



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

**Determinación de hormonas  
vegetales mediante HPLC-  
masas triple cuadrupolo en  
diferentes líneas genéticas  
de *Brachypodium*  
*distachyon* sometidas a  
estrés por sequía**

**Alumno: Lárami Galiano Mallenco**

**Julio, 2020**



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*



## Trabajo Fin de Grado

# **Determinación de hormonas vegetales mediante HPLC- masas triple cuadrupolo en diferentes líneas genéticas de *Brachypodium* *distachyon* sometidas a estrés por sequía**

**Alumno: Lárami Galiano Mallenco**

**Julio, 2020**



## ÍNDICE

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Resumen / Abstract.....                                                            | 1  |
| 2. Introducción.....                                                                  | 3  |
| 2.1. Características principales y papel de las hormonas vegetales en la planta.....  | 3  |
| 2.2. Técnicas para la cuantificación de hormonas vegetales .....                      | 8  |
| 2.3. <i>Brachypodium distachyon</i> .....                                             | 11 |
| 2.4. Estrés en plantas.....                                                           | 13 |
| 2.4.1. Estrés hídrico .....                                                           | 14 |
| 2.4.1.1. Acción de las fitohormonas durante el estrés hídrico .....                   | 15 |
| 3. Objetivos .....                                                                    | 17 |
| 4. Material y métodos.....                                                            | 18 |
| 4.1. Introducción de los patrones en el HPLC-MS QqQ y condiciones de trabajo .....    | 18 |
| 4.1.1. Condiciones de trabajo para la solución de trabajo de hormonas verdaderas..... | 20 |
| 4.2. Rectas de calibrado .....                                                        | 20 |
| 4.3. Preparación de muestras vegetales .....                                          | 20 |
| 4.4. Inducción del estrés hídrico .....                                               | 22 |
| 4.5. Obtención de extractos vegetales .....                                           | 22 |
| 4.6. <i>Software</i> para el análisis de los resultados.....                          | 24 |
| 5. Resultados .....                                                                   | 26 |
| 5.1. Patrones internos del HPLC-MS QqQ y de la mezcla de hormonas verdaderas .....    | 26 |

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2. Rectas de calibrado .....                                                                        | 29 |
| 5.3. Medición de hormonas en los extractos de las 8 líneas genéticas de<br><i>B. distachyon</i> ..... | 30 |
| 6. Discusión .....                                                                                    | 46 |
| 7. Conclusiones.....                                                                                  | 50 |
| 8. Bibliografía .....                                                                                 | 51 |

## 1. RESUMEN

El agua es un recurso cada vez más escaso, esencial para el crecimiento y óptimo desarrollo de las plantas. Conocer la tolerancia de estos organismos ante una situación de estrés hídrico y estudiar su respuesta hormonal frente a un periodo de sequía resulta de especial interés.

En este trabajo 8 líneas genéticas del genero *Brachypodium distachyon* (siete líneas diferentes y una transgénica a partir del genotipo control Bd21) se sometieron a un periodo de sequía de 10 días con el objetivo de observar su comportamiento hormonal frente a este tipo de estrés. Para ello se llevó a cabo la cuantificación de 7 fitohormonas tanto en los extractos de la planta control como en condiciones de sequía utilizando la técnica cuantitativa de cromatografía HPLC-espectrometría de masas de triple cuadrupolo.

La respuesta hormonal observada fue diversa, siendo el SA, su derivado el ácido metilsalicílico, el ácido abscísico, el ácido jasmónico y su derivado el ácido metiljasmónico, las hormonas que experimentaron mayores fluctuaciones tras el periodo de sequía. Las líneas genéticas más afectadas por el estrés hídrico fueron Bd21 (utilizado como genotipo control) y DSNSCA 5. Por el contrario, la línea que ha resultado ser la más resistente ha sido GRAB 16, seguido de JCIM 20. La hormona presente en mayor concentración en todas los genotipos de *B. distachyon* fue el ácido salicílico, por el contrario, la hormona que presentó menor concentración en la planta fue Trans-zeatina.

**PALABRAS CLAVE:** estrés hídrico, sequía, *Brachypodium distachyon*, HPLC-MS QqQ, fitohormonas, respuesta hormonal.

## 1. ABSTRACT

Water is an increasingly scarce resource, essential for the growth and optimal development of plants. It is of particular interest knowing the tolerance of plants to a situation of water stress and study their hormonal response to a period of drought.

In this investigation, 8 genetic lines of the genus *Brachypodium distachyon* (seven different lines and one transgenic from the Bd21 control genotype) underwent a 10-day dry period in order to observe their hormonal behavior to deal with this sort of stress. For this purpose, 7 phytohormones were quantified both in the extracts of the control plant and under drought conditions, using the HPLC-triple quadrupole mass spectrometry technique.

The observed hormonal response was different with salicylic acid, its derivative methylsalicylic acid, abscisic acid, jasmonic acid and its derivative methyljasmonic acid, the hormones that experienced greatest fluctuations resulting in the dry period. The genetic lines most affected by water stress were Bd21 (used as a control genotype) and DSNSCA 5. In contrast, the line that has turned out to be the most resistant has been GRAB 16, followed by JCIM 20.

The hormone present in the highest concentration in all *B. distachyon* genotypes was salicylic acid, on the contrary, the hormone with the lowest concentration in the plant was Trans-zeatin.

**KEY WORDS:** water stress, drought, *Brachypodium distachyon*, HPLC-MS QqQ, phytohormones, hormonal response.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Características principales y papel de las hormonas vegetales en la planta**

Las plantas son capaces de percibir y responder a los cambios en las condiciones ambientales o de desarrollo, para ello cuenta con mecanismos destinados para la regulación, siendo el más importante el sistema de mensajeros químicos.

Este tipo de comunicación se establece mediante hormonas, las cuales se encuentran entre los productos bioquímicos más importantes que afectan desde la germinación de las semillas, el crecimiento de la planta, la producción de rendimiento en diferentes condiciones (incluido el estrés), hasta la senescencia de la planta (Miransari, 2016; Clouse, 2003). Las hormonas vegetales, también llamadas fitohormonas son compuestos orgánicos que se sintetizan en concentraciones muy bajas (entre  $10^{-6}$  y  $10^{-9}$  M) y que causan una respuesta fisiológica relacionada fundamentalmente con los procesos de crecimiento y diferenciación (Izumi et al., 2009).

Los sitios de acción hormonal, por lo general, están alejados del sitio de biosíntesis, esto implica que sea necesaria la existencia de mecanismos de transporte eficientes (Abualia, R., 2018), este desplazamiento puede llevarse a cabo por difusión a través de los tejidos vasculares, así como por un sistema directo denominado transporte polar. Las fitohormonas no se sintetizan en estructuras especializadas, como ocurre en los animales a través de las glándulas endocrinas, sino que pueden formarse en diversos tejidos y células de la planta, tales como ápices meristemáticos de tallos y raíces, primordios de órganos vegetativos, o reproductores, semillas en desarrollo, etc. La acción de diversos tipos de estrés también pueden causar la biosíntesis de algunas hormonas en órganos maduros (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008). Pero además las plantas cuentan con células totipotentes a partir de las cuales se puede generar una planta entera a partir de una sola célula, siempre que ésta mantenga intacto su núcleo, siendo la totipotencia una propiedad poco frecuente en animales.

Las hormonas vegetales se requieren en cantidades minúsculas y sus concentraciones en los sitios de actividad están reguladas con precisión



(Srivastava, L. M., 2002). La sensibilidad que las células presentan por las fitohormonas se van a traducir en cambios significativos en el desarrollo, crecimiento, diferenciación de células y tejidos de la planta por lo que una alteración en la concentración de las mismas provocara variaciones en diversos procesos fisiológicos, esto ocurre porque ninguna hormona controla de manera exclusiva un determinado proceso fisiológico sino que se produce una interacción bien positiva o negativa entre los diferentes tipos o grupos de hormonas (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008).

Las plantas producen una amplia variedad de hormonas, que incluyen auxinas, giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), citoquininas (CK), ácido salicílico (SA), etileno (ET), jasmonatos (JA), brasinoesteroides (BR) y péptidos entre otras (Gangwar, S. et al., 2014).

Estas hormonas se clasifican atendiendo a su estructura y a las funciones fisiológicas que realizan en la planta.

#### ❖ Giberelinas

Las Giberelinas son compuestos naturales que actúan como reguladores endógenos del crecimiento y el desarrollo en los vegetales superiores (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008). Constituyen una familia de diterpenos tetracíclicos ácidos, cuya estructura básica está constituida por un anillo de ent-giberelano. La mayor parte de las giberelinas pertenecientes a esta familia de compuestos no poseen capacidad por sí mismas para regular el desarrollo de las plantas. De hecho, casi todas las giberelinas son precursores o productos inactivados, laterales o finales, de las rutas que sintetizan las GAs activas. Las principales GAs activas son GAs C<sub>19</sub> que portan un grupo hidroxilo en la posición 3β, como GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>3</sub> y GA<sub>7</sub>. (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008).

El transporte de giberelinas a través de la planta no es polar, sino que se lleva a cabo tanto vía xilema como vía floema (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008).

La mayoría de las células de una planta tienen alguna capacidad para sintetizar esta fitohormona. Su biosíntesis está fragmentada entre plastidios, retículo endoplasmático y citosol (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008).

Los niveles más elevados se encuentran en las partes reproductivas y en las partes jóvenes de la planta, por lo que se encuentran en mayor medida

en ápices de tallos y raíces, hojas jóvenes, partes florales, semillas inmaduras y embriones en germinación (Srivastava, 2002).

Efectos fisiológicos:

El más importante es inducir crecimiento en altura. También promueven el desarrollo súbito de inflorescencias y la floración en muchas plantas, particularmente en aquellas de día largo (PDL). Inducen la germinación en semillas en condiciones de dormancia (Peng & Harberd 2002). Están involucradas en la movilización de reservas en granos de cereales. En especial inducen la síntesis de  $\alpha$ -amilasas y proteasas. Y promueven el desarrollo de muchos frutos, induciendo también la partenocarpia (Jordán, M & Casaretto, J., 2006a).

#### ❖ Citoquininas

Las citoquininas son unas de las principales hormonas vegetales que regulan numerosos aspectos del crecimiento y el desarrollo. (Bhattacharya, 2019).

En muchos procesos de desarrollo, la citoquinina y las giberelinas actúan de forma antagónica. Aunque según numerosos estudios, se sugiere que la acción de la citoquinina está regulada por la giberelina (Bhattacharya, 2019).

También presenta una relación antagónica con las auxinas, ya que son capaces de estimular la división celular en presencia de ellas (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008).

La mayoría de las citoquininas son sintetizadas directamente por la planta, tanto en las zonas meristemáticas de la raíz (sitio más común), como en los meristemas de órganos aéreos y en semillas en desarrollo (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008). Las citoquininas se transportan pasivamente a través del xilema, del floema o mediante ambos según el lugar de síntesis inicial. Cuando son sintetizadas en la raíz se mueven a través de la planta con la corriente de transpiración junto con agua y minerales que absorben las raíces. (Fosket, D.E., 1994). Se encuentran en concentraciones más elevadas en las regiones meristemáticas y los tejidos en crecimiento (Jini, D. & Baby, J., 2019).

Todas las citoquininas naturales tienen una estructura de anillo de adenina con una cadena lateral de 5 carbonos isopentenilo del N6 de la molécula de adenina (Srivastava, 2002). Las citoquininas naturales son

derivados de adenina que llevan una cadena lateral derivada de isopreno o aromática en el extremo N 6 (66, 93), estas familias se denominan CK isoprenoides y CK aromáticas, respectivamente. (Sakakibara, 2006)

Efectos fisiológicos:

Promueven la división celular; Provocan la iniciación de brotes, organogénesis y androgénesis; Demoran o retrasan la senescencia; Permiten el desarrollo de cloroplastos (con formación de granas) en oscuridad. Activan yemas laterales en dormancia; Intensifican la expresión de “demanda” en el transporte de savia elaborada a nivel del floema. (Jordán, M & Casaretto, J., 2006a)

❖ Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal que se encuentra en pequeñas cantidades en todos los tejidos vegetales y que tiene múltiples funciones relacionadas con el crecimiento y desarrollo de la planta. (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008). La fitohormona ácido abscísico (ABA) fue identificada en la década de 1960 tras estudios realizados sobre la abscisión de frutos y la dormancia de yemas. (Jordán, M & Casaretto, J. , 2006b). Aunque el papel de ABA En la abscisión aún no está bien definido (Zeevaart, J.A.D., 2003)

ABA es un sesquiterpenoide (un terpenoide C15) con un anillo y una cadena lateral (Srivastava, 2002). En función de la posición de dicho grupo carboxilo es posible encontrar dos isómeros del ABA: Cis (casi todo el ABA de las plantas se encuentra en esta forma) y Trans involucradas en las respuestas rápidas y lentas (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008).

Se sintetiza en todas las células vegetales que tienen cloroplastos u otros plastidios. Desde ahí viaja al resto de la planta a través de xilema y floema (floema principalmente).

Efectos fisiológicos:

ABA controla muchos aspectos importantes del desarrollo de la planta, incluyendo la síntesis de proteínas y lípidos de almacén en semillas, la adquisición de la tolerancia de semillas a la desecación y la inhibición de la transición a germinación y del crecimiento reproductivo. ABA también estimula respuestas a estreses ambientales como el cierre estomático inducido por sequía o estrés osmótico, la inducción de tolerancia a sequía, salinidad,

hipoxia, bajas temperaturas y respuestas a heridas mediante la inducción de inhibidores de proteasas y patógenos (Srivastava, 2002; Leung & Giraudat 1998; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki 2005; Jordán, M & Casaretto, J. , 2006b; Dzhavakhiya, V.G. et al., 2007).

#### ❖ Jasmonatos

Esta hormona y el jasmonato de metilo o metiljasmonato (MeJA) se encuentran de forma amplia en plantas. Se aislaron inicialmente del jazmín (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008).

Son compuestos de origen lipídico de estructura molecular similar a la de las prostaglandinas en animales. Son formados a partir de los ácidos grasos no saturados linoleico y linolénico que se liberan desde los fosfolípidos de las membranas celulares por la acción de lipasas. La ruta de biosíntesis se llama ruta de los octadecanoides (Jordán, M. & Casaretto, J., 2006b).

Actúan como moléculas señal de las respuestas de las plantas a diversas situaciones de estrés (heridas, ataque por patógenos y plagas, exposición a sequía y ozono) y participan en diversos procesos del crecimiento y desarrollo (Creelman & Mullet 1997, Farmer et al. 2003; Jordán, M. & Casaretto, J., 2006b).

La biosíntesis de esta fitohormona se activa durante condiciones de estrés (Wasternack, 2007) y muchos de los genes involucrados en la señalización de JA están controlados por el estrés por sequía (Huang et al., 2016; Bakshi, P. et al., 2019)

Efectos fisiológicos:

En semillas, inhiben su germinación y crecimiento. Promueven el cierre de estomas en condiciones de estrés. Inhiben la elongación de las raíces, pero promueven la formación de raíces adventicias. Su ausencia afecta el desarrollo normal del polen e inhiben la germinación del mismo. Promueven la degradación de la clorofila. Promueven la senescencia y abscisión de hojas. Promueven la biosíntesis del etileno. Pueden aumentar la resistencia de las plantas al ataque por insectos. (Jordán, M. & Casaretto, J., 2006b). Además cumplen un papel significativo en las respuestas a estrés que involucren daño en la membrana plasmática. (Jordán, M. & Casaretto, J., 2006b).

#### ❖ Salicilatos

Los salicilatos son hormonas derivadas del ácido salicílico (SA). SA es

un compuesto fenólico derivado de la fenilalanina. Está implicado en procesos muy importantes como la termogénesis y la resistencia frente a patógenos, desencadenando la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), que es un mecanismo mediante el cual las plantas provocan la muerte de las células cercanas al punto de entrada de un patógeno evitando de esta manera la extensión de la infección (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008). Además, el SA es una fitohormona importante en la respuesta frente a varios tipos de estrés abiótico (temperaturas elevadas o bajas, estrés salino o estrés oxidativo). El ácido salicílico y también el ácido metil salicílico, está poco relacionado con procesos de crecimiento, en cambio, está implicado en la reducción de la síntesis de etileno, originando un retraso de la senescencia de las flores o la inducción de la floración (Jordán, M. & Casaretto, J., 2006b).

## **2.2 Técnicas para la cuantificación de hormonas vegetales**

La detección, identificación y cuantificación de las fitohormonas es muy importante para entender la fisiología y el funcionamiento de las plantas, las técnicas de medición de hormonas han ido evolucionando a lo largo del tiempo, ya que inicialmente era necesaria la purificación de una cantidad muy elevada de tejido debido a que estas se encuentran en muy baja concentración en los tejidos de las plantas, por lo que eran técnicas lentas y tediosas (Srivastava, 2002).

En los últimos años, se han mejorado mucho los instrumentos utilizados para el análisis y cuantificación de hormonas vegetales y las técnicas utilizadas, siendo cada vez más precisas y eficientes, ya que permiten cuantificar las hormonas a partir de una pequeña muestra de tejido. Estas nuevas técnicas, entre las cuales está la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con la tecnología de triple cuadrupolo (nano-HPLC/HPLC-MS QqQ) que es la utilizada en este estudio, tienen las ventajas de ser una técnica más rápida, simple y automatizada además de necesitar mucho menos tejido, aportando resultados fiables y siendo capaz de detectar concentraciones del orden del nanogramo. También tienen unos inconvenientes como puede ser la necesidad de eliminar el disolvente que queda en la muestra (a veces muy elevada) o la mano de obra

que debe ser muy especializada para trabajar con la compleja y sofisticada maquinaria. (Liu, Y. et al. 2019).

Los actuales métodos para la determinación de fitohormonas se pueden dividir principalmente en: bioensayo, inmunoensayo y análisis cromatográfico. (Jiang C. et al., 2020).

El bioensayo es un método de detección de fitohormonas semicuantitativo, que necesita mucho tiempo y unas condiciones estrictas (Jiang C. et al., 2020).

Para las técnicas inmunológicas se utilizan enzimas para la marcación de anticuerpos. Son métodos que muchas veces son utilizados como estudio previo de cuantificación antes de usar los sistemas de análisis cromatográfico, ya que son poco complejos, rápidos y baratos (Marín, A.R., 2014), Destacan el Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) y el Radioinmunoensayo (RIA). ELISA es una técnica muy apropiada para la cuantificación de fitohormonas, pero es necesario fraccionar y purificar los extractos para evitar interferencias inespecíficas con los anticuerpos y la reacción cruzada con compuestos análogos. RIA consiste en la inhibición competitiva de la unión de un antígeno marcado radiactivamente a su anticuerpo específico por parte del antígeno no marcado (Marín, A.R., 2014).

La cromatografía es muy importante actualmente es la más utilizada para la medición de hormonas vegetales por su alta eficiencia de separación, sus bajos límites de detección y por el menor tiempo y muestra necesarios, pudiendo detectar varias fitohormonas al mismo tiempo. Hay muchos tipos, como la cromatografía líquida-detección ultravioleta (LC-UV), la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (HPLC-MS), cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (UPLC-MS) o la nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con la tecnología de triple cuadrupolo (nano-LC/HPLC-MS QqQ). (Liu Y. et al., 2019).

Espectrometría de masas (MS) es una técnica de química analítica muy sensible y específica, que identifica la cantidad y tipo de compuestos químicos que hay en una muestra midiendo la relación masa/carga y la abundancia de iones en fase gaseosa. En los últimos años ha mejorado mucho la selectividad

y la sensibilidad del método analítico, permitiendo un análisis cualitativo y cuantitativo preciso en muestras complejas de plantas (Jiang C. et al., 2020).

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es la técnica más utilizada para el análisis de fitohormonas polares (Aral H. et al., 2013). Es una aplicación moderna de la cromatografía líquida, garantiza una alta sensibilidad. (Seneca, 2007)

La nano-cromatografía líquida acoplada a MS con la tecnología de triple cuadrupolo (nano-LC/HPLC-MS QqQ) actúa como un filtro de masas para identificar compuestos contenidos en la muestra en cantidades muy pequeñas. Esto es posible gracias a su alta sensibilidad y precisión cuantitativa, de manera que mediante una técnica de separación cromatográfica, se puede detectar residuos contaminantes en una concentración muy pequeña o compuestos que se encuentran presentes en la muestra que se quiere analizar en cantidades ínfimas.

El equipo produce una ionización en la muestra que se desea analizar mediante una descarga eléctrica, generando iones, que pasan a una etapa de vacío en la que mediante la tecnología cuadrupolo y una selección de radiofrecuencias produce la filtración de las masas de las muestras de interés. A continuación se realiza una reacción química a través de un segundo cuadrupolo y por último, un tercer cuadrupolo se encarga de analizar los productos de esta reacción maximizando tanto la sensibilidad como la especificidad de los mismos.

Para todo ello, el equipo cromatógrafo consta de una columna en la que se realiza la separación a través de diluyentes específicos que se introducen en la misma y que son empujados hacia ella mediante una bomba. Esta bomba es la que genera la suficiente presión para garantizar la separación de masas. Posteriormente el líquido resultante de la separación entra al espectrómetro de masas, en el que se encuentra una fuente donde entran los iones produciendo la ionización de las muestras, Es aquí, con ayuda de la tecnología cuadrupolo, donde se produce realmente el análisis de las muestras. Este último paso se hace en etapa de vacío.

Al acoplar al triple cuadrupolo un cromatógrafo operando a flujos de micro a submililitro/min, la identidad del analito se completa cuantificando el área (AA) generada bajo el pico de la transición a lo largo de la carrera

cromatográfica, y su tiempo de retención lo puede diferenciar de otros analitos con transiciones idénticas.

Una de las grandes ventajas de esta técnica es que permite analizar múltiples muestras consecutivas sin necesidad de intervenir el operativo.

Sus aplicaciones son variadas desde estudios biológicos en especies tanto animales como vegetales hasta estudio biomédicos.

### **2.3 *Brachypodium distachyon***

*Brachypodium distachyon* P. Beauv, (1812), pertenece a la familia *Poaceae* o *Gramineae* (comúnmente llamadas gramíneas). Se trata de plantas herbáceas generalmente anuales y su distribución es muy amplia, apareciendo en Europa, África y zonas de Asia y América.

El complejo *Brachypodium distachyon* está formado por tres especies: *B.stacei*, *B.distachyon* y *B.hybridum*, (Cañadilla Tendero M.F, 2019; Catalán et al., 2012). Son las únicas especie dentro de este género anuales que están presentes en Europa, monocotiledóneas silvestres, propias de zonas templadas, con un tamaño pequeño (entre 15-40 cm en el medio natural, y hasta 50 cm en buenas condiciones de cultivo),

Sus raíces finas, fasciculadas y poco voluminosas y sus semillas son cariopsides alargadas y muy resistentes. Presentan auto fertilidad, un ciclo de vida corto y requisitos de crecimiento simples, además de una gran similaridad con cereales como puede ser el trigo y la cebada. En España está presente en casi toda la península, aparece en lugares sin cultivar, pastizales secos y entre los cultivos leñosos (Junta de Andalucía, 2016).

Su genoma es fácilmente transformable, y fue el primero de Gramíneas en ser completamente secuenciado. Por esta causa *B distachyon* se ha convertido en una planta modelo no solo para el estudio comparativo frente a muchas otras especies de gramíneas, sino también en estudios frente a distintos tipos de estrés entre los cuáles uno de los más importantes es el estrés hídrico (Ozdemir. et al.2008; Roger H., 2014). Tiene uno de los genomas más pequeños dentro de las plantas superiores, con solo un 18,3% de ADN repetitivo del cual comparte un 11% con otras especies de cereales y 7,3% es específico de esta especie. (Hammami R., 2011).



Además del pequeño tamaño de su genoma, otras características que lo hacen manejable como modelo son:

- Presenta un porte bajo (20 cm aprox.)
- Genoma compacto (272 Mb)
- Poca demanda en el control de crecimiento y ciclo de vida corto (2 - 3 meses)
- Reproducción autógama
- Facilidad de transformación
- Óptimo desarrollo en condiciones de laboratorio e invernadero (López, G.P., 2014)

Por lo tanto, la importancia de esta especie explica la necesidad de conocer su filogenia, su origen evolutivo y su estructura genética (Hammami R., 2011).

Inicialmente Hasterok y col. (2006 a y b) fue el primero en describir la cito-taxonomía de distintos ecotipos de *B. distachyon*, los cuales presentaban un número de cromosomas diferente y presuntamente distintos niveles de ploidía. Los tres citotipos que se mostraron tenían 10, 20 y 30 cromosomas, distribuyéndose todas las poblaciones en esos tres grupos (Hammami R., 2011).

Al principio se creía que esta diferencia cromosómica se debía a una duplicación simple del número de cromosomas, siendo por lo tanto *Brachypodium distachyon* una única especie con tres niveles ploídicos ( $2n=10$ , 20 y 30) y originada por eventos de autoploidía a partir de un ancestro común diploide  $x=5$  y  $2n=10$  que por esos eventos generó individuos tetraploides ( $2n=20$ ) y hexaploides ( $2n=30$ ), pero más adelante se descartó esta teoría. (Opanowicz et al., 2008; López, G.P., 2014)

Tras varios estudios, se dedujo que los citotipos  $2n=10$  y  $2n=20$  son distintas especies y por consiguiente tienen una naturaleza citogenética independiente. Entre estas dos especies puede producirse una hibridación y una posterior duplicación cromosómica originando el derivado alotetraploide con  $2n=30$  (López, G.P., 2014). Tras este descubrimiento se propuso la nueva nomenclatura para los diferentes citotipos, permaneciendo *B. distachyon* con el citotipo  $2n=20$ , *B. stacei* para  $2n=10$  y *B. hybridum* para  $2n=30$  (Cañadilla, M.F., 2019; Catalán et al., 2012).

Investigaciones realizadas por un miembro de nuestra universidad han mostrado que hay poliploides derivados de *B. distachyon* (alotetraploides) que son más eficientes en el uso del agua que su ancestro parental (*B. distachyon*) bajo unas condiciones de estrés hídrico. Además a través de este estudio se ha podido observar que también son capaces de mantener ciertas propiedades fisiológicas importantes para su desarrollo lo que le ha permitido adaptarse y colonizar hábitats secos y semiáridos de la Península Ibérica (Manzaneda, A.J. et al., 2015).

En el territorio europeo, las especies más frecuentes son *B. distachyon* y *B. hybridum*, siendo *B. stacei* mucho más escasa (Hammami R., 2011).

## **2.4 Estrés en plantas**

Una planta está sometida a estrés cuando se encuentra en unas condiciones significativamente diferentes de las óptimas para la vida (Valladares, F. et al., 2004).

La tolerancia de una especie a un determinado estrés se mide con relación a la supervivencia de la planta, el rendimiento del cultivo, el crecimiento o los procesos de asimilación primaria como la incorporación de CO<sub>2</sub> o minerales (Pitarch, M., 2013), no todas las especies tienen la misma tolerancia al estrés, sino que difieren en sus requerimientos óptimos para la vida y por lo tanto en la susceptibilidad a dicho estrés (Valladares, F. et al., 2004), hay tipos de plantas que presentan especializaciones para tolerar mejor los efectos de un estrés concreto.

El estrés provoca en las plantas cambios que incrementan su supervivencia. Entre los cambios que se producen en la planta se encuentran las respuestas hormonales.

Hay dos tipos de estrés, el estrés biótico y el estrés abiótico:

El estrés biótico es el causado por organismos vivos (virus, bacterias, hongos, nematodos, insectos y arácnidos). Estos organismos privan al huésped de sus nutrientes, reduciendo el vigor de la planta e incluso, en casos muy extremos, provocando su muerte. Este tipo de estrés es una causa muy importante de pérdidas previas y posteriores a la cosecha (Singla J. & Krattinger S.G., 2016).

El estrés abiótico es el provocado por un factor físico o químico. Entre los factores físicos están el estrés hídrico, el estrés salino, las temperaturas

extremas, la radiación ultravioleta o un daño mecánico. Entre los factores químicos están por ejemplo la carencia de elementos minerales o concentraciones elevadas de contaminantes ambientales, tales como el dióxido de azufre, el óxido de nitrógeno, los compuestos clorofluorocarbonados, el ozono o los metales.

#### *2.4.1. Estrés hídrico*

El agua es esencial para la vida de las plantas, constituye entre un 80-95% de la masa de los tejidos en crecimiento y es fundamental para diversas funciones (Moreno, F., 2009).

Una cantidad limitada o excesiva de agua puede ser un factor inductor de estrés para la planta (Moreno, F., 2009)

El estrés hídrico o por sequía se produce cuando la tasa de transpiración excede a la absorción de agua (Moreno, F., 2009; Pitarch, M., 2013), esto es debido principalmente a un ambiente escaso en agua, pero también, a veces, se produce a causa de bajas temperaturas en el ambiente o por una salinidad elevada en el suelo (Moreno, F., 2009).

El estrés hídrico provoca el marchitamiento de las hojas, reduce la asimilación de CO<sub>2</sub>, la conductancia estomática, el potencial hídrico y la transpiración, también daña las membranas, reduce el crecimiento, la longitud de los brotes y el área de la hoja (Arbona et al., 2005; Pitarch, M., 2013; Bakshi P. et al., 2019). Esto causa una disminución del desarrollo de la planta, provocando, entre otras cosas, una pérdida en la producción agrícola y por lo tanto, una pérdida económica importante (Bakshi P. et al., 2019).

Las plantas han ido evolucionando a lo largo del tiempo, desarrollando diferentes respuestas y adaptaciones que les permiten sobrevivir en condiciones de constante déficit hídrico (Nilsen y Orcutt, 1996; Moreno, F., 2009). Si este déficit se provoca lentamente, la planta tiene tiempo para aclimatarse, disminuyendo la expansión foliar y aumentando el crecimiento radicular. Un mecanismo muy importante de resistencia a nivel fisiológico es el cierre de estomas (o la regulación de los ciclos de apertura y cierre de estos), ya que son los responsables de la mayor pérdida de agua en las plantas, esta respuesta está regulada por dos fitohormonas, el ácido abscísico (ABA) (Moreno, F., 2009)

#### *2.4.1.1 Acción de las fitohormonas durante el estrés hídrico*

Las fitohormonas y más en concreto el ácido abscísico, jasmonatos, ácido salicílico, etileno y brasinosteroides regulan las respuestas frente a diversos tipos de estrés (Pitarch, M., 2013).

El ácido abscísico (ABA) es la principal hormona involucrada en la regulación de respuestas frente a varios tipos de estrés abiótico y biótico, aunque está relacionado fundamentalmente con el estrés hídrico (Madani B. et al., 2019; Pitarch, M., 2013). En condiciones de déficit de agua se produce un aumento en la concentración de ABA en las hojas, concretamente aumenta hasta en 40 veces su concentración a nivel de las células estomáticas para producir el cierre de los mismos (Bakshi P. et al., 2019; Moreno, F., 2009).

Su aumento de concentración se inicia en las primeras fases de escasez de agua y su función es inducir el cierre de los estomas, evitando tanto la pérdida de agua como la entrada de atacantes bióticos (Madani B. et al., 2019), también afecta al control de la homeostasis iónica y en la reducción en la expansión de la hoja (Madani B. et al., 2019). Además induce la síntesis de proteínas que favorecen la resistencia a la desecación y bloquea la germinación haciendo que las semillas permanezcan durmientes (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008).

Además ABA también tiene efectos sobre el crecimiento, concretamente de raíz y tallo, de manera que una situación de déficit hídrico moderado produce la elongación de la raíz y por el contrario cuando la planta se enfrenta a condiciones de sequía extrema esta elongación se inhibe. En cuanto al crecimiento del tallo ABA afecta inhibiendo su desarrollo debido a su relación con la extensibilidad de la pared celular (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008).

Otras respuestas adaptativas inducidas por ABA frente a este tipo de estrés son reducción del crecimiento caular, ajuste osmótico, cambios en la expresión génica y aumento en la conductividad de las raíces (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008). El aporte de esta hormona desde la raíz provoca en la planta una señal mediante la cual regulan su estado hídrico en suelos secos para adaptar su funcionamiento a las circunstancias antes de que el estrés sea más intenso (Azcón-Bieto J. & Talón M., 2008).

También se ha estudiado que una aplicación exógena de ácido abscísico mejora la tolerancia al estrés hídrico de la planta (Bakshi P. et al., 2019). Por lo tanto, los niveles de ácido abscísico en una planta son determinantes para estudiar su comportamiento frente a una condición de estrés hídrico (Moreno, F., 2009).

En condiciones de estrés biótico y abiótico ABA y etileno actúan de forma antagónica, ya que una acumulación de ABA reduce la síntesis de etileno (Bakshi P. et al., 2019).

El ácido salicílico (SA) es otra de las fitohormonas que tienen importancia en situaciones de estrés biótico, regulando respuestas de defensa coordinadas con el ácido abscísico (Pitarch, M., 2013), también regula respuestas frente a algunos tipos de estrés abiótico como el estrés salino, oxidativo o por altas y bajas temperaturas (Chen et al., 2009).

Las citoquininas a concentraciones elevadas funcionan colaborando con el ácido abscísico en el cierre de estomas (Bakshi P. et al., 2019).

La biosíntesis de jasmonato se induce en condiciones de estrés ya que muchos de los genes implicados en la señalización de JA están controlados por el estrés hídrico (Bakshi P. et al., 2019).

Se ha observado un incremento en la concentración de JA previo al incremento de ABA en situaciones de estrés hídrico sugiriendo que JA actuaría como mediador entre la percepción del estrés y la inducción de las respuestas fisiológicas, apareciendo por lo tanto de forma temprana frente al inicio de la sequía. (Arbona y Gómez-Cadenas, 2008; Pitarch, M., 2013) Parece ser por lo tanto que la síntesis de JA y ABA están conectados.

Tanto el papel de ABA como de SA, JA y etileno son claves en la regulación de la respuesta que ejercen las plantas frente a cualquier tipo de estrés abiótico. La acción de estas fitohormonas pueden ser cooperativa o antagónica, siendo determinante el factor estresante, de manera que la interacción positiva o negativa entre estos fitoreguladores será de suma importancia para que la planta ejerza una respuesta adecuada frente al estrés (Chávez Suárez L. et al., 2012).

### 3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es analizar y estudiar el comportamiento hormonal, en concreto de giberelinas (GA3), ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA), transzeatina, ácido metiljasmónico (MeJA) y ácido metilsalicílico (MeSA) en 8 genotipos diferentes (ALSUR 4, GRAB 16, GRAB 17, Bd21, GRAZ 1, JCIM 20, DHN-trans y DSNSCA 5) de la especie *Brachypodium distachyon* frente a un estrés hídrico.

Este objetivo general se desglosa en varios subobjetivos específicos:

- Desarrollo de una recta de calibrado a partir de unas concentraciones conocidas de cada hormona medida en este trabajo (GA3, SA, JA, ABA, Trans-zeatina, MeJA y MeSA) con la finalidad de poder cuantificar la cantidad de hormona existente en cualquier extracto vegetal.
- Cuantificar las hormonas estudiadas en plantas de los 8 genotipos de *B. distachyon* que no se han sometido a ningún estrés y que servirán como control.
- Cuantificar las hormonas estudiadas en plantas de los 8 genotipos de *B. distachyon* que se han sometido a 10 días de ausencia total de agua y que por lo tanto se encontrarán en una situación de estrés hídrico.
- Comparación de la cantidad de hormonas presentes en la planta control y en la que se ha sometido a sequía de cada uno de los genotipos para ver el comportamiento de cada una de las hormonas frente a este tipo de estrés.
- Comparar el comportamiento de cada hormona individualmente para todos los genotipos estudiados en conjunto.

## 4. Material y métodos

### 4.1. Introducción de los patrones en el HPLC-MS QqQ y condiciones de trabajo

- Solución stock de hormonas verdaderas y controles internos

Las hormonas a cuantificar en este trabajo tanto en plantas control como en plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico son: Ácido abscísico (ABA), Ácido Jasmónico (JA), Ácido salicílico (SA), Giberelinas (GA3), Ácido metil jasmónico (MeJA), Ácido metil salicílico (MeSA) Y Trans-zeatina (Trans-Zea).

Los patrones de cada una de las hormonas que se van a medir en este trabajo ya existen en el HPLC-masas QqQ y fueron puestos a punto en un trabajo anterior (Hurtado, E., 2018) Sin embargo se revisaron dichos parámetros antes de comenzar a medir en cada muestra. Se utilizaron hormonas comerciales con un índice de pureza mayor al 99% disueltas en metanol. Se partió de una solución inicial de hormona de 2mg/ml y se filtró con un filtro milipore LLG Siringe Filters Nylon de 0,20  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 0,13mm. A partir de esta primera solución se hicieron diluciones.

Cada hormona por separado se midió en el HPLC-MS QqQ a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$  Con el objetivo de obtener las condiciones de trabajo para cada hormona, el ión de medida en el cromatograma y su tiempo de retención (RT) (Hurtado, E., 2018). En la tabla 1, se representan el tamaño del ión detectado para cada hormona, la polaridad, el patrón interno (utilizado para evitar el efecto matriz) y el tiempo de retención.

**Tabla 1.** Condiciones de monitoreo para cada hormona vegetal estudiada. Siendo **Q1**, ión precursor seleccionado para su medida y **RT**, tiempo de retención del ión expresado en minutos

| HORMONA       | Q1     | TIEMPO DE RETENCIÓN(RT) | POLARIDAD | ESTANDAR INTERNO |
|---------------|--------|-------------------------|-----------|------------------|
| GA3           | 345,2  | 3,94                    | -         | H2JA             |
| SA            | 137,05 | 4,68                    | -         | H2JA             |
| AIA           | 174,1  | 4,37                    | -         | H2JA             |
| IBA           | 202    | 5,89                    | -         | H2JA             |
| JA            | 208,9  | 6,21                    | -         | H2JA             |
| ABA           | 263    | 5,15                    | -         | H2JA             |
| Trans-zeatina | 220,1  | 2,57                    | +         | MeH2JA           |
| MeJA          | 227,15 | 10                      | +         | MeH2JA           |
| MeSA          | 153,1  | 6,86                    | +         | MeH2JA           |

➤ Solución mezcla de los estándares internos

Los estándares internos son muy importantes para la medición de las hormonas, ya que son compuestos utilizados como referencia para saber la diferencia de la cantidad de hormona que retiene el HPLC-MS QqQ, evitando el error provocado por el propio funcionamiento del aparato.

Estos estándares son compuestos químicos que no están presentes en las plantas de manera natural, por lo que podemos saber la concentración de partida en la muestra y la concentración final medida por el aparato para calcular el error producido en las mediciones y extrapolarlo a las hormonas verdaderas, cuya estructura química y propiedades son muy similares a las de dichos patrones internos. Cuando el HPLC-MS QqQ detecta cantidades de estándares internos que oscilan ligeramente en cada medición no se confundirá con compuestos que sintetiza la planta, sino que será debido al propio proceso de medición del aparato.

La solución mezcla de los estándares internos H2JA (usado como ión negativo) y MeH2JA (usado como positivo) se preparó con una concentración final de 10 mg/ml para ser adicionada a los tejidos vegetales en el momento de la extracción de las hormonas, quedando a una concentración final en la muestra de 1mg/ml. Los extractos con dicha mezcla de patrones fue filtrada con un filtro milipore.

➤ Solución de trabajo de hormonas verdaderas

Mediante el procedimiento anterior se consiguieron las condiciones de trabajo específicas para cada hormona individualmente, pero con el objetivo de reducir el tiempo de trabajo de la medición, siguiendo el procedimiento empleado por Pan et al. (2010), se realizó una solución de trabajo en la cual se mezclaron con una concentración final de 1µg/ml todas las hormonas verdaderas.

La utilización de esta solución tiene la finalidad de conseguir unas condiciones de trabajo comunes para todas las hormonas en un único protocolo y que en el mismo cromatograma que genere el HPLC-MS QqQ estén presentes todos los picos de todas las hormonas utilizadas.

Se detectaron así el tiempo de retención de los iones de cada hormona, con una ligera variación respecto a los datos obtenidos de la soluciones de hormonas verdaderas individuales.



#### 4.1.1. Condiciones de trabajo para la solución de trabajo de hormonas verdaderas

Para poder realizar la cuantificación de todas las hormonas necesarias para este estudio, se llevó a cabo un protocolo de trabajo para poner a punto el HPLC-MS QqQ, que permitiera la cuantificación de todas las hormonas,.

#### 4.2. Rectas de calibrado

Se realizaron diluciones a 10; 1; 0,5; 0,1; 0,01 y 0 µg/ml para la medición de todas las hormonas a partir de una concentración inicial de 10µg/ml correspondiente a la solución de trabajo de hormonas verdaderas, posteriormente se añadieron los patrones internos con una concentración final en la muestra de 50ng/ml. Se realizaron tres réplicas de cada dilución, medidas bajo las condiciones de trabajo detalladas previamente.

#### 4.3. Preparación de muestras vegetales

- Preparación previa a la germinación

**Tabla 2.** Características de los genotipos pertenecientes a *Brachypodium distachyon*: *Brachypodium hybridum* y *Brachypodium stacei* utilizados en este estudio.

| Genotipos | Especie             | Poliploidia               | Desarrollo        | Eficiencia en el uso de agua | Resistencia a la sequía | Origen                 |
|-----------|---------------------|---------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Bd21      | <i>B.distachyon</i> | Diploide                  | Ambientes húmedos | Baja                         | Sensible a sequía       | Mosul, Iraq (USDA)     |
| GRAB 16   | <i>B.distachyon</i> | Diploide                  | Ambientes húmedos | Baja                         | Sensible a sequía       | Grazalema (España)     |
| GRAB 17   | <i>B.distachyon</i> | Diploide                  | Ambientes húmedos | Baja                         | Sensible a sequía       | Grazalema (España)     |
| GRAZ 1    | <i>B.distachyon</i> | Diploide                  | Ambientes húmedos | Baja                         | Sensible a sequía       | Grazalema (España)     |
| DSNSCA 5  | <i>B.distachyon</i> | Diploide                  | Ambientes húmedos | Baja                         | Sensible a sequía       | Sierra Nevada (España) |
| ALSUR 4   | <i>B. stacei</i>    | Diploide                  | Ambientes áridos  | Alta                         | Muy resistente          | Sorbas (España)        |
| JCIM 20   | <i>B.hybridum</i>   | Autopoloploide artificial | Ambientes áridos  | Alta                         | Muy resistente          | Cimbarra (España)      |
| DHN-trans | <i>B.distachyon</i> | Diploide                  | Ambientes áridos  | Muy alta                     | Muy resistente          | Ujaen (España)         |

Para este trabajo se utilizaron las siguientes 8 líneas genéticas (Tabla 2) de la especie *Brachypodium distachyon*: *B hybridum* y *B stacei*. Una de estas líneas genéticas es una planta modificada genéticamente a partir de Bd21, en

la cual se ha insertado el gen DHN3. Se trata de un gen que codifica dehidrinas y que se expresa hasta 700 veces más como media, en condiciones de sequía con respecto al control. Debido a la escasez de semillas de esta línea hemos realizado el experimento de medida de hormonas sólo en condiciones control

Para favorecer la germinación las semillas se sometieron 24 horas a un tratamiento con frío en nevera a temperatura 4°C, posteriormente Las semillas se esterilizaron y lavaron con hipoclorito sódico (lejía comercial) en una concentración del 10% durante 5 minutos y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Todo este proceso se realizó en la cabina de flujo laminar para preservar en todo momento las condiciones de esterilidad y evitar contaminaciones. A continuación, se colocaron las semillas en placas de Petri estériles para su germinación poniendo en la base de las mismas un papel de filtro estéril humedecido con agua destilada. La incubación de las placas, se llevó a cabo en una estufa en condiciones de oscuridad con una temperatura de 25 °C durante 48 horas.

➤ Siembra en maceta

Las plántulas, en las que emergió una pequeña radícula, se sembraron en maceta con una mezcla de sustrato 70% de tierra negra universal y un 30% de perlita (ambos previamente esterilizados), una vez preparada la maceta se regó a saturación para facilitar la siembra. Introduciendo unas 4 o 5 plántulas por cada maceta con ayuda de unas pinzas estériles aproximadamente a 1 cm de profundidad. Se sembraron dos macetas de cada especie.

Por último, se riegan las macetas nuevamente con agua destilada, y se introducen las bandejas correctamente etiquetadas en la cámara de cultivo. Las condiciones de crecimiento en la cámara de cultivo, fueron de un 70% de humedad y un fotoperiodo de 16 horas de luz a 21 °C y 8 horas de oscuridad a 18 °C. Las plantas permanecieron en la cámara de cultivo alrededor de 2 meses y 23 días con riego cada 4 días ya que son plantas adaptadas a la sequía.

#### 4.4. Inducción al estrés hídrico

Una vez transcurrido ese periodo de crecimiento de las plantas, la mitad de las plantas de cada genotipo se sometieron a un estrés hídrico, utilizando una de las dos macetas como planta control y otra maceta como muestra de sequía, con el objetivo de ver el comportamiento hormonal frente a este estrés.

Este proceso duro 10 días en los que las plantas control siguieron regándose de manera habitual y las plantas sequia no se regaron nada durante este periodo (fig. 1). Posteriormente las plantas se congelaron con N líquido hasta su procesamiento.



**Figura 1** . Diferenciación de las plantas en control y sequía de los genotipos ALSUR 4 Y JCIM 20 para proceder a la inducción de estrés por sequía.

#### 4.5. Obtención de extractos vegetales

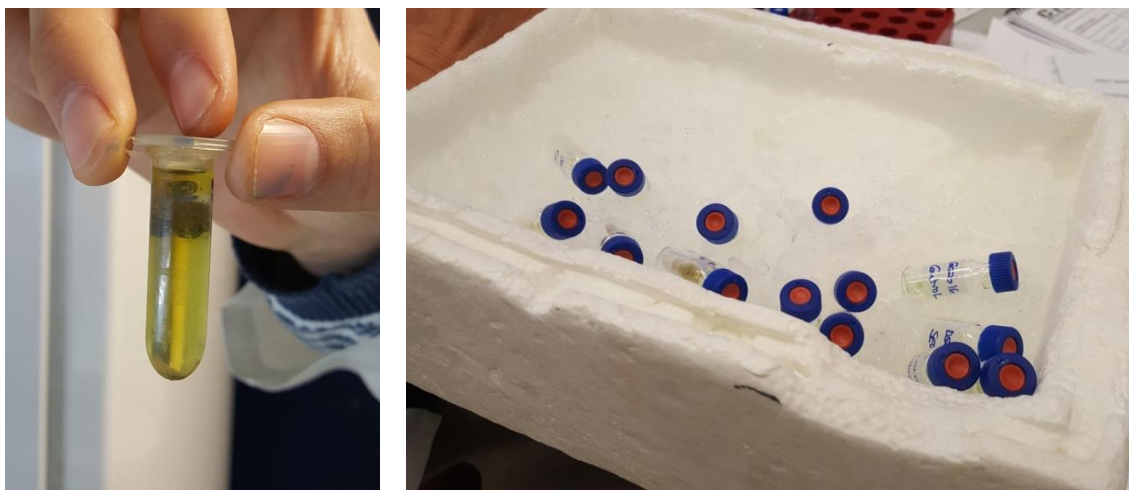
Para la obtención de los extractos vegetales se prepararon dos soluciones de trabajo compuestas por:

- Solvente de extracción, se prepararon 500 ml de esta solución stock 2propanol:H<sub>2</sub>O:HCl (2:1:0,002; v/v/v). Este solvente es estable durante 3 meses y se ha de conservar a - 20 °C.
- Solución mezcla de los patrones internos a una concentración final de 50 ng/ml.

A partir de las muestras obtenidas anteriormente, se llevó a cabo un protocolo para el procesamiento de todo el tejido vegetal:

1. Es necesario evitar que la muestra se descongele en todo momento con la ayuda de un mortero, se homogenizaron las muestras usando para ello nitrógeno líquido.

2. Pesar unos 50 mg de tejido vegetal, dicha cantidad es vertida a un eppendorf estéril.
3. Se adicionan 50  $\mu$ l de la solución de trabajo de los estándares internos (1mg/ml) por cada 50 mg de tejido vegetal aun congelado.
4. En cada tubo, se adicionan 500  $\mu$ l del solvente de extracción. Si hemos utilizado una cantidad de más de 50 mg de tejido, ajustamos el volumen para que la relación muestra:solvente sea 1:10.
5. Posteriormente, ponemos cada tubo en un agitador orbital a 100 rpm durante 30 minutos a 4 °C.
6. Pasada esta media hora, adicionamos un 1 ml de diclorometano a cada muestra, ajustando el volumen si se ha partido de más de 50 mg de tejido vegetal, de forma que la relación muestra:solvente sea 1:20; y volvemos a agitar a 100 rpm durante 30 minutos más también a una temperatura de 4 °C.
7. Posteriormente habría que centrifugar las muestras a 13000 g durante 5 minutos a 4 °C.
8. Una vez realizado este paso, obtendremos dos fases diferenciadas (fig. 2), de manera que transferirnos aproximadamente 900  $\mu$ l de la fase inferior con una ayuda de la punta de una pipeta.
9. Con un flujo de N<sub>2</sub> evaporamos todo el líquido para conseguir concentrar la muestra y congelamos dichas muestras a -20 °C hasta su análisis en el HPLC-masas QqQ.
10. Justo antes de analizar las muestras añadimos 150  $\mu$ l de metanol para evitar que este se evapore.
11. Posteriormente, pasamos cada muestra por un filtro milipore *LLG Siringe Filters Nylon* de 0,20  $\mu$ m y con un diámetro de 0,13 mm, para eliminar las posibles clorofilas contenidas en la muestra y que puedan interferir en nuestros resultados (fig. 2).
12. Por último, Inyectar en el HPLC-MS QqQ 50  $\mu$ l de muestra, atendiendo a las condiciones de trabajo y métodos correspondientes para posteriormente analizar cuantitativamente cada muestra. Este análisis dura alrededor de 8 o 9 horas y durante este tiempo, las muestras deben de mantenerse en frío a una temperatura de entre 4 y 8 °C en el HPLC-MS QqQ.



**Figura 2** . La primera imagen corresponde a uno de los extractos vegetales obtenidos del genotipo JCIM. La segunda imagen pertenece a los extractos vegetales tras pasar por el filtro milipore, ya listos para inyectar en el HPLC-MS QqQ.

#### 4.6. Software para el análisis de los resultados

Para el analizar correctamente las muestras, el aparato utiliza dos programas informáticos, *Xcalibur* y *TSQTune*.

Una vez analizados todos los extractos vegetales el HPLC-MS QqQ, es capaz de obtener resultados gráficos y numéricos, como las áreas (AA) producidas por cada fitohormona y por los estándares internos y el tiempo de retención (RT) de cada compuesto, todo esto es posible a través del software informático *Xcalibur 2.2 SP1* que permite manejar y visualizar los datos de espectrometría de masas generados.

Con estos datos podemos calcular la cantidad de hormona presente en cada tejido vegetal.

El sistema de datos *Xcalibur* es un software de análisis cuantitativo y cualitativo, que además cuenta con un navegador denominado *Quan Browser*. Este sistema de datos mediante una serie de algoritmos (Génesis, ICIS o Avalon) nos permite:

- Detectar e integrar los picos de nuestras hormonas de interés en el cromatograma
- Determinar la concentración de analitos dentro de nuestro conjunto de muestras
- Visualización de resultados e edición de los mismos

- Detección de Estándares internos y curvas de calibración para estándares de cuantificación.

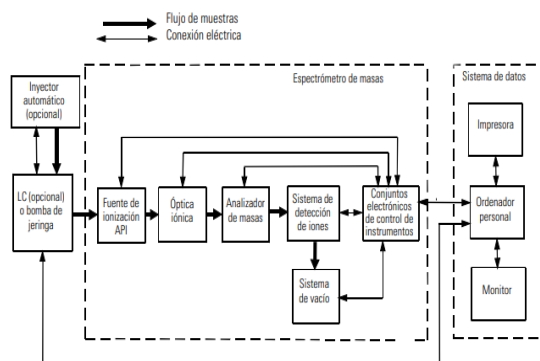
- Identificación de los picos en función de sus tiempos de retención, siendo el tiempo de retención de un pico el tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra y la detección de los picos máximos.

El espectrómetro de masa utilizado para el análisis de hormonas pertenece a la serie TSQ™. Es un instrumento de origen analítico avanzado que incluye como principales componentes una bomba de jeringa, una válvula de inyección/desvío, un espectrómetro de masas y el sistema de datos Xcalibur™ mencionado anteriormente.

Para el análisis, la muestra puede introducirse mediante distintos métodos como puede ser la bomba de jeringa a través de una infusión directa, mediante una válvula de inyección / desvío equipada con un bucle de muestras y LC (análisis por inyección en flujo) y por último la válvula de inyección/desvío y el HPLC (cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento) equipado con una columna (LC/MS) (fig.3).

En un análisis normal, el procedimiento a seguir es el siguiente: un cromatógrafo de líquidos (LC) introduce una muestra. El LC separa los diversos componentes de la muestra. Los componentes se eluyen del LC y pasan al espectrómetro de masas donde se analizan.

Para filtrar, fragmentar o transmitir iones al analizador de masas el espectrómetro TSQ utiliza varios modos y distintos tipos de barrido con el fin de obtener los picos diferenciados de cada hormona para su posterior identificación.



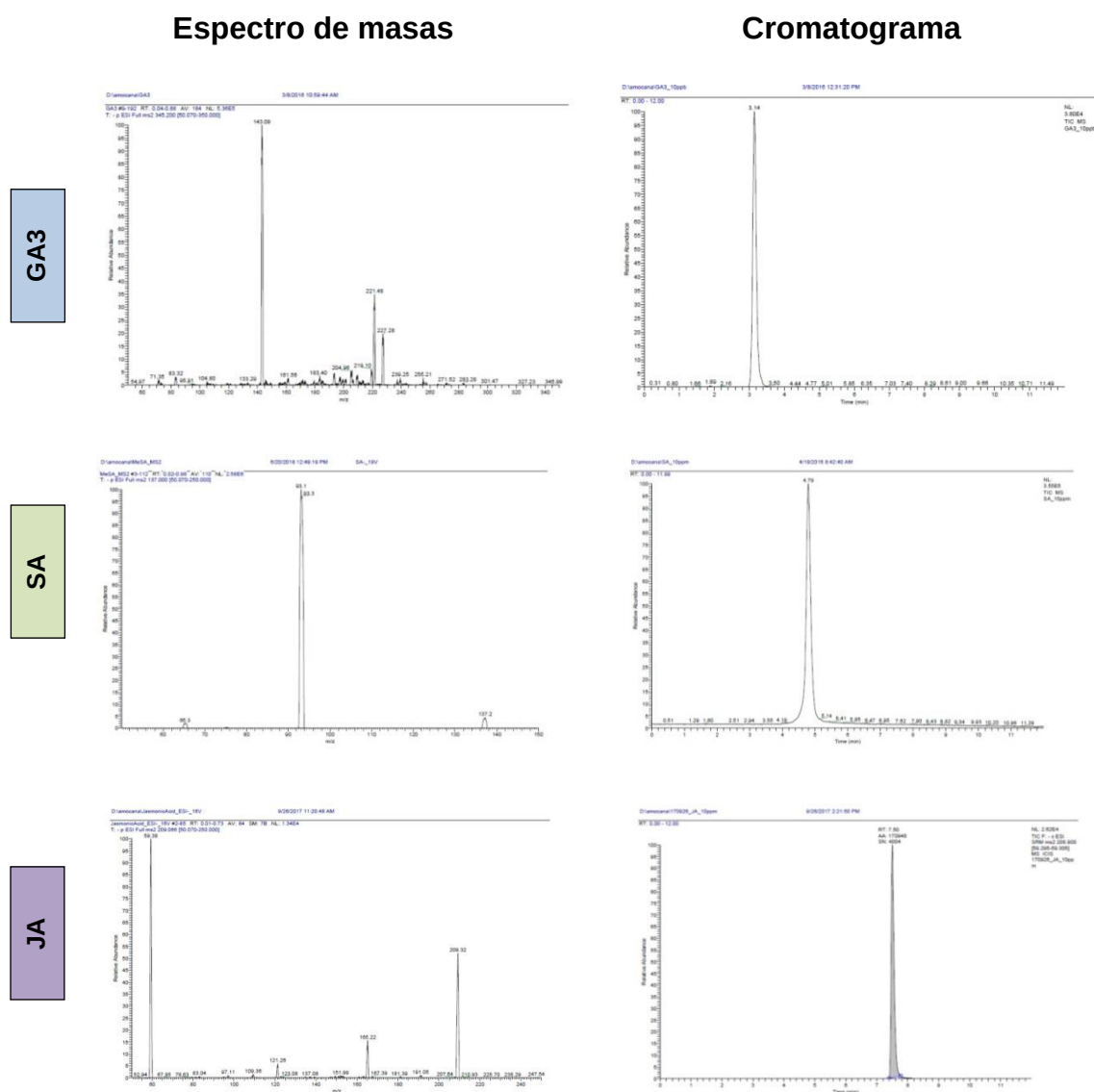
**Figura 3 .** Diagrama del funcionamiento del programa TSQ . Aparato localizados en el GSYA de los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén que nos permitió la cuantificación de hormonas vegetales mediante la técnica HPLC-espectrometría de masas de triple cuadrupolo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Patrones internos del HPLC-MS QqQ y de la mezcla de hormonas verdaderas

El primer paso necesario para la realización de este trabajo fue la introducción en el HPLC-masas QqQ de los patrones internos de cada hormona verdadera con el objetivo de conocer el peso molecular de los iones que aparecen en el cromatograma y su tiempo de retención (RT específico).

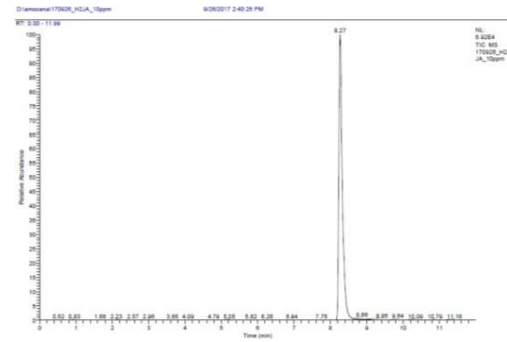
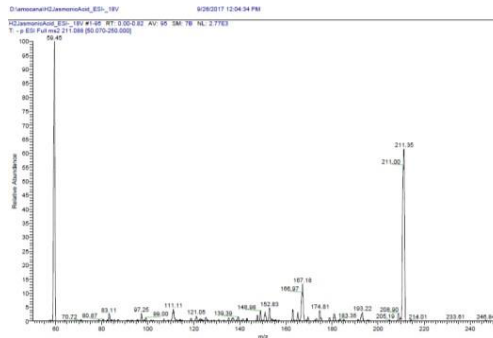
El cromatograma específico de cada hormona verdadera generado por el HPLC-masas QqQ y el espectrómetro de masas obtenido se representa en la figura 4.



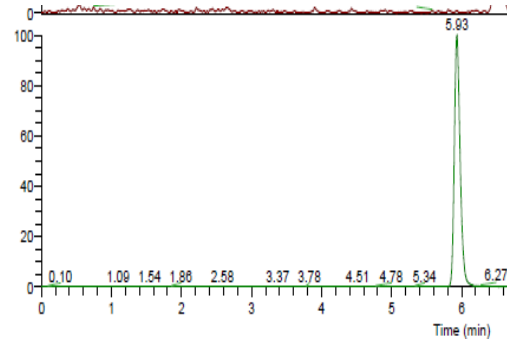
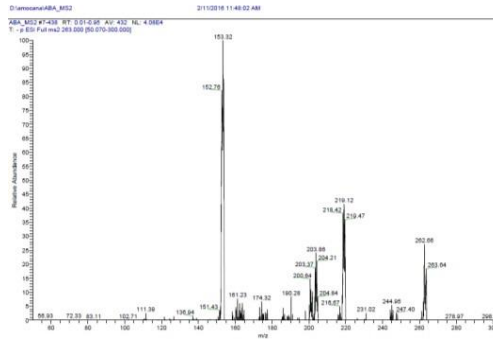
## Espectro de masas

## Cromatograma

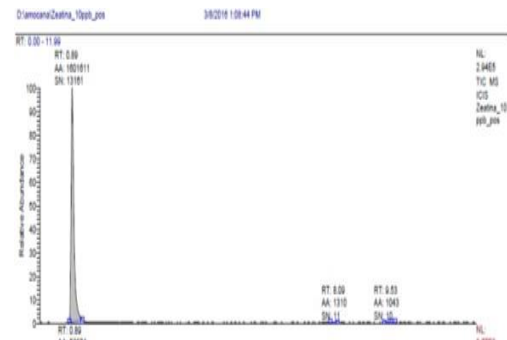
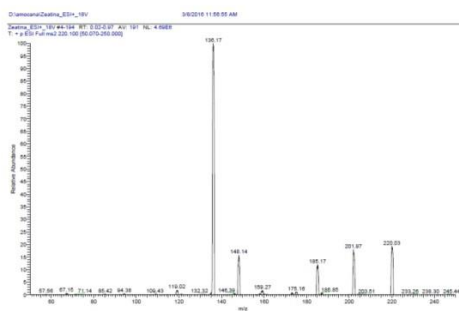
H2JA



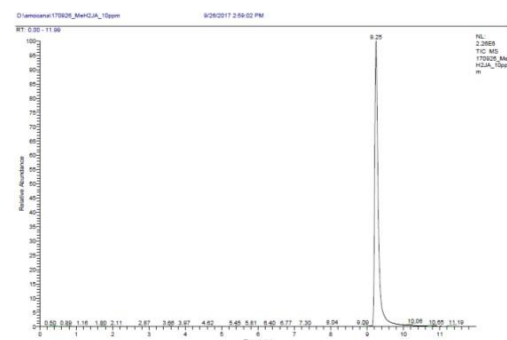
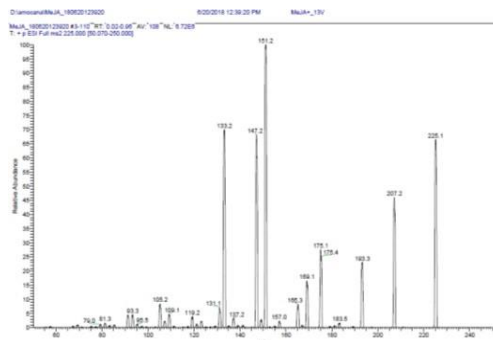
ABA



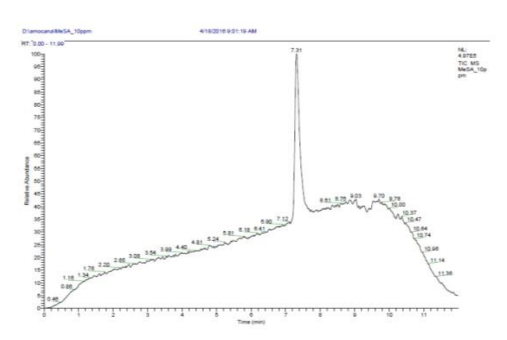
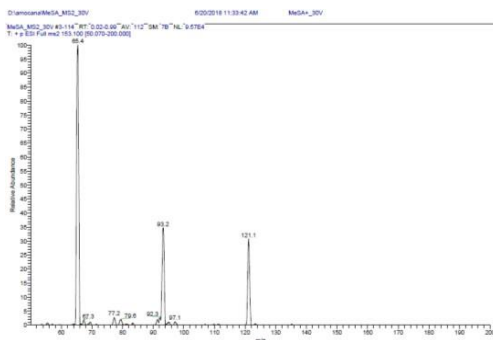
TRANS-ZEATINA



MEJA



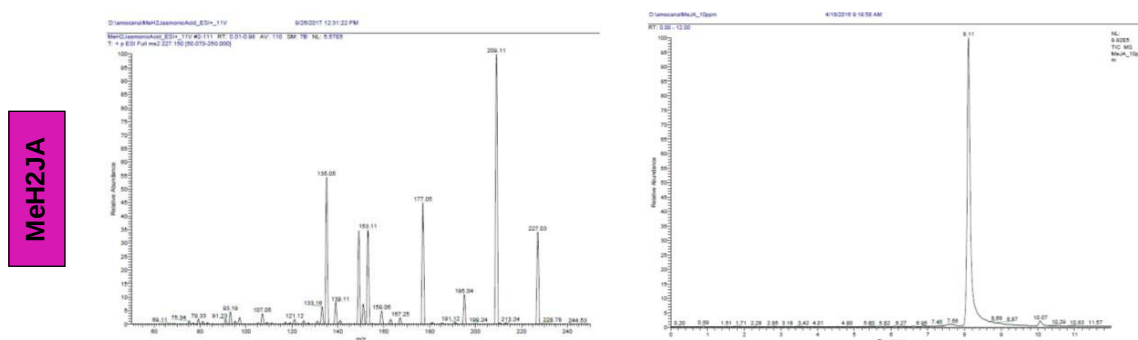
MESA





## Espectro de masas

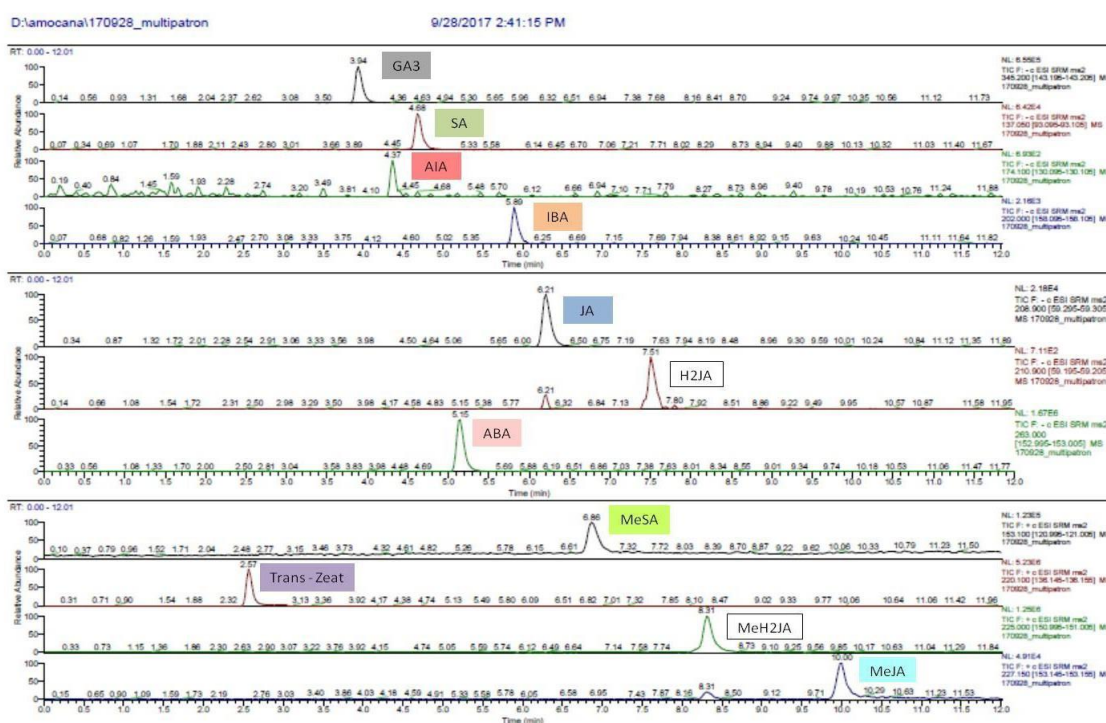
## Cromatograma



**Figura 4.** Espectro de masas y cromatograma obtenidos por el HPLC-MS QqQ para cada uno de los patrones correspondientes a las distintas hormonas verdaderas y estándares internos medidos.

Una vez detectados todos los patrones de las hormonas individualmente, se ajustaron las condiciones de trabajo del HPLC-masas QqQ usando una mezcla de todas las hormonas verdaderas con una concentración final de 10 µg/ml y los estándares internos con una concentración de 50 ng/µl.

El cromatograma para la mezcla de todas las hormonas está representado en la figura 5.

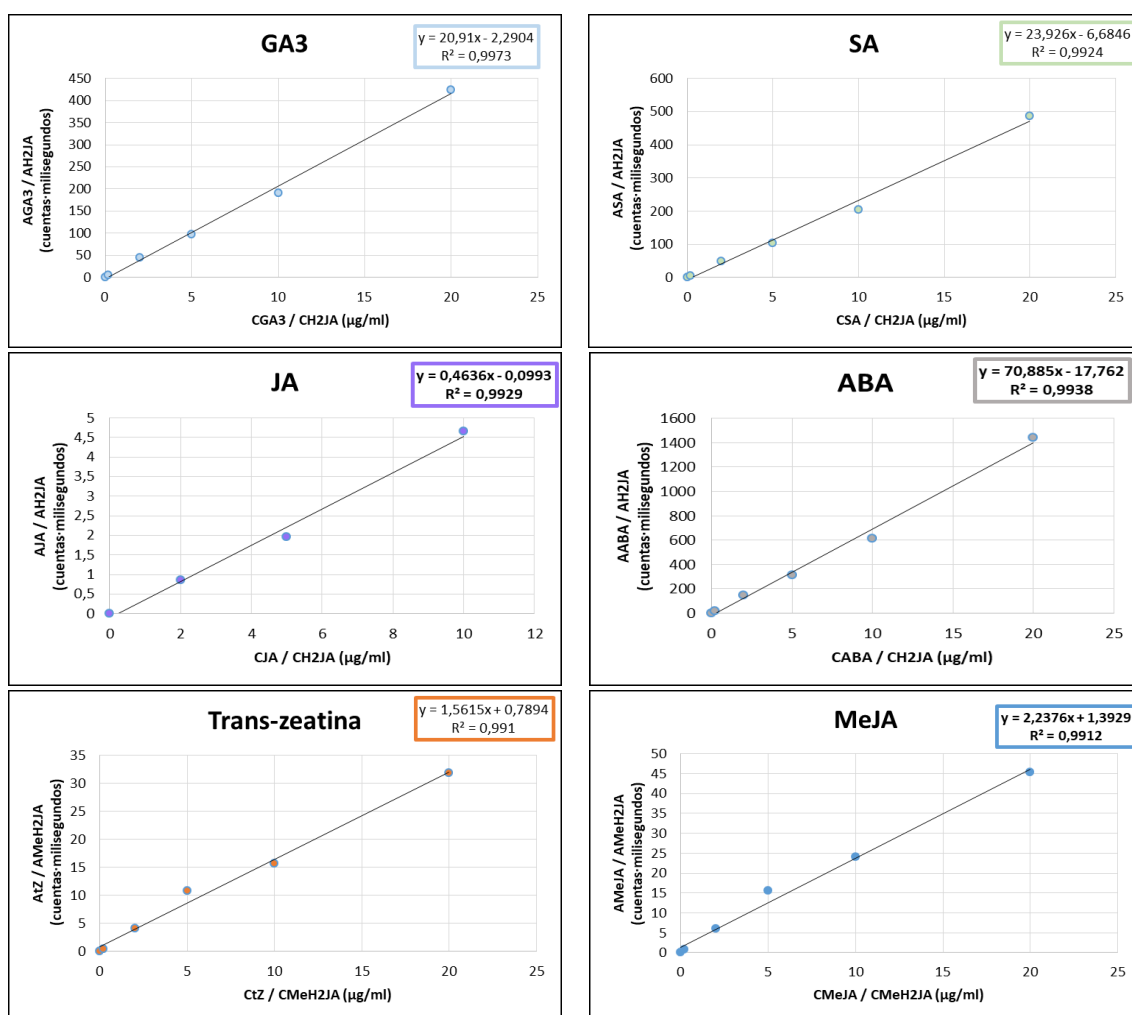


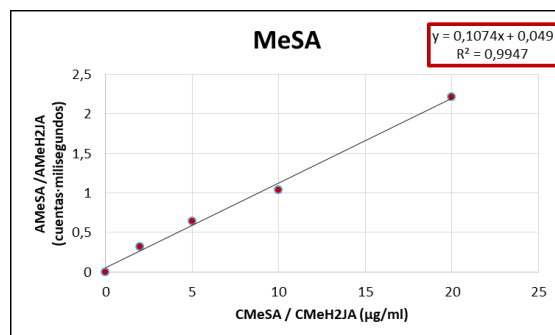
**Figura 5 .** Cromatograma obtenido por el programa.... de la solución de trabajo de las hormonas verdaderas y sus correspondientes estándares internos, H2JA y MeH2JA

## 5.2. Rectas de calibrado

Para medir la concentración de cada hormona contenida en los extractos vegetales de *B.distachyon* fue necesario hacer previamente unas rectas de calibrado que sirvieran de referencia para calcular a posteriori la concentración de cada hormona en las muestras problema. Por esta causa, se partió, de alícuotas diluidas a concentraciones de 1; 0,5; 0,1; 0,01; 0,001 y 0 µg/ml para la mezcla de hormonas.

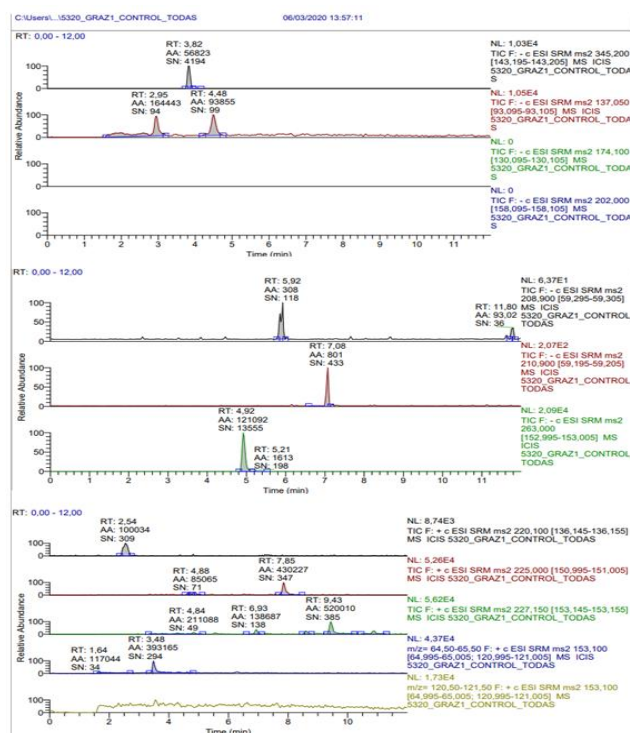
A partir de las tablas obtenidas se generó una gráfica donde en el eje X representa las concentraciones de cada hormona verdadera y en el eje Y el área relativa de las muestras con respecto al área producida por los patrones internos usados en cada caso. Se calcularon las ecuaciones de cada recta y el valor del coeficiente de regresión  $R^2$  (fig. 6) cuyo valor en todas las rectas calculadas fue superior a 0.991.





**Figura 6** . Representación gráfica de las rectas de calibrado obtenidas para cada una de las hormonas vegetales.

### 5.3. Medición de hormonas en los extractos de los genotipos de *B. distachyon*.



**Figura 7** . Cromatograma para las distintas hormonas vegetales obtenido a partir de los extractos realizados para el genotipo GRAZ 1 en su planta control

Se prepararon los extractos vegetales de las muestras de las diferentes líneas genéticas de *Brachypodium distachyon*, *B.hybridum* y *B. stacei* en condiciones control y sometidas a *sequía* que contienen las hormonas de interés para este trabajo, mediante el protocolo descrito en el apartado de material y métodos, los extractos en el momento de la medición se resuspenden en un volumen de 150 µl de metanol y se filtraron con filtros millipore de 0,2 µm y un diámetro de 0,13 mm de poro para llevarlos

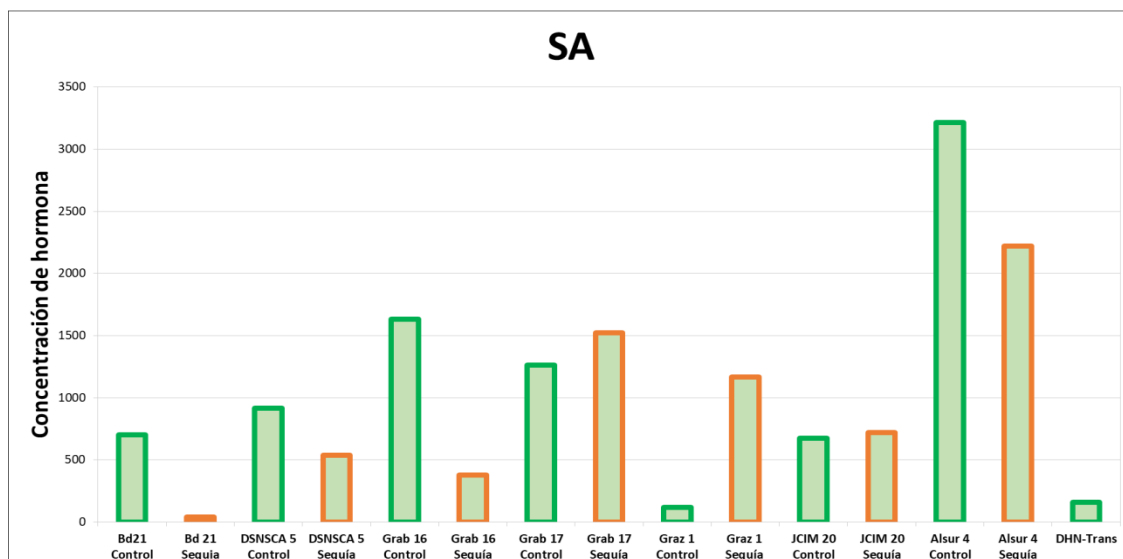
inmediatamente al HPLC-MS QqQ. De cada muestra, se obtuvo un cromatograma (Fig. 7) del cual se dedujo el valor de x que posteriormente sustituyéndolo en las ecuaciones de las rectas de calibrado anteriormente expuestas para cada hormona, nos proporcionó la concentración de las hormonas en cada muestra control y sequía.

La exposición de los resultados se hará a continuación, estudiando la variación de cada hormona en todas las líneas genéticas estudiadas y en orden decreciente es decir, primero se expondrán los datos de la hormona que está en la planta Bd21 en mayor concentración que es el ácido salicílico, hasta la que se encuentra en menor concentración que se expondrá en último lugar y se trata de Trans-zeatina.

Esta variación se va a comparar en todos los casos con Bd21 porque esta es la línea genética que se utiliza como control en el análisis de resultados de este estudio.

#### -Ácido Salicílico (SA):

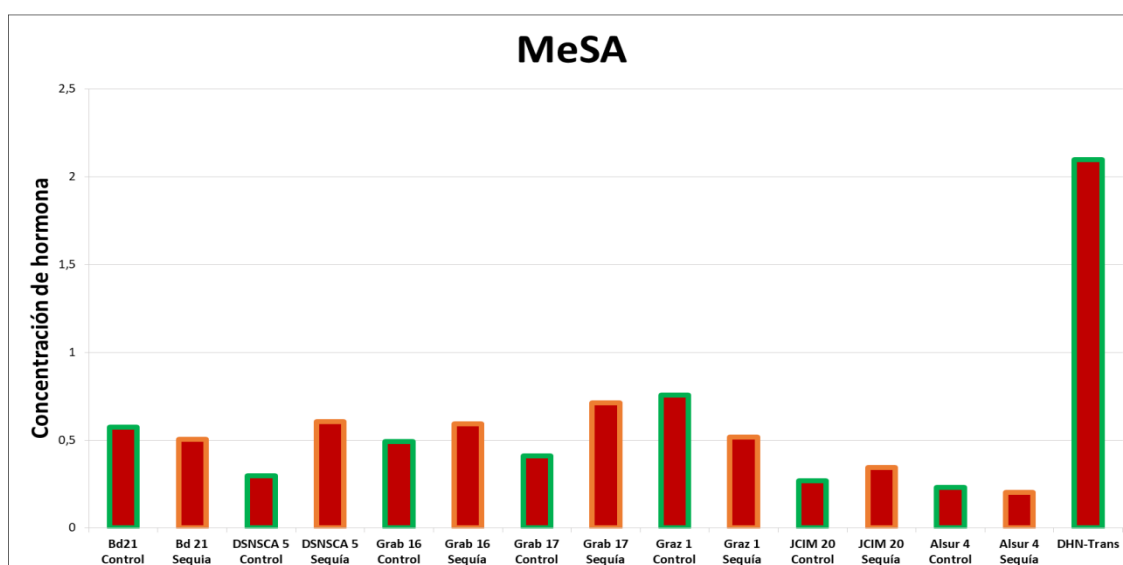
La figura 8 representa el comportamiento de SA en las diferentes líneas genéticas estudiadas tanto en condiciones control como en condiciones de estrés hídrico. Vemos el comportamiento en Bd21, nuestro control, donde SA disminuye cuando la planta se somete a condiciones de sequía. Destacar de entre todas las líneas, el genotipo ALSUR 4 donde las concentraciones son especialmente elevadas tanto en control como en sequia con respecto al resto de las líneas genéticas, seguida por GRAB 16 y GRAB 17. Por el contrario, la planta con menor concentración de SA es GRAZ 1, seguido muy de cerca por DHN-trans. Si observamos la tendencia general podemos ver que existe una disminución de esta hormona cuando la planta se somete a falta de agua con respecto a sus controles correspondientes, excepto en JCIM 20, donde prácticamente se mantiene constante y en GRAB 17 y GRAZ 1, donde aumenta su concentración y que curiosamente son líneas genéticas que crecen en lugares con alta humedad relativa en el ambiente. La concentración de SA en DHN-trans es mucho más baja que la observada en Bd21 control.



**Figura 8** . Representación gráfica de la concentración de la hormona Ácido salicílico (**SA**) en cada uno de los genotipos estudiados en su planta control y su planta sequía.

-Ácido metil salicílico (MeSA):

Esta hormona tiene una mayor concentración en el genotipo DHN-trans, siendo una cantidad mucho mayor a la observada en Bd21 control. La menor concentración de MeSA en las plantas control se puede ver en ALSUR 4. Las variaciones provocadas en esta hormona tras la inducción al estrés hídrico son mucho más suaves que en el resto de hormonas. En GRAZ 1, Bd21 y ALSUR 4 se produce un descenso de la concentración en las plantas sequía respecto al control (destacando GRAZ 1). Y en DSN5CA 5, GRAB 17, GRAB 16 y JCIM 20 ocurre al contrario, aumentando su concentración, siendo este aumento un poco más acentuado en los dos primeros genotipos (fig. 9).

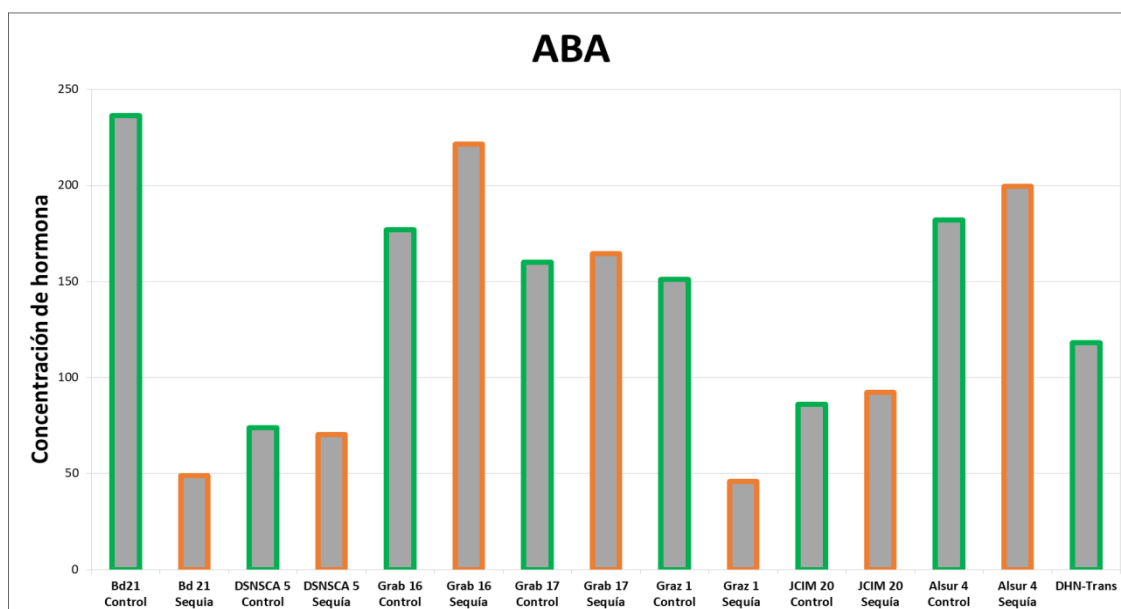


**Figura 9** . Representación gráfica de la concentración de la hormona ácido metilsalicílico (**MeSA**) en cada uno de los genotipos estudiados en su planta control y su planta sequía.

En cuanto al comportamiento de MeSA en las plantas sequía respecto al control es similar en todos menos en GRAB 16, produciendo un descenso de la concentración en las plantas estresadas, destacando DSNSCA 5, JCIM 20 y GRAB 17 en las cuales el descenso es muy brusco. Tal y como se mencionó anteriormente, GRAB 16 tiene un comportamiento totalmente diferente al resto aumentando la concentración de MeJA significativamente en la planta con estrés hídrico. En cuanto a la concentración de DHN-trans es levemente superior a la observada en Bd21.

-Ácido abscísico (ABA):

El genotipo que más concentración de ABA tiene en su control es Bd21 y la que menor concentración tiene es DSNSCA 5, seguida de JCIM 20 (fig. 10).



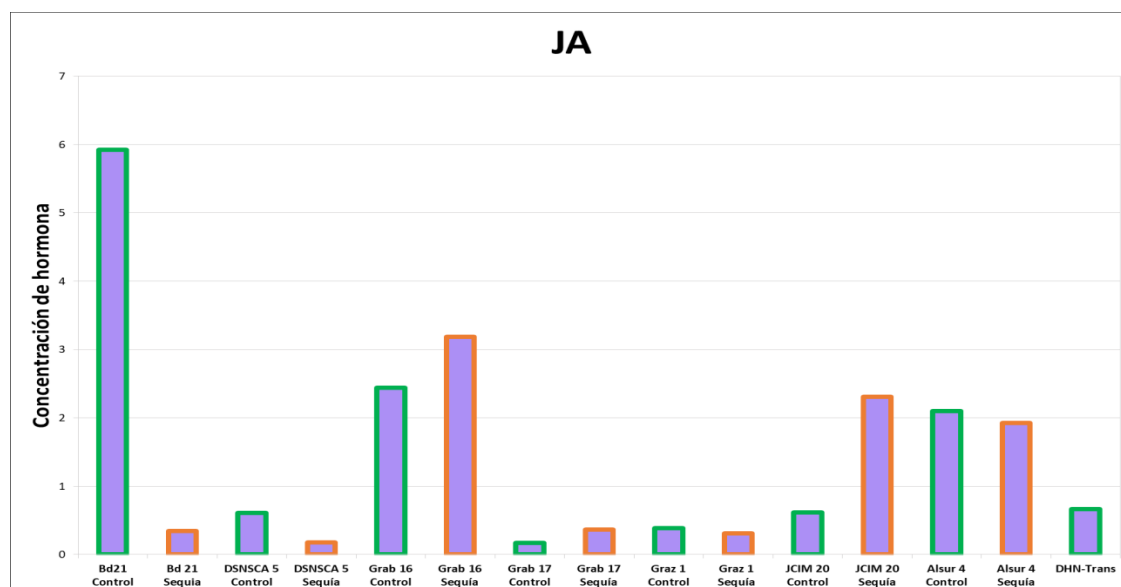
**Figura 10** . Representación gráfica de la concentración de la hormona ácido abscísico (**ABA**) en cada uno de los genotipos estudiados en su planta control y su planta sequía.

La respuesta de las plantas al someterse a sequía respecto a la producción de ABA es muy variable. En Bd21 es en el genotipo que se produce una disminución más intensa de ABA tras someter la planta a sequía. Este mismo comportamiento ocurre en GRAZ 1. En cambio, en GRAB 16 y ALSUR 4 se produjo un aumento de concentración de ABA en las plantas sequía respecto al control. En GRAB 17, JCIM 20 y DSNSCA 5 se produjo una leve variación de la concentración, aumentando en las dos primeras y disminuyendo en la última. La concentración de ABA de DHN-trans es aproximadamente la

mitad de la observada en Bd21 control. Teniendo en cuenta que la hormona del estrés descrita en la bibliografía por excelencia es el ácido abscísico, podríamos afirmar que no todas las líneas genéticas utilizadas en este estudio han sufrido un estrés muy elevado y por lo tanto la falta de agua en algunas líneas utilizadas debe ser más extrema como para producir una respuesta en la planta.

-Ácido jasmónico (JA):

En el gráfico de la figura 11, donde se observa el comportamiento del ácido jasmónico en todas los genotipos estudiados tanto en condiciones control como en sequía, se puede ver que en Bd21 control es el genotipo donde JA está presente a una mayor concentración con diferencia respecto al resto de las líneas, seguido de GRAB 16 y ALSUR 4.



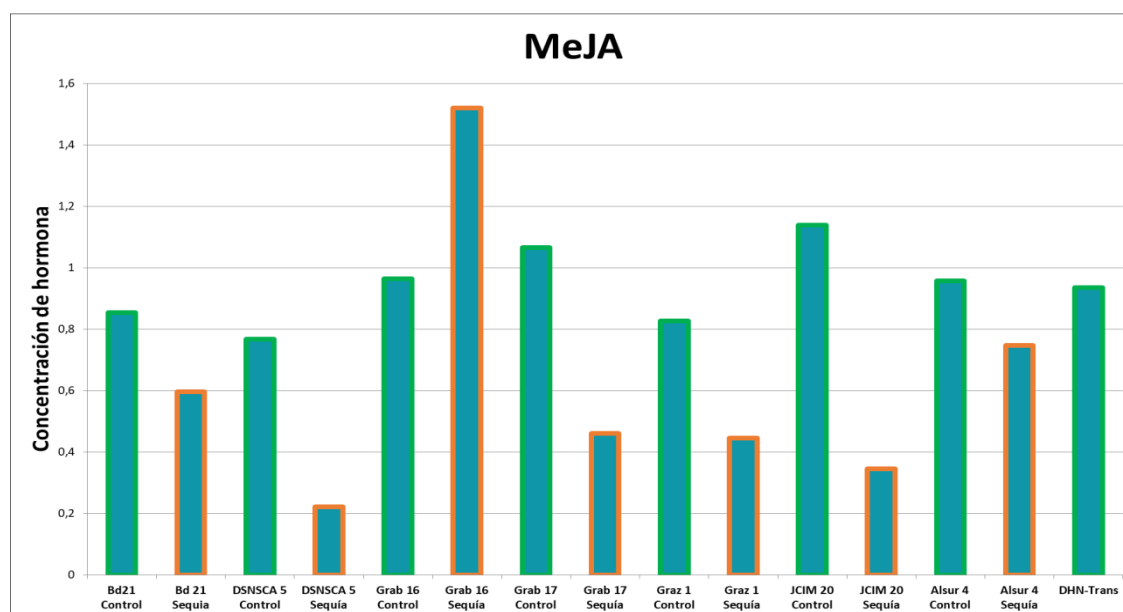
**Figura 11** . Representación gráfica de la concentración de la hormona ácido jasmónico (**JA**) en cada uno de los genotipos estudiados en su planta control y su planta sequía.

En el resto de genotipos está presente, pero a una considerable menor concentración, siendo GRAB 17 control el genotipo en el cual existe una concentración mínima. En Bd21 también podemos ver que en condiciones de falta de agua se produce un enorme descenso de la concentración de JA en la planta, esto puede deberse a que es una planta sensible a la sequía ya que se encuentra habitualmente en ambientes húmedos y JA es una hormona relacionada con condiciones de estrés abiótico. Esta tendencia ocurre también en DSNSCA 5, en GRAZ 1 y en ALSUR 4 aunque con una diferencia netamente menor. En contraposición, en el genotipo JCIM 20, el ácido

jasmónico aumenta en las plantas estresadas, este genotipo es resistente a sequía, por lo que este aumento puede deberse a que sea necesario una sequía más extrema para conseguir llegar en esta planta a la situación de estrés. GRAB 16 y GRAB 17 también aumenta su concentración pero de forma más leve que JCIM 20. La concentración de esta hormona en DHN-trans es significativamente menor que en Bd21 control.

-Ácido metil jasmónico (MeJA):

La planta control con mayor concentración de MeJA es JCIM 20, seguida de GRAB 16. La menor concentración se observa en DSNSCA 5. Destaca que todos los genotipos (control) tienen una concentración parecida de esta hormona (fig.12).



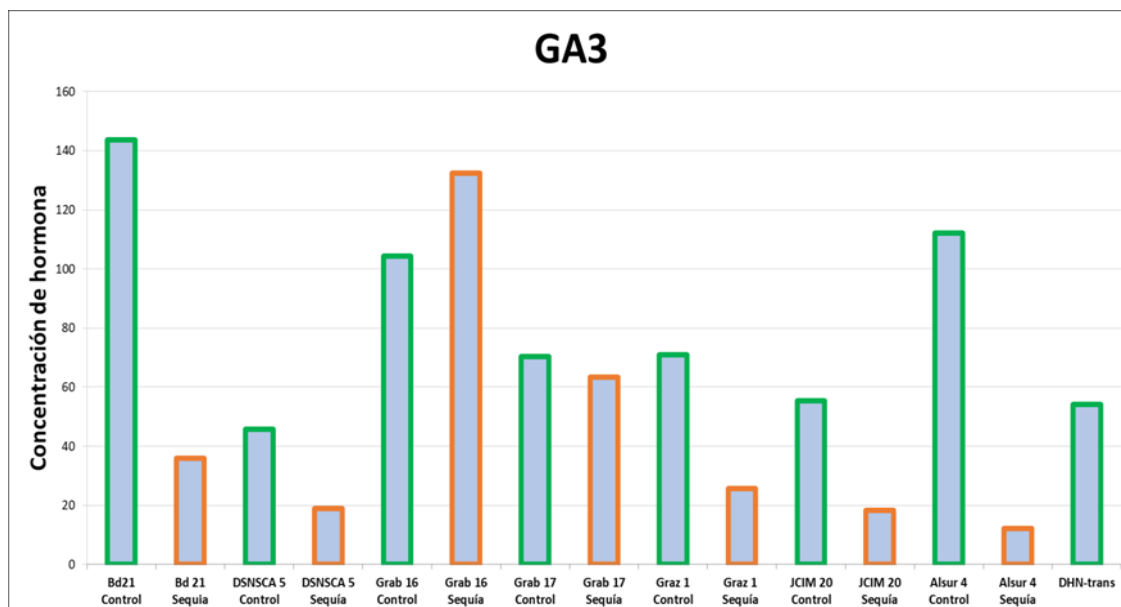
**Figura 12** . Representación gráfica de la concentración de la hormona ácido metiljasmónico (**MeJA**) en cada uno de los genotipos estudiados en su planta control y su planta sequía.

En cuanto al comportamiento de MeJA en las plantas sequía respecto a las control es similar en todas menos en GRAB 16, produciendo un descenso de la concentración en las plantas estresadas, destacando DSNSCA 5, JCIM 20 y GRAB 17 en las cuales el descenso es muy brusco. Tal y como se mencionó anteriormente, GRAB 16 tiene un comportamiento totalmente diferente al resto aumentando la concentración de MeJA significativamente en la planta con estrés hídrico. En cuanto a la concentración de DHN-trans es levemente superior a la observada en Bd21.

-Giberelinas (GA3):



Como se ve en la el gráfico de la figura 13 la planta control con más concentración de esta hormona es Bd21 (el genotipo control), seguido de ALSUR 4 y GRAB 16. Por el contrario, la línea genética con menor concentración de giberelinas es DSNSCA 5, seguida por DHN-trans y JCIM 20.

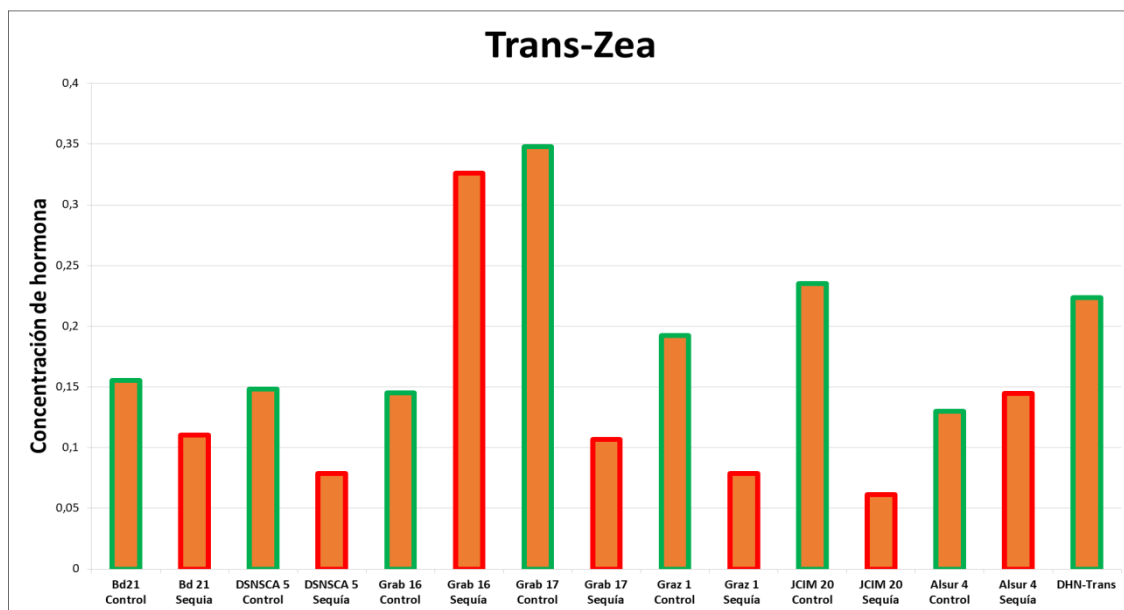


**Figura 13 .** Representación gráfica de la concentración de la hormona giberelina (**GA3**) en cada uno de los genotipos estudiados en su planta control y su planta sequía.

El mayor descenso de hormona tras el periodo de sequía se produce en ALSUR 4 y en Bd21. Destaca el comportamiento de esta hormona en GRAB 16 donde es el único genotipo en el cual aumenta su concentración en las plantas estresadas, esto podría ser debido a que este genotipo está adaptado a ambientes húmedos y esta hormona está implicada en una mejora en el uso eficiente de agua en un estrés por sequía. Las Giberelinas son hormonas implicadas en procesos como la germinación o la formación de flores y frutos en el momento de la reproducción pero no se relacionan en general con la sequía ni con ningún otro proceso de estrés. La concentración de esta hormona en DHN-trans es mucho menor que la presente en Bd21 control.

-Trans-Zeatina (Trans-Zea):

Esta hormona se encuentra a una mayor concentración en plantas control en el genotipo GRAB 17 y se encuentra menos presente en ALSUR 4, seguido muy de cerca por GRAB 16, DSNSCA 5 y Bd21 (fig. 14).

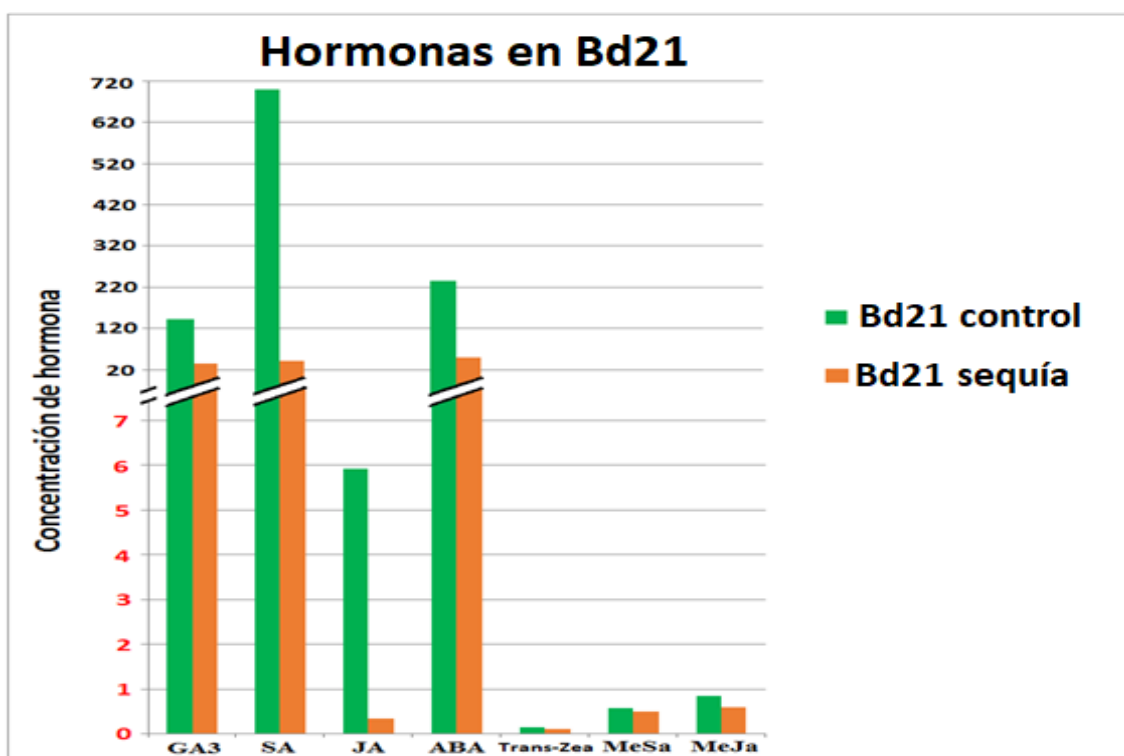


**Figura 14 .** Representación gráfica de la concentración de la hormona trans-zeatina (**Trans-Zea**) en cada uno de los genotipos estudiados en su planta control y su planta sequía.

El comportamiento de esta hormona es salvo en dos casos similar, observándose un descenso de su concentración en las plantas sequía y destacando con un disminución más notable en GRAB 17, JCIM 20 y GRAZ 1 (mayor descenso de la concentración que el ocurrido en Bd21). Los casos donde se produce un aumento de concentración de esta fitohormona es en ALSUR 4 donde aumenta ligeramente y sobre todo en GRAB 16, en el cual destaca el brusco aumento de concentración en la planta estresada respecto al control. La concentración de Trans-Zea del genotipo DHN-trans es mayor que la de Bd21.

Ahora se va a explicar el comportamiento hormonal en cada una de las líneas genéticas individualmente (tanto en su planta control como la sequía): El genotipo Bd21 (figura 15) considerado el control de nuestro experimento presenta, como se puede observar en el gráfico, un descenso de la concentración de la mayoría de las hormonas (SA, ABA, GA3, MeJA y JA) en condiciones de sequía con respecto de las plantas control. De algunas de estas hormonas está descrito en la bibliografía su importantísimo papel en la defensa de la planta cuando están sometidas a condiciones estresantes como puede ser la falta de agua. Las fitohormonas MeSA y Trans-Zea disminuyen su concentración pero mucho menos que las anteriores. Las hormonas que se

encuentran en mayor concentración en esta línea genética es SA seguido de ABA Destacar dentro de las mismas la concentración de SA y ABA.

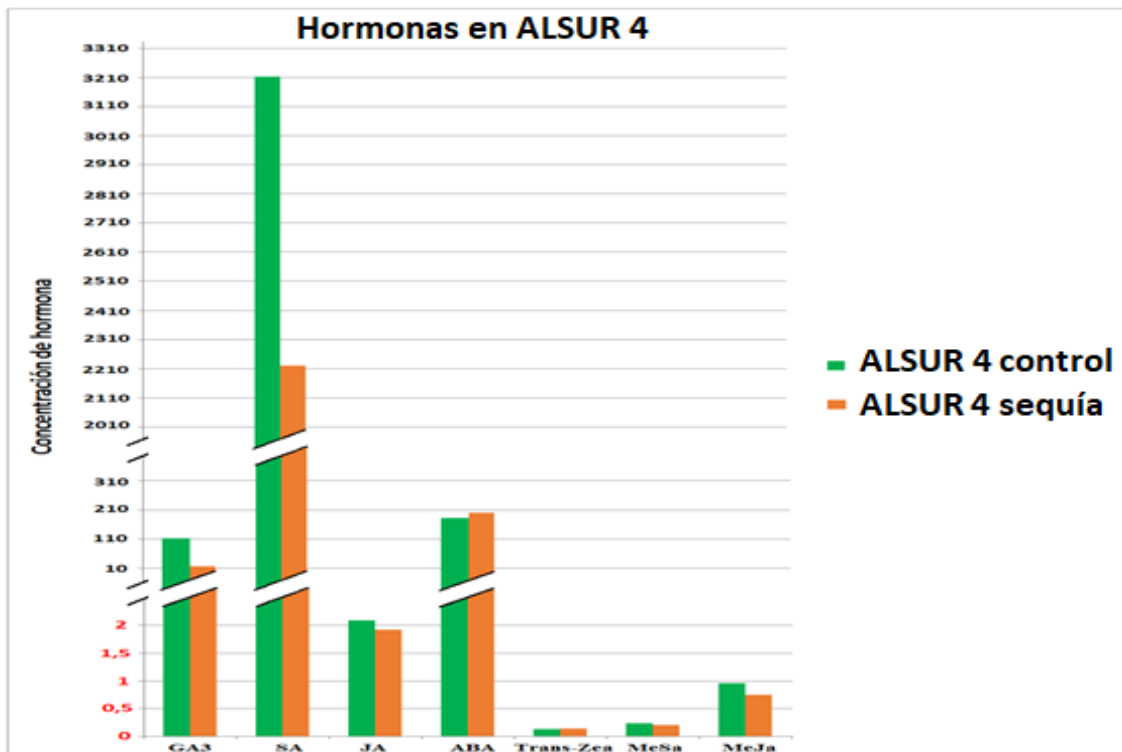


**Figura 15.** Comparación de la concentración de las distintas hormonas vegetales en la línea genética Bd21 en su planta control y sequía. El eje Y (concentración de hormona) tiene dos escalas (números rojos y negros) para poder visualizar mejor las hormonas con una concentración más pequeña.

Para hacer más fácil la interpretación de los datos se expone y comenta a continuación el comportamiento de todas las hormonas en conjunto en cada línea genética estudiada tanto en condiciones control como en condiciones de sequía:

-ALSUR 4:

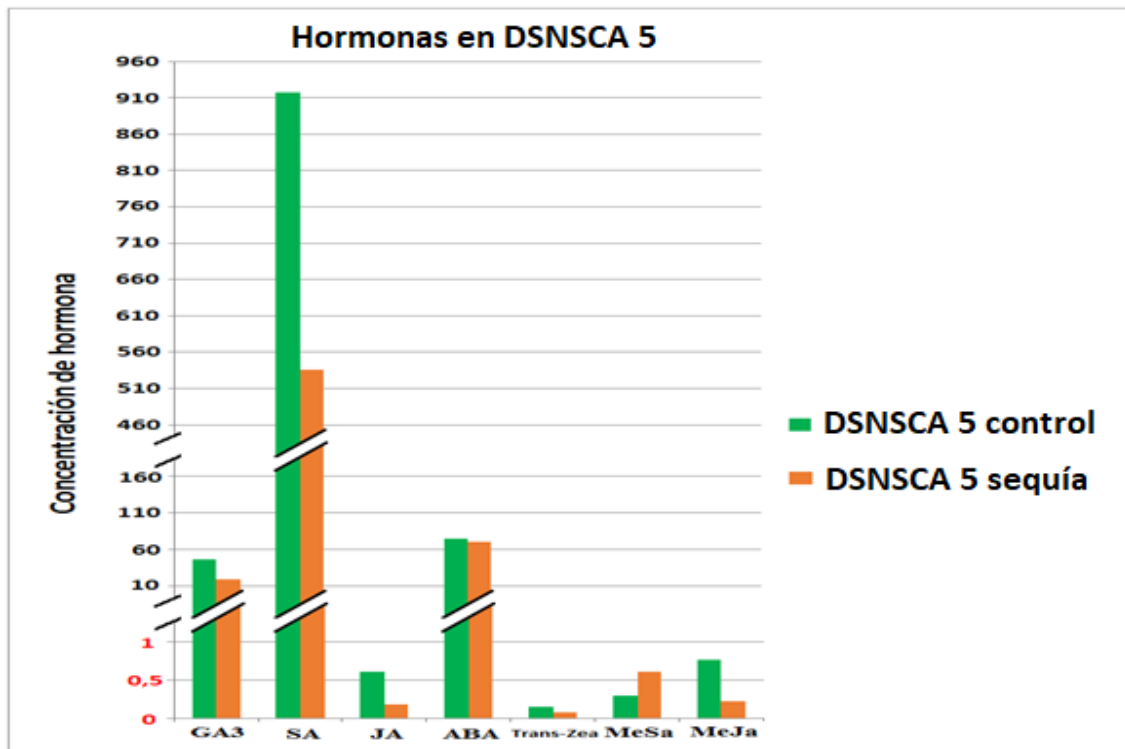
En la línea genética ALSUR 4, (fig. 16) la hormona predominante es el SA seguido de ABA y GA3, a continuación se encontrarían los jasmonatos JA y MeJA y por último el resto de las hormonas con concentraciones mucho menores. Destacar que la tendencia de todas las hormonas en condiciones de sequía con respecto al control es una ligera disminución por lo que podríamos sospechar que esta línea genética en concreto no parece haber sufrido un estrés considerable al someterla a falta de agua durante 10 días, posiblemente porque es una planta adaptada a climas áridos.



**Figura 16.** Comparación de la concentración de las distintas hormonas vegetales en la línea genética ALSUR 4 en su planta control y sequía. El eje Y (concentración de hormona) tiene dos escalas (números rojos y negros) para poder visualizar mejor las hormonas con una concentración más pequeña.

#### -DSNSCA 5:

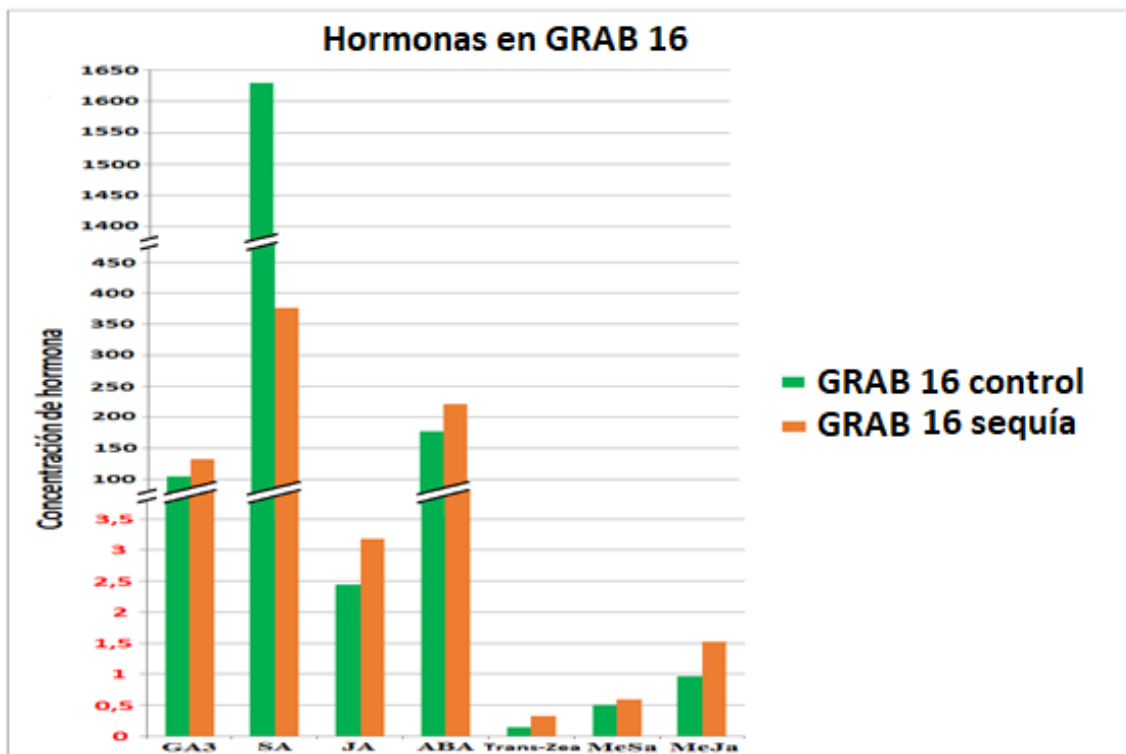
El caso DSNSCA 5 es similar al anterior aunque con ligeras diferencias. La tendencia general es que las hormonas en condiciones de estrés por sequía se ven afectadas por un descenso de su concentración, destacando SA, JA y MeJA (fig.17). Este comportamiento ocurre en todas las hormonas excepto en MeSA donde se puede observar un aumento de la misma. Esta línea genética está adaptada a condiciones de humedad y por lo tanto según estos resultados, donde disminuyen su concentración varias fitohormonas implicadas en las respuestas al estrés hídrico, la línea genética DSNSCA 5 se ha visto sometida a estrés tras el periodo de sequía.



**Figura 17.** Comparación de la concentración de las distintas hormonas vegetales en la línea genética DSNSCA 5 en su planta control y sequía. El eje Y (concentración de hormona) tiene dos escalas (números rojos y negros) para poder visualizar mejor las hormonas con una concentración más pequeña.

#### -GRAB 16:

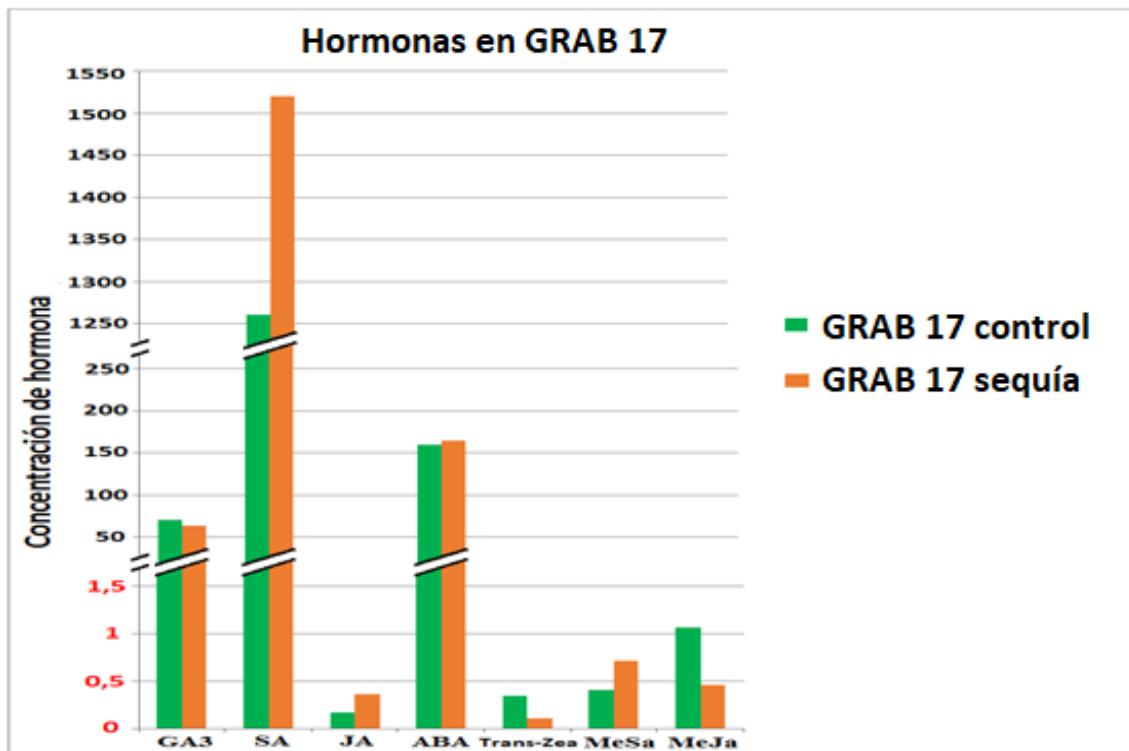
El caso de GRAB 16 es diferente a los anteriores, aumentando la concentración (en las plantas sometidas a sequía) de las hormonas GA3, JA, ABA, MeSA y MeJA y Trans-Zea (fig. 18). Pero con el ácido salicílico sí tienen un comportamiento similar ya que sufre un gran descenso en su concentración de la muestra de la planta estresada respecto al control. GRAB 16 es un genotipo que está adaptado a condiciones de humedad, y basándonos en los resultados obtenidos, esta línea, tras el periodo de sequía no parece haber sufrido un estrés considerable siendo necesaria una sequía de más tiempo para inducirle este estrés.



**Figura 18.** Comparación de la concentración de las distintas hormonas vegetales en la línea genética GRAB16 en su planta control y sequía. El eje Y (concentración de hormona) tiene dos escalas (números rojos y negros) para poder visualizar mejor las hormonas con una concentración más pequeña.

#### -GRAB 17:

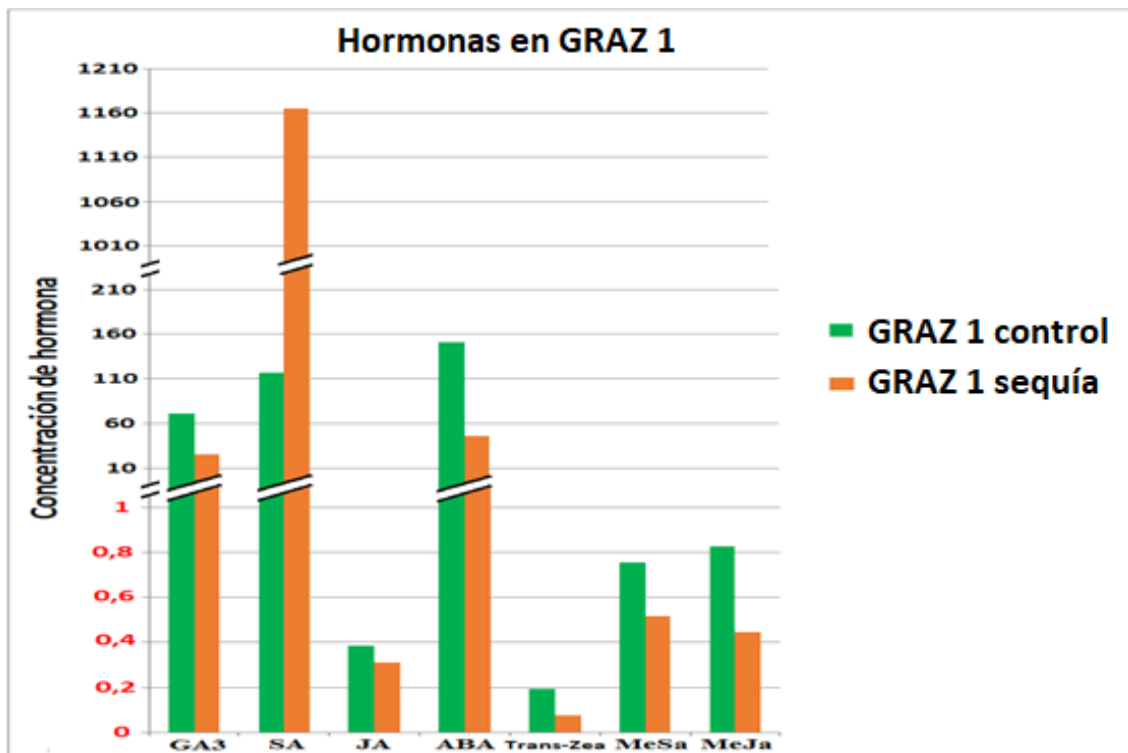
GRAB 17 tiene un comportamiento muy diferente a Bd21 en el comportamiento de las hormonas SA, JA, MeSA y ABA aumentando su concentración. MeJA y Trans-Zea en cambio disminuyen su concentración en las plantas con estrés hídrico (fig. 19). Este resultado es curioso ya que esta línea genética crece en lugares con alta humedad relativa y según los resultados obtenidos no parece presentar una situación de estrés considerable ya que hormonas como ABA, JA, MeSA y MeJA, le proporcionan mayor tolerancia frente a condiciones de déficit de agua, ya que el comportamiento de las hormonas mencionadas anteriormente debería de disminuir como es el caso de otras plantas sensibles a este estrés como Bd21 o DSN5CA 5.



**Figura 19.** Comparación de la concentración de las distintas hormonas vegetales en la línea genética GRAB 17 en su planta control y sequía. El eje Y (concentración de hormona) tiene dos escalas (números rojos y negros) para poder visualizar mejor las hormonas con una concentración más pequeña.

#### -GRAZ 1:

En el genotipo GRAZ 1 en las plantas sometidas a sequía hay una tendencia de disminución de concentración de todas las hormonas excepto de SA, donde destaca el brusco aumento de su concentración. MeSA y MeJA también tienen un comportamiento similar al del genotipo control descendiendo notablemente su concentración en las plantas estresadas (fig. 20). Es una línea genética que crece en lugares húmedos y es poco eficiente en el uso del agua pero observando los resultados obtenidos para la planta sometida al periodo de sequía encontramos que hormonas como SA, aumentan tras la inducción al estrés, confiriéndole a la planta una mejor capacidad para superar los efectos negativos provocados por dicho estrés.

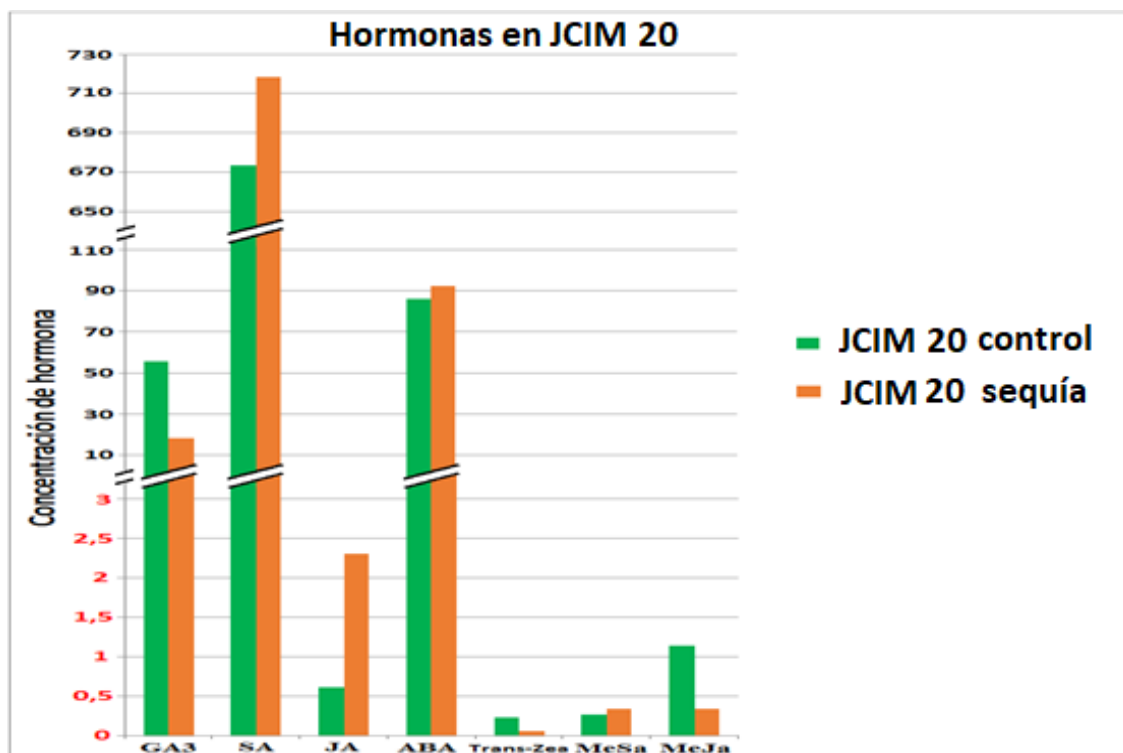


**Figura 20.** Comparación de la concentración de las distintas hormonas vegetales en la línea genética GRAZ 1 en su planta control y sequía. El eje Y (concentración de hormona) tiene dos escalas (números rojos y negros) para poder visualizar mejor las hormonas con una concentración más pequeña.

-JCIM 20:

En JCIM 20 destaca el aumento de las hormonas relacionadas con el estrés hídrico como SA, JA, ABA o MeSA, siendo la única excepción MeJA, la cual disminuye su concentración en la planta expuesta a sequía. La fitohormona Ga3 y Trans-Zea disminuyen también su concentración en las plantas sometidas a sequía (fig. 21). Estos resultados reflejan la resistencia de esta línea genética ante situaciones de sequía prolongada habitando normalmente en climas áridos y por lo tanto para que sufra una situación de estrés notable habría que someterla a una sequía más intensa.





**Figura 21.** Comparación de la concentración de las distintas hormonas vegetales en la línea genética JCIM 20 en su planta control y sequía. El eje Y (concentración de hormona) tiene dos escalas (números rojos y negros) para poder visualizar mejor las hormonas con una concentración más pequeña.

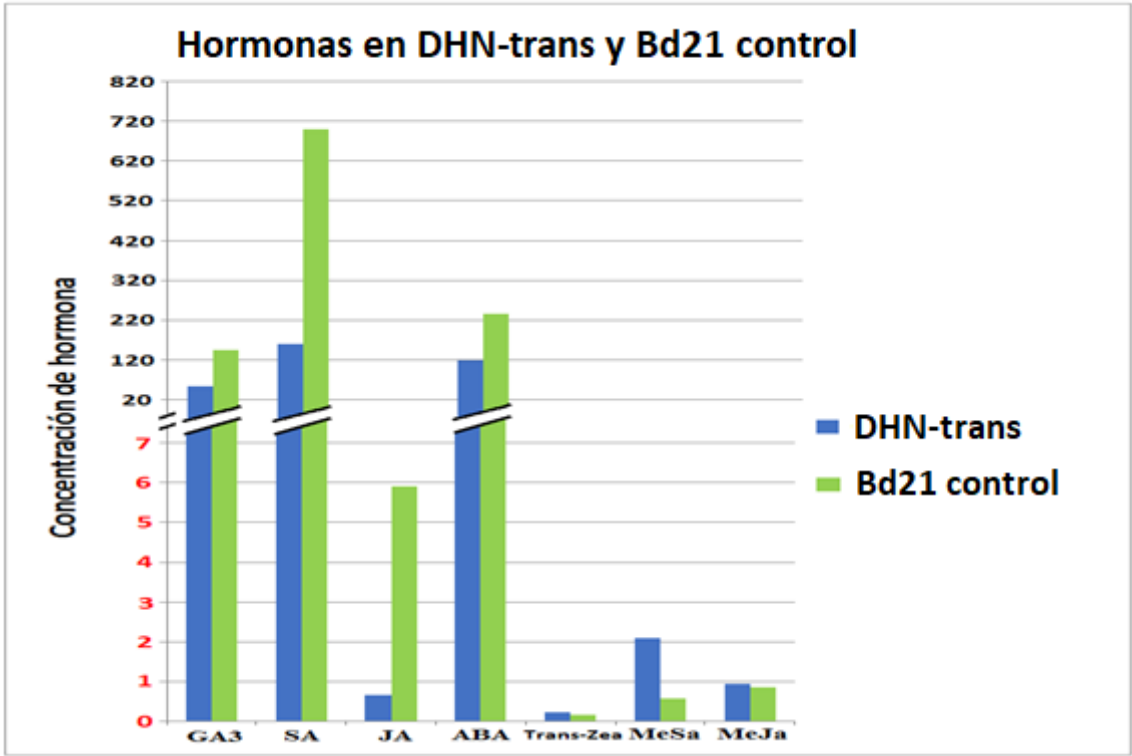
-DHN-trans:

En el gráfico de la figura 22 se representa la concentración de las hormonas estudiadas en el genotipo DHN-trans control, ya que este como se explicó en material y métodos no se hizo un estudio de DHN-trans sequía. Al ser una línea genética originada por la modificación de Bd 21, en el gráfico se representa también la concentración de hormonas en Bd 21 control para conocer así el cambio en el comportamiento hormonal en este genotipo transgénico.

En DHN-trans la hormona más abundante es el ácido salicílico, seguido de ABA y GA3, el resto de hormonas se encuentran a una concentración mucho menor, destacando Trans-Zea.

Comparando las dos líneas genéticas destaca la gran disminución de concentración de las hormonas SA, JA, ABA y GA3 en el genotipo DHN-trans respecto a Bd21. Y por el contrario, también destaca el aumento de concentración significativo de MeSA. Estos cambios pueden deberse a que los cambios genéticos realizados para originar DHN-trans han sido orientados a

conferirle una elevada resistencia a la sequía y un mejor aprovechamiento del agua, por ello las hormonas que más se han visto alteradas entre una línea y otra han sido ABA, SA, JA o MeJA que son fitohormonas que según la bibliografía tienen un papel importante en la tolerancia frente al estrés hídrico.



**Figura 22.** Comparación de la concentración de las distintas hormonas vegetales en la línea genética DHN-trans respecto a Bd21. El eje Y (concentración de hormona) tiene dos escalas (números rojos y negros) para poder visualizar mejor las hormonas con una concentración más pequeña.

## 6. DISCUSIÓN

Como se ha visto en los resultados, *Brachypodium distachyon* es una especie de gramínea bastante resistente a la sequía, ya que en algunos de los genotipos utilizados no hay aumento de las hormonas implicadas en el estrés cuando se someten a ausencia total de agua durante 10 días. Dichos genotipos son ALSUR 4, DSNSCA 5 y Bd21, observándose una disminución de SA, ABA, GA3, JA y MeJA. Esto puede deberse a que no fue suficiente el número de días que las plantas fueron privadas de agua y quizás en experimentos posteriores habría que aumentar este tiempo para observar resultados más contundentes. GRAB 16 mostró un ligero aumento de ABA, GA3, JA y MeJA en condiciones de sequía pero disminuyó SA. En el caso de GRAZ 1 aumentó enormemente el SA durante el proceso de sequía pero ABA, GA3, MeSA, JA y MeJA disminuyeron ligeramente. Los genotipos en los que se observó aumento de la mayoría de las hormonas en condiciones de estrés fueron GRAB 17, donde el SA aumentó en más de un 33% y en menor medida lo hicieron ABA, JA y MeSA. Por último, JCIM 20 experimentó un aumento de ABA y SA, y especialmente de JA (casi 5 veces más respecto al control).

GA3 no se considera hasta la fecha una hormona especialmente implicada en la respuesta frente al estrés, sin embargo, SA, y su derivado MeSA y ABA, así como JA y MeJA en menor medida, son reguladores de la tolerancia frente a estreses abióticos y bióticos. Existen multitud de trabajos que corroboran esta afirmación. En el caso del SA, está descrito que desempeña un papel primordial en la conductancia y transpiración estomáticas (Khan et al., 2003; Arfan et al., 2007), aumentando la capacidad frente a estrés oxidativo (Xu et al., 2008), regulando la actividad de algunas enzimas antioxidantes (He et al., 2002; Erasalan et al., 2007) e inhibiendo la acumulación de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, dos iones directamente implicados en el control osmótico de la planta (Gunes et al., 2007). En plantas de *Salvia officinalis* L. se comprobó el efecto de SA en estrés por sequía, aumentando su concentración en un 80% respecto al control en la primera etapa de déficit hídrico y promoviendo la aceleración en la senescencia de las hojas (proceso fisiológico que favorece a la removilización de nutrientes durante el estrés) (Abreu, M.E. & Munne-Bosch, S., 2007). También se vio una disminución en paralelo de un

40% de JA durante el estrés. Esto mismo nos ocurre en nuestro trabajo en GRAB 17, GRAZ 1. En el resto de los genotipos el comportamiento es diferente, como se ha mencionado anteriormente. Una de las estrategias a seguir para una mejor tolerancia a la sequía es la aplicación exógena de SA, (Jesús et., al, 2015). En este trabajo, realizado sobre *Eucalyptus globulus*, los autores ensayaron un pretratamiento usando altas concentraciones de SA el cual mejoro considerablemente los efectos negativos provocados por el estrés. De forma similar, Farooq et al. (2009) realizaron un tratamiento con SA sobre semillas de arroz Basmati antes de su germinación. Posteriormente se hizo un segundo tratamiento foliar de SA a las mismas plantas de arroz, que mostraron ser muy resistentes a la sequía.

Hemos de destacar que MeSA, que tiene un comportamiento bastante uniforme en todas las líneas genéticas, aumenta más de 3.6 veces respecto a Bd21 en DHN-trans. Curiosamente, la concentración de SA en la planta transgénica es mínima, siendo más de 4.4 veces menor que en Bd21. Esto nos invita a pensar que quizás la inserción del gen DHN-3 en esta planta haya repercutido también en el tipo de hormonas que abundan más dentro de la misma o que haya afectado al metabolismo general de la planta en cuanto a la síntesis y transformación de unas hormonas en otras que son estructuralmente análogas. Esto ocurre de forma menos acentuada en el caso de JA, siendo su concentración en DHN-trans de 8.95 veces menor respecto a Bd21.

Respecto a otras hormonas, Zhanga C. & Huang Z. (2013) afirmaron que una aplicación exógena de ABA y JA sobre plántulas de tomate produce una mejor adaptación de éstas frente al estrés por sequía. En nuestros genotipos GRAB 16, GRAB 17 y JCIM 20 se corrobora este comportamiento. Resulta curioso ver que en los genotipos restantes, Bd21, ALSUR 4, DSNCA 5 y GRAZ 1, disminuyen las concentraciones de ABA y JA, y en varios de estos se puede observar un aumento enorme de SA. Se sabe que las hormonas vegetales no trabajan de manera individual sino que hay una interacción ya sea positiva o negativa entre ellas (De Ollas et al., 2012). Estos autores demostraron que bajo estrés por sequía una acumulación de JA contribuía al incremento progresivo de la fitohormona ABA en las raíces de cítricos, induciendo así una mejor respuesta de la planta frente a este estrés. Kadioglu et al. (2010) sometieron plantas a 38 días de sequía separadas en dos grupos:

unas tratadas con SA (10-6 M) los días 25, 27 y 29 del período y otro grupo no tratado. Este tratamiento aumentó la tolerancia a la sequía, retrasando el enrollamiento de hojas e induciendo todas las enzimas antioxidantes. El largo periodo de sequía al que fueron sometidas las muestras en este trabajo nos hace reafirmarnos que en nuestro experimento sería conveniente aumentar el número de días de sequía para observar resultados más drásticos.

En cuanto a la fitohormona ABA, su concentración aumenta en GRAB 16, ALSUR 4 y en menor proporción en GRAB 17 Y JCIM 20. Es conocido su papel como hormona señal y regulador universal en las respuestas desencadenadas en las plantas frente a cualquier tipo de estrés. Atkinson & Urwin (2012) concluyeron que ABA actúa como un regulador positivo en la señalización de JA y suprime las respuestas de SA. Otro estudio realizado en plantas de arroz (Kim et al., 2009) observó que un aumento en la concentración de MeJA estimulaba la síntesis de ABA; los resultados de ambos estudios se cumplen en los obtenidos en nuestro trabajo para el genotipo GRAB 16, donde se produjo un aumento de ABA a la misma vez que aumentaba JA y su derivado MeJA pero disminuía la concentración de SA, por lo que se podría pensar que ambas hormonas cooperan conjuntamente en la planta bajo un estrés por déficit hídrico. Por el contrario, en Bd21 y GRAZ 1 encontramos una caída muy brusca en su concentración, siendo este último, en el que encontramos en las plantas sequía una concentración más baja de la misma. Destaca en el genotipo GRAZ 1 que la bajada en la concentración de ABA va acompañada de un aumento de hasta 9 veces en la concentración de SA con respecto a su control, motivo por el cuál la planta no necesitaría la síntesis de la hormona ABA durante la sequía. Para el resto de líneas, esta hormona presenta fluctuaciones respecto a su concentración.

Otra de las hormonas con mayor implicación en un estrés por falta de agua según la bibliografía es el ácido jasmónico (Burgess & Huang, 2016), en este estudio se produjo un descenso en la concentración de JA en GRAB 17, GRAZ 1, DSNCSA 5 y Bd21, siendo mayor la caída en las dos últimas, casi 3,5 veces en DSNCSA 5 y 17 veces en Bd21, este brusco descenso es debido a que estas dos líneas genéticas son las más sensibles a la sequía y tras este periodo se han visto en una situación de estrés extremo en el cual como se ha visto en la comparación de todas las hormonas en cada línea, hay un descenso

generalizado de prácticamente todas las hormonas. Mientras que en los genotipos GRAB 16 y JCIM 20 esta hormona experimentó un incremento en su concentración, siendo más acentuado en JCIM 20, en la que su aumento fue de hasta 4 veces; estudios como el de (Hassanein et al., 2009) reflejan que un tratamiento en plantas de soja que implicaba un aumento en los niveles de JA mejoró significativamente los efectos provocados por el estrés hídrico en dichas plantas, por lo que el resultado obtenido en nuestro estudio para JCIM 20 puede significar que la planta produce mayor concentración de JA ante el estrés para disminuir los efectos negativos producidos por la sequía, provocando que esta línea genética sea muy resistente a este tipo de estrés.

Por último, respecto al comportamiento de la hormona MeJA, la cual solo experimentó un aumento de 1.6 veces en GRAB 16. Esta línea genética presenta sensibilidad al estrés hídrico lo que explicaría no solo el aumento de esta fitohormona sino también el de otras hormonas con relación directa con dicho estrés, las cuales le van a conferir una mejor tolerancia a la falta de agua, distintos estudios comparten esta relación de retroalimentación positiva entre distintas hormonas como es el realizado por Kim et al. (2009) , que observó que tras la exposición a estrés por sequía, éstas empezaban a producir endógenamente la fitohormona MeJA , la cual a su vez estimulaba la síntesis de ABA, sugiriendo que ABA trabaja de forma conjunta con JA, favoreciendo la tolerancia y la adaptación de las plantas en condiciones de déficit hídrico.

En contraposición, en el resto de genotipos, JA tiene una tendencia de bajada, siendo este descenso más evidente en JCIM 20, con una caída de 3.29 veces y en DSNSCA 5, con una disminución de casi 3.5 veces. La explicación para estos resultados, es que en el caso de JCIM 20 se produce un aumento de las hormonas SA, ABA, MeSA y JA, las cuales le proporcionan ya una protección frente al estrés por sequía, de manera que la planta no necesita la síntesis de la hormona MeJA para mejorar su tolerancia frente a la misma. Sin embargo, en el caso de DSNSCA 5, se produce no solo una disminución en la concentración de esta hormona sino también en todas las demás, lo que nos lleva a pensar que al ser este genotipo uno de los más sensibles a la sequía, la planta se encuentra en una situación de estrés extremo, interfiriendo en el buen funcionamiento y desarrollo de la misma, provocando este descenso tan evidente de todas las fitohormonas estudiadas.

## 7. CONCLUSIONES

Tras este estudio hormonal realizado en diferentes líneas genéticas de *Brachypodium distachyon* sometidas a condiciones de sequía podemos concluir lo siguiente:

1. Las hormonas más abundantes para todas las líneas genéticas tanto en condiciones control como en plantas estresadas fueron, en orden decreciente SA, seguida muy por debajo, en concreto hasta 15.23 veces menor, de ABA, y GA3, 29 veces menos concentrada que SA. Las hormonas menos abundantes fueron Trans zeatina, en concentraciones de hasta 4600 veces menores que SA, seguida de MeJA y MeSA.

2. En condiciones de estrés por sequía, SA aumentó en GRAZ 1 (10 veces más), GRAB 17 (1.2 veces), genotipos adaptados a ambientes húmedos y también en JCIM (1.06 veces más). ABA y JA aumentaron en GRAB 16, GRAB 17 y JCIM 20 en cantidades menores. En el resto de los genotipos estas dos hormonas disminuyeron con la sequía. GA3 permaneció invariable en todas las líneas genéticas. Señalar que el resto de las hormonas experimentaron fluctuaciones menores como es el caso de los derivados de SA y JA. Trans-zeatina fue la hormona menos abundante con concentraciones de hasta 46000 veces menores que SA.

3. Se encontró el mayor aumento de MeSA (3.6 veces más) en DHN-trans con respecto al resto genotipos y en concreto con la línea genética control Bd21, siendo además en esta, la segunda línea genética con concentraciones de SA más bajas, con una disminución de hasta más de 4 veces con respecto a Bd21.

4. El genotipo GRAB 16 es el que mayor tolerancia a la sequía presenta, produciéndose un aumento de las hormonas JA, ABA, MeSA y MeJA en la planta sequia con respecto a su planta control, siendo la línea genética con mayor concentración de la hormona MeJA en condiciones de sequía.

5. Los resultados fluctuantes en las concentraciones hormonales de plantas controles con respecto a plantas problema nos hacen pensar que habría que aumentar el tiempo de exposición a la falta de agua al repetir los experimentos en esta especie, con el fin de observar resultados más contundentes con una tendencia más firme en algún sentido.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, M.E., Munné-Bosch, S. (2008). Salicylic acid may be involved in the regulation of drought-induced leaf senescence in perennials: A case study in field-grown *Salvia officinalis* L. plants. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 64, 105–112.
- Abualia, R., Benkova, E., Lacombe, B. (2018). Chapter Five - Transporters and Mechanisms of Hormone Transport in Arabidopsis. *Advances in Botanical Research*. Vol. 87, 115-138
- Aral, H., Aral, T., Ziyadanoğullari, B. y Ziyadanoğullari, R. (2013). Development of a novel amide-silica stationary phase for the reversed-phase HPLC separation of different classes of phytohormones. *Talanta*, Vol. 116, 155-163
- Arbona, V. y Gómez-Cadenas, A. (2008). Hormonal modulation of citrus responses to flooding. *J. Plant Growth Regul.* Vol. 27, 241-250.
- Arbona, V., Iglesias, D.J., Jacas, J., Primo-Millo, E., Talón, M. y Gómez-Cadenas, A. (2005). Hydrogel substrate amendment alleviates drought effects on young citrus plants. *Plant Soil*. Vol. 270, 73-82.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal (2<sup>nd</sup> ed.) 651pp..
- Bakshi, P., Handa, N., Gautam, V., Kaur, P., Sareen, S., Mir, B. y Bhardwaj, R. (2019). Chapter 19 - Role and Regulation of Plant Hormones as a Signal Molecule in Response to Abiotic Stresses. *Plant Signaling Molecules. Role and Regulation Under Stressful Environments*, 303-317.
- Bhattacharya, A. (2019). Chapter 6 - Effect of High-Temperature Stress on the Metabolism of Plant Growth Regulators. *Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules*, 485-591.
- Burgess P. y Huang B. (2016). Mechanisms of hormone regulation for drought tolerance in plants. *Drought stress tolerance in plants*.
- Cañadilla, M.F. (2019). Aproximación experimental de simulación de cambio climático.
- Catalán, P., Muller, J., Hasterok, R., Jenkins, G.L. y Mur, L.A. (2012). Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Ann Bot.* Vol. 109, 385-405.
- Chávez Suárez, L., Álvarez Fonseca, A., y Ramírez Fernández, R. (2012). Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. *Cultivos Tropicales*, Vol. 33(3), 47-56.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., y Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior*, Vol. 4(6), 493-496.
- Clouse, S.D. (2003). *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 1026-1035.
- Creelman, R.A. y Mullet, J.E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Vol. 48, 355-381.
- De Ollas, C., Hernando, B., Arbona, V. y Gómez-Cadenas, A. (2012). Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia Plantarum*. Vol. 147, 296–306.
- Dzhavakhiya, V.G., Ozeretskovskaya, O.L. y Zinovyeva, S.V. (2007). Chapter 10 - Immune response. *Comprehensive and Molecular Phytopathology. Studies in Plant Science*, 265-314.



- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., Alpaslan, M. (2007). Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Sci. Hortic.* Vol. 113, 120–128.
- Farmer, E.E., Almeras, E. y Krishnamurthy, V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 6, 372-378.
- Farooq, M., Basra, S.M.A. , Wahid, A., Ahmad, N. y Saleem, B.A. (2009). Improving the Drought Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) by Exogenous Application of Salicylic Acid. *J. Agronomy & Crop Science*.
- Fosket, D.E. (1994). 6 - Light, Hormones, and Cell Signaling Pathways. *Plant Growth and Development*, 271-340.
- Gangwar, S., Pratap, V., Durgesh, S., Tripathi, K., Chauhan, D.K., Prasad, S.M. y Maurya, J.N. (2014). Chapter 10 - Plant Responses to Metal Stress: The Emerging Role of Plant Growth Hormones in Toxicity Alleviation. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*, Vol. 2.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E.G., Cicek, N. (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J. Plant Physiol.* Vol. 164, 728–736.
- Hammami, R., Jouve, N., Cuadrado, A., Soler, C. y González J.M. (2011). Prolamin storage proteins and allopolyploidy in wild populations of the small grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. *Plant Syst. Evol.* Vol. 297(1–2), 99–111.
- Hassanein, R.A., Hassanein, A.A., El-din, A.B., Salama, M. y Hashem, H.A. (2009). Role of Jasmonic Acid and Abscissic Acid Treatments in Alleviating the Adverse Effects of Drought Stress and Regulating Trypsin Inhibitor Production in Soybean Plant. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, Vol. 3(2), 904-919.
- Hasterok, R., Dulawa, J., Jenkins, G., Leggett, M. y Langdon, T. (2006a). Multi-substrate chromosome preparations for high throughput comparative FISH. *BMC Biotechnol.* Vol. 6, 20.
- Hasterok, R., Marasek, A., Donnison, I.S., Armstead, I., Thomas, A., King, I.P., Wolny, E., Idziak, D., Draper, J. y Jenkins, G. (2006b). Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence in situ hybridization. *Genetics*. Vol. 173, 349–362.
- He, Y.L., Liu, Y.L., Chen, Q., Bian, A.H. (2002). Thermotolerance related to antioxidation induced by salicylic acid and heat hardening in tall fescue seedlings. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* Vol.28, 89–95.
- Huang, C., Wang, D., Sun, L. & Wei, L. (2016). Effects of exogenous salicylic acid on the physiological characteristics of *Dendrobium officinale* under chilling stress. *Plant Growth Regul.* Vol. 79, 199-208
- Hurtado, E. (2018). Medición de hormonas vegetales mediante HPLC-masas triple cuadrupolo (HPLC-MS QqQ) en extractos de plantas sometidas a estrés por daño mecánico.
- Izumi, Y., Okazawa, A., Bamba, T., Kobayashi, A., & Fukusaki, E. (2009). Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 648, 215-225.
- Jesús, C., Meijónb, M., Monteiro, P., Correia , B., Amaral, J., Escandón, M., Cañal, M.J.,

- Pinto, G. (2015). Salicylic acid application modulates physiological and hormonal changes in *Eucalyptus globulus* under water deficit. *Environmental and Experimental Botany*. Vol. 118, Pages 56-66.
- Jiang, C., Dai, J., Han, H., Wang, C., Zhu, L. y Lu, C. (2020). Determination of thirteen acidic phytohormones and their analogues in tea (*Camellia sinensis*) leaves using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Hongping Chen, Journal of Chromatography* . Vol. 1149, 122144.
- Jini, D y Baby, J. (2019). Chapter 31 - Use of Phytohormones in Improving Abiotic Stress Tolerance to Rice. *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance*, 633-649.
- Jordán, M. y Casaretto, J. (2006a). Capítulo XV- Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.). Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile, 16.
- Jordán, M. & Casaretto, J. (2006b). Capítulo XVI- Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasiñoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. *Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.). Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile, 16.
- Junta de Andalucía (2016). Características de la gramínea *Brachypodium distachyon* como cubierta vegetal.
- Kadioglu, A., Saruhan, N., Sağlam, A., Terzi, R. y Acet, T. (2010). Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system. *Plant Growth Regul.* Vol. 64, 27–37.
- Khan, W., Prithviraj, B., Smith, D.L. (2003). Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *J. Plant Physiol.* Vol. 160, 485–492.
- Kim, E.H., Park, S.H. y Kim, J.K. (2009). Methyl jasmonate triggers loss of grain yield under drought stress. *Plant Signaling & Behavior*, Vol. 4(4), 348-349.
- Leung, J. y Giraudat, J. (1998). Absciscic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Vol. 49, 199-222.
- Liu, Y., Fang, X., Chen, G., Ye, Y., Xu, J., Ouyang, G., Zhu, F. (2019). Recent development in sample preparation techniques for plant hormone analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 113, 224-233.
- López, G.P. (2014). Análisis de caracteres agromorfológicos y moleculares en el proceso de domesticación de poblaciones silvestres de *Brachypodium* spp. Para su uso como cubiertas vegetales.
- Madani, B., Mirshekari, A. y Imahori, Y. (2019). Chapter 19 - Physiological Responses to Stress. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Vol. 20, 405-423.
- Manzaneda, A.J., Rey, P.J. y Alcántara, J.M. (2015). Selección natural y significado adaptativo de genes candidatos asociados a la tolerancia al estrés hídrico en *Brachypodium distachyon* (Poaceae).
- Marín, A.R. (2014). Cuantificación de giberelina A4 y trans Zeatina Ribosido y su relación en la diferenciación sexual del Sotol (*Dasyllirion Cedrosanum* Trel.).
- Miransari, M. (2016). Environmental Stresses in Soybean Production. *Soybean Production*. Vol. 2., 31-156

- Moreno, F. (2009) Plant responses to water deficit stress. A review. *Agron. Colomb.* Vol. 27, 179-191
- Nilsen, E.T. y Orcutt, D.M. (1996). Physiology of plants under stress. Abiotic factors.
- Opanowicz, M., Vain, P., Draper, J., Parker, D. y Doonan, J. H. (2008). *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends Plant Sci.* Vol. 13, 172-177.
- Ozdemir, B.S., Hernandez, P., Filiz, E. y Budak, H. (2008). Review Article: *Brachypodium* Genomics. *International Journal of Plant Genomics.* Vol. 2008, 536104-536111.
- Pan, X., Welti, R., y Wang, X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nature protocols*, Vol. 5(6), 986.
- Peng, J. y Harberd, N.P. (2002). The role of GA-mediated signaling in the control of seed germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* Vol.5, 376-381.
- Pitarch, M. (2013). Efecto del estrés abiótico sobre la fisiología y regulación hormonal en citrange Carrizo.
- Roger, H. (2014). Chapter 7 - Replication of Plant Viruses. *Plant Virology* (5<sup>a</sup> ed.), 341-421.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology.* Vol. 57, 431-449.
- Seneca (2007). CHAPTER 2 - Alkaloid Chemistry, Seneca, Alkaloids - Secrets of Life Alkaloid Chemistry. Biological Significance. Applications and Ecological Role, 61-139.
- Singla, J. y Krattinger, S.G. (2016). Biotic Stress Resistance Genes in Wheat. *Encyclopedia of Food Grains* (Second Edition). Vol. 4, 388-392.
- Srivastava, L. (2002). Plant growth and development: hormones and environment. Academic Press Elsevier science. London, 772 pp.
- Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J.J., Corcuera, L., Sisó, S. y Gil-Pelegrín, E. (2004). CAPÍTULO 6 Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía , *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*, 163-190.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany.* Vol. 100, 681-697.
- Xu, Q., Xu, X., Zhao, Y., Jiao, K., Herbert, J.S., Hao, L. (2008). Salicylic acid, hydrogen peroxide and calcium-induced salinity tolerance associated with endogenous hydrogen peroxide homeostasis in naked oat seedlings. *Plant Growth Regul.* Vol. 54, 249–259.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science.* Vol. 10, 88-94.
- Zhang, C. y Huang, Z. (2013). Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress. *Scientia Horticulturae*, Vol. 159, Pages 172-177.
- Zeevaart, J.A.D. (2003). Regulators of growth, Absciscic Acid. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 995-999.