

IMPLEMENTACIÓN DE ONDAS ACÚSTICAS COMO TÉCNICA DE
FORTALECIMIENTO VEGETAL EN PLANTAS DE VIVERO: CASO DEL GÉNERO
TABEBUIA

DENISSE YANET CABEZAS ESPINOSA

Cod. 363216112

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERA AMBIENTAL

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA, SECCIONAL GIRARDOT

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROGRAMA INGENIERÍA AMBIENTAL

GIRARDOT

2021

IMPLEMENTACIÓN DE ONDAS ACÚSTICAS COMO TÉCNICA DE
FORTALECIMIENTO VEGETAL EN PLANTAS DE VIVERO: CASO DEL GÉNERO
TABEBUIA

DENISSE YANET CABEZAS ESPINOSA

Cod. 363216112

DIRIGIDO POR:

MDQ., WESLES SEDANO AGUILAR

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA, SECCIONAL GIRARDOT

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PROGRAMA INGENIERÍA AMBIENTAL

GIRARDOT

2021

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en este espacio a aquellas personas me brindaron su colaboración durante el proceso de investigación y redacción de este trabajo. En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres que me han ayudado y apoyado desde el momento en que decidí realizar este proyecto y a mi tutor, Wesles Sedano Aguilar, quiero darle las gracias por su dedicación y constancia, a pesar de las dificultades que se presentaron a lo largo de todo el proceso de investigación.

Así mismo, deseo expresar mi reconocimiento a aquellas personas que intervinieron durante el proceso para poder culminar satisfactoriamente la parte experimental de esta investigación. Al señor Fernando Perdomo, quién donó las plántulas para la investigación. Mi colega Angie Natalia Salinas, quien me acompañó en el desarrollo de las pruebas de laboratorio. La decana de la facultad Vilma Moreno y la docente Dalia Xiomara Suárez, quienes fueron de gran apoyo en la gestión para el ingreso a los laboratorios bajo la situación actual de pandemia.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. OBJETIVOS	8
4.1. OBJETIVO GENERAL	8
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	8
5. MARCO TEÓRICO.....	9
LAS ONDAS ACÚSTICAS EN LA NUTRICIÓN Y RESPIRACIÓN DE PLANTAS	10
LAS ONDAS ACÚSTICAS EN LA RELACIÓN PLANTA – ENTORNO.....	14
6. MARCO METODOLÓGICO	18
6.1. TÉCNICA DE EXPOSICIÓN A ONDAS ACÚSTICAS.	18
6.2. EXPOSICIÓN DE PLÁNTULAS A TRATAMIENTO CON ONDAS ACÚSTICAS (TOA) .	19
6.3. ANÁLISIS DE CAMBIOS FÍSICOS	20
6.4. ANÁLISIS CAMBIOS QUÍMICOS DEL TEJIDO VEGETAL	20
6.4.1. PIGMENTOS TOTALES	20
6.4.2. CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES.....	21
7. RESULTADOS Y DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS	22
7.1. CAMBIOS FÍSICOS.....	22
7.2. CAMBIOS QUÍMICOS DEL TEJIDO VEGETAL.....	23
7.2.1 PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS TOTALES.....	23
7.2.3. CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES.....	26
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
8.1. CAMBIOS FÍSICOS.....	27
8.2. CAMBIOS QUÍMICOS DEL TEJIDO VEGETAL.....	28
8.2.1. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS TOTALES.....	28
8.2.2. CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES.....	30
8.3. FORTALECIMIENTO VEGETAL CON ONDAS ACÚSTICAS.....	32
9. CONCLUSIONES	34
10. RECOMENDACIONES	36
REFERENCIAS	37

RESUMEN

Las problemáticas ambientales, han conllevado a que los viveros aumenten su producción de plantas forestales con el fin de apoyar programas de reforestación de suelos degradados. Esto requiere plantas de buena calidad y con resistencia a distintos tipos de estrés. La técnica de fortalecimiento vegetal más utilizada en los viveros es la aplicación de fertilizantes N-P-K. Sin embargo, el uso de estos productos agroquímicos son una fuente de contaminación que se ha convertido en una preocupación a nivel mundial. Motivos que incentivaron esta investigación, enfocada en evaluar la técnica ondas acústicas como posible alternativa para el fortalecimiento vegetal en vivero de plantas forestales de Bosque seco Tropical (Bs-T). La estimulación de plántulas se enfocó en la parte radicular de las plantas a 1000 Hz, 90 db y 1 h diaria de exposición durante 21 días. Las plántulas - *Tabebuia Rosea* - se clasificaron en tres grupos de estudio: B, D y N. Los grupos D y N recibieron estimulación acústica de día y de noche, respectivamente. Para evaluar la técnica se usó la metodología de análisis de imágenes de Li et al. (2020) y análisis colorimétrico con el espectrofotómetro UV-VIS. Los resultados indican que el Tratamiento con Ondas Acústicas (TOA) aumentó el crecimiento foliar de las plántulas, principalmente del grupo D, en un periodo de 3 a 15 días. Se evidenció que después de 21 días, TOA puede afectar los procesos fisiológicos y, durante la noche, podría activar el mecanismo de tolerancia al estrés hídrico de las plantas. Los hallazgos brindan soporte de que TOA en plantas de Bs-T, mejora la calidad e induce resistencia al estrés hídrico, lo que podría asegurar la supervivencia de plantas a condiciones desfavorables después del trasplante; siendo una alternativa viable y amigable con el medio ambiente.

Palabras clave: ondas acústicas; plantas; fortalecimiento vegetal; reforestación; Bosque seco Tropical; *Tabebuia Rosea*.

ABSTRACT

Environmental problems generate increases in the production of forest plants in nurseries in order to support reforestation programs on degraded soils. This requires plants of good quality and with resistance to different types of stress. Reasons that motivated this research, focused on evaluating the acoustic waves technique as an alternative for plant strengthening in the nursery of forest plants of Tropical Dry Forest (Bs-T). Seedling stimulation was focused on the root part of the plants at 1000 Hz, 90 db and 1 h daily exposure for 21 days. The seedlings - *Tabebuia Rosea* - were classified into three study groups: B, D and N. Group D received acoustic stimulation during the day and N during the night. To evaluate the technique, the image analysis methodology of Li et al. (2020) and colorimetric analysis with the UV-VIS spectrophotometer. The results indicate that the Acoustic Wave Treatment (AWT) increased the foliar growth of the seedlings, mainly of group D, in a period of 3 to 15 days. It was evidenced that after 21 days, AWT affects physiological processes and would activate the mechanism of tolerance to water stress in plants treated at night. The findings provide support that AWT in Bs-T plants improves quality and induces resistance to water stress, which could ensure plant survival under unfavorable conditions after transplantation; being a viable and environmentally friendly alternative.

Key words: Sound waves; plants; drought tolerance; reforestation; Tropical dry forest; *Tabebuia Rosea*.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo descontrolado de actividades productivas ha desencadenado problemáticas a nivel mundial como el cambio climático, la degradación del suelo y la pérdida de servicios ecosistémicos (Rodríguez-Eugenio et al., 2019). A partir de esto, se ha buscado restaurar los suelos de ecosistemas estratégicos, principalmente por medio de programas de reforestación incrementado la demanda de plantas propagadas en viveros, y con ello el uso de productos fertilizantes a base de Nitrógeno (N) y Fosforo (P) para el fortalecimiento vegetal (Ucros, 2008).

Aunque la técnica de aplicación de fertilizantes en viveros incrementa la productividad de los cultivos y reduce la pérdida de plantas se ha establecido un uso excesivo de agroquímicos generando impactos nocivos para la salud humana y los procesos ambientales (Kanter, 2018); por ejemplo, durante la extracción mineral del Fósforo (P) se liberan subproductos radiactivos al ambiente y con su aplicación se transfieren metales pesados como el Cadmio (Cd) a las plantas (Cordell et al., 2009; Van der Bom et al., 2019). Así mismo, el Nitrógeno (N) en exceso es la principal causa de acidificación y salinización de suelos, debido a que reduce su pH, y en consecuencia facilita la acumulación de metales pesados en el suelo (Li et al, 2018; Chen et al, 2018; Khan et al, 2018) afectando el proceso nutricional de las plantas.

Bajo este contexto, surge la necesidad a nivel mundial de buscar técnicas de fortalecimiento vegetal que sean amigables con el medio ambiente y no generen costos adicionales en los procesos de producción agrícola y forestal (Teixeira da Silva & Dobránszki, 2014). Técnicas como la estimulación de plántulas con ondas acústicas han llamado la atención de investigadores de Asia, Estados Unidos y América Latina por sus efectos positivos en el fortalecimiento vegetal (Mohanta, 2018; Mussel & Schneider, 2020). Razones que motivaron el

desarrollo de esta investigación, enfocada en evaluar la técnica de ondas acústicas como posible técnica para el fortalecimiento vegetal de plantas en vivero, pertenecientes al Bosque seco Tropical (Bs-T). Para la evaluación de la técnica de ondas acústicas se decidió usar la metodología de análisis de imágenes desarrollada por Li et al. (2020) y el análisis por espectrofotometría.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La reforestación de áreas con suelos degradados requiere de mucha atención en el fortalecimiento de las plántulas en vivero, Wightman & Cruz (2003) y Robles Villanueva et al. (2017) establecen que la supervivencia de las plantas depende de la calidad del material vegetal y la capacidad que tengan para resistir factores ambientales desfavorables como la sequía. Actualmente, en los viveros se aplican fertilizantes a base de N-P-K antes y después del trasplante (Escamilla et al, 2015; Robles et al, 2017), con el fin de mejorar la calidad de las plantas y asegurar su supervivencia.

Sin embargo, investigaciones como las de Pastrana et al. (2011), Cordell et al. (2015), Khan et al. (2018) y Helin & Weikard (2019) han establecido preocupación por el aumento en la demanda de fertilizantes, considerándolos una fuente de contaminación difusa, debido a que el 70-80% del agroquímico aplicado no es aprovechado por las plantas y se incorpora al ambiente generando: aceleración en la acidificación o salinización del suelo, acumulación de metales pesados, eutrofización de cuerpos de agua y fuentes elevadas de óxidos de nitrógeno. Lo que ha llevado a que se busquen alternativas al uso de fertilizantes, con el fin de disminuir su aplicación y evitar la contaminación ambiental, sin perjudicar la producción forestal.

Los integrantes del semillero de investigación de Aplicación de Campos Acústicos para la Remediación Ambiental (ACARA) de la Universidad de Cundinamarca, han debatido las problemáticas anteriormente mencionadas y establecido algunas relaciones con el ecosistema Bosque seco Tropical (Bs-T); encontrando gran viabilidad en la técnica de ondas acústicas para el fortalecimiento vegetal de plantas de vivero.

A partir de esto, se decide evaluar la influencia que puede tener la técnica de ondas acústicas en especies nativas del Bs-T, para nuestro caso el género *Tabebuia*. Con este fin se plantea la pregunta de investigación: ¿Qué eficiencia presentan las ondas acústicas como técnica de fortalecimiento vegetal en plantas de vivero, específicamente el género *Tabebuia*?

3. JUSTIFICACIÓN

Los resultados de investigaciones como la de Rodrigo-Moreno et al. (2017) han demostrado que las ondas acústicas aplicadas en plantas pueden activar el metabolismo celular, influyendo en la propagación de señales estimulantes y en el posterior desarrollo de respuestas. A su vez, se ha demostrado que con la implementación de esta técnica es posible generar aumentos de proteínas solubles, azúcares solubles, amilasa y metabolitos secundarios (Wang et al., 2002; Yi, Bochu, Xiujuan, Daohong, et al., 2003; Zhao, Wang, et al., 2002). Esto, evidencia el potencial de la técnica acústica, ya que fortalece el desarrollo de procesos biológicos de las plantas y mejora sus características estructurales.

A nivel mundial, los países desarrollados como China, Corea del Sur y Japón han implementado las ondas acústicas para mejorar la calidad de productos agrícolas (Hassanien et al., 2014) incluso después de cosechados (Kim et al., 2015). No obstante, manifiestan su interés en ampliar el campo de investigación hacia plantas leñosas o de uso forestal (Xiaocheng et al., 2003). De igual forma, López-Ribera & Vicient (2017) indican que las plantas con pretratamiento sonoro adquieren resistencia a las sequías, lo cuál puede ser utilizado en ejemplares que sean expuestos a estrés hídrico.

Razones que inducen esta investigación de ondas acústicas aplicadas en plantas de la región, específicamente del ecosistema Bs-T, que tienen gran importancia en los planes de reforestación ambiental y, adicionalmente, en la industria por sus características maderables y farmacológicas (Hamed et al., 2020; Morales & Sarmiento, 2008). Siendo un aporte al campo de la bioacústica y atendiendo a la necesidad de sustituir prácticas que impactan fuertemente el medio ambiente.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rendimiento de las ondas acústicas como técnica de fortalecimiento vegetal en plantas de vivero, específicamente el género *Tabebuia*.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Analizar el desarrollo físico de las plantas nativas del Bs-T del género *Tabebuia*, bajo la estimulación con ondas acústicas, de acuerdo con la metodología de Li et al. (2020).
2. Medir la influencia de las ondas acústicas en el aumento de proteínas azúcares solubles y pigmentos totales, por la técnica de espectrofotometría.

5. MARCO TEÓRICO

Las plantas sembradas en vivero con el fin de ser usadas para la reforestación se encuentran provistas de todas las condiciones necesarias para su supervivencia antes del trasplante. Sin embargo, éstas son dispuestas en lugares que presentan distintos tipos de tensores ambientales, ya sea, la baja o alta cantidad de nutrientes, la escasez de agua, la presencia de algún componente tóxico en los suelos, las plagas, etc.; los cuales pueden generar la pérdida de individuos si no se genera un establecimiento y una gestión adecuada en el sitio, incrementando los costos de operación.

Teniendo en cuenta esto, se han generado tratamientos en vivero para que las plantas puedan lidiar con el estrés ambiental luego del trasplante, investigadores como Vilagrosa et al. (2006) y Karimi et al. (2018), han planteado el endurecimiento o pre-acondicionamiento de las plantas en la fase de cultivo en vivero, haciendo posible que aumenten su resistencia a un factores de estrés si se exponen a dosis inducidas del mismo factor o de otro que confiera resistencia a dicha alteración perjudicial. Esto se logra tomando el control sobre las respuestas fisiológicas de las plantas y al sometimiento de tensiones abióticas; convirtiéndose en una herramienta de gestión para la protección de los ejemplares llevados a campo.

La capacidad de las plantas para detectar y responder a estímulos ambientales físicos, como la luz, la temperatura, la gravedad, la carga mecánica, el tacto, es de importancia evolutiva (Teixeira da Silva & Dobránszki, 2014), por lo que se ha planteado el uso de frecuencias acústicas para generar un estrés controlado y hacerlas más resistentes a ciertos factores bióticos o abióticos, debido a que la planta es capaz de detectar ondas sonoras específicas y realizar modificaciones en su comportamiento nutricionales, de adaptación y de protección (Fernandez-

Jaramillo et al., 2018). Esto ha demostrado tener un alto impacto en los procesos bioquímicos de las plantas y en cada uno de sus componentes estructurales como: la raíz, el tallo, las hojas y los frutos.

Los estudios realizados por Wang et al. (2002), Yi et al. (2003) y Mishra et al. (2016) han informado que hay un mayor estímulo bioquímico cuando la planta es expuesta a la frecuencia de 1000 Hz en periodos de 3 a 15 días. Sin embargo, se ha encontrado cambios significativos a menores frecuencias (Meng et al., 2012; Rodrigo-Moreno et al., 2017; Zhao, Wu, et al., 2002). El estudio realizado por Yiyao et al. (2002) evidencia que cuando la frecuencia llega a 2000 Hz, el sonido tiene un efecto inhibitorio e incluso perjudicial en el desarrollo de procesos o crecimiento de las plantas. Las respuestas fisiológicas estudiadas se dirigen a todas las células que conforman la planta, entre ellas las células de la raíz la cual asimila agua, regula los procesos de nutrición y sintetiza aminoácidos y hormonas compuestas necesarios para la división y el crecimiento del tejido vegetal.

La efectividad de una técnica para mejorar la calidad de las plantas depende de la capacidad de generar impactos en el metabolismo celular de las estructuras que la componen. Las plantas al igual que todos los seres vivos, realizan una serie de funciones indispensables para el mantenimiento de su vida, entre las que encontramos la nutrición, la respiración y la relación con el entorno.

LAS ONDAS ACÚSTICAS EN LA NUTRICIÓN Y RESPIRACIÓN DE PLANTAS.

Las ondas sonoras de menor intensidad y frecuencia no solo interrumpen la estructura completa de la célula, sino que también mejoran el procedimiento del metabolismo y la

permeabilidad y selección de la membrana plasmática, acelerando o fortaleciendo los procesos fisiológicos.

A nivel celular, la primera estructura impactada por el factor inducido es la pared celular, allí se encuentra la mayor reserva extracelular del ión Ca^{+2} , el cual juega un papel importante en el proceso de estimulación con sonido y la transducción de señales en las plantas, debido a que su funcionamiento es esencial para la división y expansión de las células. Durante el proceso de estimulación acústica, el ión Ca^{+2} se incorpora al citosol, interviniendo en otros procesos para el crecimiento celular (Wang et al., 2002). Con el aumento intracelular de Ca^{2+} , se produce un aumento en la actividad de la H^{+} -ATPasa, un transportador primario de la membrana plasmática encargado de regular procesos como: la activación de transportadores secundarios, incorporación de nutrientes a la célula como azúcares y aminoácidos, regulación de la presión de turgencia, estabilización del pH intracelular e interviene en la apertura de los canales de K^{+} (Fernandez-Jaramillo et al., 2018; Michelet et al., 1995; Wang et al., 2002).

El canal K^{+} es importante en las expresiones de los genes inducidas por el esfuerzo constante de la célula; en el estudio realizado por Zhao, Wang, et al. (2002), se demostró un aumento del 50% en la frecuencia de apertura del canal bajo la estimulación sonora, concluyendo que éste cambio puede conducir a la hiperpolarización permitiendo que la célula se adapte a todo tipo de estrés.

Del mismo modo, al estudiar la primera estructura expuesta del protoplasto, se encontró que bajo la influencia del sonido se redujo la compactación de los fosfolípidos que componen la membrana celular y se evidenció cambios en la estructura secundaria de la proteína de la membrana plasmática – y la pared celular –, los cuales pueden estar estrechamente relacionados

y conducen al aumento de la fluidez de la membrana (Yi, Bochu, Xiujuan, Chuanren, et al., 2003; Zhao, Wu, et al., 2002)

López-Ribera & Vicient (2017) mencionan que la pared celular interactúa con la membrana celular, que a su vez interactúa con el citoesqueleto, lo cual puede modificar la actividad de los canales iónicos; dando como resultado cambios en la concentración de iones como el calcio en el citoplasma, esto puede activar varias proteínas de unión al calcio y quinasas que pueden inducir grandes cambios en el transcriptoma y el proteoma, que eventualmente afectan varios procesos vitales, como el crecimiento, el desarrollo y la defensa contra patógenos o tensiones abióticas.

Adicionalmente, la investigación de Xiaocheng et al. (2003) reveló que la onda de sonido tiene un impacto significativo en el aumento del contenido de ATP, que podría promover la absorción y el transporte de nutrientes de la membrana, lo que aumenta la tasa de metabolismo y acumula mucha más sustancia para la mitosis.

A nivel de producción fotosintética, en los resultados del estudio de tratamiento con ondas sonoras de Meng et al. (2012) en la planta *Fragaria ananassa*, se encontró que el contenido de clorofila aumentó al igual que la tasa fotosintética de la planta, lo que se traduce en una mayor cantidad de carbono acumulado en el material vegetal para la formación de sus estructuras. Xiujuan et al. (2003) relacionó el aumento de proteínas solubles del tratamiento sonoro en plantas, con los aumentos que se presentaron en el contenido de ácido ribonucleico (ARN), ya que el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) puede traducir más proteínas. Estos estudios han demostrado que la tecnología de control de frecuencia acústica en las plantas podría promover significativamente la absorción de nutrientes necesarios en las células, ya sea por medio del

transporte pasivo o por transporte activo, lo que aumenta la cantidad de moléculas disponibles para la síntesis de sustancias necesarias en las plantas como los azúcares y las proteínas.

Se ha comprobado que, con frecuencias e intensidades específicas de sonido, en las estructuras celulares de las plantas se genera un aumento significativo en el contenido de proteína soluble, azúcar soluble y en la actividad de la amilasa (Chowdhury et al., 2014). Con esto, es posible deducir que con el tratamiento acústico hay mayor sustancia dispuesta para el crecimiento y la división del tejido vegetal, mayor recurso de energía para el desarrollo de los procesos fisiológicos y aumento en la descomposición del azúcar; mostrándose una aceleración en el metabolismo de las plantas, desde el anabolismo y el catabolismo, producto del tratamiento con sonido (Yi, Bochu, Xiujuan, Daohong, et al., 2003).

Sin embargo, las plantas están compuestas por distintas estructuras celulares que cumplen funciones específicas como la absorción de moléculas indispensables por medio de las raíces y los estomas, moléculas que se requieren en toda la planta y que deben ser distribuidas. El sistema vascular de las plantas es el encargado de la distribución y entrega de agua, nutrientes, azúcar y señales químicas en toda la planta; el transporte en contra de la gravedad es posible a través de diferencias en la presión del soluto y la acción capilar impulsada por la tensión superficial proporcionada a lo largo del xilema. En el estudio de Gomez et al. (2017) se buscó aumentar la transpiración de la planta por medio de ondas acústicas superficiales, y se puso en evidencia que esta técnica logra aumentar hasta 6 veces más el suministro de agua/soluto al sitio que recibe la energía acústica, lo que propone un aumento en la circulación de sustancias a través de toda la planta.

Todo lo mencionado anteriormente, impacta sobre los procesos de división de las células vegetales en todo el organismo, lo cual se ve reflejado en la aceleración del crecimiento de las

estructuras como las raíces y el tallo, y el aumento en el número de hojas, flores y frutos. En la recopilación realizada por Hassanien et al. (2014) se muestra que el tratamiento con ondas sonoras ha generado una aceleración en el crecimiento de raíces de *Chrysanthemum* y trigo, en el tallo de arroz, se ha generado aumentos en el número de hojas, flores y frutos de plantas como tomate, lechuga, espinaca, fresa, pepino y pimiento dulce; además, las ondas acústicas aceleraron el crecimiento de hongos comestibles, caupí, berenjena y melón.

LAS ONDAS ACÚSTICAS EN LA RELACIÓN PLANTA – ENTORNO

El fortalecimiento del material vegetal no depende únicamente de la formación de estructuras celulares, sino también de la obtención de características que permitan a las plantas defenderse de sus depredadores o adaptarse a las condiciones en las que se encuentran. La supervivencia de las plantas al igual que la de todos los animales, no depende solamente de la nutrición que éstas reciban, sino también de la capacidad de sobrevivir al relacionarse con su entorno biótico y abiótico. Respecto a esto, Khait et al. (2019) señalan que la recepción de sonido puede tener una ventaja selectiva significativa para las plantas. Los sonidos viajan rápido, están presentes naturalmente en el medio ambiente y contienen información importante sobre la presencia de polinizadores, herbívoros, frugívoros, condiciones climáticas y recursos esenciales como el agua. Por lo tanto, si las plantas poseen incluso una capacidad rudimentaria para responder a los sonidos, se esperaría que la selección natural favoreciera tales rasgos, y la evolución debería conducir a una mejor audición de las plantas.

Bajo condiciones de estrés ambiental las plantas aumentan la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO), estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, el aumento de estas puede resultar en daños significativos a las estructuras celulares, lo

que podría acelerar el envejecimiento o la senescencia de la materia vegetal. En consideración a esto, Li et al. (2008) realizó un estudio en la especie *Dendrobium candidum* analizando el metabolismo antioxidante de las estructuras de la planta luego de impactarlas con ondas sonoras, los datos demostraron que los órganos producen una acumulación de ERO en la etapa de tratamiento inicial y luego comienza a reducirse debido a la mejora de las actividades de las enzimas antioxidantes como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX). Así mismo, las plantas pueden reforzar la resistencia a la adversidad y la capacidad antienvjecimiento, lo que proporcionaría mejores condiciones fisiológicas para el desarrollo de los órganos (Xiujuan et al., 2003).

Adicional a esto, se ha estudiado el efecto que puede presentar el tratamiento acústico en frutos ya cosechados, los cuales están expuestos a distintos factores ambientales que pueden acelerar su maduración, Kim et al. (2015) indica que el tratamiento retrasa la maduración de la fruta del tomate y reduce significativamente la producción biológica de etileno; fitohormona responsable de los procesos de estrés en las plantas, la maduración de los frutos, la senescencia de hojas, flores y la abscisión del fruto. De igual forma, Kim et al. (2016) expresa que el retraso en la maduración ocurre a través del ajuste de la expresión de genes específicos relacionados con la biosíntesis de etileno. Lo que sugiere que la regulación de esta fitohormona en las plantas por medio del tratamiento sonoro, podría reducir la senescencia de hojas y flores, debido a distintos tipos de estrés; sin embargo, aún no se han realizado investigaciones de este tipo.

Por otra parte, Choi et al. (2017) comprobó que con el pre-tratamiento con ondas sonoras la planta *Arabidopsis* aumentó la resistencia a las enfermedades provocadas por *Botrytis cinérea*, reduciendo el crecimiento de hongos dentro de la célula huésped; lo que se debe aparentemente, a genes de defensa potenciados, asociados con la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) y / o

respuesta mediada por ácido salicílico (AS). También, se encontró genes ampliamente regulados que están asociados a la organización de la pared celular / biogénesis y la expresión génica relacionada con la patogénesis. Bochu et al. (2001) mencionan que, bajo condiciones de estrés provocado por ondas sonoras, la membrana plasmática disminuye su deformabilidad, y en consecuencia las células se vuelven más rígidas, lo que creen que se debe a la reorganización del microfilamento; esto indicaría que las células aumentarían su resistencia para adaptarse al nuevo entorno por medio de la regulación de genes.

Así mismo, las pruebas de López-Ribera & Vicient (2017) revelaron que el pre-tratamiento de plantas con ondas sonoras induce resistencia a la sequía, lo que suponen se debe a los cambios en concentración de ROS y Ca²⁺, y a los cambios hormonales; que podrían explicar la mayoría de los efectos de la señalización ante la respuesta de sonido, que según el análisis RNA-seq guarda similitudes con lo observado después de la inducción táctil. Un mecanismo por el cual las plantas pueden aumentar su nivel de resistencia es intensificando la capacidad de respuesta de su sistema inmune al reconocer las señales seleccionadas de su entorno. Se ha encontrado que las plantas cuentan con dos capas de defensa, la primera está marcada por la rápida acumulación de ROS y la segunda implica la regulación por hormonas de defensa como SA y ácido jasmónico (JA), asociada con la generación de señales de defensa a larga distancia que pueden inducir resistencia en las partes sistémicas de la planta (Pastor et al., 2013).

Luego de realizar la revisión bibliográfica, proponemos la implementación de ondas acústicas de baja frecuencia como una alternativa, frente al uso de fertilizantes en los viveros, que permita coadyuvar en el crecimiento de plantas y fortalecer algunos procesos para conseguir su supervivencia a las condiciones de trasplante en lugares con algún tipo de estrés, como lo es la deficiencia hídrica o de nutrientes como el Calcio. Con el fin de disminuir el uso de compuestos

químicos en suelos y los costos de operación que se pueden generar tras el trasplante, por el mantenimiento de las plantas; lo que trae beneficios no solamente para los productores de las plantas sino también para quienes gestionan los proyectos de reforestación dentro del país, específicamente para zonas de Bs-T.

6. MARCO METODOLÓGICO

Esta investigación es de tipo analítica debido a que se comparan las diferencias morfológicas y el comportamiento químico, de un grupo control con un grupo de plantas que ha sido estimulado con ondas acústicas. Para esto, se utilizó una metodología cuantitativa que permite medir las características que definen el crecimiento y la calidad de las plantas, facilitando la recopilación de resultados y su respectivo análisis comparativo.

6.1. TÉCNICA DE EXPOSICIÓN A ONDAS ACÚSTICAS.

En la agricultura, se realiza la estimulación acústica con la metodología Plant Acoustic Frequency Technology (PAFT), que se enfoca en la estructura foliar de las plantas (Meng et al., 2012). Sin embargo, esta tecnología no permite impactar con la misma intensidad el tejido vegetal de todas las plantas y se requiere una insonorización completa del vivero para evitar generar contaminación auditiva.

Por este motivo, se diseñó una estructura que permite realizar Tratamiento con Ondas Acústicas (TOA) enfocado en las raíces de las plántulas en vivero, de acuerdo a los parámetros que presentaron mejores resultados en los estudios de Cai et al. (2014), Michelet et al. (1995) y Zhao, Wu, et al. (2002); asegurando el contacto directo con los tejidos vegetales.

A cada plántula de *T. Rosea*, se les instaló un conducto de 20 cm en material PVC con una inclinación de 45°, desde la raíz principal hasta la superficie. En la abertura superficial del conducto se fijó un dispositivo capaz de transformar ondas eléctricas en ondas acústicas – auriculares- (Figura 1), se selló completamente la abertura para evitar que durante la exposición las ondas se dispersaran en el ambiente.

Figura 1. Estructura para la estimulación acústica de plantas por medio del Tratamiento con Ondas Acústicas (TOA) enfocado en las raíces.



Fuente: Propia.

6.2. EXPOSICIÓN DE PLÁNTULAS A TRATAMIENTO CON ONDAS ACÚSTICAS (TOA)

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron plántulas de la especie *Tabebuia Rosea*, nativa del Bs-T y disponibles en la región del Alto Magdalena (Morales & Sarmiento, 2008). Las plántulas seleccionadas para el estudio tuvieron un crecimiento en condiciones normales de vivero y tenían una altura entre 15-20 cm. Se clasificó de manera aleatoria el

montaje en tres grupos de cinco plántulas: Blanco (B), Día (D) y Noche (N). Las plántulas del grupo D y N se expusieron diariamente a frecuencias acústicas de 1000 Hz y 95 db, durante 1 hora. El grupo D recibió TOA en el horario de 7:00 am a 8:00 am y el grupo N de 6:00 pm a 7:00 pm. Se realizó TOA durante 21 días y luego se analizaron los cambios físicos y químicos de las plantas.

6.3. ANÁLISIS DE CAMBIOS FÍSICOS

Se calculó la Tasa de Crecimiento Relativa (TCR) con el área foliar (AF) de las plantas por medio de la técnica de análisis de imágenes basada en teléfonos inteligentes diseñada por Li et al. (2020). Para el procesamiento de imágenes, se utilizó la cámara de un teléfono HUAWEI P20 LITE y el software MATLAB. Se documentó AF de las plántulas antes de iniciar TOA y durante la estimulación se documentó AF cada 3 días. Después de los 21 días de TOA, se calculó la media poblacional de TCR de cada grupo de plántulas y se describió por medio de un gráfico de línea.

6.4. ANÁLISIS CAMBIOS QUÍMICOS DEL TEJIDO VEGETAL

6.4.1. PIGMENTOS TOTALES

Después de 21 días de tratamiento, se cuantificó clorofila a, b y carotenoides por unidad de masa de acuerdo con las ecuaciones de Lichtenthaler (1987), siguiendo la metodología de Quevedo et al. (2018). Para esto, las muestras se prepararon a partir del método de la Acetona al 80% y se colocaron 8 ml en una centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos. Luego, se tomó una muestra del sobrenadante y se leyó en el espectrofotómetro Genesys UV-VIS a las siguientes longitudes de onda: 663, 646, 470, 430 y 665 nm. Finalmente, se realizó un análisis estadístico

básico, obteniendo la concentración media poblacional y la desviación estándar por cada grupo de estudio.

6.4.2. CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES

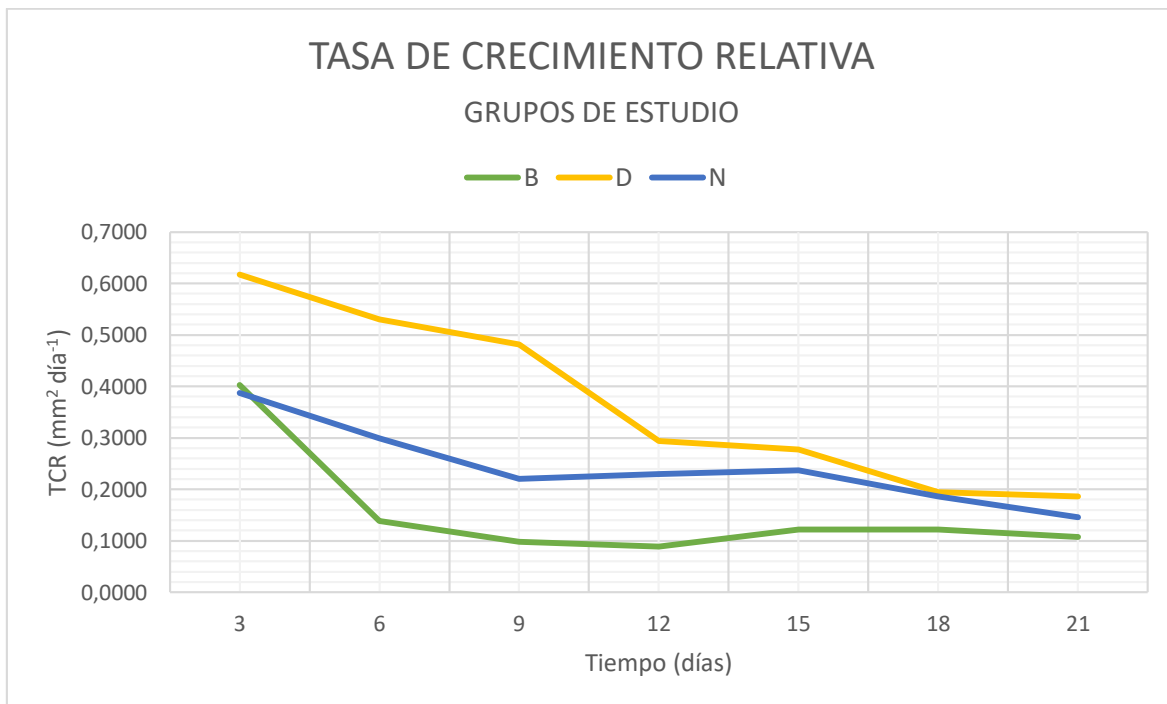
Se estimó el contenido de carbohidratos solubles totales (CST) de la estructura foliar mediante el método fenol sulfúrico. El extracto vegetal se obtuvo macerando una muestra 400 mg de hoja en peso fresco diluida en 5 ml de agua. Para el análisis, se tomó como patrón una solución de glucosa 1 mg mL^{-1} y leyó la absorbancia en una longitud de onda de 630 nm (Latsague et al., 2014) en el espectrofotómetro Genesys UV-VIS. Los datos obtenidos para cada grupo de estudio se representaron por medio de un gráfico de barra, a partir de la concentración la media poblacional.

7. RESULTADOS Y DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS

7.1. CAMBIOS FÍSICOS

A partir de la documentación del AF de las plántulas durante el tiempo de exposición al TOA, se calculó la TCR, que nos permite evaluar el aumento del AF por día para cada grupo de estudio. El Gráfico 1 evidencia el cambio que tuvo TCR con relación al tiempo de tratamiento transcurrido.

Gráfico 1. Tasa de Crecimiento Relativo (TCR) para las plántulas que recibieron tratamiento sonoro radicular diurno (D) o nocturno (N), y para el grupo control (B).



Nota: Los datos de TCR fueron extraídos de la información de AF proporcionada por software MATLAB.

De acuerdo con los datos obtenidos, se evidenció que desde el tercer día de TOA una diferencia significativa en la TCR del grupo de estudio D con respecto a B y N, siendo mayor el crecimiento foliar en el grupo de estudio D, con un valor de $0,617 \text{ mm}^2 \text{ día}^{-1}$, y obteniéndose

valores muy cercanos entre los grupos B y N, con tasas de crecimiento de $0,403 \text{ mm}^2 \text{ día}^{-1}$ y $0,387 \text{ mm}^2 \text{ día}^{-1}$, respectivamente.

A los seis días de TOA, se observa una disminución en TCR de todos los grupos, pero se presenta una mayor diferencia entre los valores del grupo D ($0,53 \text{ mm}^2 \text{ día}^{-1}$) con relación al B y, en discrepancia con el día tres, los valores del grupo N ($0,299 \text{ mm}^2 \text{ día}^{-1}$) son mayores que los observados en el grupo B.

En el día nueve, los valores de cada uno de los grupos presentaron el mismo comportamiento que lo observado en el día seis. En el caso del grupo B, la TCR tiende a ser constante hasta el último día de estudio. Por otro lado, aunque el grupo N presenta valores mayores a los del grupo B, desde el día quince hasta el último día de TOA, no son valores significativos y tienden a alcanzar el mismo comportamiento del grupo B.

Además, se observó que a partir del día doce, aunque los valores del grupo D siguen siendo mayores a los del grupo B y N, se presenta una gran disminución de su TCR y, hasta el último día de estudio, tiende a reducirse gradualmente hasta alcanzar valores cercanos al grupo B.

7.2. CAMBIOS QUÍMICOS DEL TEJIDO VEGETAL

7.2.1 PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS TOTALES

Los pigmentos fotosintéticos de las plantas son los encargados de transformar la energía lumínica en energía química, de manera que pueda ser aprovechada por las plantas para el desarrollo de sus procesos fisiológicos. Además, algunos de ellos protegen las plantas de los espectros de luz que puedan afectar su estructura. Por las anteriores razones, utilizamos el

análisis de pigmentos fotosintéticos totales para evaluar el comportamiento de estas sustancias en las plantas después de recibir estimulación con TOA, los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Pigmentos fotosintéticos para las plántulas que recibieron tratamiento sonoro radicular diurno (D) o nocturno (N), y para el grupo control (B).

Pigmento		Concentración ($\mu\text{g/ml}$)					
		B		D		N	
		μ	σ	μ	σ	μ	σ
Clorofila	A	21,021	4,301	18,889	0,628	19,791	2,408
	B	18,966	4,027	18,893	1,530	19,299	2,776
	Total	39,987	8,254	37,782	1,161	39,090	5,129
Carotenoides		19,013	0,444	18,390	1,044	18,467	0,287

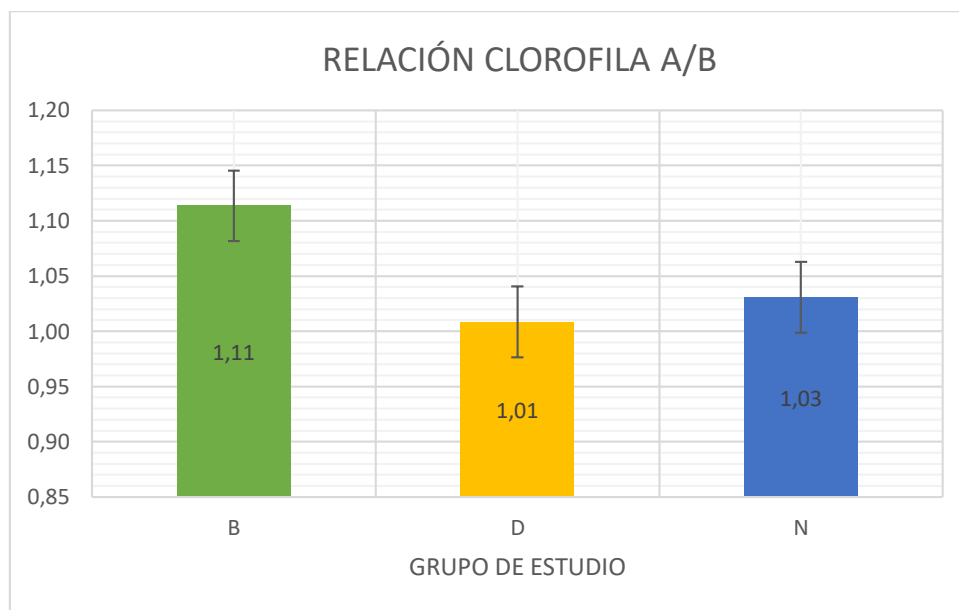
Luego de haber realizado el TOA de las plantas durante 21 días, se evidenció que las plantas que recibieron un tratamiento diurno –grupo D- presentaban una concentración media de $37,782 \mu\text{g mL}^{-1}$, siendo significativamente inferior a lo obtenido para los grupos N ($39,09 \mu\text{g mL}^{-1}$) y B ($39,987 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Asimismo, se identificó que las plantas que recibieron un TOA en la noche presentaron una concentración de clorofila total inferior a las obtenidas para el grupo control (B) pero, a diferencia del grupo D, era un valor más cercano, el cual se puede atribuir a una mayor concentración de *Clorofila b* comparada con los demás grupos de estudio.

Además, fue posible observar que, en los valores obtenidos para los carotenoides totales, donde se obtuvieron concentraciones muy cercanas entre el grupo D ($18,390 \mu\text{g mL}^{-1}$) y el Grupo N ($18,467 \mu\text{g mL}^{-1}$), los cuales fueron inferiores a los observados en las plantas del grupo control ($19,013 \mu\text{g mL}^{-1}$), pero poco significativos.

Teniendo en cuenta que el análisis de clorofila total incluye los valores de los pigmentos fotosintéticos *clorofila a* y *clorofila b*, y que tradicionalmente se ha estudiado la relación entre ambos como un indicador de estrés en las plantas (Cambrón-Sandoval et al., 2011; Jaramillo-Salazar et al., 2018). En el *Gráfico 2* se representan la relación *clorofila a/b* de los tres grupos de estudio.

Gráfico 2. Relación clorofila a/b para las plántulas que recibieron tratamiento sonoro radicular diurno (D) o nocturno (N), y para el grupo control (B).



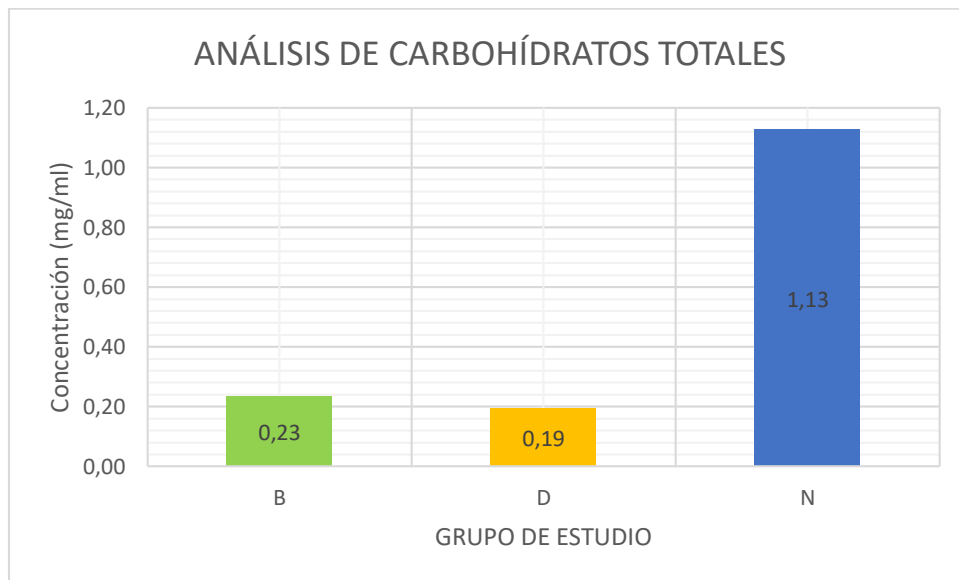
En el grupo Blanco, se observó una relación de 1,114 entre *clorofila a/b*, lo cual se debe a una mayor concentración de *clorofila a* que de *clorofila b*, y considerando lo descrito por Jaramillo-Salazar et al. (2018), es una relación normal ya que la *clorofila a* se presenta en mayor abundancia.

Asimismo, en los grupos D y N, se obtuvo valores en la relación *clorofila a/b* de 1,008 y 1,031, respectivamente. Los cuales son significativamente inferiores a los obtenidos en el grupo control y se asocian a que la concentración de *clorofila b* en las plantas es muy cercana a la concentración de *clorofila a*, como se muestra en la *Tabla 1*.

7.2.3. CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES

En esta investigación, se realizó el análisis CST con la finalidad de evaluar el comportamiento bioquímico de las plántulas después del TOA, teniendo en cuenta que son el principal producto de la fotosíntesis. Los resultados obtenidos en el análisis espectrofotométrico se presentan en el *Gráfico 3*.

Gráfico 3. Carbohidratos solubles totales para las plántulas que recibieron tratamiento sonoro radicular diurno (D) o nocturno (N), y para el grupo control (B).



Luego de 21 días de tratamiento, se observó que las plantas D presentaron una concentración de carbohidratos solubles totales promedio equivalente a $0,19 \pm 0,035 \text{ mg mL}^{-1}$ muy cercano a lo observado para el grupo control, $0,23 \pm 0,13 \text{ mg mL}^{-1}$. Por otra parte, se pudo evidenciar una diferencia significativamente alta en el grupo de plantas que recibieron tratamiento N, las cuales alcanzaron valores promedio de $1,13 \pm 0,53 \text{ mg mL}^{-1}$ en comparación de los demás grupos.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1. CAMBIOS FÍSICOS

En este estudio, fue posible observar que se estimuló positivamente la producción de estructura foliar en plántulas de *T. Rosea* expuestas al TOA diurno y nocturno; puesto que, los hallazgos pusieron en evidencia diferencias significativas en la TCR de los grupos de plántulas que recibieron el TOA en comparación con el grupo control. Estos efectos positivos también son evidenciados en los trabajos de Hassanien et al. (2014) y Jung et al. (2018).

A partir de los datos obtenidos, se encontró que el TOA diurno presentó mayor eficiencia, mostrando diferencias significativas desde el día 3, las cuales fueron altas hasta el día 9 y se mantuvieron hasta el día 15. Asimismo, en el TOA nocturno se evidenciaron diferencias en TCR, con respecto al grupo control (B), desde los 6 días de tratamiento y se mantuvieron hasta los 15 días. Los resultados, presentan similitud con lo observado en la investigación de Yi et al. (2003), en la cual se demostró mejoras en el crecimiento de las raíces de *Chrysanthemum* durante el período de 3 a 15 días, y se presentó una mayor estimulación cuando el plazo llegó a los 9 días. Esto podría indicar, que el TOA es favorable para el crecimiento y desarrollo de la planta durante 15 días de exposición, pero los efectos disminuirían después de los 9 días de tratamiento; obteniéndose mejores resultados cuando se realiza un TOA diurno.

Además, demuestra que el sonido no estimula únicamente el crecimiento del órgano expuesto directamente, sino que promueve el crecimiento de las demás estructuras que componen la planta. En los avances investigativos de Yiyao et al. (2002) y Mussel & Schneider (2020) se sugiere que la promoción del crecimiento de las plantas ocurre debido a la mejora de la fluidez de la pared celular y se generan cambios en el potencial eléctrico, la densidad, la presión

lateral y el pH de la membrana que modifican transitoriamente la interacción con componentes cercanos, incluidos iones, poli-electrolitos y agua; mejorando la capacidad de absorción y transferencia de sustancias en las células. Al ser las raíces el órgano expuesto a las ondas sonoras, se reducen los costos energéticos que se generan en estas debido a los procesos de absorción de agua y nutrientes (Azcón-Bieto and Talón, 2003). Esto permite que exista una mayor reserva de carbono y pueda ser utilizada en procesos asociados a la producción de energía metabólica utilizada durante la biosíntesis y el crecimiento de toda la planta. Además, los estudios realizados en células de una planta leñosas (Xiaocheng et al., 2003), apuntan a que se produce un aumento significativo en el contenido de ATP de las células que son estimuladas con ondas sonoras, principalmente bajo frecuencias de 1000 Hz y 100 db.

Adicionalmente, con los datos proporcionados en esta investigación, se identificó una disminución en la TCR en todos los grupos a los 6 días de estudio. Dicho cambio fue más drástico en el grupo B, reduciéndose un 65,5% la producción foliar observada en el día 3, mientras que en los grupos D y N se redujo un 14% y 23%, respectivamente. Este fenómeno se puede aludir a cambios en las condiciones ambientales de las plántulas, y pone en evidencia una mayor resistencia a las tensiones ambientales por parte de los grupos tratados con ondas sonoras. Tal como se ha reflejado en los estudios realizados por Choi et al. (2017), Jeong et al. (2014) y López-Ribera & Vicient (2017), quienes han demostrado que un tratamiento previo con ondas sonoras en las plantas induce resistencia a distintos factores bióticos y abióticos.

8.2. CAMBIOS QUÍMICOS DEL TEJIDO VEGETAL

8.2.1. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS TOTALES

En esta investigación se encontró que las plántulas de *T. Rosea*, a los 21 días de TOA diario por 1 hora, se reduce significativamente la concentración de clorofila total en el grupo que

recibe un tratamiento diurno. Esto se debió principalmente a una disminución en la concentración de *clorofila a*, que también se observó en el grupo noche, se infiere que el tratamiento sonoro por 21 días tiene un efecto negativo en los fotosistemas de las plantas (Manrique, 2003), disminuyendo la concentración de *clorofila a*. En comparación con los resultados presentados en la investigación desarrollada por Meng et al, (2012) que reporta un aumento en la concentración de clorofila de hojas de fresa cuando se realizó tratamiento sonoro 20 veces - 40 días (1 vez cada 2 días) en la estructura foliar de las plantas durante 3 horas diarias en la mañana. Esto evidencia la influencia que tiene el tiempo de exposición en la estimulación con sonido en los organelos de las plantas.

Por otro lado, en los demás pigmentos estudiados conocidos como pigmentos accesorios (*clorofila b* y *carotenoides*) no se presentaron cambios significativos. Sin embargo, de acuerdo con Jaramillo-Salazar et al. (2018), la relación entre *clorofila a* /*clorofila b* y entre *carotenos/clorofila total*, se pueden considerar un indicador de estrés en las plantas. Bajo los hallazgos de este estudio, fue posible identificar que los grupos que recibieron un TOA por 21 días presentaron valores de 7,4% (N) y 9,5% (D) inferiores, en la relación *clorofila a/b*, tomando como referencia al grupo que no recibió tratamiento. Con lo anterior, se presume que el TOA influyó en las relaciones de clorofila a/b reduciendo las concentraciones de *clorofila a*, que según Cambrón-Sandoval et al. (2011) son evidencia de estrés en las plantas, principalmente en el grupo D. Asimismo, los análisis demostraron que la relación *carotenos/clorofila total* no presentó diferencias significativas dentro de este estudio, es decir, el TOA no generó aumento en la síntesis de carotenos y las plantas continuaron su producción de clorofilas (Casierra-Posada et al., 2012).

A partir de esto y teniendo en cuenta los resultados observados en el crecimiento físico, es notorio el efecto dual que menciona Yiyao et al. (2002) de las ondas sonoras sobre los tejidos vegetales, puesto que evidencia que el tratamiento puede mejorar el crecimiento de estos, pero su crecimiento se inhibirá cuando el campo de sonido esté más allá del rango de frecuencia e intensidad que es adecuado para las plantas; adicionalmente, se pudo identificar en nuestros resultados, el tiempo de exposición y el órgano de la planta expuesto directamente. Para las especificaciones metodológicas de esta investigación, se presume que el tiempo de exposición a frecuencias sonoras para las plántulas de *T. Rosea*, es favorable durante un periodo de 3 a 15 días, siendo más eficiente durante los primeros 9 días cuando se realiza en las horas de la mañana. Después de 21 días de tratamiento, la exposición a las ondas sonoras puede generar cambios negativos en las concentraciones de clorofila, las cuales pueden afectar la obtención de energía y el crecimiento de la planta.

8.2.2. CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES

Investigaciones en plantas, han brindado un soporte acerca de aumentos en las concentraciones de carbohidratos a causa del estrés controlado (Román Guzmán et al., 2013). El estudio realizado por Yi et al, (2003) demuestra que bajo estimulación sonora el contenido de azúcar soluble en raíces es significativamente mayor. En diversas investigaciones, se ha encontrado que las tenciones implementadas en las plantas -como el estrés hídrico- pueden llevar al consumo de almidón y la acumulación o mantenimiento de azúcar soluble en la estructura foliar, como mecanismo de tolerancia para suministrar el carbono necesario en el mantenimiento de los procesos celulares y la supervivencia, ya que contribuye a una disminución del potencial osmótico celular que permite el mantenimiento de la turgencia celular (Garcia et al., 2011; Nascimento et al., 2019).

Dentro de los resultados observados en nuestra investigación, se evidenció que las plantas que recibieron un TOA nocturno presentaron un aumento significativo en la concentración de carbohidratos totales de la estructura foliar, en comparación con los otros grupos de plántulas. Según López-Ribera & Vicient (2017), esto se debe a que la estimulación con ondas sonoras induce resistencia al déficit hídrico en las plantas; lo que podría indicar que ambos factores de estrés activan el mismo mecanismo de tolerancia, aumento en la producción de carbohidratos.

En los hallazgos en fisiología vegetal, se ha observado que las plantas durante la noche reducen la respiración de las raíces y la transpiración para eliminar gradualmente los déficits hídricos diurnos (Azcón-Bieto & Talón, 2003). Sin embargo, los análisis de Fricke (2019) apuntan a que los procesos de transpiración y respiración nocturnos se combinan para respaldar el crecimiento de la expansión de las hojas durante la noche, considerando la transpiración nocturna como un posible mecanismo de aclimatación al estrés. Fenómeno que se ha puesto en evidencia con las investigaciones de Caird et al. (2007) y Montoro et al. (2016), en las cuales se ha observado aumentos en la transpiración nocturna a causa de las tenciones ambientales. Por lo tanto, se presume que el TOA nocturno, promueve la expansión de las hojas durante la noche y aumenta la pérdida de agua, debido a la influencia que ha demostrado en la absorción de O₂, el aumento en la transpiración y circulación de sustancias a través de toda la planta (Gomez et al., 2017; Qin et al., 2003). Con esto, las plantas que reciben TOA de noche aumentan sus requerimientos hídricos en comparación con los demás grupos de estudio, lo cual podría generar estrés hídrico si el agua disponible en el suelo no compensa la pérdida de agua de la planta (Carvajal et al., 2014; Torres Garcia et al., 2018).

8.3. FORTALECIMIENTO VEGETAL CON ONDAS ACÚSTICAS

La efectividad de una técnica para mejorar la calidad de las plantas depende de la capacidad de generar impactos en el metabolismo celular de las estructuras que la componen. El uso de fertilizantes en vivero, está motivado por la idea de mejorar la productividad de los cultivos y reducir la pérdida de plantas (Kanter, 2018). Dentro de esta investigación, se comprobó el potencial del TOA como técnica de fortalecimiento vegetal de plantas pertenecientes al Bs-T producidas en vivero, considerándola una alternativa para disminuir la aplicación de fertilizantes y evitar la contaminación ambiental, sin perjudicar la agricultura o la producción agroforestal.

Los resultados proporcionaron evidencia que apunta a que el tratamiento acústico fortalece el desarrollo de procesos biológicos de las plántulas de T. Rosea y mejora sus características estructurales, como se observó con el aumento de la TCR durante 15 días de TOA, que está relacionada de forma directa con la asimilación de carbono y la capacidad para utilizar de manera eficiente los nutrientes y la energía lumínica. Según dos Santos et al. (2006), son características que facilitan la revegetación de áreas degradadas, principalmente donde la irradiación es alta y la disponibilidad de nutrientes del suelo baja, debido a que permite acumular la mayor cantidad de biomasa con el menor uso relativo de nutrientes, evitando la pérdida por lixiviación y erosión. Para las especificaciones metodológicas de este estudio, el tratamiento sonoro que presentó mayor eficiencia en el aumento de la productividad fue el TOA aplicado en las horas de la mañana durante un periodo máximo de 15 días.

No obstante, la estimulación sonora a la estructura radicular en la noche también mostró tener resultados favorables, principalmente en los análisis de carbohidratos, donde se pudo observar un aumento de concentración en la estructura foliar, lo cual se asoció a la

influencia del tratamiento en los procesos biológicos de respiración y transpiración nocturna, que se presume puede generar estrés hídrico en las plantas y activar el mismo mecanismo de tolerancia. Según lo planteado por Karimi et al. (2018), el tratamiento con ondas sonoras durante la noche puede considerarse un factor inductor para sensibilizar la planta a responder más rápido y más fuerte a las futuras tensiones hídricas, convirtiéndose en una herramienta de gestión para la protección de las plantas. Teniendo en cuenta que después del trasplante de los árboles, la tasa de mortandad aumenta entre un 25 a 50 % debido a una alteración de los procesos fisiológicos por la falta de absorción de agua (Martínez-Trinidad et al., 2013), el pre-tratamiento con ondas acústicas podría reducir este porcentaje de pérdidas.

9. CONCLUSIONES

El presente estudio, pone en evidencia el potencial de la técnica de TOA para fortalecer plantas forestales en vivero, específicamente especies nativas del Bs-T. Se demostró que bajo la estimulación acústica las plantas presentan mejor desarrollo físico del área foliar y se presume una mayor resistencia a cambios en los factores ambientales que pueden afectar su crecimiento. El TOA, demostró ser eficiente durante un periodo de 3 a 15 días, principalmente durante los primeros 9 días de tratamiento para las plántulas de *T. Rosea* que recibieron estímulo acústico en las horas de la mañana.

Asimismo, se encontró que el TOA nocturno podría sensibilizar a las plantas para que respondan más rápido y más fuerte a las futuras tensiones hídricas. Los resultados de CST, evidenciaron mayores concentraciones en este grupo de estudio. Esto se asocia al incremento en la transpiración nocturna que aumenta el déficit hídrico de las plantas y activan el mismo mecanismo de tolerancia que el estrés hídrico. Cabe aclarar que, bajo el TOA en las horas de la noche, el crecimiento de las plantas fue mayor que el grupo control.

Los análisis de pigmentos totales, mostraron que después de 21 días de tratamiento la exposición a las ondas sonoras generó cambios negativos en las concentraciones de clorofila, las cuales pueden afectar la obtención de energía y el crecimiento de la planta. Esto confirmó que después de 15 días de TOA se reduce el efecto estimulante, como se observó en la TCR, y a mayor número de días de tratamiento se puede llegar a afectar los procesos fisiológicos.

Los análisis demuestran que el TOA en la especie *T. Rosea* mejoró los procesos fisiológicos de la planta, principalmente la absorción, el transporte y el aprovechamiento de agua y nutrientes. Esto indica que la implementación de esta técnica de fortalecimiento como

pretratamiento para plantas forestales del Bs-T en vivero, podría contribuir al éxito de los programas de reforestación de zonas con suelos degradados, obteniéndose plantas de mejor calidad y con mayor resistencia a factores de estrés ambiental como la sequía; aumentando el porcentaje de supervivencia de los ejemplares.

En esta investigación se demostró la eficiencia de las ondas acústicas como alternativa al uso de fertilizantes en plantas forestales del Bs-T, atendiendo a la necesidad de sustituir prácticas que impactan fuertemente el medio ambiente y brindando una línea base para la implementación de esta técnica en el ámbito ambiental. Además, es un aporte al campo de la bioacústica, debido a que se proporciona una nueva metodología de estimulación acústica que mostró resultados favorables en plantas, bajo condiciones de vivero, a nivel físico y bioquímico.

10. RECOMENDACIONES

A partir de los hallazgos, sugerimos que se implemente la técnica de ondas acústicas en otras especies de plantas del Bs-T, para poder ampliar el espectro de investigación e identificar similitudes con lo observado y discutido a lo largo de este trabajo investigativo. Así como realizar estudios que evalúen la supervivencia en programas de reforestación de plantas que reciban el TOA en vivero. Con esto se podría extender conclusiones respecto al comportamiento de las plantas de este ecosistema y la metodología en mención.

Con relación a la especie *T. Rosea*, se recomienda realizar más estudios que vinculen el efecto generado por el TOA en los distintos componentes de la planta. Puesto que, con los resultados de la presente investigación se demostró que el estímulo acústico genera cambios físicos y bioquímicos, que podrían utilizarse para facilitar la obtención de madera o fármacos.

Finalmente, se sugiere trabajar con la técnica de ondas acústicas como tratamiento para el fortalecimiento vegetal, teniendo en cuenta que es amigable con el medio ambiente y puede implementarse para la producción agroforestal, mejorando las características estructurales de las plantas y aportando al cumplimiento de los objetivos del desarrollo sostenible estipulados por la Organización de las Naciones Unidas (ONU).

REFERENCIAS

- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2003). Fundamentos de fisiología vegetal. In *McGrawHill*.
- Bochu, W., Hucheng, Z., Yiyao, L., Yi, J., & Sakanishi, A. (2001). The effects of alternative stress on the cell membrane deformability of chrysanthemum callus cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20(4), 321–325. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(00\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(00)00181-8)
- Cai, W., He, H., Zhu, S., & Wang, N. (2014). Biological effect of audible sound controls on mung bean (*Vigna radiate*) sprout. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/931740>
- Caird, M. A., Richards, J. H., & Hsiao, T. C. (2007). Significant transpirational water loss occurs throughout the night in field-grown tomato. *Functional Plant Biology*, 34(3), 172–177. <https://doi.org/10.1071/FP06264>
- Cambrón-Sandoval, V. H., España-Boquera, M. L., Sánchez-Vargas, N. M., Sáenz-Romero, C., Vargas-Hernández, J. J., & Herrerías-Diego, Y. (2011). Producción de clorofila en *Pinus Pseudostrobus* en etapas juveniles bajo diferentes ambientes de desarrollo. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales Y Del Ambiente*, XVII(2), 253–260. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2010.09.077>
- Carvajal, M., Mota, C., Alcaraz-López, M. I., & Martínez-Ballesta. (2014). Investigación sobre la absorción de CO₂ por los cultivos más representativos. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 1, 43.
- Casierra-Posada, F., Ávila-León, O., & Riascos-Ortíz, D. (2012). Cambios diarios del contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas de caléndula bajo sol y sombra // Diurnal changes

in photosynthetic pigments content in sun and shade marigold leaves. *Temas Agrarios*, 17(1), 60–71.

Chen, J., Lü, S., Zhang, Z., Zhao, X., Li, X., Ning, P. y Liu, M. (2018). Fertilizantes respetuosos con el medio ambiente: una revisión de los materiales utilizados y sus efectos sobre el medio ambiente. *Science of The Total Environment*, 613-614, 829–839.

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), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02556-9>

Chowdhury, M. E. K., Lim, H.-S., & Bae, H. (2014). Update on the Effects of Sound Wave on Plants. *Research in Plant Disease*, 20(1), 1–7. <https://doi.org/10.5423/rpd.2014.20.1.001>

Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global environmental change*, 19(2), 292-305.

Cordell, D., Turner, A., & Chong, J. (2015). The hidden cost of phosphate fertilizers: mapping multi-stakeholder supply chain risks and impacts from mine to fork. *Global Change, Peace & Security*, 27(3), 323-343.

Delgado, A. M., & Parra, D. M. S. (2008). Árboles del Bosque Seco Tropical en el área del Parque Recreativo y Zoológico Piscilago-Nilo Cundinamarca. *Universidad Autónoma de Colombia*, 1.

dos Santos, U. M., de Carvalho Gonçalves, J. F., & Feldpausch, T. R. (2006). Growth, leaf nutrient concentration and photosynthetic nutrient use efficiency in tropical tree species planted in

degraded areas in central Amazonia. *Forest Ecology and Management*, 226(1–3), 299–309.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.01.042>

Escamilla Hernández, N., Obrador Olán, J. J., Carrillo Ávila, E. & Palma López, D. J. (2015). Uso de fertilizantes de liberación controlada en plantas de teca (*Tectona grandis*), en la etapa de vivero. *Revista fitotecnia mexicana*, 38(3), 329-333.

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, 340–348.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.060>

Fricke, W. (2019). Night-Time Transpiration – Favouring Growth? *Trends in Plant Science*, 24(4), 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.01.007>

Garcia, P. M. A., Asega, A. F., Silva, E. A., & Carvalho, M. A. M. (2011). Effect of drought and re-watering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(6), 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.03.014>

Gomez, E. F., Berggren, M., & Simon, D. T. (2017). Surface Acoustic Waves to Drive Plant Transpiration. *Scientific Reports*, 7(March), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep45864>

Hamed, A. N. E., Mahmoud, B. K., Samy, M. N., & Kamel, M. S. (2020). An extensive review on genus “*Tabebuia*”, family bignoniaceae: Phytochemistry and biological activities (1967 to 2018). *Journal of Herbal Medicine*, 24(October), 100410.
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100410>

- 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)
- Helin, J., & Weikard, H. P. (2019). A model for estimating phosphorus requirements of world food production. *Agricultural Systems*, 176, 102666.
<https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.102666>
- Jaramillo-Salazar, M. T., Marín-Giraldo, Y., & Ocampo-Serna, D. M. (2018). Effects on the photosynthetic level in three species of aquatic plants treated with waste water of mining origin. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 22(1), 43-57.
- 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>
- Kanter, D. R. (2018). Nitrogen pollution: a key building block for addressing climate change. *Climatic change*, 147(1-2), 11-21.
- Karimi, S., Karami, H., Mokhtassi-Bidgoli, A., Tavallali, V., & Vahdati, K. (2018). Inducing drought tolerance in greenhouse grown *Juglans regia* by imposing controlled salt stress: The role of osmotic adjustment. *Scientia Horticulturae*, 239, 181–192.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.029>

- Khait, I., Obolski, U., Yovel, Y., & Hadany, L. (2019). Sound perception in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 92, 134–138.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.03.006>
- Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K., & Alamri, S. A. (2018). Fertilizers and Their Contaminants in Soils, Surface and Groundwater. *Encyclopedia of the Anthropocene*, 225–240.
- Kim, J. Y., Ahn, H. R., Kim, S. T., Min, C. W., Lee, S. I., Kim, J. A., ... & Jeong, M. J. (2016). Sound wave affects the expression of ethylene biosynthesis-related genes through control of transcription factors RIN and HB-1. *Plant Biotechnology Reports*, 10(6), 437-445.
- Kim, J. Y., Lee, J. S., Kwon, T. R., Lee, S. I., Kim, J. A., Lee, G. M., Park, S. C., & Jeong, M. J. (2015). Sound waves delay tomato fruit ripening by negatively regulating ethylene biosynthesis and signaling genes. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 43–50.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.015>
- Latsague, M., Sáez, P. & Mora, M. (2014). Efecto de la fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio, sobre el contenido foliar de carbohidratos, proteínas y pigmentos fotosintéticos en plantas de *Berberidopsis corallina* Hook.f.. *Gayana. Botánica*, 71(1), 37-42.
<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432014000100007>
- Li, B., Wei, J., Wei, X., Tang, K., Liang, Y., Shu, K., & Wang, B. (2008). Effect of sound wave stress on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of *Dendrobium candidum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63(2), 269–275.

- Li, C., Adhikari, R., Yao, Y., Miller, A. G., Kalbaugh, K., Li, D., & Nemali, K. (2020). Measuring plant growth characteristics using smartphone based image analysis technique in controlled environment agriculture. *Computers and Electronics in Agriculture*, 168, 105123.
- Li, W., Guo, S., Liu, H., Zhai, L., Wang, H. y Lei, Q. (2018). Los impactos ambientales completos de la aplicación de fertilizantes varían entre los diferentes cultivos: implicaciones para el ajuste de la estructura agrícola con el objetivo de reducir el uso de fertilizantes. *Gestión Agrícola del Agua*, 210, 1–10.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, 148, 350-382.
- López-Ribera, I., & Vicient, C. M. (2017). Drought tolerance induced by sound in Arabidopsis plants. *Plant Signaling and Behavior*, 12(10).
<https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1368938>
- Manrique, E. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*, 12(1), 1–11.
- Martínez-Trinidad, T., Plascencia-Escalante, F. O., & Islas-Rodríguez, L. (2013). Relationship Between Carbohydrates and Vitality in Urban Trees. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, XIX (3), 459–468.
<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2012.03.016>
- Meng, Q., Zhou, Q., Zheng, S., & Gao, Y. (2012). Responses on Photosynthesis and Variable Chlorophyll Fluorescence of *Fragaria ananassa* under Sound Wave. *Energy Procedia*, 16, 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2012.01.057>

- Michelet, B., Boutry, M., & Croix, P. (1995). H +. 1–6.
- Mishra, R. C., Ghosh, R., & Bae, H. (2016). Plant acoustics: In the search of a sound mechanism for sound signaling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 67(15), 4483–4494.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw235>
- 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.
- Montoro, A., López Urrea, R., Mañas, F., Martínez, L., & Sánchez, J. M. (2016). Transpiración Nocturna En Vid. *Congreso Nacional de Riegos*, 1, 2–7.
<https://doi.org/10.21151/cnriegos.2016.a11>
- Mussel, M., & Schneider, M. F. (2020). Sound pulses in lipid membranes and their potential function in biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.08.001>
- Nascimento, N. F. do, Nascimento, L. B. de B. do, & Gonçalves, J. F. de C. (2019). Respostas funcionais foliares de plantas jovens de *Hevea brasiliensis* submetidas à deficiência hídrica e à reidratação. *Ciência Florestal*, 29(3), 1019. <https://doi.org/10.5902/1980509832658>
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., & Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environmental and experimental botany*, 94, 46-56.
- Pastrana V., Iván, & Reza G., Sony, & Espinosa C., Manuel, & Suárez P., Emiro, & Díaz A., Eliecer (2011). Efecto de la fertilización nitrogenada en la dinámica del óxido nítrico y metano en *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickhardt. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2),134-142. ISSN: 0122-8706.

- Qin, Y. C., Lee, W. C., Choi, Y. C., & Kim, T. W. (2003). Biochemical and physiological changes in plants as a result of different sonic exposures. *Ultrasonics*, 41(5), 407–411.
[https://doi.org/10.1016/S0041-624X\(03\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0041-624X(03)00103-3)
- Quevedo, O., Sierra, W., Manzano, P., & Barragán, A. (2018). Cuantificación de proteínas y clorofila como indicadores de polución en *Rhizophora harrisonii* en el Puerto de Guayaquil. *Revista Cumbres*, 4(2), 09-18.
- Robles Villanueva, F. A., Rodríguez Trejo, D. A., & Villanueva Morales, A. (2017). Calidad de planta y supervivencia en reforestación de *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(42), 55-76. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v8i42.19>
- Rodrigo-Moreno, A., Bazihizina, N., Azzarello, E., Masi, E., Tran, D., Bouteau, F., Baluska, F., & Mancuso, S. (2017). Root phonotropism: Early signalling events following sound perception in *Arabidopsis* roots. *Plant Science*, 264(July), 9–15.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.08.001>
- Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M., & Pennock, D. (2019). La Contaminación Del Suelo: Una Realidad Oculta. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura - FAO*, 144. Disponible en: <http://www.fao.org/3/I9183ES/i9183es.pdf>
- Román Guzmán, I. de J., Bravo Andrade, S. D., Tapia Campos, E., Qui Zapata, J., & Dupré, P. (2013). Efecto del estrés hídrico sobre el contenido de inulina y otros carbohidratos en dalia (*Dahlia* sp.). *Universidad Autónoma de Guadalajara, 4to Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía: Innovación para el desarrollo sustentable*, 58–66.

- Teixeira da Silva, J. A., & Dobránszki, J. (2014). Sonication and ultrasound: Impact on plant growth and development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(2), 131–143.
<https://doi.org/10.1007/s11240-014-0429-0>
- Torres Garcia, A., Cué García, J. L., & Héctor Ardisana, E. F. (2018). *Fisiología Vegetal Volumen I: Nutrición hídrica y mineral de las plantas* (Issue May).
- Ucros, J. (2008). Breve historia y situación actual del patrimonio forestal colombiano. Recuperado de: <http://www.fao.org/forestry/1727209c7bb88cbaad85cf5c312d8422b>
- Van der Bom, F. J., McLaren, T. I., Doolette, A. L., Magid, J., Frossard, E., Oberson, A., & Jensen, L. S. (2019). Influence of long-term phosphorus fertilization history on the availability and chemical nature of soil phosphorus. *Geoderma*, 355, 113909.
- Vilagrosa, A., Villar-Salvador, P., & Puértolas, J. (2006). El endurecimiento en vivero de especies forestales mediterráneas. *Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos: estado actual de conocimientos*. MMA, Organismo Autónomo de Parques Nacionales, Madrid, 119-140.
- Wang, B., Zhao, H., Duan, C., & Sakanishi, A. (2002). Effects of cell wall calcium on the growth of Chrysanthemum callus under sound stimulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25(3), 189–195. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00322-8](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00322-8)
- Wightman, K. E., & Cruz, B. S. (2003). La cadena de la reforestación y la importancia en la calidad de las plantas. *Foresta Veracruzana*, 5(1), 45–51.

- Xiaocheng, Y., Bochu, W., & Chuanren, D. (2003). Effects of sound stimulation on energy metabolism of *Actinidia chinensis* callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30(1–2), 67–72.
- Xiujuan, W., Bochu, W., Yi, J., Defang, L., Chuanren, D., Xiaocheng, Y. y Sakanishi, A. (2003). Effects of sound stimulation on protective enzyme activities and peroxidase isoenzymes of chrysanthemum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27 (1), 59–63.
[https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00038-3)
- Yi, J., Bochu, W., Xiujuan, W., Chuanren, D., Toyama, Y., & Sakanishi, A. (2003). Influence of sound wave on the microstructure of plasmalemma of chrysanthemum roots. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29(2–3), 109–113. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00154-6](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00154-6)
- Yi, J., Bochu, W., Xiujuan, W., Daohong, W., Chuanren, D., Toyama, Y., & Sakanishi, A. (2003). Effect of sound wave on the metabolism of chrysanthemum roots. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29(2–3), 115–118. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00155-8)
- Yiyao, L., Wang, B., Xuefeng, L., Chuanren, D., & Sakanishi, A. (2002). Effects of sound field on the growth of *Chrysanthemum* callus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 24(3–4), 321–326. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00275-2)
- Zhao, H. C., Wang, B. C., Liu, B. A., Cai, S. X., & Xi, B. S. (2002). The effects of sound stimulation on the permeability of K⁺ channel of *Chrysanthemum* Callus plasma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26(4), 329–333. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(02\)00008-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(02)00008-5)

Zhao, H. C., Wu, J., Xi, B. S., & Wang, B. C. (2002). Effects of sound-wave stimulation on the secondary structure of plasma membrane protein of tobacco cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25(1), 29–32. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00294-6](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00294-6)