través de floema (Wu and Baldwin, 2009; Evans and Morris, 2017).

El mecanismo de percepción al sonido mencionado, coincide con el efecto ejercido por la percepción mecánica, ha sido sugerido como una posible explicación de la respuesta positiva de tolerancia a sequía en plantas estimuladas con EA.

Por ejemplo, se reportó que las EA indujeron una disminución del tamaño de hoja y el incremento de la conductancia estomática mejorando el estado hídrico foliar y el rendimiento en plantas de arroz (Jeong et al., 2015).

Otro estudio demostró que plantas tratadas con EA incrementaron la sobrevivencia de plantas *Arabidopsis thaliana* L durante periodos de sequía: (24,8%) en comparación con plantas mantenidas en silencio (13,3%), regulación de 87 genes (31 de respuesta al estrés abiótico (López-Ribera and Vicient, 2017).

Por todo lo anterior, se plantea que si las plantas de *Capsicum annuum* L al experimentar determinado nivel de estrés hídrico, pueden sufrir modificaciones de su estado geométrico, de masa y subsecuente modo de vibración natural, una posible explicación que ha sido propuesta para un tipo de comunicación no química que podría explicar la señalización entre plantas (Langre et al., 2019; Stabile et al., 2022). De este modo, las señales de frecuencia que emiten las plantas pueden medirse y transformarse a sonido en forma de EA, como un tratamiento emulador de señales planta-planta y con potencial para inducir respuestas medibles.

Por todo lo anterior, se propone que la aplicación de EA obtenidas a partir de señales de vibración de las plantas, tienen potencial para ejercer una respuesta de mayor tolerancia a sequía y estimular el metabolismo secundario, incrementando la acumulación de capsaicinoides en fruto.

III. Hipótesis

Los patrones de vibración característicos del estrés hídrico en plantas *Capsicum annuum* L, tienen potencial para aplicarse como emisiones acústicas (EA) e inducir tolerancia al estrés hídrico e incrementar la síntesis de metabolitos secundarios asociados al estrés por sequía

IV. Objetivo general

Identificar patrones de vibración de *Capsicum annuum* L y reproducirlos como tratamientos en forma de emisiones acústicas (EA) para evaluar su efecto en la inducción de tolerancia sequía e incremento de metabolitos secundarios.

V. Objetivos específicos

1. Identificar las frecuencias (Hz) y amplitudes (dB) por vibrometría laser, que sean características de *Capsicum annuum* L en tres condiciones de estrés hídrico.
2. Seleccionar señales de desplazamiento y vibración mediante frecuencias (Hz) y amplitudes (dB y mm/s) con mayor repetibilidad entre muestras en tres condiciones de estrés hídrico *Capsicum annuum* L.
3. Elaborar tratamientos acústicos basados en patrones de frecuencias previamente seleccionadas en objetivo 2 para usar como elicitador físico en condiciones de invernadero.
4. Determinar el efecto de EA en cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares relacionados a la producción de capsaicinoides y respuesta antioxidante en plantas de *C. annuum* L. en distintas etapas fenológicas
5. Establecer el tratamiento biofísico basado en EA con potencial para elicitación de plantas *C. annuum* L.

VI. Materiales y Métodos

VI.1 Material biológico

Las plantas de *Capsicum annuum* L. (Solanáceas) se obtuvieron del semillero del área de Biosistemas de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro (2018) Campus Amazcala. El sustrato de suelo utilizado fue PEAT MOSS (Sunshine Mix 3), del proveedor Impulsora Agroquímica del Sureste S.A. de C.V., México. Se utilizó una mezcla comercial de suelo franco-arenoso ajustado con riego a capacidad de campo. La germinación realizó durante 3 días de oscuridad y un total de 6 días de incubación a una temperatura promedio (°T) de 25 °C y 53% de humedad relativa (HR%). El pH del agua de riego en germinación se mantuvo entre 6,5 y 7,3. Las características del sustrato se pueden localizar en el número de

catálogo # 1001 SUNAGRO-HORTICULTURE CANADA, el cual cita las siguientes características del sustrato: porosidad total de 84,1%, aireación 1%, agua fácilmente disponible 33,8%, agua de reserva 14%, agua total disponible 48%, capacidad de retención de agua 69,5% y densidad aparente 0,107 g / cm³. Las plantas fueron trasplantadas a los 30 días de germinación y se mantuvieron hasta un desarrollo vegetativo identificable como etapas fenológicas: antesis (joven) y fructificación. Las plantas estuvieron monitoreadas y mantenidas con densidad de flujo de fotones fotosintéticos, por sus siglas en inglés (PPFD) en un intervalo de 3000 a 4500 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ utilizando un solarímetro SM-206, un fotoperiodo monitoreado de aproximadamente 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, temperatura entre 25-28 \pm 2 °C día / noche, pH del agua de riego entre 7.3 - 8.5, fertilización basada en la formulación Steiner convencional (Steiner, 1984), los datos de HR (14 - 36%) y θ_T (18 -27 °C) fueron registrados en el equipo y software ElitechLog V4.4.0.

VI.2 Identificación de características asociadas al estrés hídrico para medición de patrones vibratorios.

La restricción del riego se realizó para establecer tres tratamientos de estrés hídrico, identificados como estrés hídrico bajo: LHS; estrés hídrico medio/moderado: MHS y estrés hídrico alto: HHS. Cada nivel de estrés hídrico se relacionó a un intervalo de días con limitación de riego y se midió su potencial mátrico (Centibar/kPa), utilizando el medidor WATERMARK- Item # 6450WD.

VI.3 Selección de metodología para detección de señales acústicas

La clasificación del estrés hídrico de las muestras se realizó con respecto a los días de restricción hídrica y medición de potencial mátrico, como se indica en la tabla 1. los sistemas de laser permiten un escaneo sin contacto, con una mejor calidad en la transducción de la señal espaciotemporal y una mayor resolución de esta, con la posibilidad de tomar elementos de referencia y comparar espectros entre muestras con diferentes condiciones.

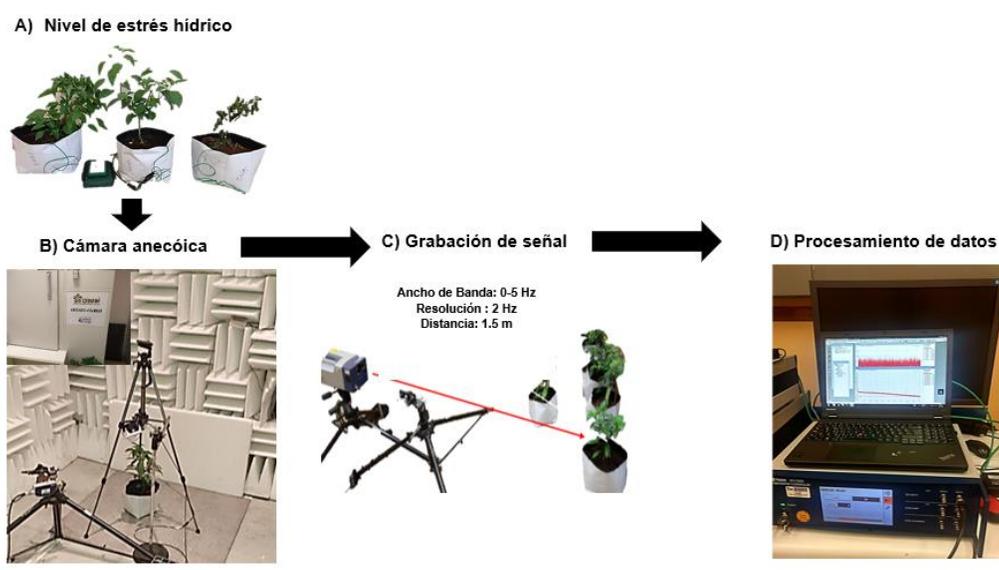
Tabla 1. Diseño experimental para caracterización de la muestra

| Unidad Experimental (UE) | Plantas <i>Capsicum annum</i> L | | |
|---|---------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| Factores | Niveles | | |
| Suspensión de riego en plantas | Bajo (LHS) | Medio (MHS) | Alto (HHS) |
| | 3 - 5 días | 5 - 9 días | > 10 días |
| Edad fenológica (meses después trasplante) | Adultas | Jóvenes | |
| | 5 | 3 | |
| Variable de respuesta: | Patrón oscilatorio: | Intensidad: amplitud de la señal | |
| Repetibilidad entre Muestras (N=10) | Frecuencia (Hz) | en decibelios (dB) | |

VI.4 Medición y selección de señales de frecuencia y amplitud por vibración mediante el uso de vibrómetro laser

Se midió el espectro de la velocidad de desplazamiento vibratorio de las plantas utilizando un vibrómetro laser, de diferentes plantas bajo condiciones de estrés hídrico. Se adaptó un arreglo de dos vibrómetros que funcionaron así: uno, como el sensor de movimiento láser por escaneo Polytec 3D (PSV-3D) y el otro fue el sensor láser de un solo punto acoplado como referencia. Head OFV-534 (Brüel & KjEAR, Alemania). El segundo instrumento se utilizó como punto de referencia. La ubicación de ambos láseres se estableció a 1,5 m de distancia de la planta (consulte la figura 1, configuración experimental). El escaner 3D se colocó en el mismo eje del tallo principal de la planta, y el de un solo punto se colocó a 90° del eje de medición. La señal de referencia se direccionó hacia a la parte más baja de la planta, donde comienza el tronco principal. La medición se realizó en el centro geométrico del sistema a 10 cm por encima de la capa de sustrato, durante la medición, el láser estuvo directamente encima del punto de referencia. Se utilizó una placa de pruebas óptica rígida y altamente amortiguada junto con soportes compatibles para suprimir la vibración del suelo. El ruido acústico de fondo se mantuvo por debajo de 6 dB mientras, se hicieron mediciones donde se registraron datos de muestras inertes de pieza de madera y superficies metálicas para calibrar el instrumento. La sensibilidad del instrumento se configuró para detectar desplazamientos de 5 mm por cada voltio. Se colocó una cinta reflectante en el vástago (punto de señal) para aumentar la calidad de la señal.

Figura 1. Configuración experimental de mediciones laser Doppler en plantas de chile jalapeño *C. annuum* L.



A). Determinación de estrés hídrico antes de colocar las muestras en la cámara. B) La cámara anecoica trabajó con una salida de ruido de fondo de $-6 \pm 0,5$ dB. C). La grabación de la señal se obtuvo de 2 láseres, un láser de escaneo 3D y un láser de un solo punto como referencia. D) La adquisición masiva de señales se transdujo utilizando un controlador adaptado al software B&K Germany Labshop para el procesamiento de datos.

Cada planta se consideró como un sistema completo, incluyendo el sustrato del suelo. Las señales se tomaron dentro de una cámara anecoica, con una velocidad de flujo de aire de 0 m / s, 22-25 °C y 40-42,5% de humedad relativa (HR) (HM34-Vaisala, EE. UU.). La iluminación medida, durante las 2 horas de medición fue de 0,930 W/m². Se consideró un tiempo de 20 min para estabilizar la planta una vez que esta se coloca dentro de la cámara anecoica antes de iniciar las mediciones. Los resultados se obtuvieron a partir de 600 señales registradas obtenidos en cada una de las 50 mediciones por punto (punto / segundo).

VI.5 Identificación de la primera frecuencia natural

La identificación de la primera frecuencia natural se realizó mediante una estimulación mecánica, desplazando el centro geométrico de la planta, siguiendo la metodología reportada por (Sano et al., 2013, 2015) con ligeras modificaciones (en lugar de desplazar una hoja, se desplazó el tallo). El promedio de alturas de las plantas fue de 57 cm (la longitud considerada para la frecuencia natural calculada en la Ecuación 1) (ver ilustración 1). El láser de un solo punto se utilizó como referencia para descartar señales de ruido del suelo, las vibraciones del aire y la interferencia eléctrica del instrumento, siguiendo la norma ISO 3744 disminuyeron siguiendo normas de metrología recomendadas por el Departamento de Física - Laboratorio de acústica y vibraciones del Centro Nacional de Metrología CENAM.

VI.5.1 Cálculo teórico de Frecuencia Natural

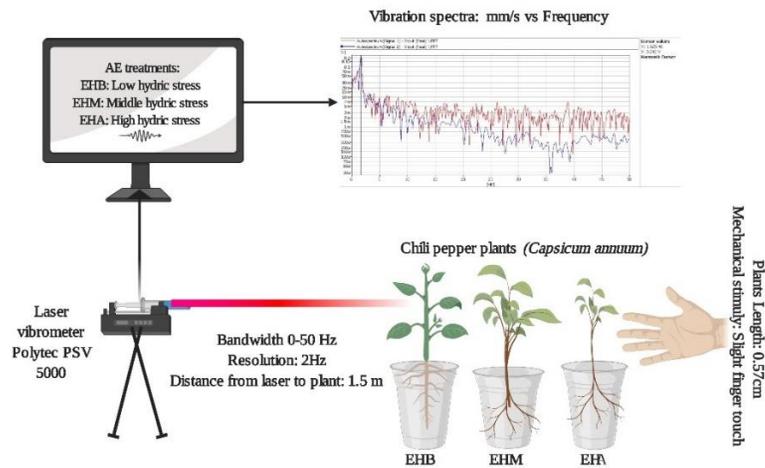
La física ha establecido que la frecuencia natural depende de la masa y la rigidez que tenga un material. Para la estimación de la frecuencia natural $[fn]$ de forma teórica se considera una viga en voladiza (fenómeno cantiléver), en el que se asume una carga uniforme (w) por unidad de longitud, dónde se calcula la ecuación 1. Los valores utilizados para la ecuación son de origen teórico con fines comparativos. Se consideraron módulos de elasticidad reportados para paredes celulares deshidratadas y sus módulos de tracción entre 1.9 y 4.9 Mpa (Kn) (Young et al., 2002) y los valores constantes fueron reemplazados en la fórmula:

$$\text{Ecuación (1)} f_n = \frac{Kn}{2\pi} \sqrt{\frac{EIg}{wl^4}}$$

Dónde se consideró lo siguiente:

- > Kn ; refiriéndose a una constante;
- > n se refiere al modo de vibración;
- > I , el momento de inercia del área;
- > l , la longitud del eje;
- > E el módulo de elasticidad
- > w : la carga uniforme.

Figura 2. Método de estimulación mecánica y posterior registro de señal y primera frecuencia natural.

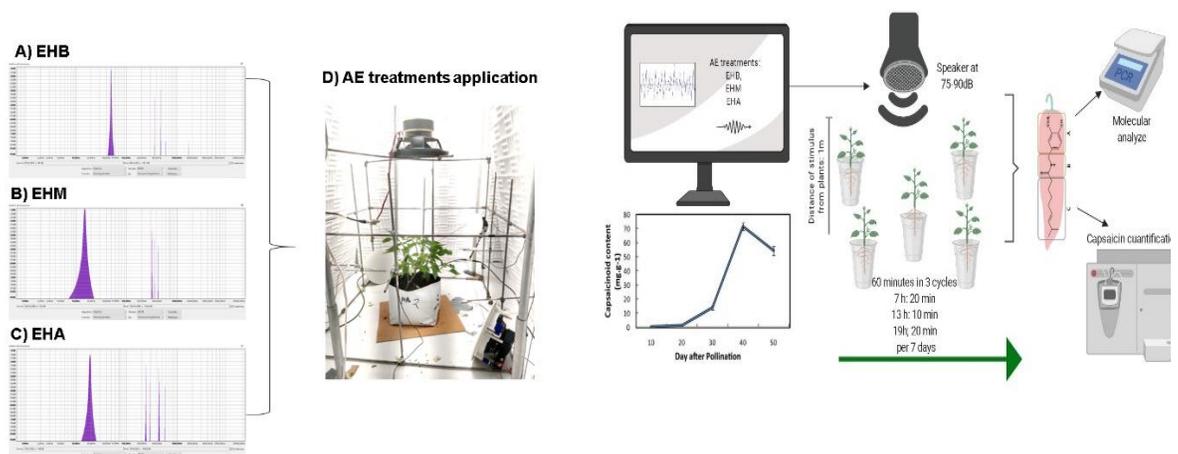


La figura es ilustrativa para indicar el desplazamiento manual de aproximadamente 10 centímetros desde el punto de reposo, en el centro geométrico de la planta.

V.6 Definición de tratamientos de EA elaborados a partir de frecuencias de vibración identificadas en plantas *Capsicum annuum* L.

El tratamiento se realizó mediante la reproducción de audio en formato (.wav) y un amplificador. Los actuadores (bocinas) fueron bocinas modelo NS I400 YAMAHA – con un diámetro de 10 cm, frecuencia de respuesta de 95 Hz a 45kHz (-10dB) y con una sensibilidad de 85 dB-2.83V-1m. Para poder corroborar la correcta aplicación de los patrones acústicos se utilizaron micrófonos y sonómetros proporcionados por el Centro Nacional de Metrología CENAM. Para la aplicación de frecuencias como estimulantes biofísicos de plantas *Capsicum annuum* L se consideraron los multitono como fuente sonora, descritos en el cuadro 4.

Figura 1. Exposición de plantas de *C. annuum* L. a 20 minutos de EA dentro de cámara anecoica y posterior evaluación transcripcional



La aplicación corta de EA se realizó asegurando un nivel de presión homogéneo de $80 \text{ dB} \pm 0,5$ dentro de la cámara anecoica y un campo envolvente acondicionado

El archivo de audio utilizado dentro de un campo acústico fue creado en el programa AUDACITY (<https://www.audacityteam.org/download/>), basado en frecuencias mayormente detectadas por la vibración en plantas sometidas a 3 condiciones hídricas. El campo acústico fue se formó a través de un arreglo de bocinas con emisión homogénea en un volumen de área de 0.6 m³. La aplicación uniforme de EA se corroboró utilizando un conjunto de seis micrófonos condensadores B&K (1/4-type 4180, Serial No 1886367) y sensibilidad de -37.9 dB re 1V / Pa (Brüel & KjEAR) para monitorear el ruido de fondo, ubicados de manera equidistante en posiciones X, Y y Z de 56 cm. Los micrófonos permitieron la confirmación del nivel de presión sonora de fondo (dB) de ruido de $7.17 \pm 0,36$ decibels y la aplicación uniforme de cada tipo de multimodo EA. En la segunda aplicación (60 min por una semana previa a cosecha) en el segundo experimento de campo, se presentó un ruido de fondo de 36 ± 6 dB. Las intensidades se midieron usando un sonómetro Extech SL510 para el monitoreo de ruido en escenarios ambientales (McLennon et al., 2019).

VI.7 Preparación de muestras foliares para pruebas moleculares de respuesta antioxidante en plantas *C. annuum* L.

Los extractos fueron obtenidos de acuerdo con la técnica reportadas por (Sibanda and Okoh, 2008). Se usaron 50 mg de tejido foliar apical, fueron macerados con nitrógeno líquido hasta pulverizar. Posteriormente, el tejido pulverizado fue homogenizado con doble lavado en acetona (2.5 mL por lavado), utilizando tubos falcon de 15mL por inversión del tubo (5-6 veces) y se almacenó a 4°C por 24 h. Transcurrido el tiempo, volumen se transfirió a viales de 1mL para posteriores centrifugaciones a 5000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se homogenizó por resuspensión y vortex con 1.5 mL de regulador de fosfatos a pH 7.0 (0.05M), fue centrifugado a 13000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y almacenó a -20°C.

VI.8 RT-qPCR de enzimas antioxidantes y gen de acuaporina en tejido foliar, precursores de capsaicinoides en fruto de *C. annuum* L.

La determinación de expresión génica se realizó para el primer experimento de exposición corta a sonido durante 20 minutos. En esta etapa, se evaluaron hojas después de la aplicación de los tratamientos acústicos EA para establecer si se mantenía o incrementaba la expresión de dichos transcritos.

VI.8.1 Selección de oligonucleótidos cebadores

La amplificación de los genes se realizó a partir de secuencias de la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) como se

muestra con sus respectivos números de acceso en el cuadro 1. En el experimento de exposición corta, se midieron dos marcadores genéticos para la biosíntesis de flavonoides: Todos los oligonucleótidos utilizados fueron proporcionados por OLIGO T4 y amplificados con Applied Biosystems™ Power Up™ SYBR™ Green Master Mix para realizar análisis de qPCR (Step One Plus Real-Time PCR System, ThermoFisher Scientific).

VI.8.2 Método de extracción de ARN y análisis molecular

La extracción de ARN total se realizó utilizando el kit zymo research direct-zol RNA miniprep, posterior obtención de ADN complementario para las estimaciones transcripcionales. Se utilizó ARN de alta pureza (relación de absorbancia de 260/280 nm por encima de 2,0 y relación de absorbancia de 260/230 nm de 1,8 a 2,0) para sintetizar el ADNc utilizando el kit de Maxima First Strand # K1612 (ThermoFisher Scientific) para RT-qPCR según las instrucciones del proveedor (10 min a 25 °C seguido de 15 min a 50 °C). La síntesis de ADNc se realizó a partir de 100 ng de ARN total, siguiendo la metodología del proveedor, utilizando el equipo C100 Touch Thermal Cycler Marca BIORAD CFX96 Real Time System. El análisis de expresión génica se realizó mediante la Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-qPCR).

VI.8.3 Condiciones de amplificación

La expresión del gen relativo se evaluó mediante el método 2 – $\Delta\Delta CT$ (Livak & Schmittgen, 2001). Para la amplificación de PCR, que fueron las siguientes: 30 ciclos de 95 °C por 30 s; 65 °C por 2 min; y 72 °C por 1 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.2 % en el foto-documentador DNR Bio-Imaging System Mini BIS Pro.

Cuadro 2. Cebadores transcripcionales para estimaciones moleculares

| Gen | Dirección | Secuencia del iniciador | (Pb) | Número de acceso al banco genómico |
|-------------------------------|-----------|--|------|------------------------------------|
| <i>pod</i> | Forward | 5'-GCAGCATTCTCCTCCTACT-3' | 197 | NM_001324997.1 |
| | Reverse | 5'-ATTTCTTTGCCTTGTTGTTG-3' | | |
| <i>CaPIP1-1</i> | Forward | 5'-CAGCACAAACAGACAAAGATTA3' | 271 | XM_016711608.1 |
| | Reverse | 5'-TTGATGTGTCCTCCTGAGATAC3' | | |
| <i>pal</i> | Forward | 5'-ATTCGCGCTGCAACTAAGAT-3' | 94 | NM_001324603.1 |
| | Reverse | 5'-CACCGTGTAAGGCCTTGTTT-3' | | |
| <i>Mn-sod</i> | Forward | 5'-CTCTGCCATAGACACCAACTT-3' | 179 | NM_001324998.1 |
| | Reverse | 5'-CCAAGTTCGGTCTTTAATAA-3' | | |
| <i>chs</i> | Forward | 5'-TCGACCCTCAGTCAAACGAC-3' | 154 | NM_001325005.1 |
| | Reverse | 5'-TGGGCCACGGAAAGTAACTG3' | | |
| <i>at3</i> | Forward | 5'-AAATCCAACAAGGGCAGAAG-3' | 1541 | NM_001324769 |
| | Reverse | 5'TCTTTCAGGTCTTCCCCATC-3' | | |
| <i>kas</i> | Forward | 5'-GATTA | 1167 | NM_001324658 |
| | Reverse | CAAATGCCAG CAAGCTCTGTTGC3' GTCAAGGTTTGTAGGGTGC-3' | | |
| <i>β-tub</i> | Forward | 5'-GAGGGTGAGTGAGCAGTT-3' | 167 | NM_001324931.1 |
| | Reverse | 5'-CTTCATCGTCATCTGCTGTC-3' | | |

Se evaluó la expresión de dos marcadores genéticos (genes *at3* y *kas*) involucrados en la biosíntesis de capsaicinoides, utilizando oligonucleótidos previamente descritos por Zunun-Perez et al. (2017).

VI.9 Exposición de plantas de *C. annuum* L. a 60 minutos de EA en condiciones de invernadero.

El diseño experimental consistió en los mismos tratamientos EA: LHS, MHS, HHS y controles adicionales a la etapa 1: silencio, Ruido blanco y estrés hídrico real. Los tratamientos se aplicaron a plantas cultivadas en condiciones de invernadero a una temperatura promedio de 25 ° C y 45-53% de humedad relativa. Se registró el ruido de fondo del campo exterior de 20-36 dB, y el nivel de presión sonora (SPL) de los tres EA (LHS, MHS, HHS) que se utilizó como tratamientos se ajustó alrededor de 85 dB, los altavoces eran los mismos en el experimento 1 y se colocaron a 1 m de la parte superior de la planta. La etapa de desarrollo de las plantas de *C. annuum* L. al momento de aplicación EA fue de 35 días. Las plantas se agruparon en cuatro individuos por cada tratamiento: LHS, MHS, HHS, sin EA o "silencio" y un patrón de múltiples mezclas de señales senoidales de frecuencias aleatorias con una distribución normal, conocidas como "Ruido blanco" (Kuo, 2018).

VI.10 Exposición consecutiva de plantas *C. annuum* L. a 60 minutos de EA por 2 semanas mediante el uso de cajones reverberantes.

La exposición completa de las plantas a 60 minutos diarios durante 2 semanas se realizó para explorar la respuesta del metabolismo secundario en frutos. Después la aplicación de tratamiento con EA, los frutos se recolectaron y liofilizaron para la determinación electroquímica del contenido de capsaicinoides.

VI.11 Preparación de extractos para cuantificación de Capsaicinoides

Las muestras fueron 500 mg de muestra liofilizada disueltos en 10 mL de metanol con una hora de sonicación). Las muestras se mantuvieron a -20 ° C durante 24 horas. Antes de las mediciones, se mezclaron y filtraron con filtro Millipore 0.25.

VI.11.1 Cuantificación de capsaicinoides por detección electroquímica por cromatografía líquida de alta resolución

La detección electroquímica se realizó según el protocolo HPLC-EC sugerido en la ficha técnica THERMO-SCIENTIFIC, aplicando las modificaciones descritas a continuación. El sistema utilizado incluía una bomba ESA (modelo 582), un muestreador manual y cuatro canales acoplados al detector ESA, colocado antes de la matriz Coul - modelo 5600 serie 286. El detector se ajustó a 4 celdas eléctricas para aplicar potenciales de 400, 550, 700 y 850 mV. La columna utilizada fue una SUPELCO-CAT 5356250 (25 cm x 4,6 mm x 5 um). El tamaño de la inyección fue de 10 ul, con el 100% de una fase móvil isocrática a una presión promedio de 125 y 134 mPa. Las determinaciones de los contenidos de Dcap (29 min) y Cap (35 min) fueron de acuerdo con las áreas de pico de la curva de calibración y su respectivo

tiempo de retención. La fase móvil preparada fue un tampón de acetato de amonio 50 mM, acidificado con ácido acético glacial. El pH se ajustó a 4.35 con una solución estándar de hidróxido de sodio 0.1N. Se mezcló con acetonitrilo-amonio (55:45).

VI.11.2 Determinación espectrofotométrica de capsaicinoides totales

Se añadió un volumen de 2 mL de H₂O a los extractos y se agitó vigorosamente con 4 mL de HCl 0,5 N y se añadió a cada mezcla 2 mL de metanol 100% (v/v) antes de agitar. Se descartó la fase orgánica y la capa interfacial. Al mismo tiempo, se adicionaron 2 mL de reactivo de nitrito de sodio-molibdato de sodio a la fase acuosa clara y se incubaron durante 15 min a T.A. Finalmente, se agregaron 2 mL de NaOH 1 N antes de la medición inmediata a una absorbancia de 430 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de capsaicinoides totales (CAPs) y se estimaron empleando una curva de calibración. La absorbancia de las soluciones de las muestras desconocidas se leyó usando una celda de cuarzo de un cm y en una adaptación de la técnica acoplada a microplaca con un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific™ Multiskan™ FC (Ferri et al., 2017).

VI.11.3 Determinación de prolina

La concentración de prolina estuvo en función del ácido fosfórico en el reactivo de ninhidrina, y las reacciones se llevaron a cabo a 100 ° C durante 60 minutos, según (Lee et al., 2018). La absorbancia se midió mediante espectrogramas UV-Vis obtenidos de la curva estándar de reacción prolina-ninhidrina de prolina y = 0,236x-0,291 (R² = 0,98).

VI.12 Estimación de porcentaje de sobrevivencia

Se indujo la sequía a través de la restricción de riego después de una semana de tratamientos con EA. Al pasar cuatro días, se adicionó a cada planta un volumen de 400 mL de rehidratación para evaluar la sobrevivencia y viabilidad de las plantas (Wilson et al., 2009).

VI.13 Medición de la transpiración

Las señales adquiridas de las hojas de las plantas se tomaron utilizando el sistema de monitoreo de la fotosíntesis desarrollado por (Millan-Almaraz et al., 2013). Las señales de los sensores de temperatura y humedad se usaron para calcular las variables relacionadas con la fotosíntesis, como fotosíntesis neta (P_n), balance de carbono en tiempo real (RTCB). Este proceso de adquisición se llevó a cabo en un ciclo de monitoreo de 1 semana para demostrar los cambios de día y noche en los datos. Incluye la medición de la temperatura del aire y de la hoja, la humedad, el flujo de aire, el dióxido de carbono y la luz ambiental. Todas las medidas se tomaron

en las mismas condiciones.

VI.14 Estimación de índice de salud

Para determinar el índice de salud adaptado a *C. annuum L.* se contempló el número de hojas, diámetro del tallo, biomasa foliar, entre otras, lo cual sirvió para calcular el índice de salud de la siguiente manera, ver ecuación 2. (Aguirre-Becerra et al., 2020; Pérez-Llorca et al., 2018), dónde: Is es el índice de salud; dT : diámetro de tallo; a : altura; ps : peso seco (ver ecuación a).

$$a) Is = \left(\frac{dT}{a}\right) * ps$$

VI.15 Cuantificación de ácidos fenólicos libres totales y Flavonoides

Los compuestos fenólicos se cuantificaron mediante el método de Folin-Ciocalteu (Oomah et al., 2005) utilizando ácido gálico como estándar. Los flavonoides totales de las muestras se midieron según el procedimiento adaptado para microplacas utilizando el estándar Rutina, para las estimaciones espectrofotométricas, siguiendo el método reportado por (Oomah et al., 2005).

VI.16 Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se calculó utilizando el ensayo del radical 1,1-difenil-2-pirilhidrazil (DPPH) y el método del ácido mono catiónico radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) como se describe por (Fukumoto & Mazza, 2000; Nenadis et al., 2004). La capacidad antioxidante se expresó como capacidad antioxidante de Trolox (TEAC) usando una curva de calibración de Trolox. La curva de concentración de Trolox osciló entre 50 y 800 μM .

VI.17 Imágenes de termografía

La técnica del termómetro infrarrojo mide la temperatura de la superficie de la planta sin tocar la planta. Se usó una cámara termográfica modelo IR FLIR5 para tomar lecturas de temperaturas individuales de las plantas bajo tratamiento. Se utilizaron imágenes térmicas para capturar tres individuos representativos de cada grupo de tratamiento.

VI.18 Determinación de índice de vegetación normalizada (NDVI) como indicador de cambios espectrales

El índice (NDVI) es un estimador indirecto de las diferencias en las superficies de la vegetación a través de la radiación roja e infrarroja cercana (NIR) (Beisel et al., 2018; Muñoz-Huerta et al., 2013). La ecuación (b) muestra el cálculo de NDVI donde RED corresponde a 650nm de radiación y NIR a 850 nm aproximadamente.

$$b) NDVI = (NIR - ROJO)/(NIR + ROJO)$$

$$c) NDVI = (ROJO - AZUL)/(ROJO + AZUL)$$

El NDVI se puede adquirir utilizando dispositivos de doble cámara o de una sola cámara. Por un lado, las configuraciones de cámara dual utilizan un sensor rojo y un sensor NIR, y el NDVI se calcula según (ecuaciones b y c). Los dispositivos de una sola cámara se basan en cámaras RGB con filtros de bloqueo de infrarrojos (IR) reemplazados por filtros de paso de banda azul. Para calcular el NDVI en la configuración de una sola cámara, se utiliza la ecuación (c) donde se utilizan los canales rojo y azul

VII. Diseño experimental y análisis estadístico

La estructura general del diseño correspondió a un orden de 2^4 , aleatorio. El análisis de los datos se basó en la varianza comparativa de una vía con respecto al control (ANOVA). Se realizó una comparación multivariante mediante la prueba de Spearman.

VIII. Resultados y discusión

VIII.1 Caracterización de 3 niveles de estrés hídrico en plantas *Capsicum annuum* L.

Los resultados que corresponden a la caracterización de los niveles de estrés hídrico se muestran en el cuadro 3. El interés en establecer los parámetros a cada condición fue establecer un el fundamento físico que permitiera relacionar el nivel de estrés hídrico con otras variables que afectan la masa y rigidez de las estructuras biológicas. Esta condición inicial permite interpretar diversas interacciones biomecánicas que también son dinámicas y modifican las tasas de evapotranspiración, humedad relativa, temperatura y riego disponible en los cultivos.

VIII.2 Frecuencia natural en las plantas *C. annuum* L. con estrés hídrico

Capsicum annuum L. emite vibraciones a frecuencias naturales confirmando que las plantas actúan como u sistemas mecánicos que mantiene movimientos particulares (figura 2). Los resultados del registro de vibrometría muestran que la frecuencia natural de las vibraciones está entre 1.875 y 7.86Hz. La frecuencia menor corresponde a plantas LHS y se encontró una frecuencia de hasta 6,87 Hz en plantas con HHS). La primera frecuencia natural generada por las plantas de *Capsicum annuum* osciló con las amplitudes, variando de 1 a 9 Hz dependiendo del estado hídrico de la muestra. Estos resultados son similares al ancho de banda reportado en estudios previos realizados en otras especies como tabaco (*Nicotiana benthamian*), trigo (*Triticum EAstivum* L.) y álamo (*Populus* sp.), Así como órganos

como hojas y tricomas (Magal et al., 2000; Rosner et al., 2019; Sano et al., 2015).

Cuadro 3. Clasificación del estrés hídrico en plantas *Capsicum annum* L. con respecto a potencial mátrico y días sin riego.

| Nivel de estrés hídrico | Estrés hídrico Bajo (LHS) | Estrés hídrico medio (MHS) | Estrés hídrico Alto (HHS) |
|---|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Días sin riego | 3 a 5 | 5 a 9 | > 10 |
| Potencial hídrico (MPa) | -0.2 a -0.8 | -0.81 a -1.49 | > -1.5 |
| Pérdida relativa de agua (RWC) (%) | 5 a 15 | 15 a 30 | > 50 |
| Potencial mátrico (Centibar/kPa) | 0 a 9 | 10 a 20 | > 20 |
| Contenido de clorofila ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$) | 427 \pm 17 | 220.00 \pm 22.2 | 130.12 \pm 17.2 |

El potencial hídrico se da en los valores teóricos, según la clasificación de (Hsiao, 1973). Los tipos de estrés hídrico se ajustaron a comparaciones experimentales de potencial matricial (Centibar / kPa) y el ajuste a la escala teórica de contenido de agua (Flexas y Medrano, 2002). Las unidades de clorofila se expresaron como

Es posible decir que las variaciones ambientales hacen que las plantas adapten su estructura para enfrentar condiciones hostiles. La respuesta subyacente integra eventos mecánicos que requieren modificaciones inmediatas que, por lo tanto, ajustarán la primera frecuencia natural de vibración y otras vibraciones de todo el sistema de la planta.

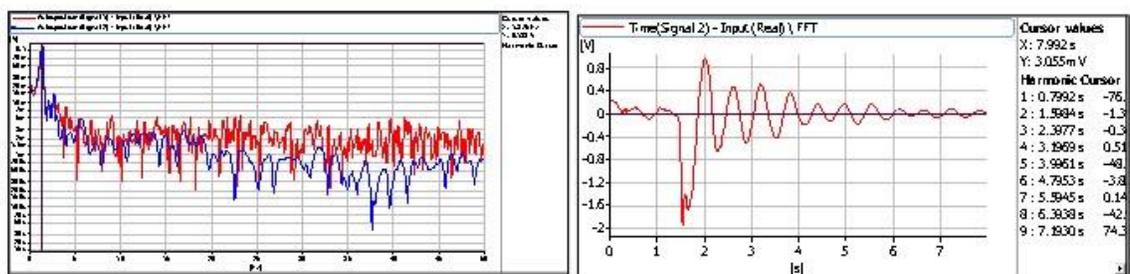
Cabe resaltar que la frecuencia natural de los objetos no depende de la amplitud del estímulo mecánico o fuerza ejercida sino de las propiedades del material. Según estudios previos, solo determinadas ondas acústicas podrían tener un efecto selectivamente favorable para ejercer un efecto de comunicación física entre plantas. Esta comunicación está siendo explorada para determinar si algunas especies son susceptibles a cambios derivados de la exposición a ciertas frecuencias. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertas ondas inducen la sequía y la tolerancia a enfermedades en plantas cercanas o en partes de la misma planta (Choi et al., 2017; Jeong et al., 2014; López-Ribera & Vicent, 2017).

La imagen muestra la velocidad de desplazamiento del tallo de las plantas *C. annuum* usando un sensor de desplazamiento láser Doppler. La velocidad de desplazamiento de las formas de onda LHS, MHS y HHS correspondientes al dominio de frecuencia utilizando transformadas rápidas de Fourier (gráficos de la derecha) y su respectivo dominio de tiempo obtenido de las plantas (gráficos A, B y C de la figura 2).

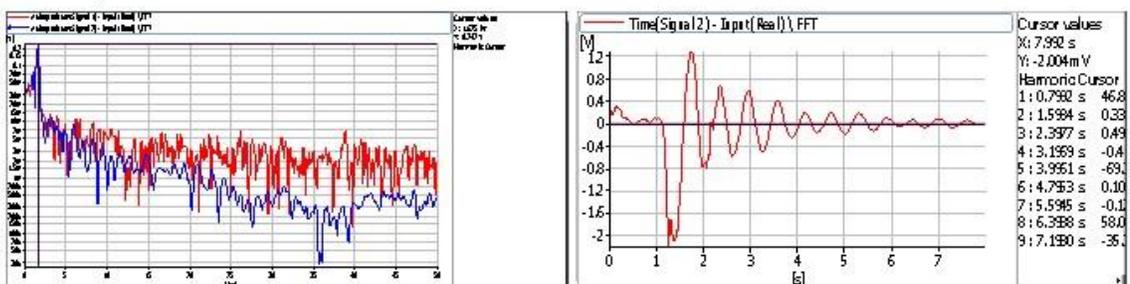
Los resultados demostraron que las plantas de *Capsicum annuum* L pueden también presentar frecuencias naturales adicionales a la primera natural. Esto podría explicar la variación observada en los modos de vibración de la planta, debido a que las condiciones de elasticidad, rigidez y masa varían con las condiciones ambientales, edad fenológica, geometría típica de un fenotipo, entre otros, a diferencia de la de otros materiales inertes. Podría considerarse que las vibraciones de las plantas se varían de forma proporcional y dependiente del agua disponible. Asimismo, su biomecánica es estrictamente dependiente de las interacciones ambientales circundantes al entorno de crecimiento

Figura 3. Espectros de la frecuencia de vibración en el dominio de tiempo para plantas *C. annuum* L.

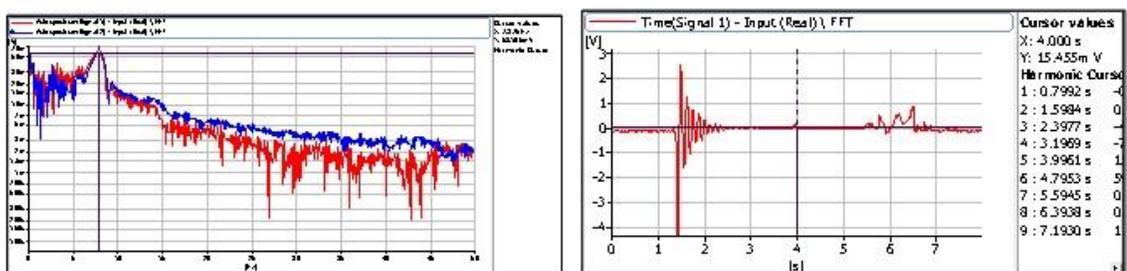
A) LHS



B) MHS



C) HHS



La señal roja corresponde láser scanner múltiple 3D. La línea azul pertenece a una segunda señal del segundo vibrómetro (un solo punto) que se utilizó como punto de referencia para evitar la posible fuente de ruido.

En esta sección concluye que, las plantas pueden ser sensibles a un amplio ancho de banda de sonidos audibles, similar a lo reportado por (Cochard et al., 2013). Además, el intervalo de frecuencias en el que una planta puede generar cualquier onda o 'emisión' es dependiente de su estatus hídrico. Asimismo, la importancia de los intervalos de las frecuencias de tratamientos que, podrían utilizarse para comunicar y preparar las plantas para condiciones ambientales cambiantes, como la escasez de agua (Gagliano, 2013; Gagliano & Renton, 2013).

Cabe mencionar que es relevante entender la dinámica de las vibraciones en las plantas para poder usar propiedades físicas como potenciales indicadores fisiológicos del estado de salud de las plantas. Los datos masivos de fenómenos como las vibraciones de las plantas pronto podrían ayudar como señales de rasgos que podrían transformar o agregar a los modelos de predicción que podrían emplear métodos de aprendizaje como Support Vector Machine (SVM), K-means o redes neuronales para clasificar, detectar, o predecir el estrés en las plantas (Kamilaris & Prenafeta-Boldú, 2018).

También se ha propuesto que dichas vibraciones pudieran estar enviando información del estatus de salud de una planta a otra a través de la propagación de señales físicas transmitidas por el aire. Se ha sugerido que dicho fenómeno es complementario a las señales químicas y que podría suceder en las plantas a muy bajas intensidades y probablemente largas distancias (Gagliano et al., 2017).

No obstante, pocos experimentos han profundizado en la identificación de dichas señales. Por último, se sugiere que pueden obtenerse más datos si se realizan más experimentos con el fin de caracterizar los modos de vibración de la planta de Chile bajo tensiones particulares, condiciones climáticas y etapas fenológicas, etc.

VIII.3 Identificación de señales de frecuencia en *Capsicum annuum* L

A continuación, se establecen las señales seleccionadas (cuadro 4). Estos datos fueron utilizados para reproducir las señales de vibración de las plantas por medio de actuadores acústicos y ser usados como tratamientos acústicos originados en condiciones (nivel de estrés hídrico) específicas.

Dado que, el estado de humedad de una planta afecta sus membranas celulares y está relacionado con alteraciones bioquímicas, seguidas de eventos mecánicos resultantes de alteraciones a la geometría, rigideces y masa (Emmanuel de Langre et al., 2019; Loughian et al., 2014), se contempló una selección por cada nivel. Así, otros factores biofísicos, como la deformación del suelo también puede variar según la función hidráulica (Robinson, 2019).

Cuadro 4. Selección de frecuencias de vibración usadas para conversión a sonido en forma de EA.

| Nivel de estrés hídrico | Picos de señal principales (Amplitudes destacadas) | Amplitud |
|--------------------------------|--|-----------------|
| Archivos multitono .WAV | | |
| LHS | 50, 360, 480, 600, 1700 | 0.2413 - 1.29 |
| MHS | 240, 320, 480, 525 | 0.0254 - 1.13 |
| HHS | 240, 291, 445, 570 | 0.5499 - 6.78 |
| WNC | Frecuencias aleatorias independientes con una distribución de probabilidad uniforme en un intervalo | |

Para cada tratamiento se eligieron los cuatro picos de amplitud de señal más altos a partir de la señal del dominio de la frecuencia. Las frecuencias se identificaron como las de mayor repetibilidad entre individuos y mayor amplitud durante la grabación de señales.

Estas señales podrían tener aplicaciones ecológicas, principalmente para obtener beneficios agronómicos (Fernandez-Jaramillo et al., 2018), similares a los obtenidos cuando se encontró que las plantas tienen respuestas tigmomorfogénicas activas (Niez et al., 2019). Probablemente, todas estas interacciones convergen en la capacidad de las plantas para percibir su situación ambiental y la supervivencia que le corresponde.

Las señales pico podrían tener potencial para inducir respuestas en cultivos, utilizando herramientas bioacústicas o vibratorias y posiblemente activar mecanismos de respuesta que incrementen las propiedades nutraceuticas de las plantas, de manera similar a las reportadas por la aplicación de sonido (Li & Gong, 2011).

Finalmente, aún existe un vacío de conocimiento sobre el mecanismo por el que pueden responder a estímulos acústicos, aunque existe vasta evidencia que, los efectos mecánicos activan el metabolismo de la planta, promueven la división y mejoran la actividad de enzimas protectoras y hormonas endógenas, aumentando el contenido de azúcares solubles, proteínas y niveles de transcripción. Por lo tanto, se podría inferir que estas fluctuaciones también están involucradas en las respuestas de señalización biomecánica (Hassanien et al., 2014; Jung et al., 2018).

VIII.6 Influencia de la exposición breve (20 min) de plantas *C. annuum* L. a EA en los genes *Mn-sod*, *pod*, *pal*, *chs* y *caPIP-1*

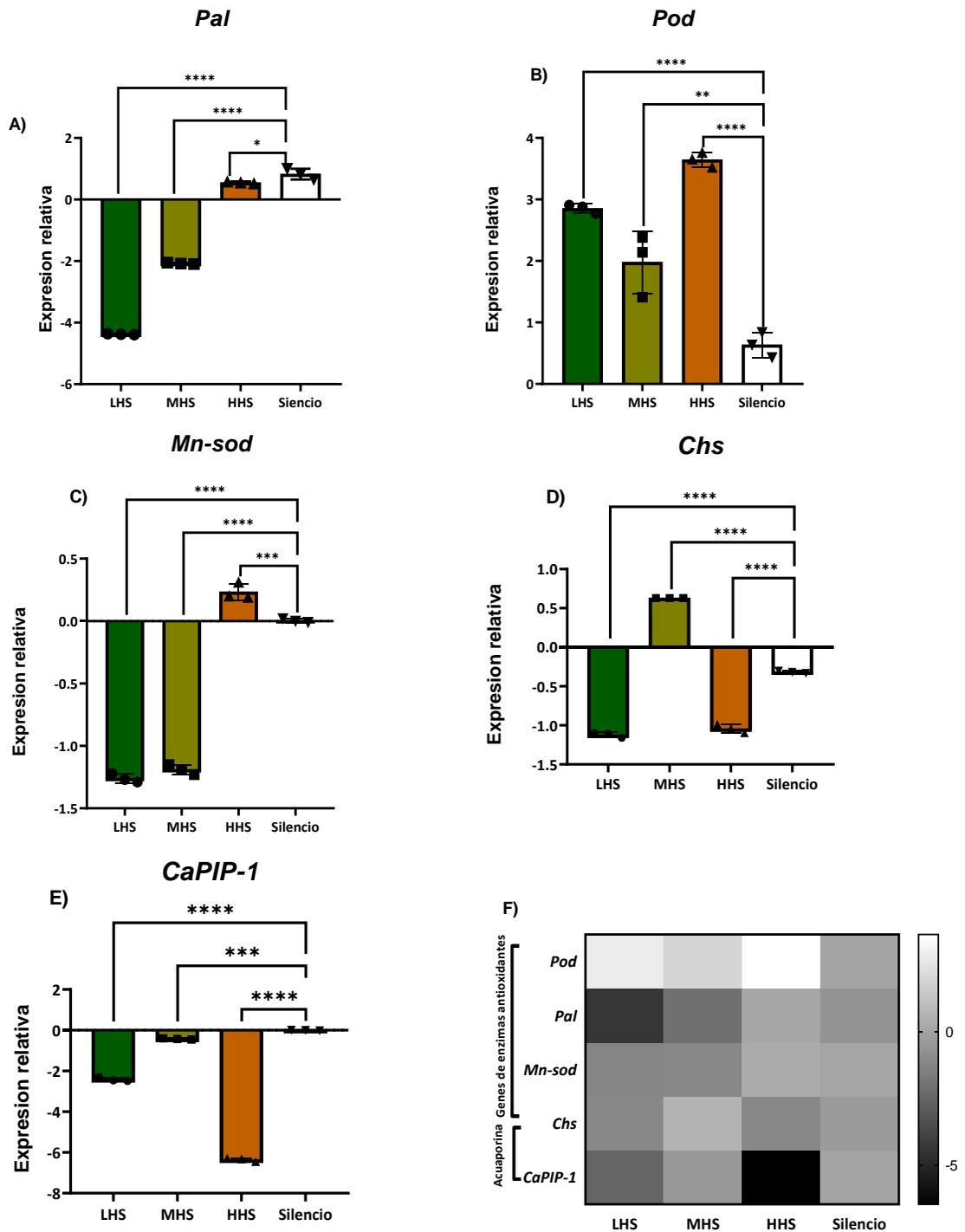
En la figura 4 se muestra como todos los tratamientos EA. LHS, MHS y HHS activaron la transcripción de los genes de respuesta antioxidante y el gen de acuaporina de una manera dependiente del tratamiento. Los tratamientos LHS y MHS mostraron una regulación a la baja de *Pal* con una disminución de su expresión aproximada -4,37 y -2,077 veces de cambio, respectivamente, mientras que HHS activó una regulación positiva de ~ 0,5 veces. Por el contrario, LHS y HHS redujeron significativamente la expresión de *Chs* en ~ (-1,12 y -1,04 veces de cambio,

respectivamente), mientras que MHS regularon significativamente su expresión (0,63 veces).

La transcripción del gen *Pod* mostró una regulación positiva de ~ 2,8, ~ 1,9 y ~ 3,6 veces de cambio por LHS, MHS y HHS, respectivamente.

De manera particular, el tratamiento HHS mostró un efecto más sustancial en *Pod*. Al igual que la tendencia de activación del gen *Pal* ejercida por los EA, el gen *Mn-sod* fue regulado negativamente por LHS y MHS ~ (-1,26 y -1,19, respectivamente) mientras que HHS mostró una regulación positiva (0,23 veces). No obstante, la señal de HHS no difirió significativamente del control de silencio (*). *Sod* y *Pal* mostraron una correlación positiva (0,73 *), mientras que *Chs* y *Pod* presentaron una correlación negativa (- 0,58 *). Por otro lado, el gen de la acuaporina *CaPIP-1* mostró una regulación a la baja significativa después de todos los tratamientos con EA. Específicamente, LHS ~ (- 2.41), MHS ~ (- 0.43) y HHS ~ (-6.36) en comparación con el control de silencio. *CaPIP-1* también mostró una correlación negativa con *Pod* (- 0,98 *) y positiva con *Chs* (0,60 *).

Figura 4. Perfil de transcripción de genes. A) Peroxidasa (*Pod*), B) acuaporina de ají (*CaPIP1-1*), C) fenilalanina amoniacal-liasa (*pal*), D) Mn-superóxido dismutasa (*Mn-sod*) y, E) Chalcona sintasa (*Chs*), F) Escala de color de expresión.



Influencia de la exposición breve (20 min) de las plantas de *C. annuum* L. a los tratamientos de EA en la expresión génica, asociada con genes de estrés hídrico (*Mn-sod*, *pod*, *pal*, *chs*) y flujo de agua (*caPIP-1*).

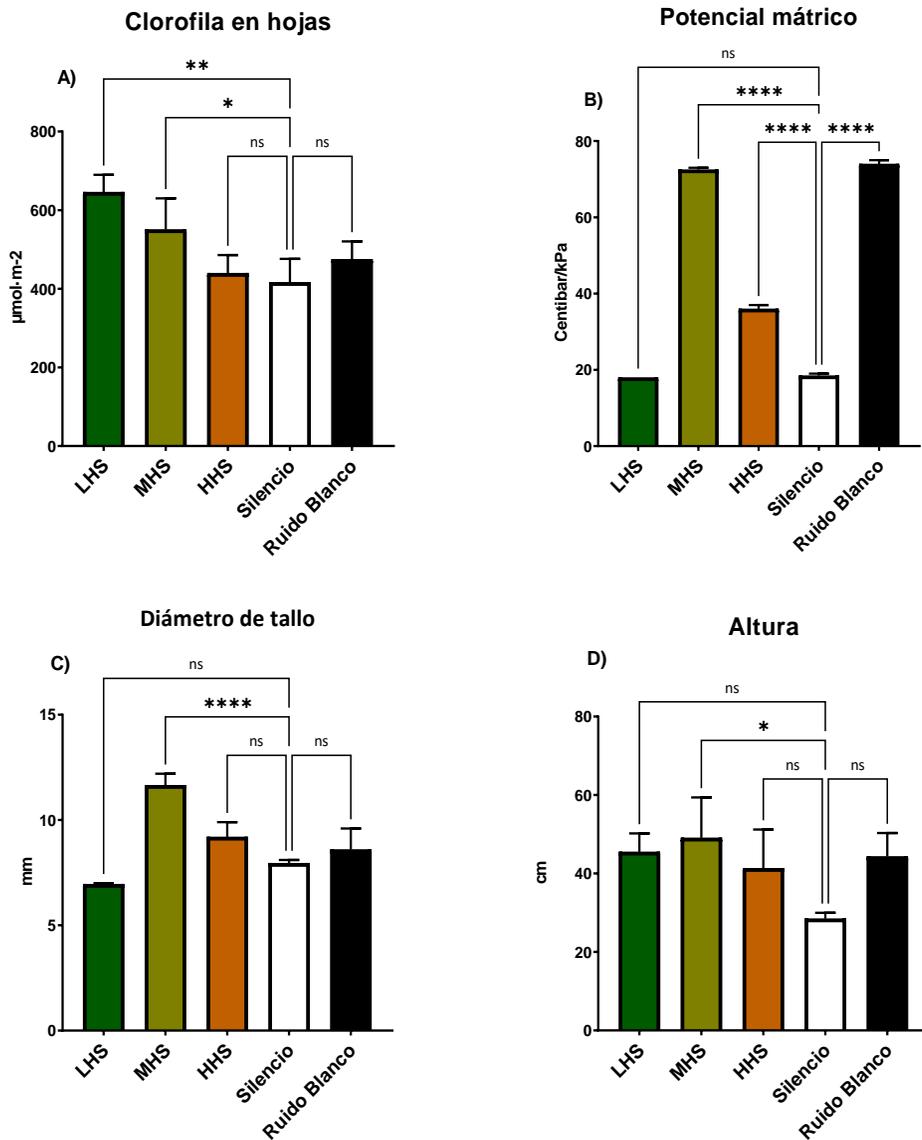
VIII.7 Influencia de la exposición prolongada (60 min) a los tratamientos EA en cambios morfológicos, bioquímicos de plantas *C. annuum* L.

La Figura 5 muestra los efectos morfológicos y fisiológicos de la aplicación de EA en plantas sanas y bien regadas. En el panel A), el gráfico muestra que solo LHS y MHS afectaron significativamente el contenido de clorofila en comparación con el silencio y el control del Ruido blanco. El panel B muestra que los EA podrían afectar parcialmente la tasa de absorción de agua o el esfuerzo ejercido por las plantas estimuladas con sonido, quizás por ajustes biomecánicos en las raíces. El LHS, el control de silencio y los tratamientos de Ruido blanco no presentaron diferencias significativas entre ellos. Solo MHS mostró diferencias significativas en comparación con el control de silencio (Panel C).

Finalmente, los EA no mostraron diferencias significativas en la longitud de las plantas entre los diferentes tratamientos, pero sí un cambio ligero de longitud en las plantas tratadas con MHS. En general, las variables morfológicas de las plantas no se vieron afectadas drásticamente por los EA, excepto en el estado del sustrato en el que crecieron, mostrando cambios en el potencial mátrico. Por otro lado, los resultados bioquímicos fueron contrastantes.

La segunda etapa experimental consistió en la exposición de una semana a los tratamientos EA y mostró cambios ligeramente significativos en el contenido de clorofila. Sin embargo, el potencial matricial y el diámetro del tallo se vieron afectados. Después de una semana de aplicaciones EA. El tratamiento MHS comparado con el silencio demostró que las plantas disminuyeron su absorción de agua cuando percibieron el estímulo con patrones acústicos específicos. A partir de los hallazgos se sugiere que el comportamiento de la mecánica hídrica de las hojas y las raíces con respecto al potencial hídrico del sustrato, puede ser altamente no lineal, en concordancia con lo reportado por otros autores (Mencuccini et al., 2019).

Figura 5. Efectos morfológicos y fisiológicos de la aplicación de EA en plantas sanas de *C. annuum* L.

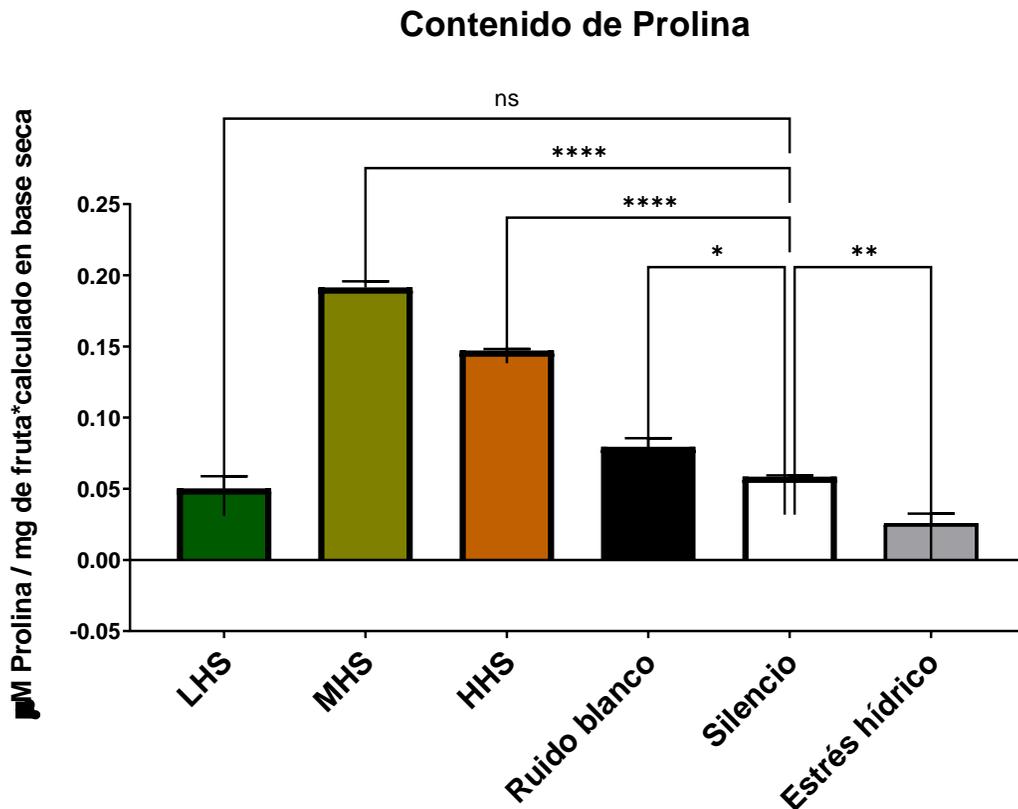


El panel A muestra que el contenido de clorofila estimado con medidor SPAD-502 (Konica-Minolta Japón) ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2$), el panel B muestra el potencial mátrico medido con un WATERMARK-Item # 6450WD. El panel C indica el diámetro del tallo (mm) y el panel D muestra la longitud del tallo (cm). Los resultados se expresan en base seca. Las barras representan la media \pm S.D. Los asteriscos sobre las barras indican que la respuesta al tratamiento fue significativamente diferente ($p < 0.05$).

Se exploró una asociación entre los tratamientos de EA y la acumulación de prolina para inferir un efecto potencial sobre el estrés hídrico o la osmorregulación desencadenada por los EA utilizados como tratamientos de sonido en este trabajo (ver Fig. 6).

El tratamiento con MHS mostró la mayor acumulación de prolina (3,63 mM), seguido de HHS (2,80 mM) y Ruido blanco (1,49 mM). La acumulación más baja se observó mediante el tratamiento de silencio (0,86 mM) y LHS (0,64 mM). De acuerdo con esto, MHS puede inducir 4.2 veces más acumulación de prolina en comparación con el tratamiento de silencio.

Figura 6. Efecto de los tratamientos EA en la acumulación de prolina en hojas de *C. annuum* L.



Los resultados del contenido se expresan en base seca. Las barras representan la media \pm S.D. Los asteriscos sobre las barras indican que la respuesta al tratamiento fue significativamente diferente ($p < 0.05$).

Los tratamientos EA resultaron en un aumento del 5% del contenido de prolina después de los tratamientos MHS y HHS, dentro del rango reportado en la literatura. De esta manera, puede asociarse que los EA, pueden tener efectos protectores en la planta, ya que la prolina actúa como un estabilizador de membranas y proteínas, es un inductor de genes relacionados con el estrés osmótico. También actúa como mediador del ajuste osmótico (Delaunet & Verma 1993; Kavi Kishor et al. 1995; Yoshida et al. 1997). Adicionalmente, es una fuente de carbono y nitrógeno disponibles en la rehidratación celular. También cumple la función de proporcionar electrones equivalentes de reducción (provenientes del catabolismo de prolina) para sostener fosforilación oxidativa, cuando empieza su degradación.

Un incremento de la prolina también puede ser indicador de recuperación al estrés, ya que su degradación libera ATP que es usado por las plantas durante la recuperación del estrés (Hare & Cress 1997; Hare et al, 1998). Ayuda en la decodificación del exceso de NH_4^+ y permite que las células logren liberar tensión oxidativa (Ramanjulu & Sudhakar, 2000; Harsh).

Por otro lado, los resultados de metabolismo secundario que corresponden a

capsaicinoides demostraron que, en etapa de fructificación se exhibe una respuesta dependiente del tipo de tratamiento.

La acumulación de CAP demostró potencial de afinidad o posible selectividad de las plantas hacia las señales (Fig.7), de hecho, las EA de MHS y HHS mostraron diferencias significativas en ambos niveles de capsaicinoides en comparación con el Ruido blanco y el control negativo.

El tratamiento LHS (257,31 μg de Cap y 134,43 μg de Dcap) mostró una diferencia significativa respecto al control positivo, el cual fue un grupo de plantas inducidas con estrés hídrico por una semana de restricción de riego (1417,33 μg de Cap y 430 μg de Dcap). En consecuencia, todos los EA indujeron cantidades significativas de Cap y Dcap. MHS mostró contenidos de 1000,64 μg de Cap y 147 μg de Dcap, presentando un aumento de veces al cambio de ($\sim 5,37$ y $\sim 1,72$, respectivamente). En particular, el tratamiento con MHS mostró un aumento de aproximadamente 6,9 veces el cambio de la proporción de Cap hacia la biosíntesis de Dcap (ver Fig.7).

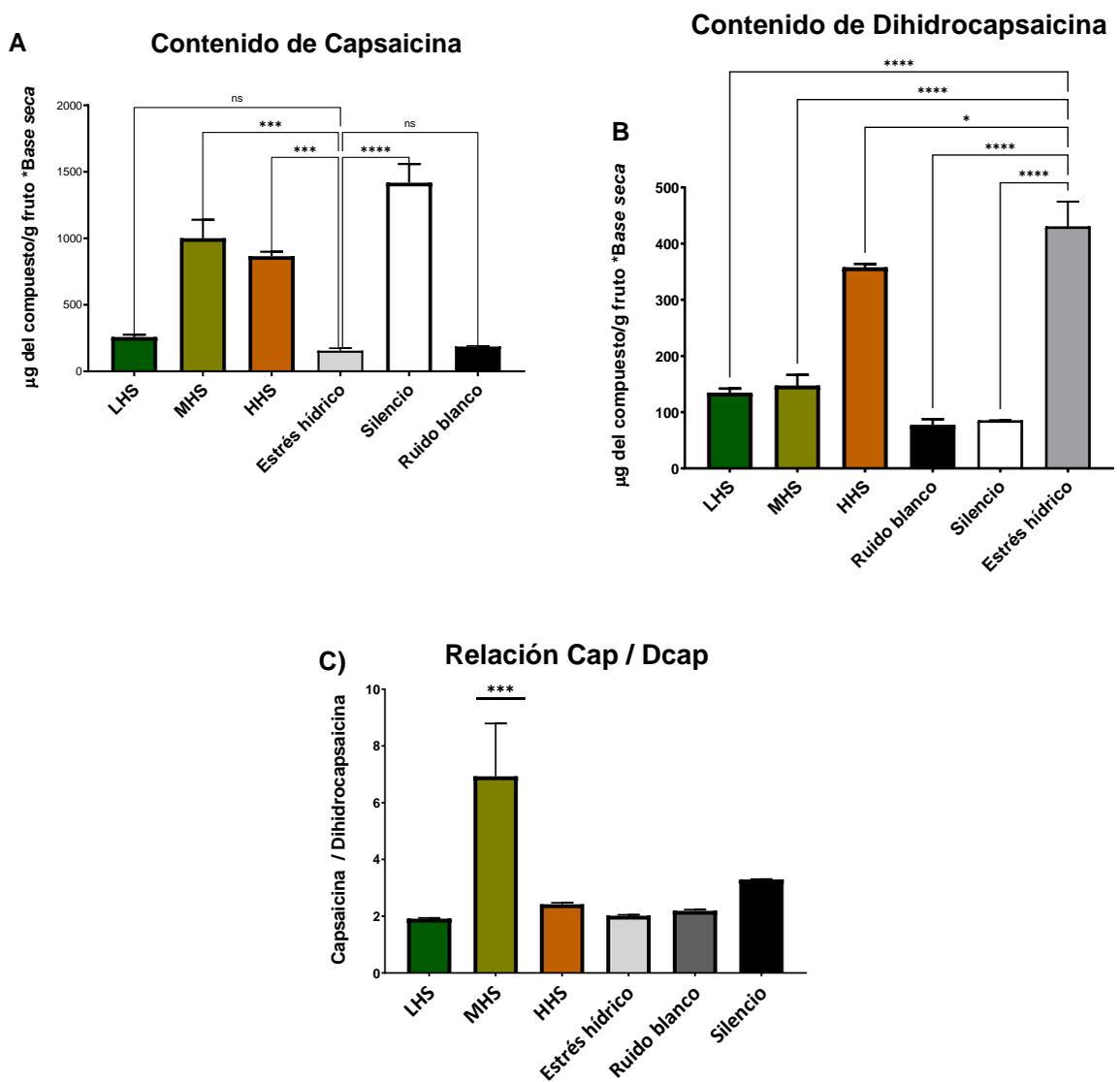
Se encontró que el tratamiento MHS fue significativamente diferente al resto de tratamientos y controles para los tratamientos de EA. Asimismo, los resultados indican una ligera diferencia al comparar la EA con el estrés hídrico, lo que confirma que los tratamientos MHS y HHS presentaron efectos similares en la inducción de la vía de los capsaicinoides.

Por otro lado, EA cambia la proporción regular en las producciones de capsaicinoides. Los resultados demostraron que los tratamientos EA pueden generar contenidos de capsaicina similares a los inducidos a través del estrés hídrico natural que, en esta investigación alcanzo un incremento 8,33 veces mayor que el control negativo de plantas bien regadas mantenidas en silencio, confirmando que *C. annuum* L. podría ser altamente sensibles a la elicitación de metabolitos mediante EA.

En el mismo sentido, otros estudios han informado que el rendimiento del capsaicinoide relacionado con el estrés hídrico aumentó de ~ 3.6 a 4.52 veces, lo que se explica por una competencia potencial entre la biosíntesis de capsaicinoides y otros metabolitos fenilpropanoides (Phimchan et al., 2014).

El efecto de la sequía puede aumentar relativamente los CAP en las plantas estresadas por la sequía de los cultivares de bajo picante (aumento de 1,7 a 7,2 veces el cambio), que fue más alto que los de los cultivares de picante medio, un rango de 1,13 a 1,41 veces el cambio (Phimchan et al., 2014). Aun así, en los resultados bioquímicos de este estudio, puede sugerirse que los efectos de sonido dependen de las respectivas frecuencias EA especificadas como baja, media y alta.

Figura 7 Efecto de los tratamientos EA en el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina



El cuadrante A muestra el contenido de capsaicina y B el contenido de dihidrocapsaicina determinado en frutos de chile después de una semana de tratamientos con EA. Los controles utilizados para validar la afinidad de frecuencia fueron: control negativo de No-EA regularmente regado y Ruido blanco para descartar la respuesta a cualquier otro tipo de frecuencias (frecuencias aleatorias).

El control positivo del estrés hídrico se mantuvo bajo restricción de agua durante el tratamiento. Los resultados del contenido se expresan sobre una base seca. El cuadrante C muestra la relación entre Cap y Dcap. Los asteriscos sobre las barras indican diferencias significativas en respuesta a los tratamientos ($p < 0.05$).

La proporción de capsaicina / dihidrocapsaicina puede ser de 1: 1 o 2: 1. Por lo tanto, era de interés considerar si la tasa comúnmente reportada era consistente después de los tratamientos.

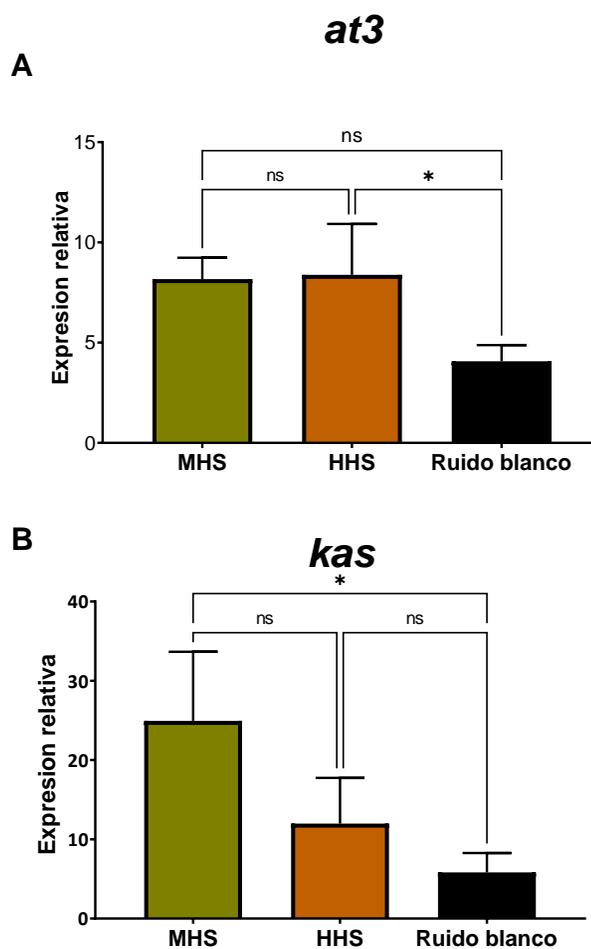
La relación entre Cap y Dcap podría explicarse a partir de su base estructural, ya que la capsaicina sometida a hidrogenación forma dihidrocapsaicina. En consecuencia, la falta de moléculas de hidrógeno por estrés hídrico podría causar una reducción en la proporción de dihidrocapsaicina (Kaiser et al., 2017). Los resultados mostraron que dependiendo de la EA (HHS, MHS, LHS) aplicada a las plantas, la capsaicina aumenta y la tasa entre Cap y Dcap también aumenta, en comparación con los controles que utilizan el tratamiento de silencio y Ruido blanco.

Con respecto a los resultados moleculares, los hallazgos confirmaron que a nivel

transcripcional hay un efecto significativo en expresión de uno de los genes relevantes en la regulación de la biosíntesis de CAP de la capsaicina sintasa (*at3*) y la β -cetoacil sintasa (*kas*) en las muestras con diferencias contrastantes en el contenido de CAPs, siendo los tratamientos MHS y HHS los que mayor diferencia presentaron en la expresión de *Kas* con respecto a la expresión inducida por el control de Ruido blanco. (ver Fig. 8).

Se observó una regulación positiva significativa mediante el tratamiento con MHS (2,3 veces) en comparación con las muestras de HHS y Ruido blanco.

Figura 8. Efecto de los tratamientos EA en la expresión de los genes *kas* y *at3* asociados a la biosíntesis de capsaicinoides en frutos de *C. annuum* L



El análisis RT-qPCR de pun 1 (*at3*) y *kas*. Estos genes reguladores de la vía biosintética de las plantas de Chile expuestas a tratamientos contrastante de EA. Las barras muestran la expresión relativa calculada como cambio de veces con respecto a la tubulina como gen de referencia. Los cálculos se realizaron utilizando C_q y $2^{-\Delta C_q}$. Las barras representan medias \pm SD, $n = 3$. Los asteriscos encima de las barras indican que la respuesta al tratamiento fue significativamente diferente después de un ANOVA ($p \leq 0.05$).

Los resultados de la expresión de *at3* sugirieron que la acumulación de capsaicinoides observada después de los tratamientos con MHS y HHS estaba relacionada con la regulación del nivel de transcripción. Por lo tanto, las ondas acústicas MHS y HHS indujeron la transcripción de un gen crítico de la biosíntesis

de capsaicinoides (*at3* y *kas*), que es una explicación molecular parcial de por qué aumentaron en comparación con el Ruido blanco.

Cabe mencionar que, la asociación entre las respuestas después de la exposición corta (etapa 1) y la prolongada (etapa 2) de plantas de *C. annuum* a las EA se analizó mediante un análisis de componentes principales (PCA). Su correlación se muestra en la Fig. 9, así como también el cuadro 5, indica los porcentajes de dispersión de participación de los componentes en la respuesta integrada de todas las variables. Esto significa que la respuesta de transcripción de los genes *Pal* y *Pod* podría explicar aproximadamente el ~ 70% del efecto observado.

Cuadro 5. Porcentaje de representatividad de los principales componentes que influyen en la respuesta de las EA

| Número | Valor propio | Porcentaje | | Porcentaje acum. |
|--------|--------------|------------|--|------------------|
| 1 | 5,3199 | 33,470 | | 33,470 |
| 2 | 4,0953 | 25,766 | | 59,236 |
| 3 | 3,0099 | 18,937 | | 78,172 |
| 4 | 1,4593 | 9,181 | | 87,353 |
| 5 | 1,1871 | 7,468 | | 94,822 |
| 6 | 0,5255 | 3,306 | | 98,128 |
| 7 | 0,1908 | 1,200 | | 99,328 |
| 8 | 0,0791 | 0,497 | | 99,826 |
| 9 | 0,0243 | 0,153 | | 99,978 |
| 10 | 0,0034 | 0,022 | | 100,000 |

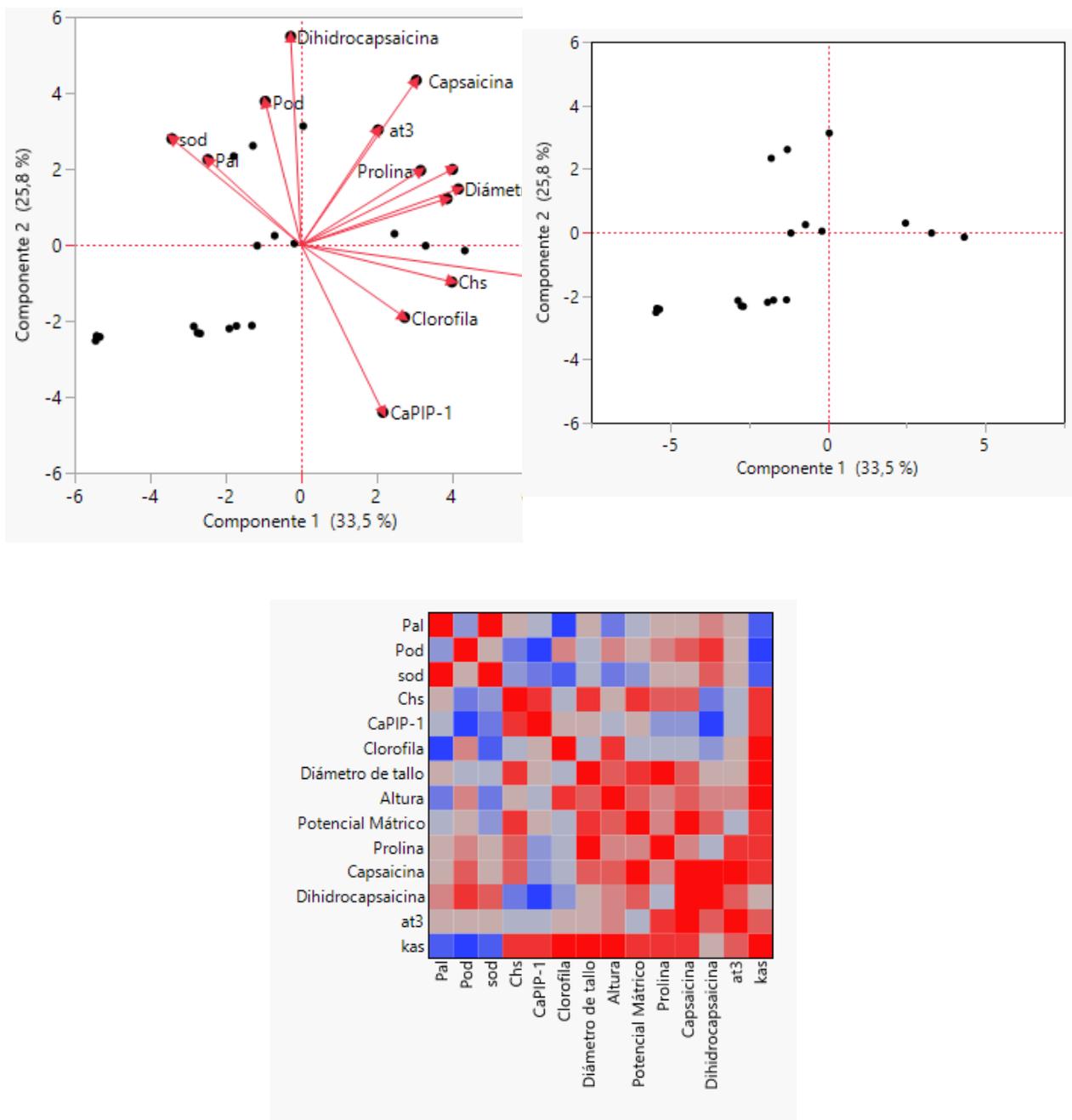
Contribución parcial de las diferentes respuestas variables a los tres primeros componentes principales que explican las respuestas de los EA.

Las correlaciones estadísticamente significativas (prueba de Spearman) se presentan en la gráfica de color de la figura 9. Las correlaciones positivas de los genes *Pod* y *Pal* (0,73 *) son similares a otros hallazgos que informaron una diferencia en los niveles de pungencia y crecimiento estimados en plantas estresadas por sequía. Autores encontraron un aumento en las actividades de las enzimas *Pal*, *C4h*, *At3* y peroxidasa (POD) (Phimchan et al., 2014). Por el contrario, *Chs* y *Pod* presentaron negativo ($p < 0,0471$ *). De manera equivalente, la capsaicina y la dihidrocapsaicina presentaron una fuerte correlación positiva ($p < 0,0001$ *). Los resultados del presente trabajo sugirieron que las plantas evaluadas en dos etapas de desarrollo pueden reaccionar de forma estadísticamente significativamente a la exposición de sonidos, tal como lo son las EA usadas en este trabajo, posiblemente activando mecanismos de respuesta a estímulos físicos.

Paralelamente, *Pod* presentó una correlación negativa con el gen de la acuaporina *CaPIP-1* ($p < 0,001$ *), mientras que *CaPIP-1* mostró una correlación positiva con *Chs* ($p < 0,0423$ *) e igualmente, *Sod* y *pal* presentaron una relación muy positiva. correlación ($p < 0,0065$ *). La tendencia negativa en la correlación entre *Pod* y *CaPIP-1* y positiva entre *CaPIP-1* y *Chs* indicó un posible efecto dinámico y cambiante ejercido por las frecuencias de las EA y el papel antioxidante que se juega cuando se generan estrategias en la planta para incrementar la tolerancia a

la sequía. Los genes *Mn-sod*, *Pod*, *Pal* y *Chs* codifican enzimas protectoras que forman parte del sistema de defensa antioxidante contra los radicales libres. y su respuesta variable cambió significativamente según el tratamiento con EA. El contenido de clorofila se correlacionó positivamente con la longitud ($p < 0,0175$ *) y negativamente con los genes *Pal* ($p < 0,0012$ *) y *Sod* ($p < 0,0174$ *).

Figura 9. Efecto de los EA en la respuesta integral de metabolismo primario y secundario de *C. annuum* L



Gráficos de resumen. Los cuadrantes a) y b) representan la distribución gráfica de PCA de diferentes respuestas variables; El cuadrante c) muestra un mapa de colores realizado con la correlación de Spearman significativa entre todas las variables evaluadas. Los colores indican los niveles de correlación, los esquemas de colores personalizados son los siguientes: correlación negativa = -1 (azul) y correlación positiva = 1 (rojo).

Como era de esperar, la respuesta molecular de dos genes de la vía esencial de la síntesis de capsaicinoides, como *at3* ($p < 0,0125$ *) y *Kas* ($p < 0,0053$ *), mostró una correlación positiva con capsaicina de (0,78 *) y (0,83 *) respectivamente, mientras que solo *at3* ($p < 0,0358$ *), con Dihidrocapsaicina (0,70 *).

Los resultados indican una respuesta correlacionada entre las dos etapas

fenológicas de las plantas (floración y fructificación) y su respectiva respuesta a los tratamientos con EA. En particular, la correlación negativa de la clorofila y la expresión relativa de *Pal* (-0.82 *) y *Sod* (-0.67 *) podría deberse a sus funciones metabólicas opuestas, como el metabolismo primario y secundario, respectivamente, diferente de la correlación de la longitud de la planta, lo cual se correlaciona positivamente (0,60 *). Además, el gen de la acuaporina se correlaciona positivamente con la dihidrocapsaicina ($p < 0,0030$ *). Al mismo tiempo, la osmorregulación de la prolina se correlaciona positivamente con el diámetro del tallo (0,66 *) y la expresión del gen *Chs* (0,72 *) con significaciones de $p < 0,0066$ * y $p < 0,0074$ *, respectivamente. Según el potencial matricial, se correlaciona positivamente con el gen *Chs* (0,65 *) $p < 0,0169$ *; contenido de capsaicina (0,86 *) y dihidrocapsaicina (0,74 *), ambos con una significación de $p < 0,0001$ *.

Los resultados son comparables con previos reportes que sugieren una relación causal entre el aumento de la síntesis de prolina y la tolerancia de las plantas al estrés hiperosmótico, ya que las plantas acumulan prolina durante la exposición a daños ambientales graves como la salinidad y la sequía (Hare et al., 1999) Su contenido puede variar del 5% al 80% del total de aminoácidos (Meena et al., 2019). Estos hallazgos respaldan que los EA relacionadas a los patrones de vibración de las plantas de *C. annuum* con estrés hídrico, pueden desencadenar respuestas moleculares y bioquímicas relacionadas con las respuestas al estrés por sequía, esto representa conocimiento nuevo relevante, ya que las EA están asociadas a señales provenientes de la planta.

VIII.8 Tolerancia a la sequía y productividad de biomasa como respuesta de recuperación después de EA y rehidratación

Se monitorearon las plantas expuestas a sequía y su capacidad de recuperación después de EA y rehidratación. El cuadro 6 indica el porcentaje de sobrevivencia de las plantas que sobrevivieron a la exposición a sequía por 12 días.

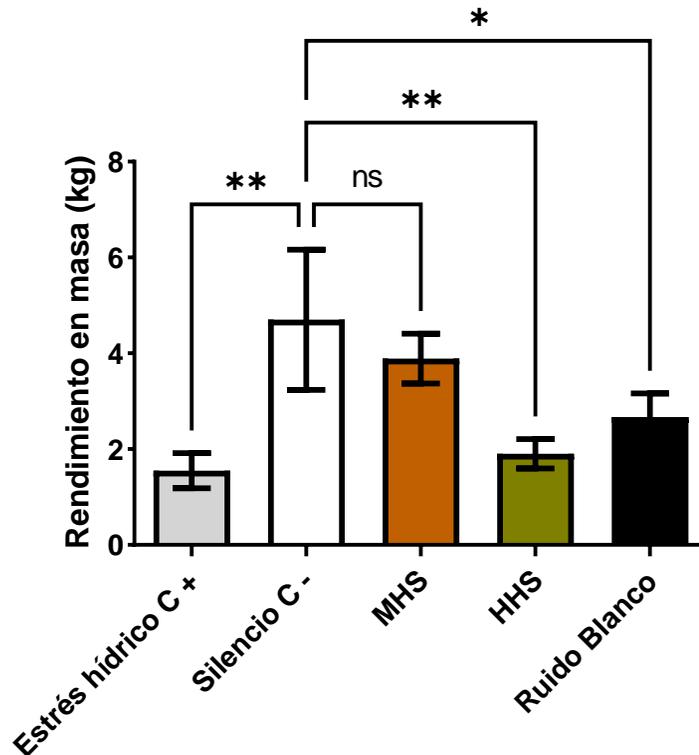
Cuadro 6. Aplicación de EA y porcentaje de sobrevivencia

| TRATAMIENTO /VARIABLE | |
|------------------------------|-----|
| ESTRÉS HÍDRICO C + | 56% |
| SILENCIO (C -) | 87% |
| MHS | 77% |
| HHS | 75% |
| RUIDO BLANCO | 81% |

Por otro lado, la figura 10 se muestra el porcentaje de productividad obtenidos en los diferentes tratamientos con EA. Para dicha estimación se contempló el rendimiento en masa de las plantas y el peso del fruto.

Figura 10. Efecto de los tratamientos EA en la biomasa de *C. annuum* L.

A)



B)

| Tratamiento /Variable | Peso Del Fruto (g)/kg de planta | Peso De La Planta (Kg) |
|---------------------------|---------------------------------|------------------------|
| ESTRÉS HÍDRICO C + | 0.02 ± 0 | 6.0 ± 0.25 |
| SILENCIO (C -) | 0.08 ± 0 | 6.8 ± 0.55 |
| MHS | 0.06 ± 0 | 6.6 ± 0.26 |
| HHS | 0.03 ± 0 | 7.0 ± 0.55 |
| RUIDO BLANCO | 0.04 ± 0 | 7.3 ± 0.60 |

Respuesta de la biomasa en plantas tratadas con EA. El recuadro A muestra los cambios de peso en la planta y el recuadro B indica la relación entre pesos de fruto / planta. Se consideraron análisis de varianza. Los resultados representan la media de tres réplicas ± DE *asteriscos expresan diferencias significativas respecto al control negativo por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

El estatus hídrico inicial afectó significativamente el peso total del fruto con respecto a la planta. El control negativo del riego demostró mantener valores promedios de producción. No obstante, el tratamiento acústico de Ruido blanco demostró un incremento del 7% en peso. Por otro lado, el peso es una variable que debe acompañarse de otras características morfológicas asociadas al desarrollo vegetal. Estas se muestran a continuación en el cuadro 7.

El control de silencio presentó una mayor altura entre los tratamientos en etapa de floración, mientras que el tratamiento MHS presentó mayor crecimiento en la fructificación. El diámetro de tallo lo presentó el Ruido blanco, al igual que el desarrollo foliar, acompañado del tratamiento MHS.

Literatura técnica del manejo de cultivo, refiere 20 a 30 t/ha (cuatro a seis cortes) bajo riego de aspersión o rodado y de 40 a 60 t/ha con sistema de fertirrigación (riego por goteo) (De Luna-Vega et al., 2017)

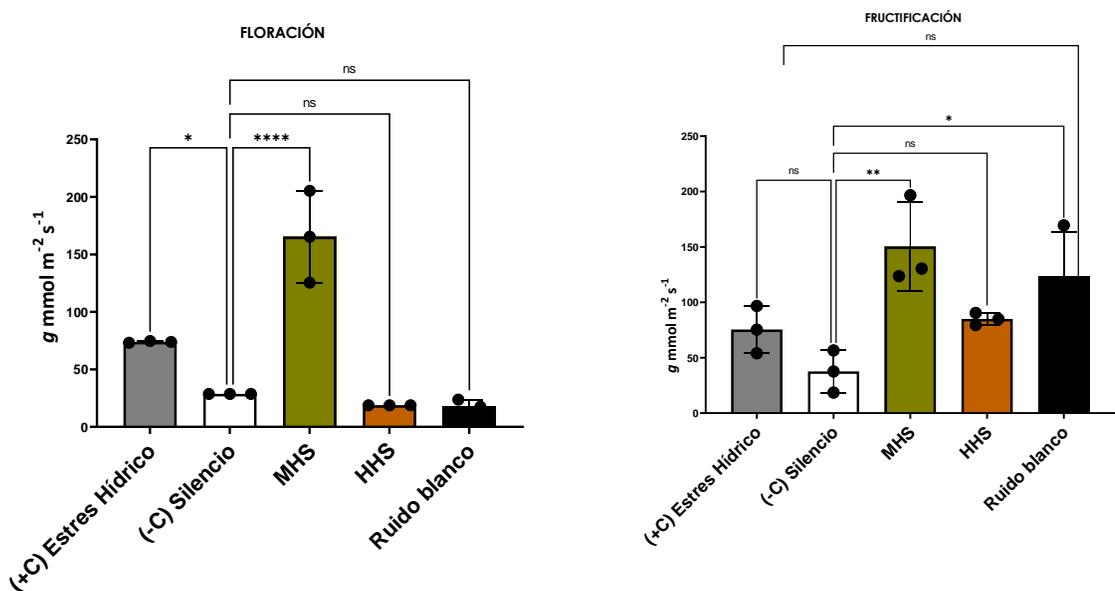
Cuadro 7. Efecto de las EA en el desarrollo morfológico de *C. annuum* 2 etapas fenológicas.

| EA | Altura (cm) | | Diámetro del tallo (mm) | | Número de hojas | |
|--------------|-------------------|-------------------|-------------------------|------------|-----------------|-----------------|
| | BF | FM | BF | FM | BF | FM |
| C + | 32.7 ± 1.2 | 51.7 ± 4.0 | 6.6 ± 0.4 | 8.7 ± 0.4 | 56 ± 9 | 111 ± 14 |
| (C-) | 55.5 ± 1.0 | 55.3 ± 17.4 | 7.9 ± 0.3 | 10.1 ± 2.9 | 85 ± 17 | 118 ± 21 |
| MHS | 37.1 ± 3.2 | 61.1 ± 8.5 | 2.2 ± 1.1 | 10.3 ± 1.9 | 58 ± 5 | 143 ± 16 |
| HHS | 43.3 ± 4.0 | 55.8 ± 14.9 | 2.5 ± 0.9 | 10.3 ± 1.4 | 64 ± 6 | 118 ± 29 |
| Ruido blanco | 46.8 ± 2.0 | 61.7 ± 3.1 | 8.4 ± 0.6 | 12 ± 1.3 | 60 ± 11 | 156 ± 27 |

Etapas: Floración (BF); Madurez de fructificación (FM). Los valores muestran la media de tres experimentos independientes. Los resultados representan la media de tres réplicas ± DE

Paralelamente, se midió la conductancia estomática y las diferencias entre tratamientos pueden observarse en la figura 11.

Figura 11 Efecto de EA sobre la conductancia estomática y el rendimiento de cultivo de *C. annuum* L. campo



Los cuadrantes A) y B) muestran la conductancia estomática después de los tratamientos con EA, respectivamente. Se consideraron análisis de varianza. Los resultados representan la media de tres réplicas ± DE *asteriscos expresan diferencias significativas respecto al control negativo por la prueba de Dunnet (p < 0.05).

Una explicación del comportamiento de ganancia-perdida de biomasa y transpiración puede explicarse considerando que la limitación de agua en las plantas promueve la biosíntesis/acumulación de ácido abscísico (ABA), que tiene un papel crucial en el cierre estomático, lo que conduce a una disminución de la conductancia estomática y minimiza las pérdidas por transpiración (Balestrini et al., 2018).

El tratamiento MHS puede inducir una mayor conductancia estomática en niveles significativamente más altos que los controles. Esto es de interés para la tolerancia

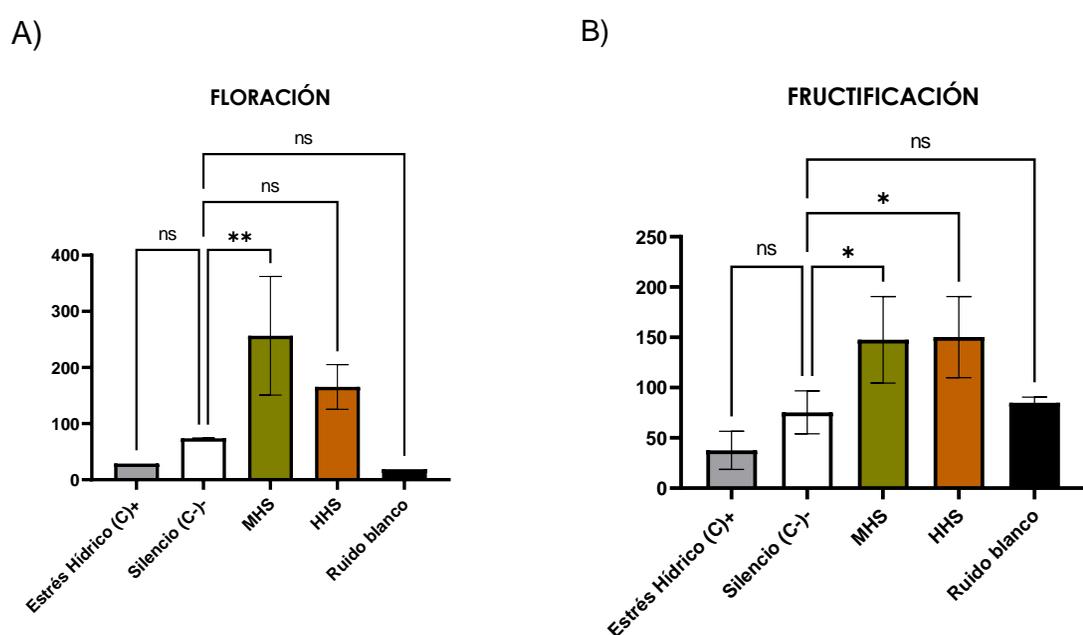
a sequía ya que se ha reportado que un alto rendimiento requiere una alta conductancia estomática para mantener una fijación de CO₂ adecuada.

Además, algunas características de las hojas, como el número/densidad de estomas y la estructura del mesófilo de la hoja, pueden aumentar la eficiencia en el uso del agua (Leonardis & Petrarulo, 2012). Convenientemente, la regulación epigenética está emergiendo como un mecanismo esencial en respuesta al estrés, como la variante H1-S de la histona enlazadora inducida por la sequía, que está relacionada con la regulación negativa de la conductancia estomática en las plantas de tomate (Scippa et al., 2004).

Otros estudios realizados en trigo sugieren que variedades modernas de alto rendimiento mantienen altas tasas de conductancia estomática con una humedad óptima del suelo, para reducir la conductancia estomática cuando la humedad del suelo es limitada. Estos resultados sugieren que pruebas de mayor profundidad molecular son requeridas para integrar los hallazgos y descifrar el mecanismo molecular que regula los cambios de conductancia estomática observados.

Por lo tanto, proporcionar información precisa sobre la capacidad de supervivencia después de los tratamientos con EA puede implicar factores adicionales. Por lo tanto, de los resultados puede inferirse el efecto estomático y de rendimiento en cultivo se relacionan de forma proporcional. También se midió la transpiración, como se muestra a continuación en la figura 12. Asimismo, la correlación entre conductancia estomática y transpiración se identificó como una relación proporcional.

Figura 12. Efecto de EA sobre la conductancia estomática y el rendimiento de cultivo de *C. annuum* L. campo



Los cuadrantes A) y B) muestran la conductancia estomática después de los tratamientos con EA, respectivamente. Se consideraron análisis de varianza de correlaciones significativas para significación estática $P < 0,001^*$, y los asteriscos (*) muestran las diferencias.

Cabe resaltar que la conductancia estomática varía con respecto a la intensidad de la luz, a diferencia de la escala de la hoja, donde la conductancia estomática muestra aumentos marginales o decrecientes (Wehr et al., 2017).

Otra posible explicación de los resultados en transpiración y conductancia estomática en hoja, tanto de controles como de EA es que la conductancia estomática se ha modelado extensamente empírica y teóricamente. Ambos enfoques lo describen como proporcional a la fotosíntesis neta, dadas las concentraciones fijas de CO₂ y vapor de agua en el aire. Sin embargo, la asociación entre la transpiración y el estado fisiológico indica que la planta se encuentra activa en su proceso metabólico, generalmente en estados de enfriamiento evaporativo, absorción de nutrientes y entrada de bióxido de carbono.

Esto podría explicar que la evapotranspiración aumente casi 4 veces en los tratamientos MHS y de Ruido blanco. Autores han reportado que a medida que avanza la temporada de crecimiento, hay variaciones en las tasas de conductancia estomática y transpiración (Wehr et al., 2017).

Otros resultados de interés estimados corresponden al factor de índice de salud. Este valor es un estimador arbitrario que puede ser obtenido de cada especie y se comportará en rangos específicos debido a la proporción de valores. En este caso, la referencia fue el control negativo, estableciéndose valores normalizados (con respecto al control), en el que se consideraron los siguientes estimadores: índice de plantas enfermas >10 y plantas sanas <10. El cuadro 8 muestra que MHS exhibió un aumento de desarrollo foliar en el número de hojas, diámetro del tallo y longitud, lo que resultó en un índice más saludable que los demás tratamientos en ambas etapas, seguido por Ruido blanco que mostró valores aún mayores, pero más en las etapas de fructificación, por encima del control negativo. Por el contrario, el control positivo y los EA con más restricción de riego mostraron valores de índice de desarrollo morfológico y de insalubridad más bajos, cercanos a 20 (Máx). Sin embargo, HHS no mostró diferencias en el control negativo.

Cuadro 8. Diferencias morfológicas de *C. annum* L. después de tratamientos con EAs en diferentes estados fenológicos

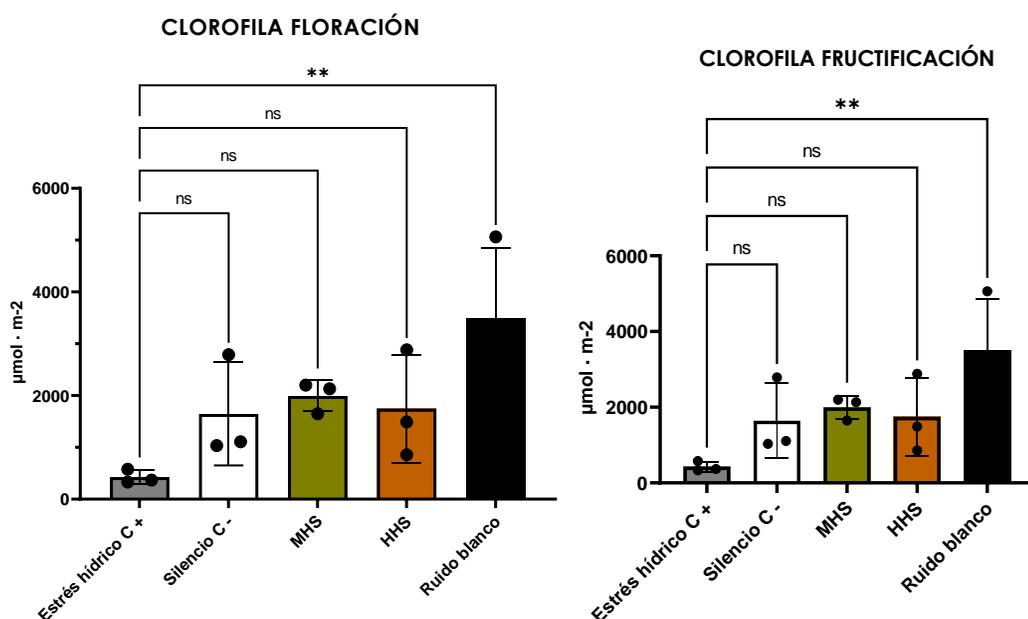
| Etapa Tratamiento | BF | FM | BF | FM | BF | FM | FM |
|----------------------|--------------------|--------|---------------------------|-------|----------------|-------|----------------------------|
| | Numero de hojas | | Diámetro de tallo (cm) | | Altura (cm) | | Índice de salud vegetal |
| C+ | 64 | 103,5 | 6,7 | 11,1* | 32,8 | 52 | 18,87 |
| C- | 85* | 129,7* | 7,9 | 9,3 | 55,5* | 48 | 9,93 |
| MHS | 58 | 142,7* | 2,2 | 10,3* | 37,2 | 61,2* | 4,22 |
| HHS | 56 | 118,3 | 2,6 | 8,7 | 43,3 | 55,8 | 4,49 |
| Ruido blanco | 60 | 156,3* | 8,4 | 12* | 46,8* | 61,7* | 13,96 |

Etapas: Floración (BF); Madurez de fructificación (FM). Los valores muestran la media de tres experimentos independientes. El índice de sanidad se calculó dividiendo el diámetro del tallo entre la altura, multiplicando el resultado por peso seco y peso seco según (Aguirre-Becerra et al., 2020; Pérez-Llorca et al., 2018).

Con respecto al contenido de clorofila, diversos factores ambientales como la sequía y salinidad pueden disminuir la actividad de los pigmentos fotosintéticos (clorofila), sin embargo, estas diferencias también pueden ser un resultado de una fertilización inadecuada (Chávez et al., 2018). El contenido de nitrógeno (N) está estrechamente relacionado con la capacidad fotosintética de las hojas debido a que los tilacoides y las proteínas del ciclo de Calvin representan la mayoría del N foliar, lo que indica una relación muy estrecha entre la concentración de clorofila y el contenido de N (Muñoz-Huerta et al., 2013).

En un estudio se evaluó el efecto del contenido total de clorofila sobre la eficiencia del uso del agua en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.). Los resultados que obtuvieron fueron que aquellos cultivares que tuvieron una eficiencia alta de transpiración también tuvieron un alto contenido de clorofila en condiciones de estrés por sequía y bien regadas (Fotovat et al., 2007). Lo que indica que en condiciones de sequía existe una relación positiva entre los contenidos de clorofila y transpiración. En la figura 13 se muestran los resultados inducidos por las EA con respecto al contenido de clorofila, donde el único tratamiento que demostró diferencias estadísticamente significativas fue el Ruido blanco. No obstante, todos los tratamientos indican mayores contenidos que el acumulado en las plantas mantenidas con estrés hídrico.

Figura 13. Efecto de EA sobre el contenido de clorofila en diferentes estados fenológicos de *C. annuum* L.

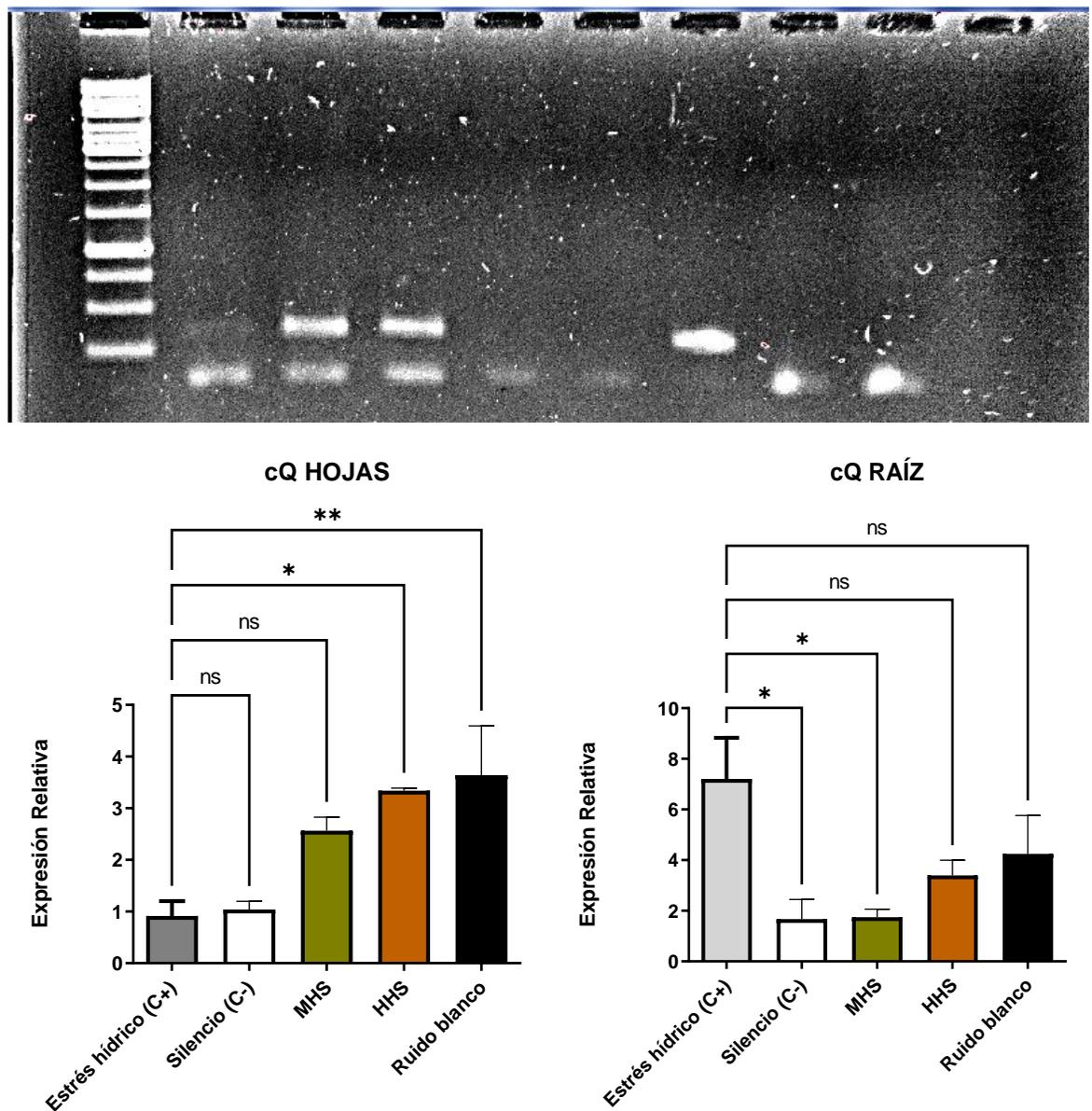


Los valores de SPAD de contenido de clorofila ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$) se recalcaron de acuerdo con el método utilizado por Richardson (Richardson et al., 2002). Todos los resultados se calcularon usando la fórmula: $(\text{valor SPAD} \wedge 0,264)$. Los datos se expresan con unidades ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$). Se consideraron análisis de varianza. Los resultados representan la media de tres réplicas \pm DE *asteriscos expresan diferencias significativas respecto al control negativo por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

La respuesta transcripcional se muestra en la figura 14. Los resultados mostraron que la expresión de *CaPIP-1* fue variable entre tratamientos y particularmente, en el control positivo de estrés hídrico entre etapas fenológicas. Cabe resaltar que la expresión relativa de estas proteínas depende del nivel de estrés, tejido, especie y por supuesto de la isoforma de las acuaporinas.

En este trabajo se consideró el papel que juegan las acuaporinas en una posible respuesta de tolerancia a sequía. La expresión relativa del gen *caPIP-1* en las hojas fue de 0.36 para el control negativo de Silencio, 0.49 para el control positivo de estrés hídrico, 1.37 para el tratamiento MHS y 0.11 para HHS.

Figura 14. Efecto de EA sobre la expresión de acuaporinas *CaPIP-1* en diferentes estados fenológicos de *C. annuum* L.



Se consideraron análisis de varianza. Los resultados representan la media de tres réplicas \pm DE *asteriscos expresan diferencias significativas respecto al control negativo por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

Se ha reportado que una disminución en la regulación de las acuaporinas en la familia *PIP* reduce la pérdida de agua y previene el descenso del agua al suelo. No

obstante, se ha encontrado una importante participación por parte de las acuaporinas no solo en el transporte del agua, sino que también en el transporte del CO₂ por medio de la formación de hetero tetrámeros (proteínas formadas por cuatro subunidades diferentes) entre las mismas familias de acuaporinas mejorando así su conductancia estomática, fotosintética y además el crecimiento de la planta en general (Afzal et al., 2016).

Por ejemplo, en plantas de maíz transgénico se encontró una relación entre el cierre estomático y la actividad de las acuaporinas para mantener un estatus hídrico en las plantas en condiciones de sequía (Chávez Suárez et al., 2014).

No obstante, se han encontrado varias discrepancias entre la expresión del ARNm de las acuaporinas con respecto a las proteínas sintetizadas por la planta en respuesta a los estreses abióticos a los que ha sido expuesta, lo que indica que las acuaporinas tienen participación en las vías de las hormonas que son inducidas por el estrés (Afzal et al., 2016; Yepes-Molina et al., 2020). Lo que podría deberse a que la modificación en la expresión de genes y la acumulación de ciertas proteínas en respuesta a estrés hídrico. Esto no siempre está armonizado con cambios en la expresión de genes, ya que es una respuesta que tiene la planta en poco tiempo. Por el contrario, la participación de las proteínas se presenta en un periodo de estrés largo (Yepes-Molina et al., 2020). Sin embargo, en estos resultados mostraron una correlación positiva con la acuaporina *caPIP-1* y el aminoácido prolina quien forma parte de las proteínas.

Por ejemplo, en figura 15 se muestra el contenido de prolinas en hojas y raíces en ambas etapas fenológicas. Ambos resultados se consideraron debido a su relevancia en el transporte de agua y osmorregulación, acuaporinas y prolina, respectivamente.

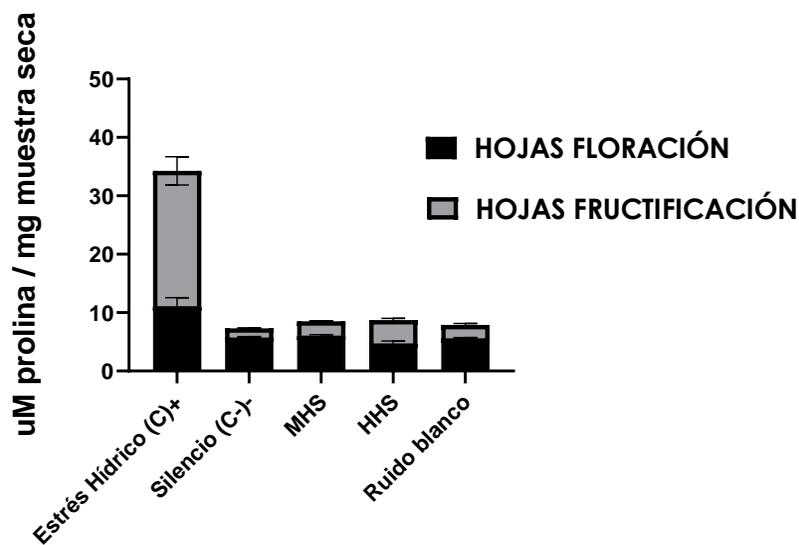
La aclimatación que llevan a cabo las plantas cuando se encuentran bajo condiciones de sequía, consiste en un ajuste osmótico que es una reducción en la diferencia de potencial de agua entre las células de la planta y el suelo, fenómeno conocido como evapotranspiración. Este ajuste está relacionado con la acumulación de metabolitos solubles de bajo peso molecular también denominados osmolitos como: glucosa, sacarosa, manitol, sorbitos, poliaminas, espermina, putrescina y prolina desarrollados como mecanismos de protección incluyendo también cambios en las actividades enzimáticas y en la expresión génica. Habiendo preferencia por la síntesis de aminoácidos como la prolina y proteínas como las llamadas acuaporinas (Flores Marín, 2013).

Aunque las proteínas son importantes en las vías de transducción de señales, existen otros tipos de moléculas que también pueden participar. Varios segundos

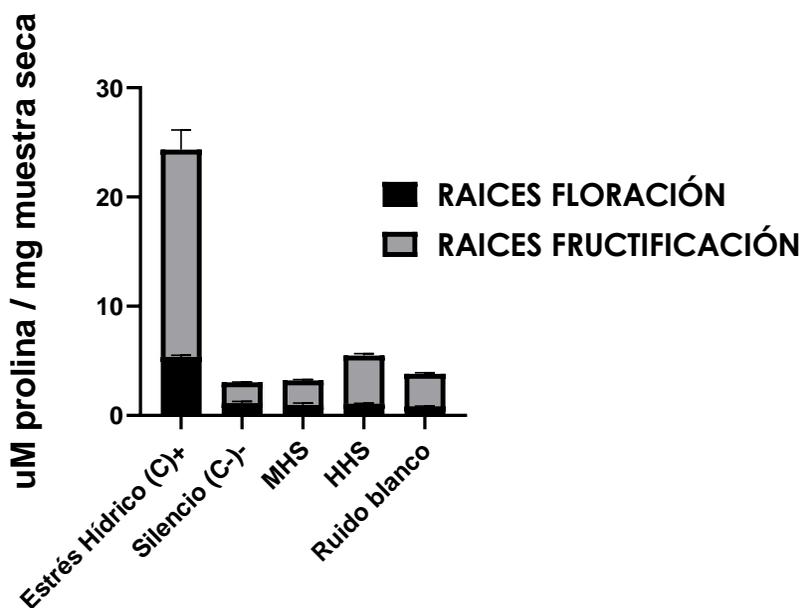
mensajeros como el calcio, los nucleótidos cíclicos, los fosfolípidos, etcétera, son utilizados por las plantas para codificar información y llevarla a la parte más baja de la cadena de señalización a las proteínas que decodifican/interpretan señales e inician respuestas celulares (cambios en la actividad enzimática, expresión génica, citoesqueleto reorganización, etc.). Evidencia creciente indica que cambios espaciales y temporales en los niveles de estos segundos mensajeros se utilizan para codificar información celular sobre respuestas necesarias para un estímulo proveniente de una condición ambiental, tal como lo es el estrés hídrico (Song et al., 2008).

Figura 15. Efecto de EA sobre la acumulación de prolina en hojas y raíces bajo diferentes estados fenológicos de *C. annuum* L.

A)



B)



Además,
se ha

Se consideraron análisis de varianza. Los resultados representan la media de tres réplicas \pm DE

Por otro lado, los indicadores del metabolismo secundario se evaluaron después de las aplicaciones consecutivas solo en la etapa de fructificación.

VIII.9 Diferencias entre la respuesta del metabolismo primario y secundario a la tolerancia a la sequía después de los EA.

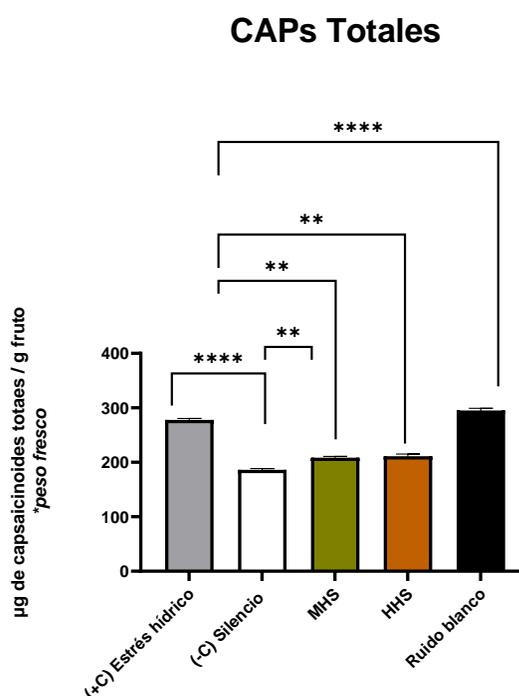
El control positivo mostró una acumulación sustancial de flavonoides libres totales, seguido de tratamientos con MHS. De manera similar, los compuestos fenólicos libres tuvieron la acumulación más sólida en C+ seguido de MHS (ver cuadro 10) y el contenido de capsaicinoides totales (figura 15).

Cuadro 9. Efecto de la aplicación consecutiva de EA en contenido total de fenoles, flavonoides libres totales y capacidad antioxidante de *C. annuum* L.

| EA | Flavonoides totales | Ácidos fenólicos totales libres | Capacidad antioxidante DPPH |
|--------------|---------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| C+ | 398,39 | 68,57* | 91,78 |
| C- | 200,40- | 61,71 | 101,33* |
| MHS | 294,95* | 63,33* | 90,47 |
| HHS | 265,01* | 52,57 | 96,64* |
| Ruido blanco | 252,98 | 53,76 | 93,91 |

*Todos los valores se calcularon sobre la base seca de *hojas. Flavonoides totales, ácidos fenólicos se calculan en base a μg de estándares comerciales puros comerciales Sigma Aldrich (98%) según su curva de calibración previamente calculada ($R= 99\%$). Los flavonoides se expresan como equivalente de rutina (404 nm), los ácidos fenólicos libres totales como equivalente de ácido gálico (760 nm) y Trolox (520 nm).

Figura 16. Efecto de las EA en la acumulación de capsaicinoides totales en *C. annuum*.



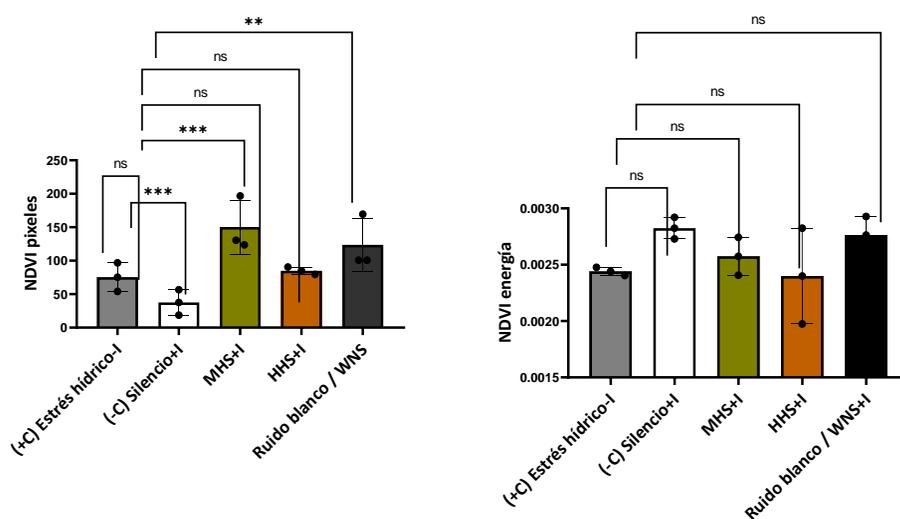
CAPs: capsaicinoides totales equivalentes a vainillylamida y fenoles como equivalentes de ácido gálico estimados en frutos tratados con EA en dos etapas fenológicas consecutivas. Los resultados representan la media de tres réplicas \pm DE *asteriscos expresan diferencias significativas respecto al control negativo por la prueba de Dunnet ($p < 0.05$).

Los resultados sugieren que el tratamiento MHS tiene potencial para inducir la capacidad antioxidante en hojas, seguido del HHS. Por otro lado, aunque MHS y HHS no presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles, se observa un incremento con respecto a las plantas sin EA. De manera diferente, el tratamiento con ruido blanco demostró un incremento significativo con los demás tratamientos de EA. Los resultados muestran esquemas contrastantes que sugieren la respuesta combinada que activan las plantas luego de los tratamientos con EA.

En cuanto al efecto sobre las propiedades nutraceuticas, como el aumento de compuestos de interés como los ácidos fenólicos y los capsaicinoides, las técnicas analíticas mostraron que las cantidades totales en frutos aumentaron significativamente después de los tratamientos con EA. Todos los EA estimularon los CAPs totales en una tendencia diferente a la etapa 2 de la investigación.

En la respuesta espectral a través de imágenes NDVI, solo los píxeles promedio de NDVI evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos, mientras que el índice de energía, el cual se obtiene con la matriz de coocurrencia de la imagen de la cual se obtiene el índice NDVI, no mostró resultados comparables. Sin embargo, los píxeles revelaron diferencias significativas f MHS+I, MHS-I y Ruido blanco en comparación con el grupo de control de silencio. A partir del estudio, el resultado sugiere que evitar la sequía con los tratamientos EA incluye no solo adaptaciones fisiológicas sino también variaciones morfológicas y multiespectrales, según las correlaciones realizadas entre los resultados de imágenes bioquímicas, morfológicas y NDVI (ver figura 17).

Figura 17. Efecto de la aplicación consecutiva de tratamientos EA en la variación de imágenes NDVI en *C. annum* L.



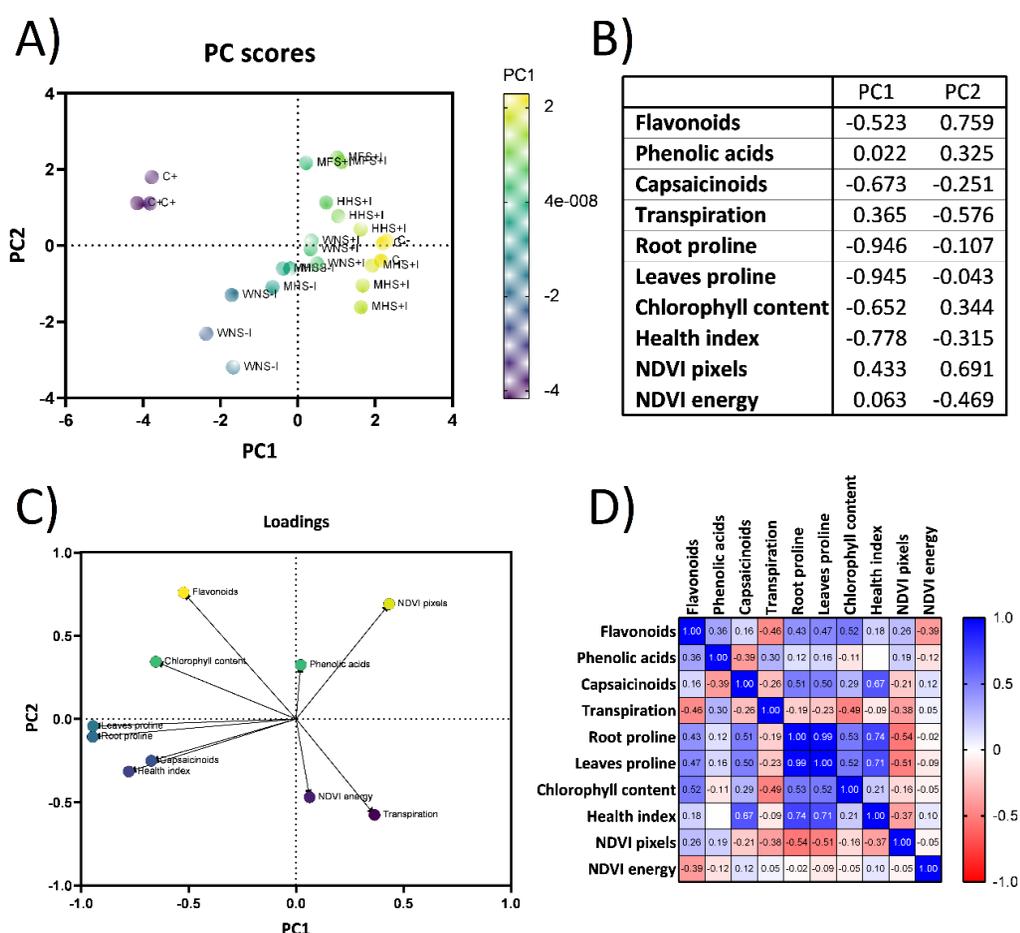
Cuadrante A indica el cálculo representativo de píxeles y el cuadrante B, el equivalente a nivel de energía estimado a partir de las imágenes NDVI.

De manera similar, en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con salinidad mostró a través del análisis NDVI un índice más alto de las imágenes antes del estrés visible. Finalmente, se observó estrés antes de la detección visual durante el tratamiento con nitrato de amonio de las plantas de *Eruca sativa*. Por lo tanto, es posible la detección temprana del estrés de las plantas utilizando imágenes NDVI, siendo más rentable que las imágenes hiperespectrales o NDVI tradicionales de imagen dual (Beisel et al., 2018). La productividad del cultivo se consideró de acuerdo con el índice de sanidad del rendimiento del fruto. Al mismo tiempo, los píxeles y la energía del NDVI son señales de aptitud física indirectas.

VIII.10 Efecto multivariante de los tratamientos con EA en la respuesta del metabolismo primario y secundario de las plantas de *C. annuum* L.

Para realizar una interpretación integral, se analizó el efecto multivariante de los resultados como se muestra en la figura 19.

Figura 18. Análisis de componentes principales en plantas de *C. annuum* después de 14 días de tratamiento sonoro con EAs.



Los cuadrantes A) y B) representan la distribución gráfica PCA de diferentes respuestas variables; C) muestra una contribución parcial de las diferentes respuestas variables a los tres primeros componentes principales que explican las respuestas de los EA. El cuadrante D) muestra un mapa de colores elaborado con la correlación de Spearman significativa entre las variables evaluadas. Los colores indican los niveles de correlación, los esquemas de colores personalizados son los siguientes: correlación negativa = -1 (rojo) y correlación positiva = 1 (azul). Las correlaciones significativas son $P < 0,001^*$

La correlación positiva entre la transpiración y los flavonoides y el contenido de prolina y capsaicinoides confirma que los EA pueden afectar simultáneamente el metabolismo primario y secundario. Por lo tanto, en una etapa de desarrollo se induce una respuesta de estrés particular bajo dos semanas de exposición al sonido de las plantas. Tal estrés puede alterar la acumulación de prolina foliar y el contenido de capsaicinoides, por lo que podrían ser deseables tiempos cortos de exposición al sonido. De lo contrario, se podría ocasionar un detrimento en el rendimiento de frutos en etapas de desarrollo.

Estos hallazgos en comparación con las demás etapas de la investigación coinciden con resultados reportados en la literatura. Por ejemplo, con el contenido total de flavonoides encontrado después tratar con diversas frecuencias distintos tipos de vegetales, que demostraron una regulación positiva de los genes *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H* y *DFR* (Jeong et al., 2020).

Con respecto a las correlaciones entre estomas, fotosíntesis, abundancia de osmoprotectores, potencial hídrico de los tejidos e integridad de la membrana celular (Laxa et al., 2019). Con respecto a los píxeles de NDVI y la prolina de las hojas (-0.50), las plantas estresadas acumulan la prolina de osmolito porque es una respuesta crítica a una amplia gama de estreses bióticos y abióticos. También interviene en el ajuste osmótico, estabiliza las estructuras subcelulares y elimina los radicales libres. Por lo tanto, su correlación negativa con los píxeles NDVI sugiere que las imágenes pueden aproximarse a ciertos niveles de estrés según los rangos de píxeles en las plantas. Es decir, entre más sana la planta los niveles de NDVI son más altos y la prolina más baja.

La exposición consecutiva a tratamientos sonoros por 2 semanas (etapa 3) sugieren que MHS y HHS exhiben potencial significativo para el aprovechamiento de estímulos acústicos en la producción agrícola. Sin embargo, debe evitarse una aplicación crónica o consecutiva de EA debido a que puede generarse un impacto negativo en el metabolismo primario y afectar el rendimiento en campo.

Se relaciona con la primera etapa del presente estudio cuando se reportó que la transcripción de genes antioxidantes en la exposición corta demostró una correlación positiva con la activación del metabolismo secundario por exposición a EA (Caicedo-lopez et al., 2021). Finalmente, es podría inferirse que la sensibilidad o la capacidad de respuesta de un sistema biológico hacia un estímulo externo, como las aplicaciones de EA tienen potencial para inducir el metabolismo secundario y, en consecuencia, incremental el potencial nutracéutico de hojas y frutos.

VIII.11 Aportes finales de la investigación

- a) La sensibilidad de las plantas a determinadas frecuencias podría ser dependiente de la estructura física, geometría y densidad foliar del tejido vegetal. Esto probablemente explica que cada especie tenga una selectividad en la respuesta a determinadas frecuencias.
- b) La edad fenológica y tiempo de exposición al sonido influye en la respuesta fisiológica y bioquímica de la planta. Para el chile jalapeño es preferible usar frecuencias multitono (MHS y HHS) de baja intensidad por cortos periodos (menores a 1 hora/semana). Si se usa Ruido blanco (Ruido blanco) pueden ser aplicaciones más prolongadas (2 semanas) y antes de la cosecha y debe evitarse la aplicación durante el desarrollo de la planta.
- c) Los estímulos físicos son una alternativa ecológica de elicitación viable de “eustress” para inducir mayor producción de compuestos bioactivos y, por lo tanto, confieren activación de mecanismos protectores en la planta.

IX. Conclusión

Los patrones de vibración característicos del estrés hídrico en plantas *Capsicum annuum L.*, tienen potencial para aplicarse como tratamientos biofísicos en forma de emisiones acústicas (EA) para inducir tolerancia al estrés hídrico e incrementar la síntesis de metabolitos secundarios asociados al estrés por sequía.

X. Perspectivas

El impacto de las ondas sonoras en las plantas es un campo de investigación que debe abordarse desde un enfoque integral. Principalmente en plantas de interés agroalimentario como trigo, arroz, tomate, pepino y otras hortalizas de alto consumo humano. Algunas de estas ya han sido estudiadas y han demostrado efectos en la regulación del crecimiento. No obstante, aunque el tratamiento sonoro ha ganado una atención significativa, la investigación sobre el rendimiento de frutos en cultivo e inducción de metabolitos especializados sigue siendo escasa. Por lo tanto, estudios de transcriptómica, proteómica y metabolómica serán útiles en el aprovechamiento del sonido en la producción de alimentos.

XI. Financiamiento otorgado para el desarrollo de la investigación

1. Beca de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT-México [número-71429] con vigencia para el periodo 2018-2022.
2. Beca institucional por la Universidad Autónoma de Querétaro [número 255309].
3. Fondo para el fortalecimiento de la investigación FOFI-UAQ 2018 con

- número de registro FIN201902 por la Universidad Autónoma de Querétaro
4. Fondo de Proyectos especiales de la Rectoría 2021 – FOPER 2021-FIN2427 por la Universidad Autónoma de Querétaro
 5. Fondo para el Desarrollo del Conocimiento FONDEC 2021-1117, número de proyecto FIN202205, por la Universidad Autónoma de Querétaro
 6. Instituciones colaboradoras
 7. Centro Nacional de Metrología de México (CENAM)
 8. Departamento de Ciencias de la Alimentación y Nutrición Humana, Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, Champaign, IL, EE. UU.

XII. Referencias

- Afzal, Z., Howton, T. C., Sun, Y., & Mukhtar, M. S. (2016). The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of Developmental Biology*, 4(1), 9.
- Allievi, S., Arru, L., Forti, L., Allievi, S., Arru, L., & Forti, L. (2021). A tuning point in plant acoustics investigation A tuning point in plant acoustics investigation. *Plant Signaling & Behavior*, 00(00).
<https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1919836>
- Alvarado, A. M., Aguirre-Becerra, H., Vázquez-Hernández, M. C., Magaña-Lopez, E., Parola-Contreras, I., Caicedo-Lopez, L. H., Contreras-Medina, L. M., Garcia-Trejo, J. F., Guevara-Gonzalez, R. G., & Feregrino-Perez, A. A. (2019). Influence of Elicitors and Eustressors on the Production of Plant Secondary Metabolites. In *Natural Bio-active Compounds*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7154-7_11
- Bacete, L., & Hamann, T. (2020). The role of mechanoperception in plant cell wall integrity maintenance. *Plants*, 9(5), 574.
- Balestrini, R., Chitarra, W., Antoniou, C., Ruocco, M., & Fotopoulos, V. (2018). Improvement of plant performance under water deficit with the employment of biological and chemical priming agents. *Journal of Agricultural Science*, 1–9.
<https://doi.org/10.1017/S0021859618000126>
- Basith, S., Cui, M., Hong, S., & Choi, S. (2016). Harnessing the therapeutic potential of capsaicin and its analogues in pain and other diseases. *Molecules*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/molecules21080966>
- Beisel, N. S., Callahan, J. B., Sng, N. J., Taylor, D. J., Paul, A. L., & Ferl, R. J. (2018). Utilization of single-image normalized difference vegetation index (SI-NDVI) for early plant stress detection. *Applications in Plant Sciences*, 6(10), e01186. <https://doi.org/10.1002/aps3.1186>
- Berry, Z. C., Emery, N. C., Gotsch, S. G., & Goldsmith, G. R. (2019). Foliar water uptake: processes, pathways, and integration into plant water budgets. *Plant, Cell & Environment*, 42(2), 410–423.
- Bhandawat, A., Jayaswall, K., Sharma, H., & Roy, J. (2020). Sound as a stimulus

- in associative learning for heat stress in Arabidopsis. *Communicative and Integrative Biology*, 13(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1080/19420889.2020.1713426>
- Bidhendi, A. J., & Geitmann, A. (2019). Methods to quantify primary plant cell wall mechanics. *Journal of Experimental Botany*, 70(14), 3615–3648.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz281>
- Braam, J., & Braam, J. (2004). In touch - plant responses to mechanical stimuli (2004) NP . *New Phytologist*, 165(2), 17. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01263.x>
- Bruinsma, J. (2017). *World agriculture: towards 2015/2030: an FAO study*. Routledge.
- Cai, W., Dunford, N. T., Wang, N., Zhu, S., & He, H. (2016). Audible sound treatment of the microalgae *Picochlorum oklahomensis* for enhancing biomass productivity. *Bioresource Technology*, 202, 226–230.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.019>
- Caicedo-Lopez, L. H., Aranda, A. L. V., Márquez, E. E., Gómez, C. E. Z., & Romero-Zepeda, H. (2021). Elicitors : bioethical implications for agriculture and human health. *Revista Bioética*, 29(1), 76–86.
- Caicedo-Lopez, L. H., Contreras-Medina, L. M., Guevara-Gonzalez, R. G., Perez-Matzumoto, A. E., & Ruiz-Rueda, A. (2020). Effects of hydric stress on vibrational frequency patterns of *Capsicum annuum* plants. *Plant Signaling & Behavior*, 1770489. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1770489>
- Caicedo-lopez, L. H., Sc, M., Caicedo-lopez, L. H., Sc, M., Caicedo-lopez, L. H., Sc, M., Guevara-gonzalez, R. G., & Ph, D. (2021). Plant Physiology and Biochemistry Effect of hydric stress-related acoustic emission on transcriptional and biochemical changes associated with water deficit in *Capsicum annuum* L . *Plant Physiology and Biochemistry*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.011>
- Chávez, E. S., Ruiz, J. M., Romero, L., Preciado-Rangel, P., Flores-Córdova, M. A., & Márquez-Quiroz, C. (2018). ¿Son los pigmentos fotosintéticos buenos indicadores de la relación del nitrógeno, fósforo y potasio en frijol ejotero? *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(15), 387.
<https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1757>
- Chávez Suárez, L., Álvarez Fonseca, A., & Ramírez Fernández, R. (2014). Aspectos de interés sobre las acuaporinas en las plantas. *Cultivos Tropicales*, 35(3), 45–54.
- Chehab, E. W., Eich, E., & Braam, J. (2009). Thigmomorphogenesis: A complex plant response to mechano-stimulation. *Journal of Experimental Botany*, 60(1), 43–56. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern315>
- Choi, B., Ghosh, R., Gururani, M. A., Shanmugam, G., Jeon, J., Kim, J., Park, S.

- C., Jeong, M. J., Han, K. H., Bae, D. W., & Bae, H. (2017). Positive regulatory role of sound vibration treatment in *Arabidopsis thaliana* against *Botrytis cinerea* infection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02556-9>
- Cochard, H., Badel, E., Herbette, S., Delzon, S., Choat, B., & Jansen, S. (2013). Methods for measuring plant vulnerability to cavitation: A critical review. *Journal of Experimental Botany*, 64(15), 4779–4791.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert193>
- de Langre, Emmanuel, Penalver, O., Hemon, P., Frachisse, J.-M., Bogeat-Triboulot, M.-B., Niez, B., Badel, E., & Moulia, B. (2019). Nondestructive and Fast Vibration Phenotyping of Plants. *Plant Phenomics*, 2019, 6379693.
- DE LUNA-VEGA, A., GARCÍA-SAHAGÚN, M. L., RODRIGUEZ-GUZMAN, E., PIMIENTA-BARRIOS, E., & GONZÁLEZ-LUNA, S. (2017). Response of jalapeño pepper (*Capsicum annum* L.) Organic with drip irrigation and plastic mulch. *ECORFAN Journal-Republic of Nicaragua*, 3–4.
- Dorji, K., Behboudian, M. H., & Zegbe-Dominguez, J. A. (2005). Water relations, growth, yield, and fruit quality of hot pepper under deficit irrigation and partial rootzone drying. *Scientia Horticulturae*, 104(2), 137–149.
- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., & Saud, S. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1147.
- FAO. (2018). The impact of disasters and crises on agriculture and food security. In 2018. <https://doi.org/978-92-5-130359-7>
- 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>
- Ferri, M., Gruarin, N., Barbieri, F., & Tassoni, A. (2017). all Aspects of Plant Biology *Capsicum* spp in vitro liquid cell suspensions : A useful system for the production of capsaicinoids and polyphenols. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 3504(April), 1–9. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1305998>
- Fotovát, R., Valizadeh, M., & Toorchi, M. (2007). Association between water-use efficiency components and total chlorophyll content (SPAD) in wheat (*Triticum aestivum* L.) under well-watered and drought stress conditions. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 5(3–4), 225–227.
- Frongia, F., Forti, L., & Arru, L. (2020). Sound perception and its effects in plants and algae. *Plant Signaling and Behavior*, 15(12), 1–7.

<https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1828674>

- Fukumoto, L. R. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 48(8), 3597–3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Gagliano, M. (2013). Green symphonies: A call for studies on acoustic communication in plants. *Behavioral Ecology*, 24(4), 789–796. <https://doi.org/10.1093/beheco/ars206>
- 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>
- Gagliano, M., Mancuso, S., & Robert, D. (2012). Towards understanding plant bioacoustics. *Trends in Plant Science*, 17(6), 323–325. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.002>
- Gagliano, M., & Renton, M. (2013). Love thy neighbour: Facilitation through an alternative signalling modality in plants. *BMC Ecology*, 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-13-19>
- Gagliano, M., Renton, M., Duvdevani, N., Timmins, M., & Mancuso, S. (2012). Acoustic and magnetic communication in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1346–1348. <https://doi.org/10.4161/psb.21517>
- Gholizadeh, S., Leman, Z., & Baharudin, B. T. H. T. (2015). A review of the application of acoustic emission technique in engineering. *Structural Engineering and Mechanics*, 54(6), 1075–1095. <https://doi.org/10.12989/sem.2015.54.6.1075>
- Ghosh, D., Lin, Q., Xu, J., & Hellmann, H. A. (2017). How plants deal with stress: exploration through proteome investigation. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1176.
- Gosh et al 2017. (n.d.).
- Gosselin, F. P. (2019). *Mechanics of a Plant in Fluid Flow Keywords*. 1–26.
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1999). Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, 50(333), 413–434.
- Hassanien, R. H. E., Hou, T. Z., Li, Y. F., & Li, B. M. (2014). Advances in Effects of Sound Waves on Plants. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(2), 335–348. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60492-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60492-X)
- Honorata DP, J. S. P. (2017). RJOAS, 6(66), June 2017. *Rjoas*, 6(June), 205–214.
- Ishibashi, Y., Yamaguchi, H., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M., Arima, S., & Zheng, S. H. (2011). Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology*, 168(13), 1562–1567. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.02.003>
- 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.
- Jung, J., Kim, S.-K., Kim, J. Y., Jeong, M.-J., & Ryu, C.-M. (2018). Beyond Chemical Triggers: Evidence for Sound-Evoked Physiological Reactions in Plants. *Frontiers in Plant Science*, *9*(January), 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00025>
- Jung, J., Kim, S. K., Jung, S. H., Jeong, M. J., & Ryu, C. M. (2020). Sound Vibration-Triggered Epigenetic Modulation Induces Plant Root Immunity Against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*, *11*(August).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01978>
- Kaiser, M., Higuera, I., & Goycoolea, F. M. (2017). Capsaicinoids: Occurrence, Chemistry, Biosynthesis, and Biological Effects. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition*, 499–514.
- Kamilaris, A., & Prenafeta-Boldú, F. X. (2018). Deep learning in agriculture: A survey. *Computers and Electronics in Agriculture*, *147*, 70–90.
<https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.02.016>
- Karban, R. (2015). Plant Sensing and Communication. In *Plant Sensing and Communication*. University of Chicago Press.
<https://doi.org/10.7208/chicago/9780226264844.001.0001>
- Khait, I., Obolski, U., Yovel, Y., & Hadany, L. (2019). Sound perception in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *92*(December 2018), 134–138.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.03.006>
- Khait, I., Obolski, U., Yovel, Y., & Hadany, L. (2019). Seminars in Cell & Developmental Biology Sound perception in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *92*(March), 134–138.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.03.006>
- Khait, Itzhak, Sharon, R., Perelman, R., Boonman, A., Yovel, Y., & Hadany, L. (2018). The sounds of plants – Plants emit remotely-detectable ultrasounds that can reveal plant stress. *BioRxiv*, 507590. <https://doi.org/10.1101/507590>
- Khalili, M., Pour-Aboughadareh, A., & Naghavi, M. R. (2016). Assessment of drought tolerance in barley: integrated selection criterion and drought tolerance indices. *Environmental and Experimental Biology*, *14*(1), 33–41.
<https://doi.org/10.22364/eeb.14.06>
- Kim, J. Y., Kang, Y. E., Lee, S. I., Kim, J. A., Muthusamy, M., & Jeong, M. J. (2020). Sound waves affect the total flavonoid contents in *Medicago sativa*, *Brassica oleracea* and *Raphanus sativus* sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(1), 431–440. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10077>
- Kim, S., Jeong, M., Ryu, C., & Kim, S. (2018). How do we know that plants listen : Advancements and limitations of transcriptomic profiling for the identification of sound-specific biomarkers in tomato profiling for the identification of sound-

- specific biomarkers in tomato. *Plant Signaling & Behavior*, 00(00), 1–3.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1547576>
- Kollasch, A. M., Abdul-Kafi, A. R., Body, M. J. A., Pinto, C. F., Appel, H. M., & Cocroft, R. B. (2020). Leaf vibrations produced by chewing provide a consistent acoustic target for plant recognition of herbivores. *Oecologia*, 194(1–2). <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04672-2>
- Kuo, H.-H. (2018). White Noise Distribution Theory. In *White Noise Distribution Theory*. CRC press. <https://doi.org/10.1201/9780203733813>
- Kurusu, T., Kuchitsu, K., Nakano, M., Nakayama, Y., & Iida, H. (2013). Plant mechanosensing and Ca²⁺ transport. *Trends in Plant Science*, 18(4), 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.12.002>
- Langre, E. De, Penalver, O., Hémon, P., & Frachisse, J. (2019). *Nondestructive and Fast Vibration Phenotyping of Plants*. 2019.
- 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(June), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.06.022>
- Li, Z.-G., & Gong, M. (2011). Mechanical stimulation-induced cross-adaptation in plants: an overview. *Journal of Plant Biology*, 54(6), 358.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-Ribera, I., & Vicient, C. M. (2017). Drought tolerance induced by sound in Arabidopsis plants. *Plant Signaling & Behavior*, 2324(August), e1368938. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1368938>
- Loughian, C. Der, Tadrist, L., Allain, J., Diener, J., Moulia, B., & Langre, E. De. (2014). Comptes Rendus Mecanique Measuring local and global vibration modes in model plants. *Comptes Rendus Mecanique*, 342(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.crme.2013.10.010>
- Magal, C., Schöller, M., Tautz, J., & Casas, J. (2000). The role of leaf structure in vibration propagation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 108(5), 2412–2418.
- Mardani, S., Tabatabaei, S. H., Pessarakli, M., & Zareabyaneh, H. (2017a). Physiological responses of pepper plant (*Capsicum annuum* L.) to drought stress. *Journal of Plant Nutrition*, 40(10), 1453–1464. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1269342>
- Mardani, S., Tabatabaei, S. H., Pessarakli, M., & Zareabyaneh, H. (2017b). Physiological responses of pepper plant (*Capsicum annuum* L.) to drought stress. *Journal of Plant Nutrition*, 40(10), 1453–1464. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1269342>

- McLennon, T., Patel, S., Behar, A., & Abdoli-Eramaki, M. (2019). Evaluation of smartphone sound level meter applications as a reliable tool for noise monitoring. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, *16*(9), 620–627.
- Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., & Zehra, A. (2019). Heliyon Regulation of L-proline biosynthesis , signal transduction , transport , accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, *5*(November), e02952.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952>
- Mencuccini, M., Manzoni, S., & Christoffersen, B. (2019). Modelling water fluxes in plants: from tissues to biosphere. *New Phytologist*, *222*(3), 1207–1222.
<https://doi.org/10.1111/nph.15681>
- 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*(December 2017), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2013.04.009>
- Mishra, R. C., & Bae, H. (2019). Plant Cognition: Ability to Perceive ‘Touch’ and ‘Sound.’ *Sensory Biology of Plants*, 137–162. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8922-1_6
- Mohanta, T. K. (2018). Sound wave in plant growth regulation: A review of potential biotechnological applications. *Journal of Animal and Plant Sciences*, *28*(1), 1–9.
- Monshausen, G. B., & Haswell, E. S. (2013). A force of nature: Molecular mechanisms of mechanoperception in plants. *Journal of Experimental Botany*, *64*(15), 4663–4680. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert204>
- Muñoz-Huerta, R. F., Guevara-Gonzalez, R. G., Contreras-Medina, L. M., Torres-Pacheco, I., Prado-Olivarez, J., & Ocampo-Velazquez, R. V. (2013). A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: Advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors (Switzerland)*, *13*(8), 10823–10843. <https://doi.org/10.3390/s130810823>
- Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS •+ Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(15), 4669–4674.
<https://doi.org/10.1021/jf0400056>
- Niez, B., Dlouha, J., Moulia, B., & Badel, E. (2019). Water-stressed or not , the mechanical acclimation is a priority requirement for trees. *Trees*, *33*(1), 279–291. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1776-y>
- Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., & Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of*

the Science of Food and Agriculture, 85(6), 935–942.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.2019>

- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). *Biochemistry & Analytical Biochemistry A Comprehensive Review on Function and Application of Plant*. 6(1), 1–16. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
- Peyronnet, R., Tran, D., Girault, T., & Frachisse, J. M. (2014). Mechanosensitive channels: Feeling tension in a world under pressure. *Frontiers in Plant Science*, 5(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00558>
- Prasch, C. M., & Sonnewald, U. (2015). Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.020>
- Prévost, V., David, K., Ferrandiz, P., Gallet, O., & Hindié, M. (2020). Diffusions of sound frequencies designed to target dehydrins induce hydric stress tolerance in *Pisum sativum* seedlings. *Heliyon*, 6(9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04991>
- Qiu, J., Shen, Z., & Xie, H. (2023). Drought impacts on hydrology and water quality under climate change. *Science of The Total Environment*, 858, 159854.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., & Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), 182.
- Richardson, A. D., Duigan, S. P., & Berlyn, G. P. (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153(1), 185–194. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00289.x>
- Roberto E. Rosales. (2017). *Mexican Farmers Picking up the Slack in Chile Cultivation | Agweb.com*. The Albuquerque Journal via AP. <https://www.agweb.com/article/mexican-farmers-picking-up-the-slack-in-chile-cultivation-apnews/>
- Robinson, J. (2019). *sustratos para la producción protegida de alimentos*. 4–7.
- Rosner, S., Heinze, B., Savi, T., & Dalla-Salda, G. (2019). Prediction of hydraulic conductivity loss from relative water loss: new insights into water storage of tree stems and branches. *Physiologia Plantarum*, 165(4), 843–854. <https://doi.org/10.1111/ppl.12790>
- Sano, M., Nakagawa, Y., Sugimoto, T., Shirakawa, T., Yamagishi, K., Sugihara, T., Ohaba, M., & Shibusawa, S. (2015). Estimation of water stress of plant by vibration measurement of leaf using acoustic radiation force. *Acoustical Science and Technology*, 36(3), 248–253. <https://doi.org/10.1250/ast.36.248>
- Sano, M., Sugimoto, T., Hosoya, H., Ohaba, M., & Shibusawa, S. (2013). *Basic Study on Estimating Water Stress of a Plant Using Vibration Measurement of*

Leaf.

- Scippa, G. S., Di Michele, M., Onelli, E., Patrignani, G., Chiatante, D., & Bray, E. A. (2004). The histone-like protein H1-S and the response of tomato leaves to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, *55*(394), 99–109.
- Song, W. Y., Zhang, Z. Bin, Shao, H. B., Guo, X. L., Cao, H. X., Zhao, H. Bin, Fu, Z. Y., & Hu, X. J. (2008). Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. *International Journal of Biological Sciences*, *4*(2), 116–125. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.116>
- Sparke, M., & Wünsche, J. (2020). Mechanosensing of Plants. *Horticultural Reviews*, *47*, 43–83.
- Taíz and Zeiger. (2006). Photosynthesis: Physiological and Ecological Considerations. *Plant Physiology*, 171–192.
- Vázquez-Hernández, M. C., Parola-Contreras, I., Montoya-Gómez, L. M., Torres-Pacheco, I., Schwarz, D., & Guevara-González, R. G. (2019). Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables production. *Scientia Horticulturae*, *250*, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.053>
- 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>
- Velasco, D. O.-G. I. (2014). ASPECTOS SOCIOECONÓMICOS Y AMBIENTALES DE LAS SEQUÍAS EN MÉXICO SOCIOECONOMIC AND ENVIRONMENTAL ASPECTS OF DROUGHT IN MEXICO David Ortega-Gaucin 1 e Israel Velasco 1. *Aqua-LAC*, *5*, 78–90.
- Wasaya, A., Zhang, X., Fang, Q., & Yan, Z. (2018). Root phenotyping for drought tolerance: a review. *Agronomy*, *8*(11), 241.
- Wehr, R., Commane, R., Munger, J. W., Barry Mcmanus, J., Nelson, D. D., Zahniser, M. S., Saleska, S. R., & Wofsy, S. C. (2017). Dynamics of canopy stomatal conductance, transpiration, and evaporation in a temperate deciduous forest, validated by carbonyl sulfide uptake. *Biogeosciences*, *14*(2), 389–401. <https://doi.org/10.5194/bg-14-389-2017>
- Wilson, P. B., Estavillo, G. M., Field, K. J., Pornsiriwong, W., Carroll, A. J., Howell, K. A., Woo, N. S., Lake, J. A., Smith, S. M., Harvey Millar, A., Von Caemmerer, S., & Pogson, B. J. (2009). The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in Arabidopsis. *Plant Journal*, *58*(2), 299–317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03780.x>
- Yepes-Molina, L., Bárzana, G., & Carvajal, M. (2020). Controversial regulation of

gene expression and protein transduction of aquaporins under drought and salinity stress. *Plants*, 9(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/plants9121662>

Young, W. C., Budynas, R. G., & Sadegh, A. M. (2002). *Roark's formulas for stress and strain* (Vol. 7). McGraw-Hill New York.

Zhao, H. C., Wu, J., Zheng, L., Zhu, T., Xi, B. S., Wang, B., Cai, S., & Younian, W. (2003). Effect of sound stimulation on *Dendranthema morifolium* callus growth. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29(2–3), 143–147. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00184-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00184-4)