



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Medición de hormonas
vegetales mediante HPLC-
masas triple cuadrupolo
(HPLC-MS QqQ) en
extractos de plantas
sometidas a estrés por
daño mecánico**

Alumno: Ester Hurtado Fernández

Julio, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Medición de hormonas
vegetales mediante HPLC-
masas triple cuadrupolo
(HPLC-MS QqQ) en
extractos de plantas
sometidas a estrés por
daño mecánico**

Alumno: Ester Hurtado Fernández

Julio, 2018

ÍNDICE

Resumen / Abstract	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Características y tipología de las hormonas vegetales	6
1.2. Métodos de medida de hormonas vegetales	10
1.3. Estrés en plantas	11
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. Introducción de los patrones en el HPLC-MS QqQ y condiciones de trabajo	14
3.1.1. Condiciones de trabajo para la solución de trabajo de hormonas verdaderas	17
3.2. Rectas de calibrado	19
3.3. Preparación de muestras vegetales	20
3.4. Inducción del estrés mecánico	21
3.5. Obtención de extractos vegetales	22
3.6. <i>Software</i> para el análisis de los resultados	23
3.7. Análisis estadístico	24
4. RESULTADOS	24
4.1. Patrones internos del HPLC-MS QqQ y de la mezcla de hormonas verdaderas	24
4.2. Rectas de calibrado	29

4.3. Medida de hormonas en los extractos de tomate sometidos a estrés mecánico	31
5. DISCUSIÓN	36
6. CONCLUSIONES	42
7. BIBLIOGRAFÍA	43

Resumen

Las plantas están sometidas continuamente a diversos tipos de estreses, tanto bióticos como abióticos, lo cual les afecta notablemente a su crecimiento y desarrollo, y con ello a las oscilaciones en el contenido de sus hormonas. Este estudio se centra en la puesta a punto de la medición de nueve fitohormonas principales. Para ello, se ha utilizado la técnica cuantitativa HPLC-espectrometría de masas de triple cuadrupolo usando los aparatos localizados en el GSYA de los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén. Una vez puesta a punto dicha técnica, ha sido posible cuantificar la concentración de estas nueve hormonas en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) sometidas a daño mecánico por heridas. Tras la inducción del estrés en las plantas, por punzamiento del tallo, se recogieron muestras a los 0, 15 y 30 minutos; y a las 1, 2, 4 y 6 horas. Finalmente se hizo un análisis del comportamiento de cada una de estas hormonas y las fluctuaciones que producen a lo largo del periodo de tiempo detallado.

PALABRAS CLAVE: estrés abiótico, daño mecánico, heridas, fitohormonas, espectrometría de masas, HPLC triple cuadrupolo, comportamiento hormonal.

Abstract

Plants are continually subjected to various types of stress, both biotic and abiotic, which greatly affect their growth and development, and thus the oscillations in the content of their hormones. This study focuses on the development of the measurement of nine main phytohormones. To do this, the HPLC-triple quadrupole mass spectrometry technique was used using the devices located in the GSYA of the Technical Services of the University of Jaén. Once this technique has been perfected, it has been possible to quantify the concentration of these nine hormones in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants subjected to mechanical damage by wounds. After stress induction in the plants, by puncture of the stem, samples were collected at 0, 15 and 30 minutes; and at 1, 2, 4 and 6 hours. Finally, an analysis was made of the behavior of each of these hormones and the fluctuations that they produce throughout the detailed time period.

KEY WORDS: abiotic stress, mechanical damage, wounds, phytohormones, mass spectrometry, triple quadrupole HPLC, hormonal behavior.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características y tipología de las hormonas vegetales

Una hormona vegetal se define como un compuesto orgánico que se sintetiza en una parte de la planta y que se transporta hasta otra diferente donde, en concentraciones muy bajas (entre 10^{-9} y 10^{-6} M), causa una respuesta fisiológica relacionada casi siempre, aunque no de modo exclusivo con los procesos de crecimiento y diferenciación (Izumi *et al.*, 2009). Habitualmente, se utiliza el término de reguladores del crecimiento o fitohormonas como sinónimos del anterior.

Las hormonas vegetales presentan algunas diferencias con respecto a las animales. En plantas no existen glándulas especializadas secretoras de hormonas como ocurre en animales, sino que su secreción, se realiza en distintos órganos (raíz, meristemas o yemas axilares entre otros) y además se translocan para actuar en otras zonas diferentes a la de síntesis. No existe algo similar al sistema nervioso animal, y además, los vegetales conservan células totipotentes con características embrionarias, que pueden revertir su programa de diferenciación hasta células indiferenciadas durante toda su vida. También existen zonas con crecimiento indeterminado a lo largo de toda la vida de la planta, como por ejemplo el tallo o la raíz.

La clasificación de hormonas se hace normalmente de acuerdo a su estructura y funciones fisiológicas. A continuación se explica una breve reseña de los grupos más importantes de hormonas.

❖ Auxinas

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas y es precisamente el ácido indol-3-acético (AIA) la hormona más abundante, así como la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas (Srivastava, 2002), aunque también es de gran relevancia el ácido indol-3-butírico (IBA). Se encuentran normalmente en las partes de la planta en división celular activa, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos y coleóptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical (McSteen & Zhao, 2008). Las auxinas generalmente se transportan en el sentido del eje longitudinal de la planta,

desde el ápice hacia la base (transporte basípeto) en el tallo, y desde los meristemos hacia arriba (transporte acrópeto) en la raíz (Srivastava, 2002).

❖ Citoquininas

Este grupo de fitohormonas es considerado el responsable de los procesos de división celular, entre los que se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular y también el retardo de la senescencia (Klee & Estelle, 1991). Debido a su diferente estructura química se clasifican en citoquininas (CK) isoprenoides y aromáticas (Sakakibara, 2006). Se cree que las CK son sintetizadas en tejidos jóvenes o meristemáticos como ápices radiculares, yemas del tallo, nódulos de raíces de leguminosas, semillas en germinación y especialmente en endospermos líquidos y frutos jóvenes; desde allí se transportan vía xilema hacia la hoja, para luego ser translocadas vía floema hasta otros órganos como los frutos (Srivastava, 2002).

❖ Giberelinas

Las giberelinas son un grupo de diterpenoides. Las giberelinas biológicamente activas, como es el caso del ácido giberélico (GA_3), actúan como reguladores esenciales del desarrollo de las plantas, modulando varias respuestas esenciales en el crecimiento, como la germinación de semillas, la elongación del tallo, el desarrollo de la partenocarpia (frutos sin semillas), la inducción de floración y la liberación de enzimas hidrolíticas en algunos tejidos entre otras (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2007). En general, se encuentran mayores niveles de giberelinas en las partes reproductivas que en las vegetativas, y en partes jóvenes en comparación con las maduras. Se encuentra por lo tanto en ápices de tallos y raíces, en hojas jóvenes, partes florales, semillas inmaduras y embriones en germinación (Srivastava, 2002).

❖ Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es un sesquiterpenoide particularmente importante en la respuesta a estrés. Entre sus múltiples funciones, se incluye la inducción de proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant*), las cuales se acumulan en la semilla seca y en tejidos vegetativos expuestos a limitación de agua (Cuevas-Velázquez & Covarrubias-Robles, 2011). Además se le atribuye el mantenimiento de dormición de

semillas, inhibe el crecimiento y elongación de hipocótilos, epicótilos y coleóptilos; y en hojas, el ABA promueve su senescencia (Finkelstein *et al.*, 2008). Cumple un papel importante en la regulación de los procesos hídricos, por su relación determinante en la respuesta de las células guarda estomáticas y en el mantenimiento del crecimiento radical durante el déficit hídrico, lo cual se encuentra ampliamente estudiado y documentado en la actualidad (Kim *et al.*, 2010). Por otro lado, el ABA tiene un efecto importante en la defensa de la planta contra patógenos (Asselbergh *et al.*, 2008b; Ton Flors & Maunich-Mani, 2009).

❖ Etileno

Es la única hormona gaseosa y resulta difícil de cuantificar por esta causa. Su biosíntesis se incrementa en plantas sometidas a estrés y se asocia con procesos de senescencia y maduración. Dentro de sus funciones fisiológicas más investigadas, se encuentran las relacionadas con la abscisión de hojas, marchitamiento de flores, maduración de frutos y otros procesos relacionados con el envejecimiento, pues participa en la degradación de clorofilas y en la peroxidación de lípidos de membranas. El etileno (ET) también favorece la epinastia de hojas, la germinación de semillas y promueve la síntesis de enzimas relacionadas con la defensa frente a patógenos, daños mecánicos o en situaciones de estrés, entre otros (Santner & Estelle, 2009).

❖ Jasmonatos

Los jasmonatos, incluyen el ácido jasmónico (JA), sus ésteres, como el ácido metil-jasmónico (MeJA) y otros metabolitos intermedios. Son ciclopentanonas derivadas del ácido linoleico, cuyos niveles se incrementan rápidamente en respuesta a perturbaciones mecánicas, ataques de insectos o infecciones por patógenos. Se ha demostrado el papel de los jasmonatos como mecanismos de defensa frente a pestes, patógenos y estrés abiótico, así como también su participación en la formación de zarcillos, maduración de semillas, producción de polen y crecimiento de raíces, entre otros (Srivastava, 2002).

❖ Ácido salicílico

El ácido salicílico (SA) es una importante molécula señal cuyo papel más estudiado y establecido es el producido en la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR)

frente a patógenos (Santner & Estelle, 2009). En plantas termogénicas, el SA es el responsable de la generación de calor por activación de la respiración alternativa, produciendo la volatilización de compuestos con el fin de atraer insectos durante la polinización. Adicionalmente, el SA participa en la regulación de la respuesta de las plantas frente a ciertos tipos de estreses abióticos, como altas y bajas temperaturas, estrés salino y estrés oxidativo (Chen *et al.*, 2009).

❖ Brasinoesteroides

La familia de los brasinoesteroides (BR) está constituida por polihidroxi-esteroides; sus funciones se relacionan positivamente con la elongación y división celular en tallos, el desarrollo de tubo polínico, la diferenciación del xilema y el desenrollamiento de las hojas (Srivastava, 2002).

❖ Poliaminas

Las poliaminas (PA), entre las cuales espiromidina, putrescina y espermina son las más abundantes, están involucradas en una serie de importantes procesos celulares tales como división celular, empaquetamiento de ácidos nucleicos y replicación de ADN entre otros. Tiene un papel importante en la homeostasis celular y protección contra el estrés (Kaur-Sawhney *et al.*, 2003; Gill & Tuteja, 2010). Sus asociaciones con otras moléculas le confieren actividad como reguladores de crecimiento, son moléculas de señalización para modular las funciones mitocondriales, la proliferación celular y la estimulación de síntesis proteica que puede ser esencial para comprender su participación en el mecanismo de tolerancia de las plantas a estrés (Luna-Esquivel *et al.*, 2014).

❖ Estrigolactonas

En el 2008, se identificaron las estrigolactonas como un nuevo tipo de hormonas que inhibe la ramificación vegetal (Kamiya, 2010). Curiosamente, las estrigolactonas actúan como estimulantes de germinación para las plantas parásitas de la raíz; y además, la estrigolactona 5-deoxystrigol de exudados de raíz de *Lotus japonicus* se identificó como el compuesto responsable de la inducción del crecimiento de hifas en hongos micorrícicos arbusculares (AM). Este es un paso crítico en el reconocimiento del huésped (Akimaya *et al.*, 2005). Otras estrigolactonas, incluyendo estrigol y sorgolactona, y sus análogos sintéticos GR24 y

GR7 también han demostrado inducir la ramificación de hifas y/o la germinación de esporas de los hongos AM (Akiyama *et al.*, 2005; Besserer *et al.*, 2006).

Así pues, el crecimiento y desarrollo de las plantas está regulado por un equilibrio entre las hormonas estimulantes del crecimiento y las hormonas inhibitoras.

1.2. Métodos de medida de hormonas vegetales

Inicialmente, la cuantificación de hormonas vegetales requería técnicas demasiado tediosas, ya que era necesario purificar cantidades excesivas de tejido para poder medirlas, dadas las concentraciones ínfimas en las que se encuentran en la planta. Para determinar los rangos de sensibilidad de una planta a un fitoregulator, se idearon bioensayos donde se aplicaban estos exógenamente a diferentes concentraciones y se medía la respuesta de la planta frente a los mismos (Srivastava, 2001).

Posteriormente, se han desarrollado métodos más sofisticados y exhaustivos como la cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acopladas ambas a espectrometría de masas (MS), que permiten cuantificar las hormonas a partir de extractos procedentes de una pequeña cantidad de tejido. De esta forma, se pueden medir hormonas en brotes, tallo, o raíz, entre otros. Si bien es cierto que estos métodos actuales tienen ventajas, también presentan inconvenientes, que puede ser la cantidad de disolvente que queda en la muestra, a veces muy elevada, el tiempo empleado para ello y la mano de obra especializada que se requiere.

No se ha de olvidar las técnicas RIA y ELISA, que además de la sensibilidad y la rapidez de los análisis, se obtiene una gran capacidad de procesamiento de muestras. ELISA es una técnica menos cara y más segura, y según algunos autores, una de las más apropiadas para la cuantificación de las fitohormonas. Pero para ello es necesario purificar y fraccionar los extractos, con el fin de evitar la interferencia inespecífica con los anticuerpos y la reacción cruzada con compuestos análogos. Según Sequeira (1992), se han desarrollado bastantes modificaciones de la versión original de ELISA, por ejemplo la llamada *double antibody sandwich*, en la que se fija el antígeno a la placa sin el uso de anticuerpos de revestimiento. Alternativamente,

en este ELISA indirecto, un segundo anticuerpo ligado a la enzima, es usado para cuantificar un primer anticuerpo anti-hormona. Los anticuerpos desarrollados realizan una purificación eficiente de los extractos vegetales antes de su análisis cuantitativo y se han usado a menudo en inmunoensayos y cromatografía de inmunoafinidad.

Sin embargo, la 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. Un espectro de masas es un gráfico de la señal del ión en función de relación masa/carga. A partir de los espectros, se utilizan la masa del ión molecular y los fragmentos para determinar la composición elemental o la firma isotópica de un compuesto. Esta información se utiliza para determinar las estructuras químicas de las moléculas. La MS funciona ionizando los compuestos químicos para generar moléculas cargadas o fragmentos de moléculas y medir su relación masa/carga (Alcántara-Durán, 2016).

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 monitorizar selectivamente un ión molecular específico (modo SRM) y uno o varios de sus iones fragmento. 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. Los espectrómetros de triple cuadrupolo tienen otra ventaja, y es que son capaces de monitorizar múltiples transiciones en un mismo evento analítico (modo MRM, monitorización de múltiples reacciones), es decir, pueden medir múltiples compuestos a la vez en una sola carrera analítica (Fig. 1).

1.3. Estrés en plantas

Se define el estrés como la presencia de cualquier factor ambiental biótico o abiótico que reduce cualquier tasa fisiológica de la planta (fotosíntesis, respiración o crecimiento, entre otras) por debajo de la tasa mínima que podría alcanzar (Lambers *et al.*, 1998).

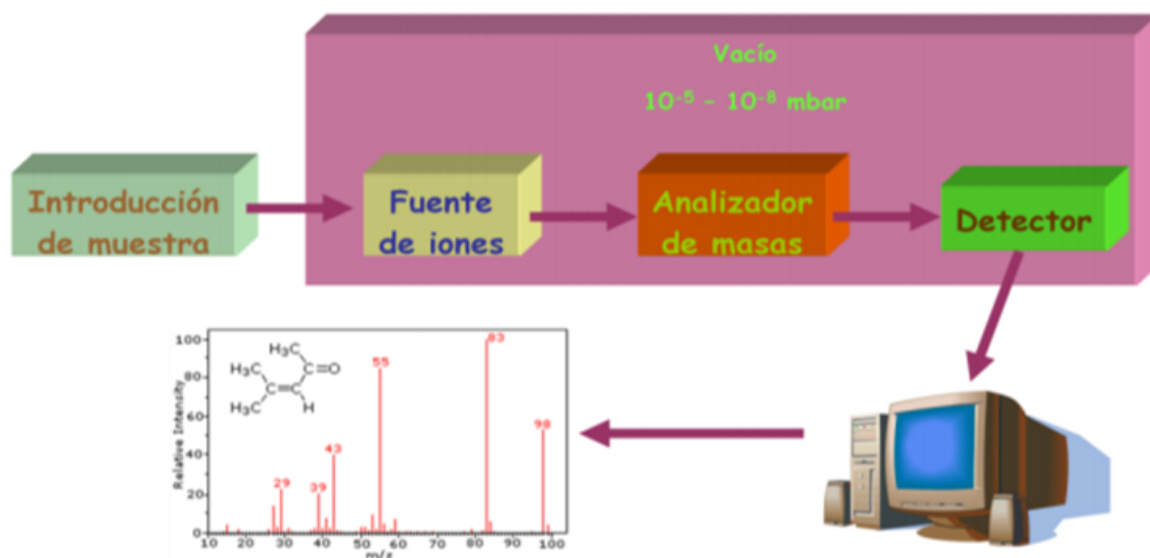


Figura 1| Esquema de un espectrómetro de masas

Existen varias clasificaciones del estrés. En general, una de las más utilizadas es aquella que lo clasifica en estrés biótico y abiótico (Azcón-Bieto & Talón, 2008). El estrés biótico es aquel causado por la acción de otros organismos vivos, ya pueden ser animales, otras plantas, microorganismos, hongos o virus. Por otro lado, el estrés abiótico, es el originado por un factor físico o químico. Entre los factores físicos podemos encontrar el agua y el cloruro sódico causantes del estrés hídrico y salino respectivamente, la radiación UV o el daño mecánico, causante de heridas en la planta entre otros.

La herida es un daño común que se produce en las plantas como resultado de factores de estrés abióticos como el viento, la lluvia, el granizo y factores bióticos, especialmente la alimentación de insectos herbívoros. Representa una amenaza constante para la supervivencia de la planta, ya que no solo destruye físicamente sus tejidos, sino que además proporciona una vía abierta para la invasión por patógenos. Por ello, las plantas responden induciendo la síntesis de ciertas hormonas que a su vez inducen la síntesis de compuestos de defensa, produciendo cadenas de señalización en las que la finalidad es producir una respuesta rápida para evitar una enfermedad o un daño mayor. Así pues, las hormonas vegetales influyen sobre la fisiología de la planta modulando la expresión de los genes, controlando el ciclo celular, la expansión de las paredes celulares, el movimiento de iones, etc.

Según estudios realizados en plantas de tomate sometidas a un estrés biomecánico, se sabe que el JA, después del daño producido por un patógeno aumenta su concentración, dando como resultado un incremento de la producción de compuestos de resistencia, como el SA y ET (Chávez *et al.*, 2012). Aunque según otros autores, el JA y SA son dos hormonas antagónicas, es decir, cuando una aumenta, la otra disminuye, y viceversa (Thale *et al.*, 2012). También se ha demostrado que el JA provoca efectos fisiológicos sobre las plantas similares a los del ABA (Schilmiller & Howe, 2005). Debido a la presencia del éster volátil MeJA, no sólo la planta que los produce responde al estrés, sino también las plantas que crecen alrededor (Ryan, 2000). Se ha observado que las plantas sanas expuestas a MeJA son capaces de acumular inhibidores de proteinasas de manera similar a las plantas dañadas por insectos, lo que sugiere que el MeJA volátil es transmitido por el aire. Estudios posteriores lograron descifrar que el ataque de órganos foliares por herbívoros causaba que un polipéptido de 18 aminoácidos, la sistemina, siendo liberado y transportado por el floema a otras hojas donde una lipasa de membrana induciría un incremento del ácido graso precursor del JA, y éste a su vez induciría la expresión de genes que codifican a proteínas de defensa como los inhibidores de proteinasas (Wasternack *et al.*, 2006).

Las cadenas de señalización provocan respuestas muy variadas. Entre ellas se encuentran las reacciones de hipersensibilidad (SAR), síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRP), producción de fitoalexinas, aumento en la concentración de compuestos fenólicos, transformación de glucósidos a fenoles tóxicos para el patógeno, producción de enzimas que oxidan fenoles como polifenoloxidasas, peroxidasa o fenilalanina amonio-liasa (PAL), las que aceleran la síntesis de lignina que fortalecen las paredes celulares, o las reacciones que activan la síntesis de pectinas, proteínas, productos cianogénicos y toxinas producidas por el patógeno entre otras (Agrios, 2002; Robledo-Esqueda *et al.*, 2012).

Sin embargo, hay menos estudios realizados sobre estrés mecánico y giberelinas, CK o auxinas, y no se llega a un consenso en los resultados obtenidos.

La finalidad de este estudio se centra en la puesta a punto de una técnica nueva de medición de hormonas vegetales en la Universidad de Jaén. Se trata de una técnica de gran precisión, usando para ello un aparato HPLC-masas triple

cuadrupolo (HPLC-MS QqQ) (TSQ Quantum Access Max, acoplado a un HPLC *Accela* de la marca *Thermo*) de los Servicios Técnicos del GSYA (Grupo de Investigación en Seguridad y Auditoría). Una vez logrado este objetivo, se realizó la medida de las 9 fitohormonas en plantas de tomate sometidas a estrés por heridas a tiempos cortos. Actualmente no hay estudios que aborden este tema de una forma estructural, midiendo tantas y tan diversas categorías de hormonas.

2. OBJETIVOS

Para lograr el objetivo general mencionado anteriormente, se plantearon los siguientes subobjetivos:

- Afinamiento y puesta a punto en el HPLC-MS QqQ de las condiciones de trabajo para cada patrón de hormonas verdaderas y de los patrones internos.
- Afinamiento y puesta a punto de las condiciones de trabajo de la mezcla de hormonas verdaderas con los dos patrones internos que permitan su medida conjunta en un solo ciclo de medida del aparato.
- Realización de las rectas de calibrado a partir de concentraciones conocidas de cada una de las 9 hormonas medidas (GA_3 , SA, AIA, IBA, JA, ABA, trans-zeatina, MeJA y MeSA) para poder cuantificar *a posteriori* en cualquier muestra de extracto vegetal.
- Estudio del comportamiento de las 9 fitohormonas en plantas de tomate sometidas a estrés por heridas a tiempos cortos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

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

- ❖ Solución *stock* de hormonas verdaderas y controles internos

Se partió de hormonas comerciales purificadas, con alto índice de pureza, siempre mayor del 99%, para introducir en el aparato y usar como patrones. Se hizo una solución de partida de cada una de ellas de 2 mg/ml en metanol *Panreac* con

una pureza del 99,5%. A partir de la misma, y una vez filtrada con filtro milipore *LLG Siringe Filters Nylon* de 0,20 μm y con un diámetro de 0,13 mm, se hicieron diluciones. Cada una de las hormonas vegetales descritas en la Fig. 2 se midió por separado en el HPLC-MS QqQ a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ con el fin de obtener las condiciones de trabajo para cada hormona, el ión de medida en el cromatograma y su tiempo de retención (RT). El tamaño del ión detectado para cada hormona, su RT, polaridad y el patrón interno, usado para evitar el efecto matriz, se encuentran resumidos en la Tabla 1. Estas soluciones son estables durante 3 meses.

Tabla 1| Condiciones de monitoreo de reacción seleccionadas para hormonas vegetales protonadas o desprotonadas. **Q1**, ión precursor seleccionado para su medida. **RT**, tiempo de retención del ión expresado en minutos

HORMONA	Q1	RT	POLARIDAD	ESTÁNDAR INTERNO
GA ₃	345,200	3,94	-	H ₂ JA
SA	137,050	4,68	-	H ₂ JA
AIA	174,100	4,37	-	H ₂ JA
IBA	202,000	5,89	-	H ₂ JA
JA	208,900	6,21	-	H ₂ JA
ABA	263,000	5,15	-	H ₂ JA
Trans-zeatina	220,100	2,57	+	MeH ₂ JA
MeJA	227,150	10,00	+	MeH ₂ JA
MeSA	153,100	6,86	+	MeH ₂ JA

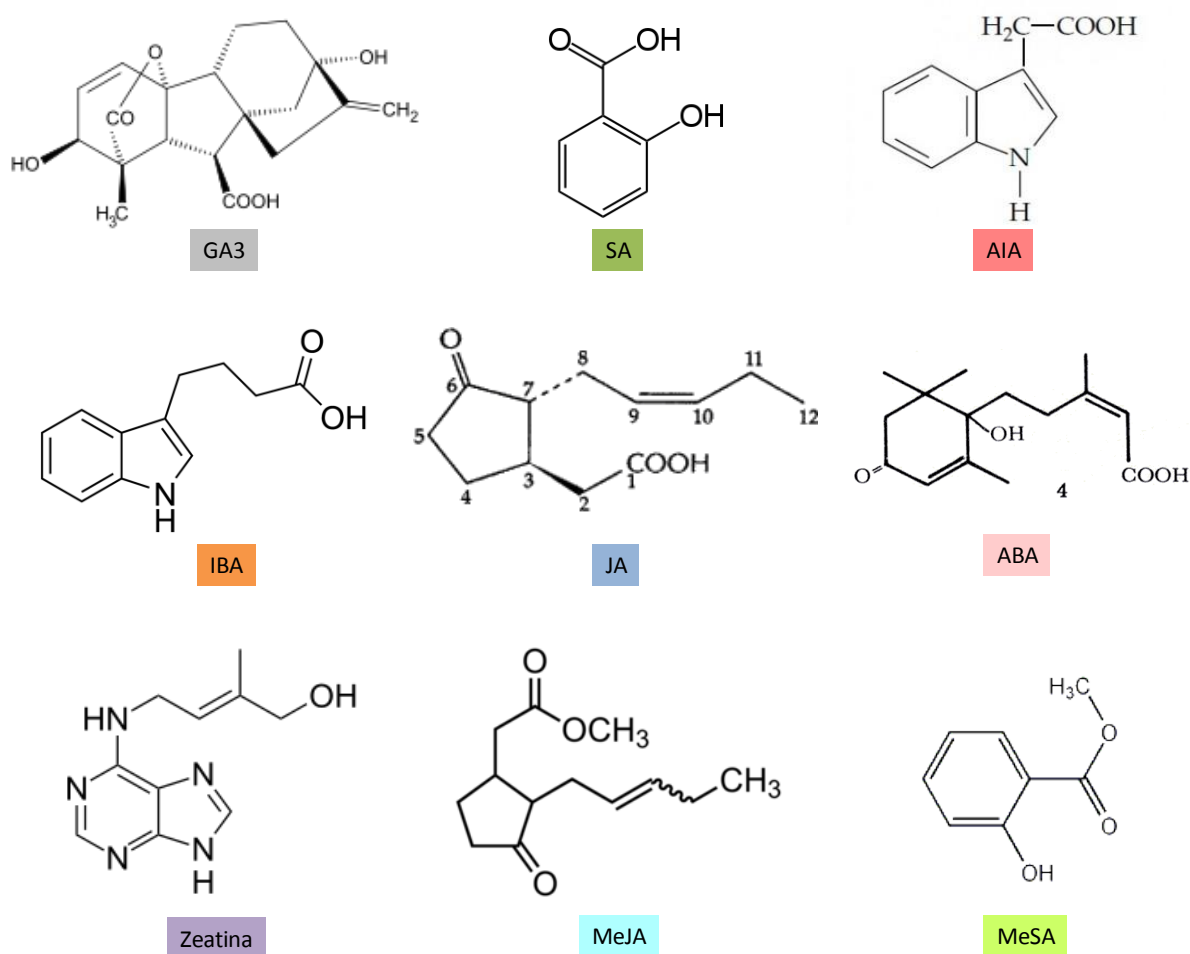


Figura 2| Hormonas sujetas a estudio. **GA3**, ácido giberélico. **SA**, ácido salicílico. **AIA**, ácido indol-3-acético. **IBA**, ácido indol-3butírico. **JA**, ácido jasmónico. **ABA**, ácido abcísico. **MeJA**, metil-jasmonato. **MeSA**, metil-salicílico

❖ Solución mezcla de los estándares internos

Los patrones o estándares internos son compuestos que se utilizan como referencia, es decir, gracias a ellos se puede saber la diferencia de la cantidad de hormona que retiene el HPLC-MS QqQ en el proceso de medición, y por tanto evita el error producido por el propio funcionamiento del aparato, de forma que dicha cantidad es la que tendremos que sumar a la medición de hormona final. Como es lógico, estos estándares son compuestos químicos que no están presentes en la planta de forma natural, por lo que si el HPLC-MS QqQ detecta cantidades ligeramente oscilantes en cada medición, nunca se podría pensar que procediese de la síntesis de dichos compuestos por parte de la planta, sino del propio proceso de medida del aparato.

Esta solución mezcla de los dos estándares internos, H₂JA y MeH₂JA, negativo y positivo respectivamente, se preparó a una concentración final de 10 µg/ml. Por último, esta mezcla fue filtrada con filtro milipore para adicionarla posteriormente a los tejidos vegetales durante la obtención de sus extractos.

❖ Solución de trabajo de hormonas verdaderas

Una vez obtenidas las condiciones de trabajo para cada hormona individualmente, con el fin de minimizar el trabajo y tiempo de medida, y siguiendo el estudio realizado por Pan *et al.* (2010), se preparó una solución de trabajo en la cual se mezclaron todas las hormonas verdaderas a una concentración final de 1 µg/ml.

La finalidad fue encontrar unas condiciones de trabajo comunes para todas las hormonas que produjese un cromatograma con todos los picos usando un único protocolo de trabajo. En esta solución de trabajo se introdujeron los dos patrones internos a una concentración final de 50 ng/µl.

De esta forma se introdujo la solución en el HPLC-MS QqQ para tener las nuevas condiciones de trabajo y así detectar el peso molecular y los nuevos tiempos de retención de los iones (ligemente variados con respecto a los obtenidos individualmente) tal y como se detallan en la Tabla 1.

3.1.1. Condiciones de trabajo para la solución de trabajo de hormonas verdaderas

Las condiciones de trabajo generales y en fuente utilizadas para poner a punto el HPLC-MS QqQ fueron dos diferentes: 1) Unas condiciones válidas para todas la hormonas, excepto las auxinas (Tabla 2 y Fig. 3). 2) Otro protocolo para la cuantificación de auxinas, ya que fue imposible medirlas con el resto de la mezcla (Tabla 3 y Fig. 4).

Tabla 2| Condiciones de trabajo generales de HPLC-MS QqQ para todas las hormonas excepto AIA e IBA

-c SRM Micro Scans 1							
<i>Parent</i>	<i>Center</i>	<i>Width</i>	<i>Time</i>	<i>CE</i>	<i>Q1 PW</i>	<i>Q3 PW</i>	<i>Tube Lens</i>
137,050	93,100	0,010	0,100	19	0,70	0,70	60
174,100	130,100	0,010	0,100	10	0,70	0,70	30
202,000	158,100	0,010	0,100	16	0,70	0,70	60
208,900	59,300	0,010	0,100	15	0,70	0,70	45
210,900	59,200	0,010	0,100	15	0,70	0,70	50
163,000	153,000	0,010	0,100	12	0,70	0,70	45
345,200	143,200	0,010	0,100	35	0,70	0,70	60
+c SRM Micro Scans 1							
<i>Parent</i>	<i>Center</i>	<i>Width</i>	<i>Time</i>	<i>CE</i>	<i>Q1 PW</i>	<i>Q3 PW</i>	<i>Tube Lens</i>
153,100	65,000	0,010	0,100	30	0,70	0,70	60
153,100	121,000	0,010	0,100	11	0,70	0,70	60
220,100	136,150	0,010	0,100	18	0,70	0,70	60
225,000	151,000	0,010	0,100	13	0,70	0,70	50
227,150	153,150	0,010	0,100	13	0,70	0,70	60
Gradient table							
<i>Nº</i>	<i>Time</i>	<i>A%</i>	<i>B%</i>	<i>C%</i>	<i>D%</i>	<i>µl/min</i>	
0	0,00	90,000	0,0	0,0	10,0	200,0	
1	2,00	50,000	0,0	0,0	50,0	200,0	
2	11,00	30,000	0,0	0,0	70,0	200,0	
3	12,00	0,000	0,0	0,0	100,0	200,0	
4	12,10	90,000	0,0	0,0	10,0	200,0	
5	17,00	90,000	0,0	0,0	10,0	200,0	

A

Device	Value	Readback
☐  Spray Voltage	3000	3028
☐  Vaporizer Temperature	350	318
☐  Sheath Gas Pressure	50	50
☐  Ion Sweep Gas Pressure	0.0	-0.1
☐  Aux Gas Pressure	30	30
☐  Capillary Temperature	275	274
☒  Tube Lens Offset	-96	-68
☐  Skimmer Offset	0	0
☐  Collision Pressure	1.5	1.5
☐  Collision Energy	10	10

Spray Voltage

B

Device	Value	Readback
☐  Spray Voltage	3000	3028
☐  Vaporizer Temperature	350	310
☐  Sheath Gas Pressure	50	45
☐  Ion Sweep Gas Pressure	0.0	-0.2
☐  Aux Gas Pressure	30	10
☐  Capillary Temperature	275	262
☒  Tube Lens Offset	95	123
☐  Skimmer Offset	-0	-0
☐  Collision Pressure	1.5	1.5
☐  Collision Energy	-20	-10

Spray Voltage

Figura 3| Condiciones de trabajo en fuente de HPLC-MS QqQ para todas las hormonas excepto AIA e IBA **A.** Iones negativos. **B.** Iones positivos

Tabla 3| Condiciones de trabajo generales de HPLC-MS QqQ para AIA e IBA

-c SRM Micro Scans 1							
<i>Parent</i>	<i>Center</i>	<i>Width</i>	<i>Time</i>	<i>CE</i>	<i>Q1 PW</i>	<i>Q3 PW</i>	<i>Tube Lens</i>
174,100	130,100	0,010	0,100	10	0,70	0,70	30
202,000	158,100	0,010	0,100	16	0,70	0,70	60
210,900	59,200	0,010	0,100	15	0,70	0,70	50
Gradient table							
<i>Nº</i>	<i>Time</i>	<i>A%</i>	<i>B%</i>	<i>C%</i>	<i>D%</i>	<i>µl/min</i>	
0	0,00	90,000	0,0	0,0	10,0	200,0	
1	2,00	50,000	0,0	0,0	50,0	200,0	
2	11,00	30,000	0,0	0,0	70,0	200,0	
3	12,00	0,000	0,0	0,0	100,0	200,0	
4	12,10	90,000	0,0	0,0	10,0	200,0	
5	17,00	90,000	0,0	0,0	10,0	200,0	

Device	Value	Readback
☐ Spray Voltage	3000	0
☐ Vaporizer Temperature	350	212
☐ Sheath Gas Pressure	50	-0
☐ Ion Sweep Gas Pressure	40.0	-0.1
☐ Aux Gas Pressure	30	-0
☐ Capillary Temperature	250	264
☒ Tube Lens Offset	-96	0
☐ Skimmer Offset	0	0
☐ Collision Pressure	1.5	0.0
☐ Collision Energy	10	-0

Spray Voltage	3000	▲ ▲ ▲ ▼ ▼ ▼
---------------	------	----------------

Figura 4| Condiciones de trabajo en fuente de HPLC-MS QqQ para AIA e IBA

3.2. Rectas de calibrado

El rango de concentración que mide el HPLC-MS QqQ depende del analito. Normalmente, en pruebas previas conviene ir haciendo diluciones y comprobar dónde están los límites de cuantificación (LOQ) y de detección (LOD), lo cual servirá para realizar las rectas de calibrado.

Se partió de una concentración inicial de 10 µg/ml de la solución de trabajo de hormonas verdaderas, y a partir de ella se hicieron diluciones a 10; 1; 0,5; 0,1; 0,01 y 0 µg/ml. Sin embargo, en el caso de las auxinas, las diluciones que se utilizaron

fueron 1; 0,5; 0,1; 0,01; 0,001 y 0 $\mu\text{g/ml}$. En todas las diluciones se añadieron los patrones internos a una concentración constante de 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. El ensayo se realizó con tres réplicas de cada dilución midiendo con las condiciones de trabajo previamente expuestas en el apartado anterior para obtener las rectas de calibrado. Es importante conservar todas las soluciones mencionadas anteriormente en frío, a -20 °C.

3.3. Preparación de muestras vegetales

- Pregerminación

Se utilizaron semillas de tomate previamente sometidas a una asepsia superficial con hipoclorito sódico (lejía comercial) al 10% durante 5 minutos. A continuación, dentro de la cabina de flujo laminar y en condiciones de esterilidad se lavan las semillas tres veces con agua destilada estéril. Seguidamente, utilizando placas de Petri estériles se germinaron poniendo en la base un papel de filtro humedecido con agua destilada. Estas placas se llevaron a una estufa para su germinación en oscuridad a 27 °C durante 48 horas.

- Siembra en maceta

Pasadas las 48 horas se efectuó la siembra en maceta de las plántulas. El sustrato utilizado se compuso de un 70% de tierra negra universal, y un 30% de perlita esterilizado previamente. Se utilizaron bandejas de alveolos, introduciendo de 4 a 5 plántulas/alveolo. El sustrato se humedeció con agua destilada; y a continuación, con ayuda de las pinzas se introdujeron las plántulas a 1 cm de profundidad. Por último, se riegan las macetas nuevamente con agua destilada, y se introducen las bandejas en la cámara de cultivo. Los parámetros de crecimiento de la cámara fueron del 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 durante 2 meses con riego *ad libitum* usando para ello agua destilada entre 2 y 3 veces por semana.

3.4. Inducción del estrés mecánico

A partir de plantas de tomate de dos meses de edad, se indujo estrés mecánico producido por heridas a diferentes tiempos, 0 (muestra control); 15 y 30 minutos; 1, 2, 4 y 6 horas. Este daño mecánico consistió en el punzamiento del tallo con una aguja de 3 a 5 veces (dependiendo de la longitud y grosor del tallo), atravesándolo por completo. Cada una de estas muestras se hizo por triplicado en tres macetas con cinco plantas por maceta. Inmediatamente se contó el tiempo tras el daño para su inmediata congelación en nitrógeno líquido.

Las muestras se limpiaron rápidamente de los restos de sustrato y se introdujeron en un tubo Falcon, sumergiéndolo en nitrógeno líquido. Los controles se congelaron directamente sin producir daño alguno sobre los mismos. Posteriormente, las muestras se conservaron en un congelador a - 80 °C hasta su procesamiento (Fig. 5).

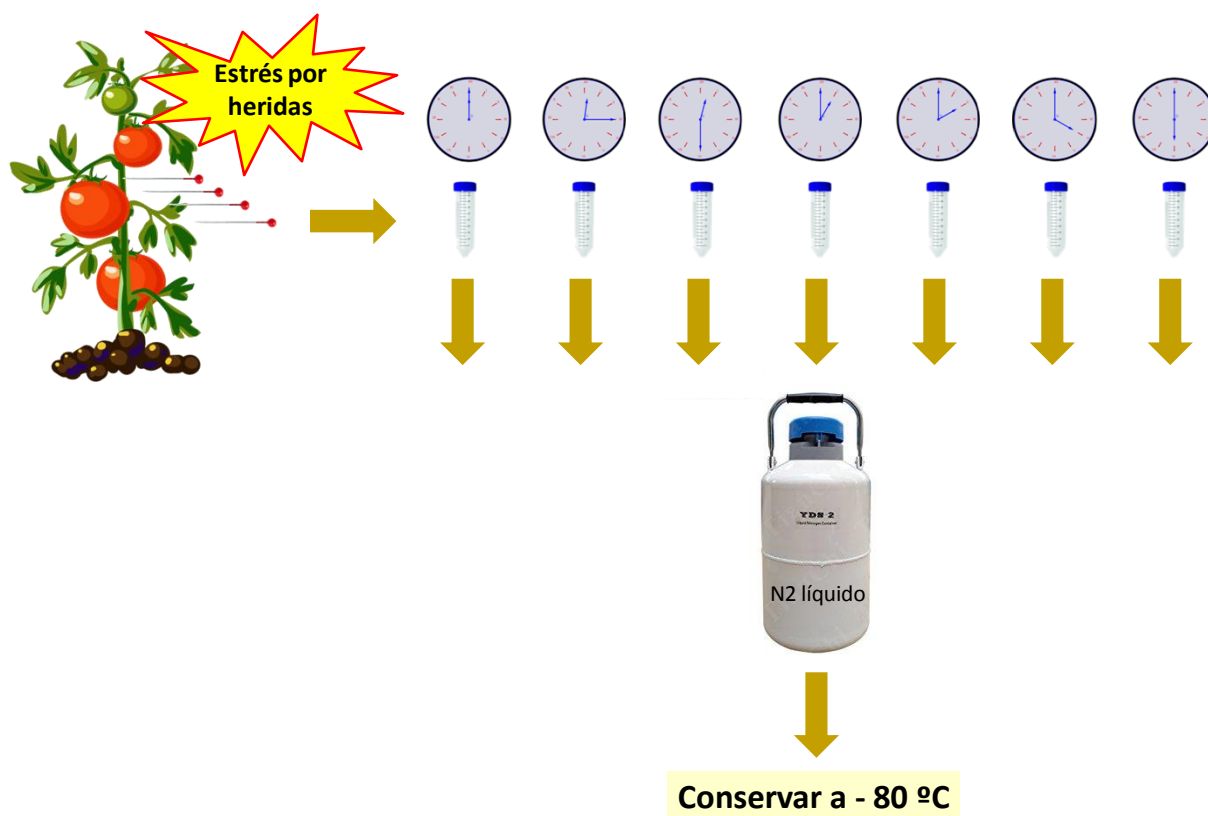


Figura 5| Representación gráfica de la inducción del estrés por heridas

3.5. Obtención de extractos vegetales

Para la obtención de los extractos vegetales se necesitaron dos soluciones de trabajo que se detallan a continuación:

- Solvente de extracción, se prepararon 500 μ l de esta solución *stock* 2-propanol:H₂O:HCl (2:1:0,002; vol/vol/vol). Este solvente es estable durante 3 meses y se ha de conservar a - 20 °C.
- Solución mezcla de los patrones internos a una concentración de 50 ng/ml.

Partiendo de la muestra conservada a - 80 °C, se llevó a cabo el procesamiento del tejido vegetal mediante el siguiente protocolo (Fig. 6):

1. Evitando que la muestra se descongele en todo momento, homogeneizar en el mortero usando para ello nitrógeno líquido.
2. Pesar 50 mg de tejido vegetal en un eppendorf.
3. Con el material vegetal aún congelado, adicionar 50 μ l de la solución de trabajo de los estándares internos por cada 50 mg de tejido vegetal.
4. Adicionar 500 μ l del solvente de extracción a cada tubo. Si hemos partido de más de 50 mg de tejido, ajustamos el volumen de forma que la relación muestra:solvente sea 1:10.
5. Poner tubos en un agitador orbital a 100 rpm durante 30 minutos a 4 °C.
6. Adicionar 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 agitar a 100 rpm durante 30 minutos a 4 °C en agitador orbital.
7. Centrifugar a 13000 g durante 5 minutos a 4 °C.
8. Transferir aproximadamente 900 μ l de la fase superior con una pipeta Pasteur y concentrar la muestra evaporando con un flujo de N₂.
9. Redisolver la muestra en 100 μ l de metanol (pueden congelarse las muestras a -20 °C hasta su análisis).

10. Centrifugar la muestra durante 5 minutos a 15000 rpm a 4 °C. Y extraer el sobrenadante, deshaciéndose de la fase de precipitado.
11. Inyectar en el HPLC-MS QqQ 50 µl de muestra, atendiendo a las condiciones de trabajo y métodos correspondientes, para posteriormente poder analizarlas cuantitativamente. Durante el análisis en el HPLC-MS QqQ, las muestras han de mantenerse en frío a temperatura entre 4 y 8 °C.

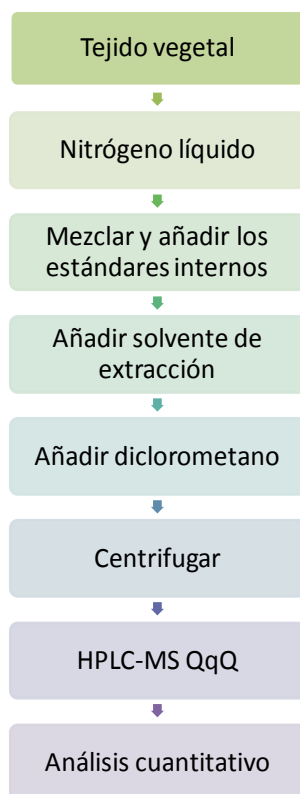


Figura 6| Diagrama de flujo esquemático que muestra los pasos seguidos para la obtención de extractos vegetales hasta su análisis cuantitativo

3.6. *Software* para el análisis de los resultados

Para el análisis de las muestras, el aparato usa dos programas informáticos, *Xcalibur* y *TSQTune*.

Una vez analizados todos los extractos el HPLC-MS QqQ, devuelve resultados gráficos y numéricos, como AA producidas por cada fitohormona, AA producidas por los estándares internos y RT de cada compuesto a través del *software* informático *Xcalibur 2.2 SP1* que permite ver y manejar los datos de espectrometría de masas generados por los equipos *Thermo*.

3.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico con todos los datos obtenidos, utilizando para ello el programa informático *Statistica 7*. Para dicho análisis se utilizó el método ANOVA de medidas repetidas y después un test Fisher LSD para cada hormona en función del tiempo de medida, con un nivel de significación del 95% ($\alpha=0,05$).

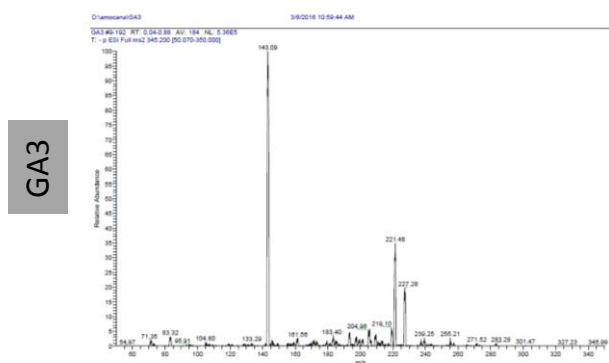
4. RESULTADOS

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

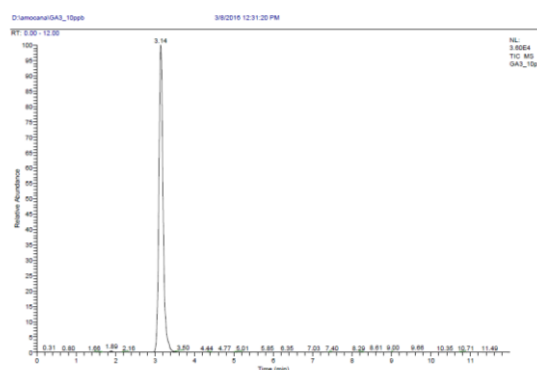
Como se ha mencionado anteriormente, el primer paso en la ejecución de este trabajo fue la introducción en el aparato de medida de los patrones internos de hormonas verdaderas individualmente, con el fin de identificar los iones en el cromatograma y sus respectivos tiempos de retención.

En el HPLC-MS QqQ, se obtuvo el correspondiente cromatograma de cada uno de los iones sujetos a identificación y el espectro de masas que se genera (Fig. 7). Estos iones, cada uno con un peso molecular concreto aparecen eluidos siempre en el mismo momento, es decir, a un RT específico (Tabla 1) y con una abundancia relativa determinada.

Espectro de masas



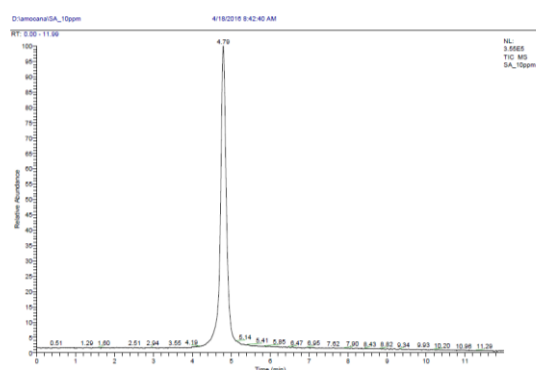
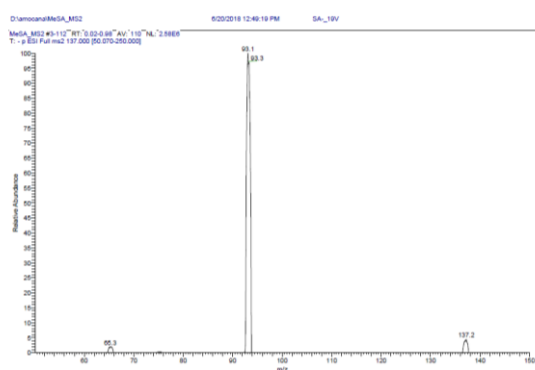
Cromatograma



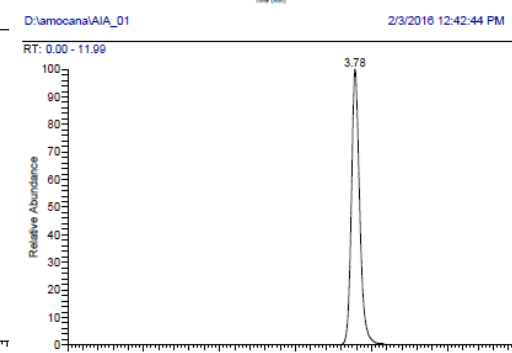
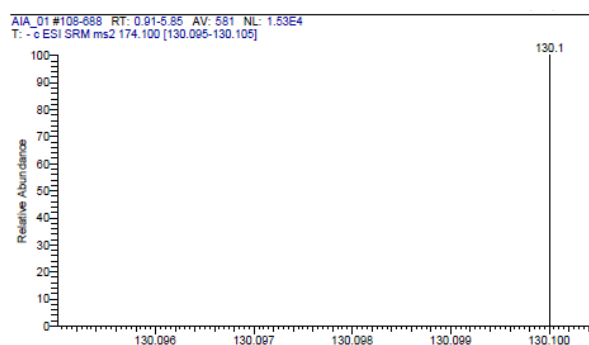
Espectro de masas

Cromatograma

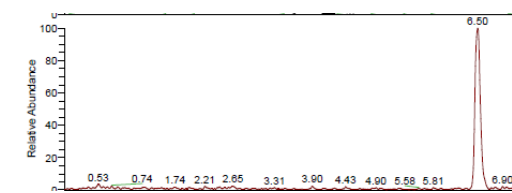
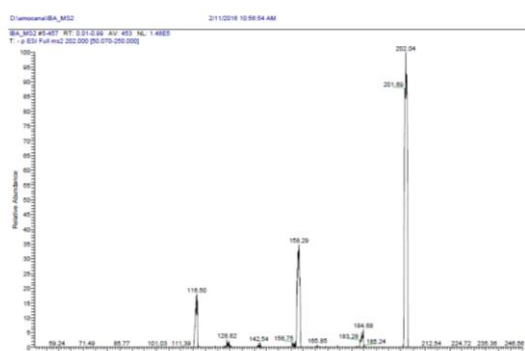
SA



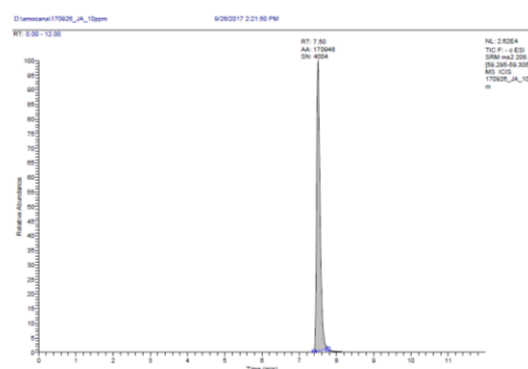
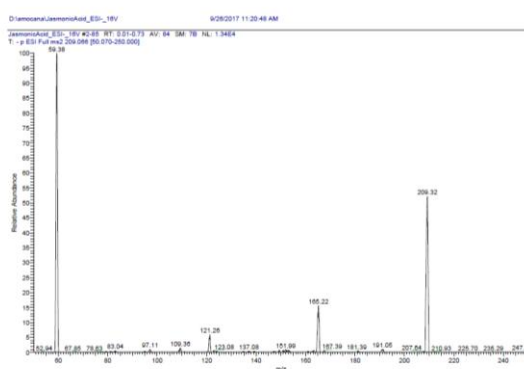
AIA



IBA



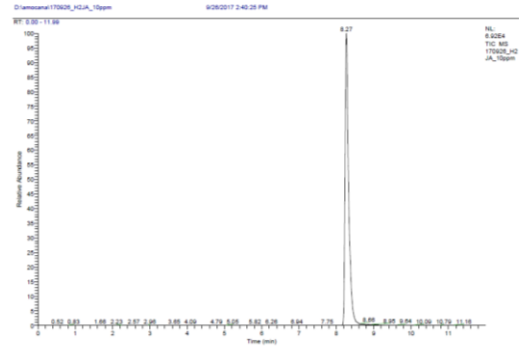
JA



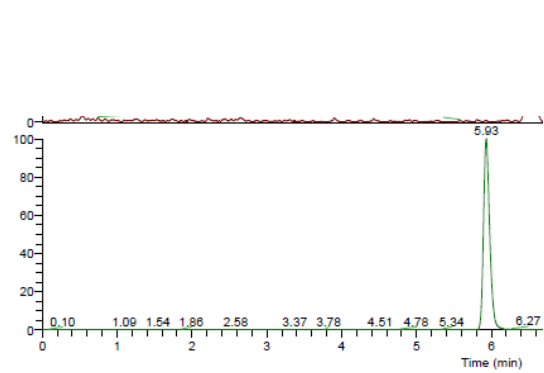
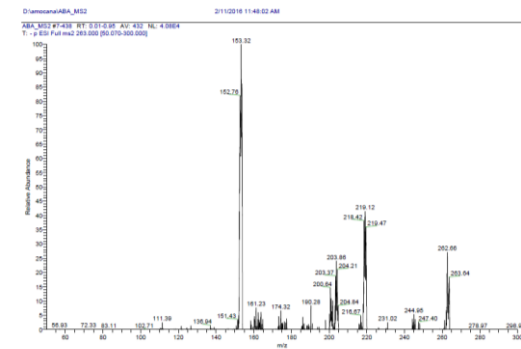
Espectro de masas

Cromatograma

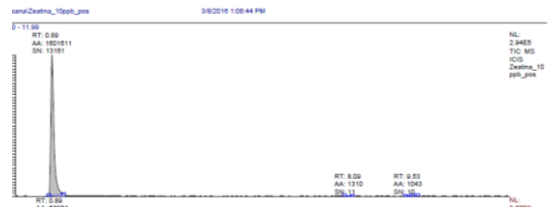
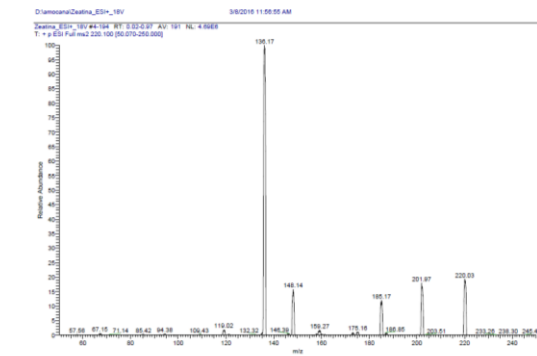
H2JA



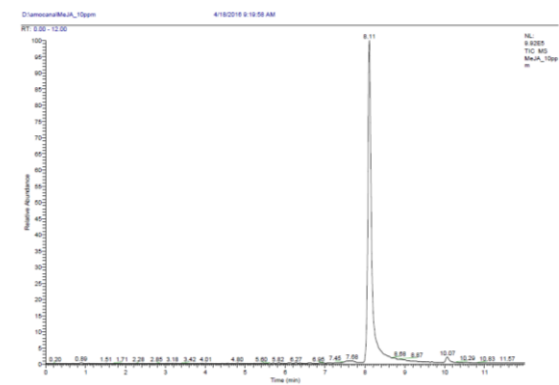
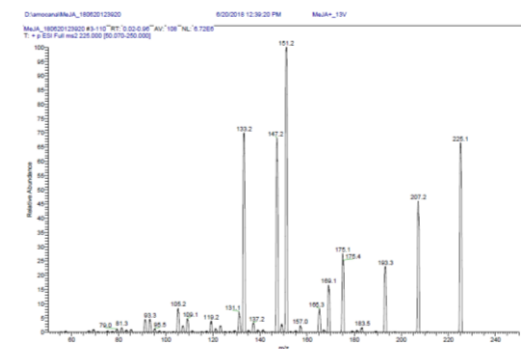
ABA



Trans – zeatina



MeJA



Espectro de masas

Cromatograma

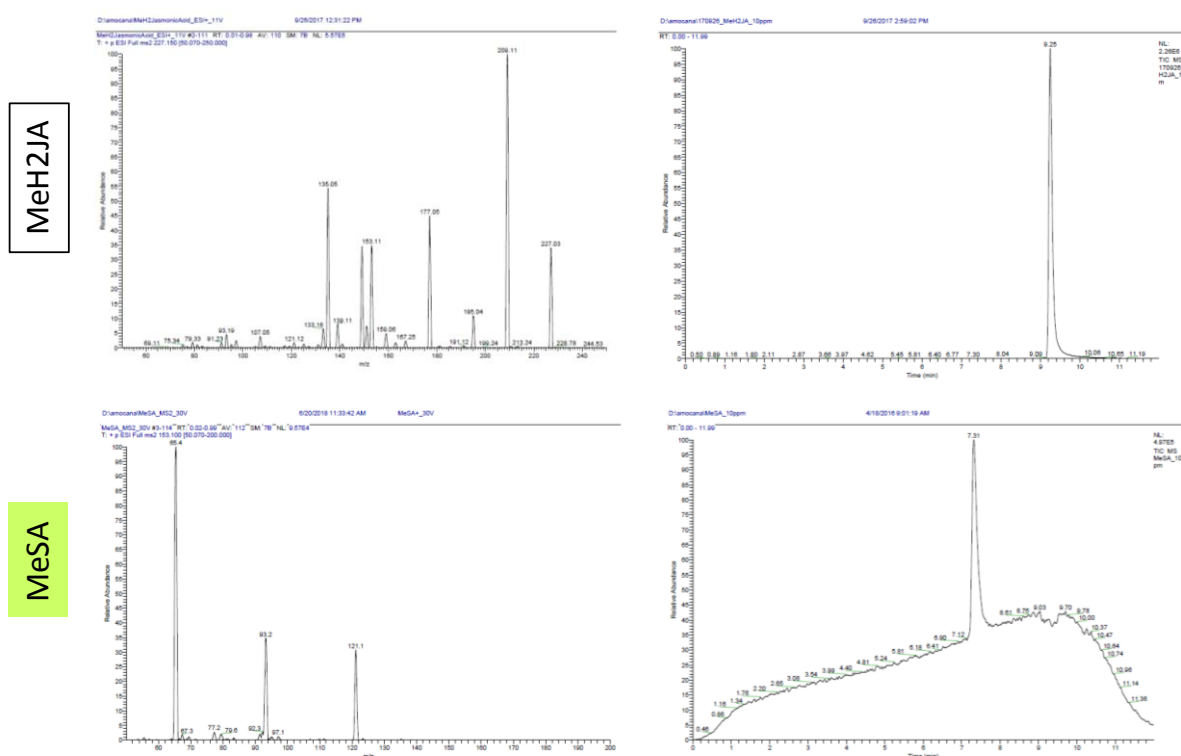


Figura 7] Espectro de masas y cromatograma de cada uno de los patrones de hormonas verdaderas y estándares internos medidos en este trabajo

A continuación, y una vez obtenidos individualmente los espectros de cada hormona y sus condiciones de trabajo, se preparó la solución de trabajo de hormonas verdaderas, es decir, una mezcla de todas las hormonas verdaderas a una concentración final de 10 µg/ml. También se agregó a la mezcla los estándares internos a una concentración a 50 ng/µl.

Por último se midió en el HPLC-MS QqQ y se ajustaron las nuevas condiciones de trabajo. Dado que las auxinas no aparecían en el cromatograma en las concentraciones adecuadas, se seleccionaron dos programas de trabajo, por una parte, unas condiciones de medida específicas para todas las hormonas (excepto auxinas) y un segundo programa, con las condiciones óptimas para medir auxinas. El cromatograma que se obtuvo en la medida de todas las hormonas a la vez (incluidas las auxinas) fue el que se muestra en la Fig. 8.

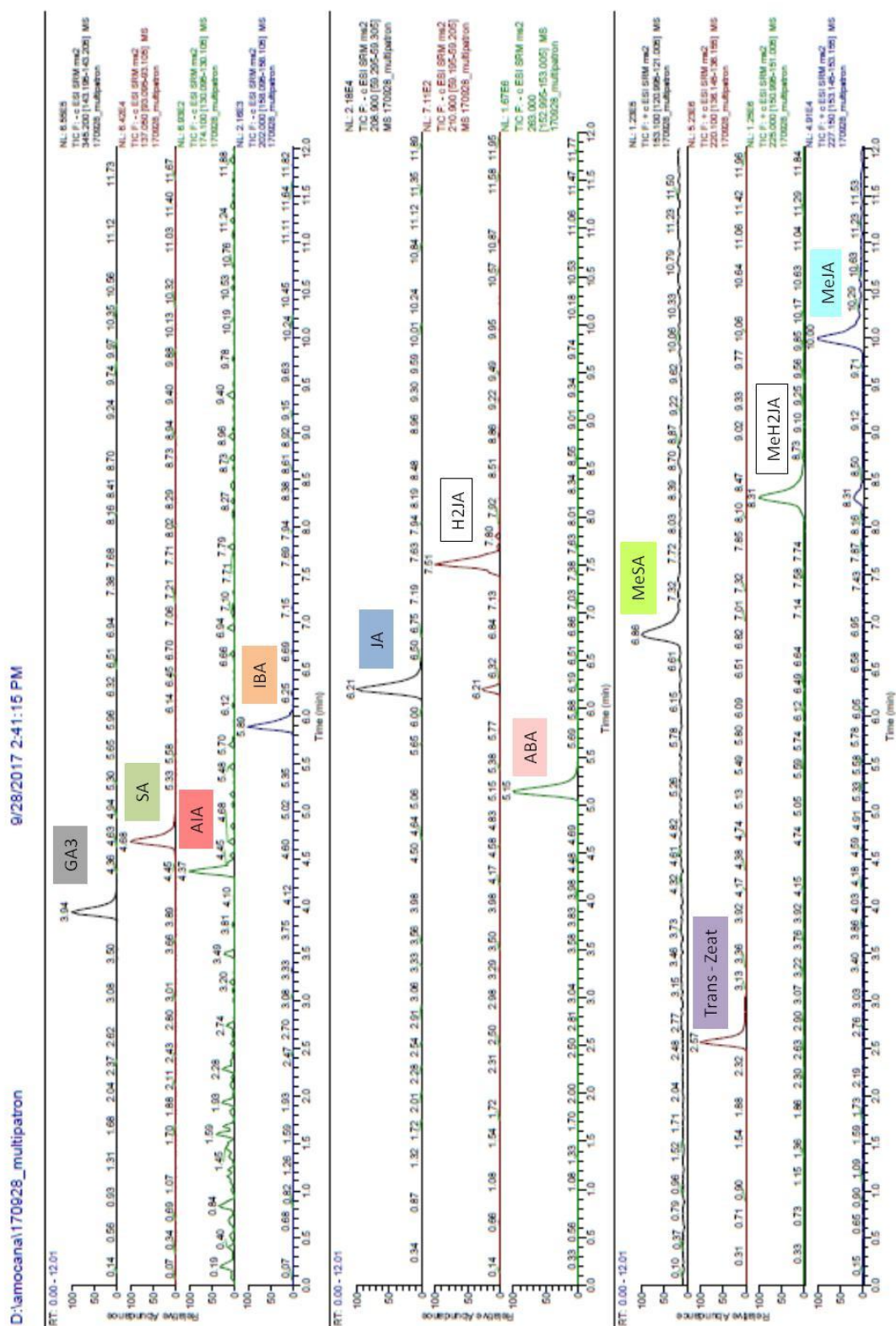


Figura 8] Cromatograma de la solución de trabajo de las hormonas verdaderas y sus estándares internos, H₂JA y MeH₂JA

4.2. Rectas de calibrado

Para hacer las rectas de calibrado que nos permitieran *a posteriori* medir en el HPLC-MS QqQ la concentración de cada hormona en muestras de tomate, se partió de varias alícuotas diluidas a diferentes concentraciones: 1; 0,5; 0,1; 0,01; 0,001 y 0 $\mu\text{g/ml}$ para todas las hormonas. En el caso de las auxinas (AIA e IBA), las diluciones fueron 10; 1; 0,5; 0,1; 0,01 y 0 $\mu\text{g/ml}$.

Para hacer las rectas de calibrado, se buscó el ión positivo o negativo que debía medirse para cada hormona al RT correspondiente, según la Fig. 7, utilizando el AA que produjo cada pico para el cálculo. Este AA arrojada por cada hormona verdadera se divide entre el AA del correspondiente patrón interno positivo o negativo, con el fin de eliminar el llamado “efecto matriz”, es decir, un aumento o más frecuentemente una disminución no esperada de la respuesta de los analitos de interés, que se produce por la coelución de otros componentes presentes en la muestra vegetal, como son las clorofilas u otros metabolitos solubles en los solventes utilizados para llevar a cabo la obtención de extractos vegetales (Jiménez, 2011). Con los datos obtenidos, se generó una tabla en la que, en el eje X aparecen las diferentes concentraciones mencionadas anteriormente a las que se midió cada hormona divididas entre 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (que es la concentración constante a la que se encuentran los patrones internos). En el eje Y de las rectas de calibrado aparece el área relativa que arrojan las muestras y se calcula dividiendo el AA que produce cada hormona en el cromatograma entre el AA que produce el patrón interno correspondiente. Así pues, a partir de estos datos se elaboraron las rectas de calibrado para cada hormona. Se calcularon sus ecuaciones y el valor de R^2 en cada caso. Para valores de $R^2 < 0,9706$, se desecharon los datos y se volvió a repetir el ensayo con dicha hormona.

Siguiendo el proceso explicado anteriormente, se han obtenido las gráficas que se muestran en la Fig. 9. Estas rectas son las que se utilizarán para cuantificar cada una de las hormonas vegetales en nuestros extractos problema.

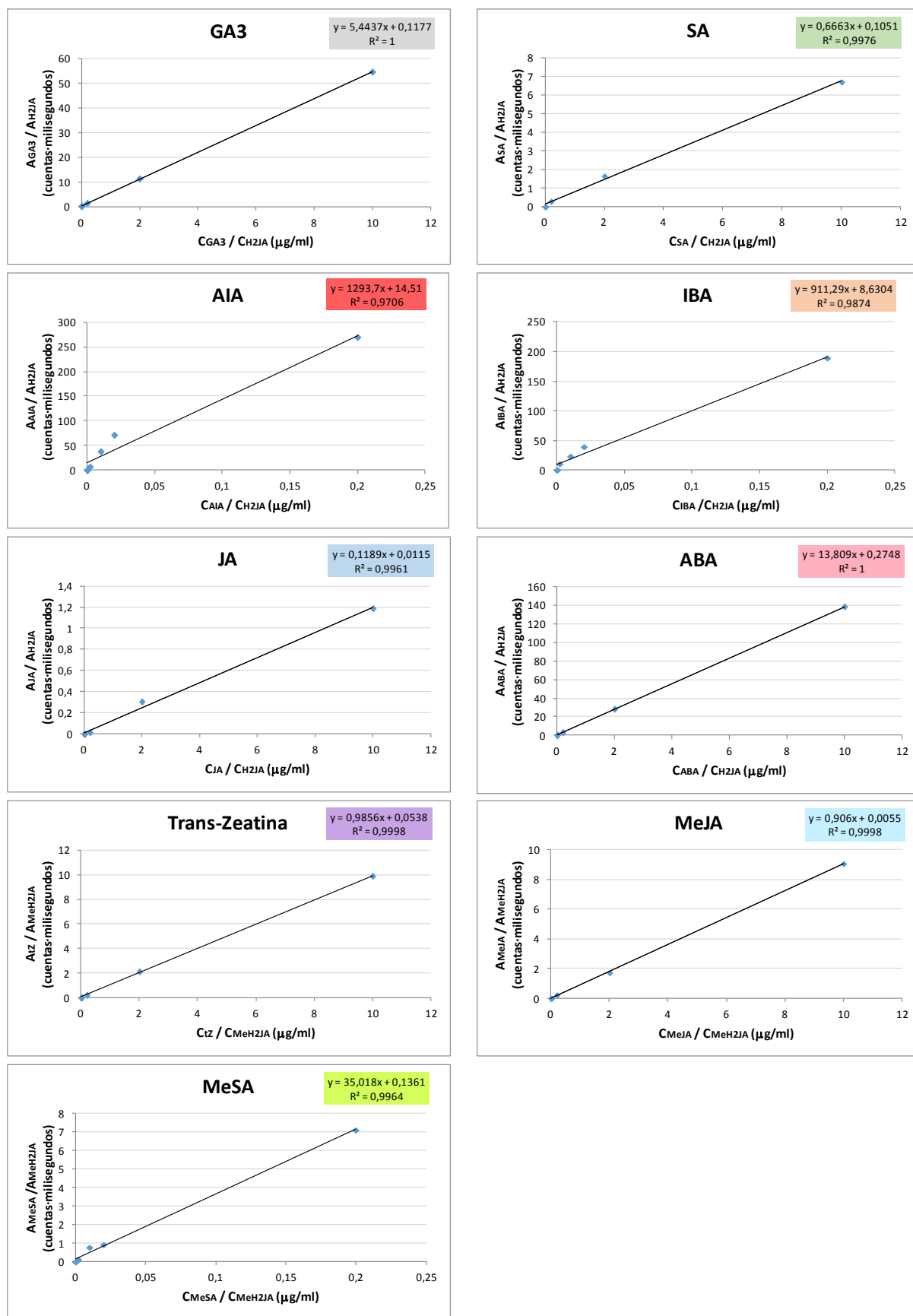


Figura 9] Recta de calibrado de cada una de las hormonas verdaderas

4.3. Medida de hormonas en los extractos de tomate sometidos a estrés mecánico

Tras la preparación de los tejidos vegetales y la elaboración de las 21 muestras finales, tal y como se ha detallado en material y métodos, los extractos se analizaron en el HPLC-MS QqQ. Se tomó el AA de cada ión detectado y se dividió entre el AA de su correspondiente patrón interno. A continuación, se sustituyó este valor en la ecuación de la recta de calibrado de la hormona, para obtener el valor de y. Se siguió este procedimiento con las 9 réplicas realizadas para cada tiempo de medida, y después, con los 9 datos se calculó su media aritmética. A partir de estos resultados se generó una gráfica para observar el comportamiento de cada hormona a lo largo de las 6 horas tras la producción del daño mecánico en el tallo (Fig. 10). En la Fig. 10 se representa la evolución a lo largo del tiempo de las 9 hormonas estudiadas en tomate sometido a estrés por heridas. Se aprecia cómo las auxinas, AIA e IBA, son las fitohormonas que se encuentran en una mayor concentración, con un patrón de comportamiento muy similar en ambas, mientras que el JA, MeJA y la trans-zeatina se encuentran en ínfimas concentraciones, como está descrito en la bibliografía.

Las auxinas alcanzan su máximo absoluto a los 15 minutos de la aplicación del estrés, disminuyendo su concentración bruscamente hasta llegar a un mínimo a la hora. Poco a poco, comienzan a aumentar de nuevo su concentración hasta alcanzar un máximo de nuevo a las 4 horas. A partir de este momento, vuelven a disminuir progresivamente. El patrón de comportamiento es idéntico en ambas hormonas, como se puede observar. En el caso del AIA, no se han obtenido los datos a 0 y 15 minutos al hacer varios intentos del ensayo experimental, sin conseguir resultados y agotarse las muestras. Ha sido imposible iniciar un nuevo experimento para medir las mismas puesto que se necesitan dos meses para el crecimiento y desarrollo de las plantas de tomate. Sin embargo, puesto que en el resto de los tiempos ambas, se comportan en la gráfica de forma muy similar, podría sospecharse que los datos que nos faltan son parecidos a los que se observan para el IBA. Las diferencias de concentración en auxinas que se producen a cada uno de los tiempos de medida, como puede observarse son estadísticamente significativas en el caso del AIA y sólo a los 15 minutos se observan diferencias significativas para el IBA.

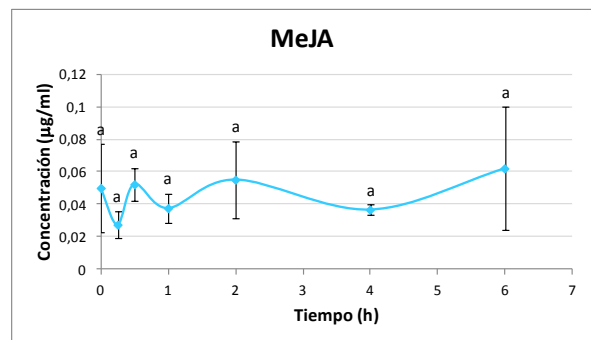
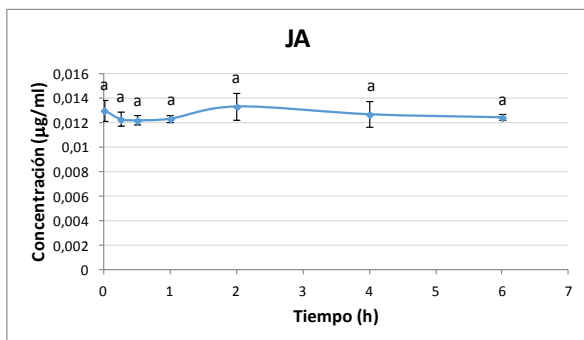
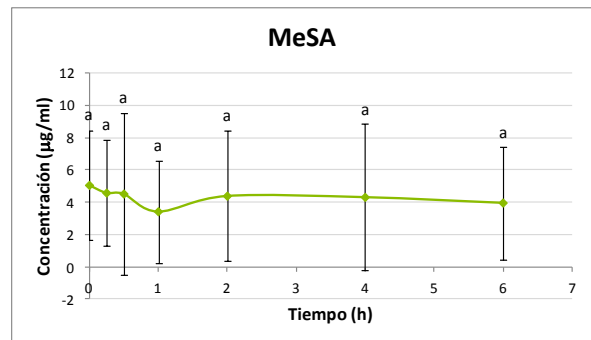
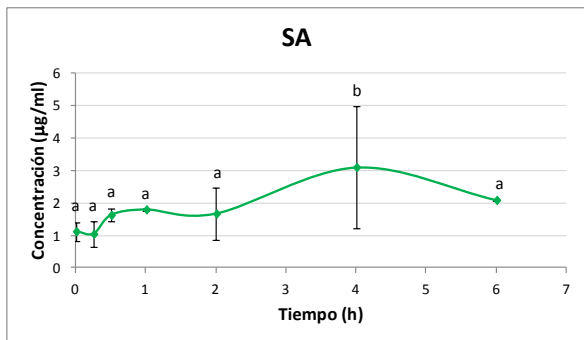
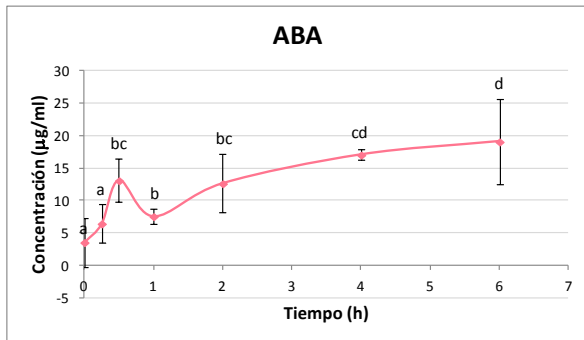
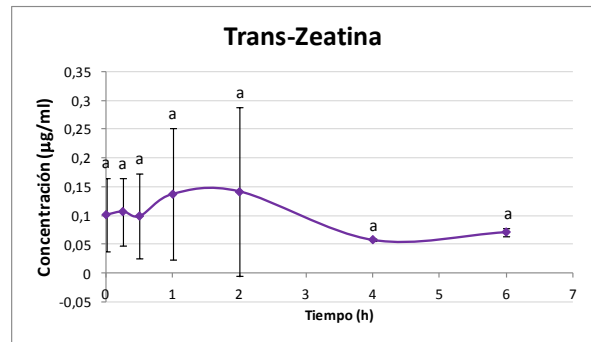
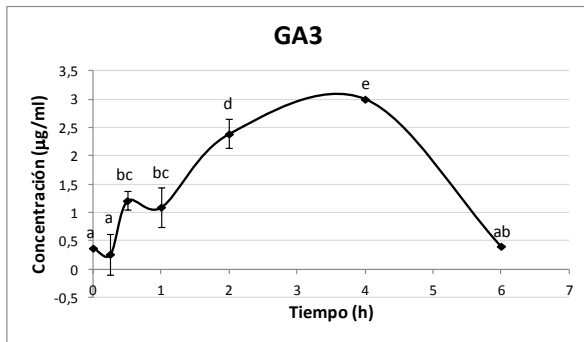
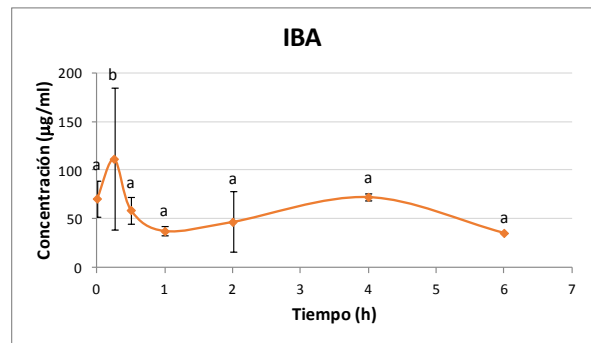
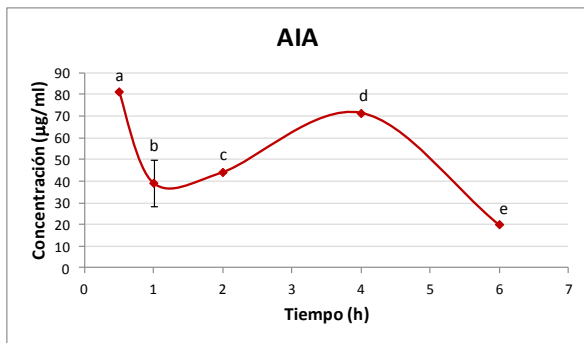


Figura 10| Evolución de la concentración iónica a lo largo del transcurso del tiempo

Las giberelinas GA₃ inicialmente están en muy pequeña cantidad en la planta control. A partir del momento en el que se produce el estrés se observa que su concentración aumenta mucho hasta alcanzar su máximo absoluto a las 3,5 horas. Hay diferencias significativas de concentración de giberelinas una vez hecho el daño mecánico a partir de los 30 minutos tras la punción del tallo en todos los tiempos de medida, para alcanzar la máxima concentración pasadas las tres horas y decaer bruscamente después. Se observa que a las 6 horas del daño las concentraciones de GA₃ han disminuido considerablemente, hasta obtener su estado basal de nuevo.

Con respecto a las CK, el ejemplo que hemos estudiado ha sido la trans-zeatina, y como podemos observar se encuentra en concentraciones ínfimas en la planta. No hay diferencias significativas de concentración de esta hormona a lo largo del tiempo, es decir, la trans-zeatina no parece intervenir en la respuesta al daño mecánico. Tiende a aumentar ligeramente su concentración hasta una hora y media aproximadamente tras la aplicación del estrés, donde alcanza su máximo. Sin embargo, después desciende hasta las 4 horas produciendo oscilaciones muy leves de concentración con el tiempo. Las medidas obtenidas además, presentan un margen de error grande.

El ABA es la hormona del estrés. Se la llama así porque está implicada en numerosas procesos que cursan en la planta en condiciones de estrés, como es el control de apertura y cierre de los estomas ante un exceso de pérdida de agua. En este caso, en las plantas control podemos observar que el ABA se encuentra a bajas concentraciones, pero una vez producido el daño mecánico empieza a acumularse en la planta significativamente. Concretamente alcanza un máximo a los 30 minutos para decrecer en la siguiente media hora (puede ser un proceso de ajuste de la hormona ante el daño producido). A partir de ese momento, el ABA comienza a aumentar su concentración significativamente como se demuestra en el gráfico, alcanzando su máximo a las 6 horas. En este caso, también se han observado diferencias significativas.

Por otro lado, el SA, así como el MeSA, al ser dos hormonas similares en estructura química y funciones, adoptan un comportamiento similar a lo largo del tiempo, produciendo oscilaciones entre la primera y segunda hora tras la aplicación del estrés, para aumentar *a posteriori* a tiempos más largos y finalmente decaer

levemente a las 6 horas. En el caso del SA, se han obtenido diferencias significativas del control con respecto a la concentración acumulada a las 4 horas tras el daño y de este punto con respecto a las 6 horas, en donde se produce un descenso significativo, mientras que en el caso de su éster, el MeSA, no hay oscilaciones significativas de su concentración con respecto al control para ninguno de los tiempos estudiados.

Finalmente, en el caso del JA y MeJA, aun siendo derivados de la misma molécula, su patrón no es exactamente el mismo. A pesar de encontrarse ambas hormonas en cantidades ínfimas, no aparecen diferencias significativas entre el control y las plantas problema en ninguno de los tiempos medidos. El JA y derivados se han relacionado con la respuesta frente al daño mecánico producida por herbívoros.

Se han trabajado los datos desde otro enfoque distinto, es decir, comparando con el control las concentraciones de cada hormona a todos los tiempos de medida tras la producción de las heridas (Figs. 11 y 12). En estas figuras se representa el control de todas las hormonas (barra situada a la izquierda en cada gráfico) frente a cada uno de los tiempos estudiados.

Podemos observar que las auxinas, junto con el ABA son las hormonas más abundantes en la planta. Cabe destacar que los salicilatos, SA y MeSA también aparecen a alta concentración. Por otro lado, se puede ver que las CK y jasmonatos son las hormonas menos abundantes en la planta. Las giberelinas están presentes en cantidades intermedias, con oscilaciones algo más notorias que el resto de las hormonas.

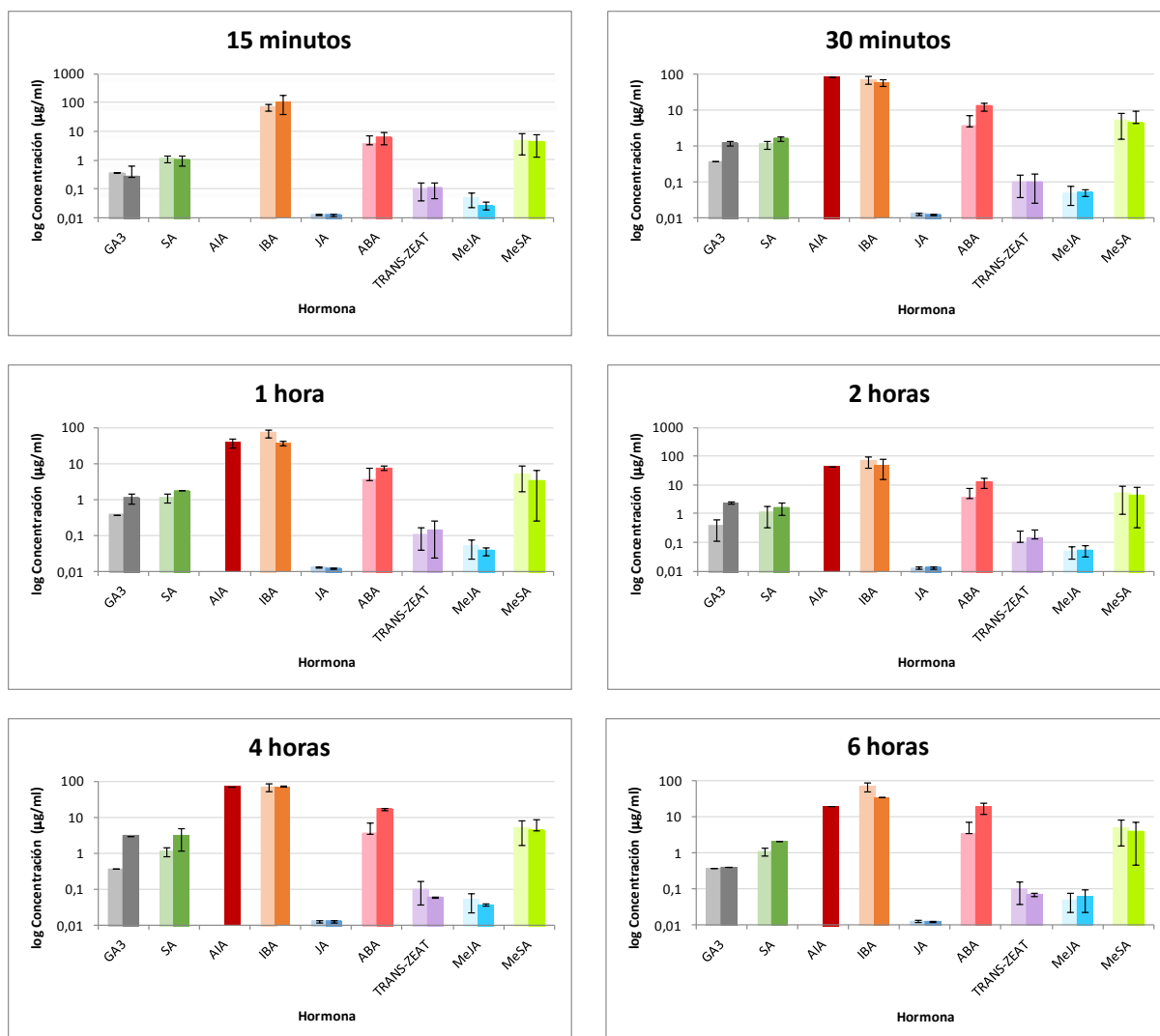


Figura 11] Representación gráfica de cada una de las concentraciones a las que se encuentran fitohormonas en el transcurso de 6 horas respecto al control. La primera barra en cada una de las hormonas representa el control, mientras que la segunda, la concentración de la hormona al tiempo indicado

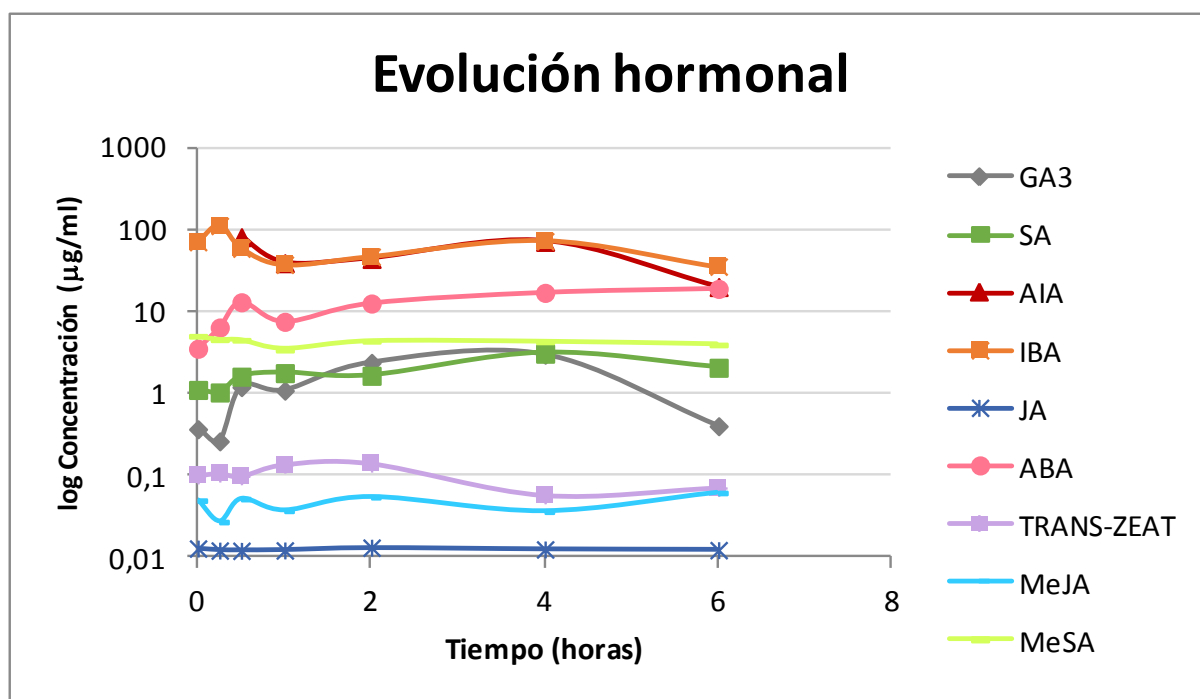


Figura 12| Representación gráfica de cada una de las concentraciones a las que se encuentran fitohormonas en el transcurso de 6 horas

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio realizado, se ha analizado el comportamiento de 9 hormonas vegetales en plantas de tomate de dos meses de edad. En estas plantas se indujo un estrés abiótico de tipo mecánico, punzando su tallo en varios puntos, y recogiendo muestras de tejido vegetal a los 0 (control), 15 y 30 minutos, y 1, 2, 4 y 6 horas tras el daño, con el fin de ver la respuesta de dichas hormonas frente al estrés mecánico.

La respuesta producida en plantas por ataque de herbívoros es uno de los ejemplos más destacados en los que el JA está involucrado como molécula señal. En los últimos cinco años se han generado multitud de datos en este área de investigación (Howe & Jander, 2008; Koo & Howe, 2009; Felton & Tumlinson, 2008; Walling, 2009; Dicke & Baldwin, 2010; Heil & Karban, 2010; Bonaventura *et al.*, 2011b; Sun *et al.*, 2011a; Erb *et al.*, 2012; Meldau *et al.*, 2012). En el caso de heridas locales producidas por herbívoros, estos daños conducen a una explosión en la síntesis de JA en todos los tejidos foliares (como en *Arabidopsis*; Stenzel *et al.*, 2003b) o en haces vasculares (como en tomate; Hause *et al.*, 2000, 2003)

respondiendo con un aumento inmediato de JA en varios minutos (Glauser *et al.*, 2008; Mielke *et al.*, 2011), mientras que más tarde (desde 15 minutos en adelante) la maquinaria de transcripción para la expresión de genes implicados en su síntesis como LOX, AOS, AOC, OPR3 y las JAZ se activan (Stenzel *et al.*, 2003a, b; Chung *et al.*, 2008; Koo & Howe, 2009). En esta red de señalización compuestos de secreciones orales de insectos, actúan como señales positivas adicionales como la volicitina (Bonaventure *et al.*, 2011b), el péptido sistemina, H₂O₂, NO y ET, (Wasternack, 2006; Koo & Howe, 2009), lo cual no se puede contemplar en este trabajo. Nuestro estudio revela que las oscilaciones que se producen en los jasmonatos no son significativas con respecto al control, con lo cual podríamos deducir que deben existir moléculas en las secreciones orales de los insectos, que sería las responsables de esa inducción del JA y MeJA. Experimentos con mutantes de tomate defectuosos en la biosíntesis de JA revelaron una fuerte evidencia de que en la respuesta sistémica de las hojas de tomate frente a heridas se requiere el desencadenamiento de la cadena de señalización, pero no la biosíntesis de JA como tal (Li *et al.*, 2002). Más recientemente, se ha propuesto un posible mecanismo para la señalización sistémica de heridas que implica la estimulación de una bomba protónica H⁺-ATPasa en la membrana plasmática que produce flujos de iones (Zimmermann *et al.*, 2009).

Muy recientemente, Hilleary & Gilroy (2018) han expresado que las plantas poseen redes de señalización sistémicas que permiten la percepción de tensiones locales (estudian concretamente plantas sometidas a estrés por heridas), las cuales se traducirán en toda la planta como respuestas. Aunque la información puede propagarse a través las hormonas dentro del flujo masivo del floema o en la corriente de transpiración, el sistema vascular (xilema del tallo) también parece ser una vía principal por la cual se mueven bidireccionalmente señales extremadamente rápidas a lo largo de la planta. En estos casos, los mecanismos de movimiento no solo dependen de la redistribución de dichas hormonas a través del flujo masivo. Por ejemplo, sistemas basados en cambios de concentración intracelular de Ca²⁺ y especies reactivas de oxígeno (ROS), parecen ser capaces de generar ondas de información que pueden propagarse a cientos de mm/s. Estas señales preparan a la planta para un efecto más eficaz de defensa. La naturaleza precisa de estas redes de señalización permanece aún desconocida, pero siendo críticos, si los diferentes

estímulos están usando la misma red de señalización rápida y sistémica, o si hay múltiples vías paralelas para desencadenar respuestas sistémicas específicas, sigue siendo una pregunta clave sin respuesta.

La herida representa una amenaza constante para la supervivencia de la planta, ya que no solo destruye físicamente los tejidos de las plantas, sino que también proporciona una vía abierta para la invasión por patógenos. Para hacer frente a las heridas de manera efectiva, las plantas deben prepararse para el ataque de patógenos (Cheong *et al.*, 2002). Las respuestas que produce una planta frente a heridas son consideradas intermedias entre estrés de tipo abiótico y estrés como biótico, ya que también comparten una serie de moléculas componentes en sus vías de señalización (Maleck & Dietrich, 1999). En las hojas heridas (Fig. 13), según Hilleary & Gilroy (2018) tiene lugar la producción de un conjunto de señales químicas muy diversas (por ejemplo, MeSA, G3P, ácido pipecólico, S-nitrosoglutatión, JA y SA). Estas señales pueden potencialmente: (1) ser transmitidas a hojas distales a través de los haces vasculares del xilema y floema u otros mecanismos de transporte simplásticos, o (2) desencadenar redes de señalización de largo alcance aguas abajo. Las señales de propagación automática (por ejemplo, ondas eléctricas, ondas de calcio y ondas ROS) pueden moverse rápidamente a hojas distales para inducir una respuesta sistémica como la síntesis *de novo* de compuestos de defensa (por ejemplo, JA y SA para heridas / herbivoría).

Los resultados obtenidos en este trabajo (Figs. 10, 11 y 12) en su mayoría coinciden con otros estudios de diversos autores, que a continuación se analizarán. Si bien es cierto que la mayoría de estudios en relación con el estrés por heridas, ya sea biótico (por ataques de insectos) o abiótico (debido a daños mecánicos) que pueda sufrir la planta, se centran casi exclusivamente a fitohormonas tales como el JA, SA y ET (Wasternack *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2016).

De acuerdo a los resultados de esta Memoria y discutiendo cada comportamiento hormonal detalladamente, se observa cómo en nuestro caso, el JA y MeJA presentan un comportamiento fluctuante, ya que alcanza un mínimo a la media hora tras la aplicación del estrés, un máximo absoluto a las 2 horas, y a partir de este momento decrece, a pesar de que las concentraciones no muestran diferencias significativas de fluctuación con el tiempo. Orozco-Cárdenas *et al.*,

(2001) realizaron un modelo, en el que observó que los genes de la ruta de señalización del JA se expresaban dentro de los 30 minutos posteriores a la herida, mientras que los genes defensivos se expresan 4 horas después (Ryan, 2000). Curiosamente, la expresión del gen que codifica la enzima degradadora de pared celular (PG) en hoja de tomate, inducida por la herida, se produce muy temprano, junto con la expresión de los genes de señalización. Este hallazgo sugiere que el gen PG tiene un papel de señalización al generar compuestos químicos desencadenantes del estallido oxidativo (Legendre *et al.*, 1993; Stennis *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999). Por otro lado, Reymond *et al.* (2000) trabajaron con genes de *Arabidopsis* sometida a estrés por mordedura de insectos y por heridas mecánicas. Según estos autores, la concentración del JA alcanza su máximo a las 2 horas tras la formación de la herida. Este dato coincide exactamente con las medidas obtenidas en el presente trabajo, sin embargo creemos que debe haber algún compuesto cuando se produce la mordedura del insecto en las hojas de la planta que actúe como señal desencadenante y que lógicamente no aparecería en nuestro estudio.

Con respecto al MeJA, es un regulador *in vivo* esencial de la expresión génica de defensa (Reymond & Farmer, 1998). Cuando Sato *et al.* (2011) discutieron los mecanismos de transporte de jasmonatos, las funciones de este compuesto, el MeJA, que se conoce como un compuesto volátil, no pudieron ser ignoradas. En tomate, se descubrió que el MeJA se escindiría en las plantas para generar JA o un derivado de éste con el fin de provocar la respuesta de defensa de la planta (Wu *et al.*, 2008). Estos mismos autores estudiaron el comportamiento de ambas hormonas observando un aumento de MeJA durante los 15 a 30 minutos tras el daño mecánico. El JA, en este periodo presentaba una concentración baja sugiriendo que había una interconversión del MeJA hacia el JA. Estos resultados concuerdan totalmente con lo que sucede en nuestro estudio, si bien las concentraciones que hemos obtenido de dichas hormonas no son significativas.

Curiosamente, en numerosas especies de plantas la evidencia sugiere que puede haber una comunicación cruzada de señalización SA y JA conservada evolutivamente, lo que da como resultado un antagonismo recíproco entre las vías de señalización de SA y JA de manera que cuando una aumenta, la otra disminuye y viceversa (Glazebrook, 2005). En este trabajo, el SA se ha acumulado en la planta

tras inducir el estrés mecánico, así como el MeSA. Si bien es cierto que no se han encontrado estudios que traten sobre el comportamiento de esta hormona en situaciones de este tipo de estrés, sino en la defensa de la planta por ataques de insectos o herbivoría, en este caso ocurre algo similar a lo observado por nosotros, ya que también se acumula SA y este podría justificar las bajas concentraciones de jasmonatos en las muestras estudiadas (Qaiser *et al.*, 2010). En otro estudio realizado con plantas de tabaco por Niki *et al.* (1998), los niveles de SA se mantuvieron casi a un nivel constante durante un total de 24 horas. Este podría ser un resultado a gran escala, mientras que el que se ha obtenido en esta Memoria se centra sólo en las 6 primeras horas.

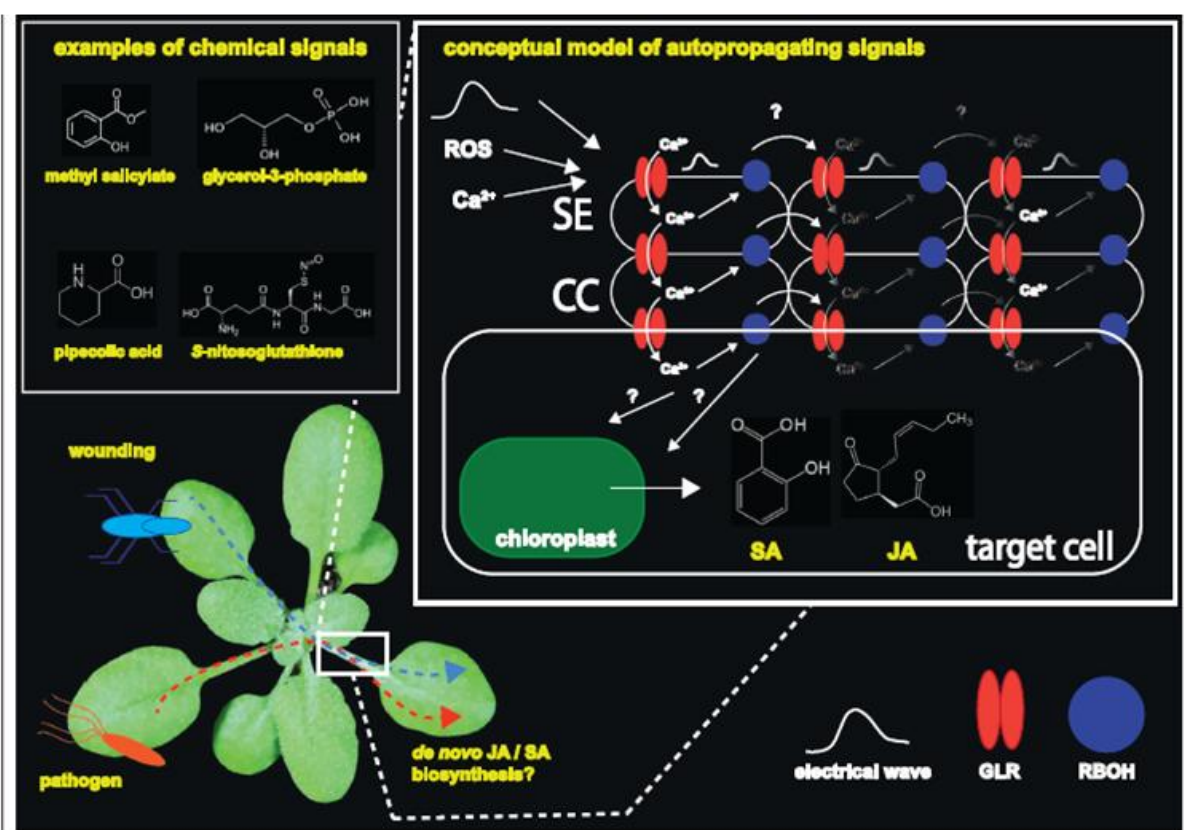


Figura 13| Esquema de cómo las tensiones locales en las hojas pueden provocar señales a larga distancia que se propagan a través de la vasculatura para afectar respuestas de defensa en hojas distales. Imagen procedente de Hilleary & Gilroy (2018)

El ABA actualmente se considera un regulador global de respuestas de estrés en plantas. Su producción puede ser el factor crucial para determinar cómo responden las plantas a múltiples tensiones. Según autores tales como Atkinson & Urwin, (2012) el ABA actúa como un regulador positivo de la señalización de JA y

suprime las respuestas de SA. Se ha propuesto que una señal física relacionada con la presión o el punzamiento (como es una herida producida en los tallos), se propague a lo largo del xilema, donde, por ejemplo, las heridas causarían una interrupción en la corriente de transpiración raíz-hojas que se propagaría rápidamente por todo el sistema del vaso. Tal señalización mecánica podría desencadenar un aumento masivo del ABA en las hojas, induciendo al cierre estomático. En este estudio hormonal se observa exactamente esto, un aumento masivo del ABA a lo largo del tiempo siendo máxima su concentración a las 6 horas tras el daño, con lo cual nuestros resultados están corroborando dicha hipótesis. Esta señalización sistémica está basada únicamente en la corriente de transpiración, pero ha demostrado ser difícil diseñar experimentos para comprobar la hipótesis directamente.

En el caso de la trans-zeatina, tiene un comportamiento irregular conforme avanza el tiempo de medida. Según el estudio de Sano *et al.* (1996) las CK son esenciales para desencadenar la transducción de la señal de la herida. Posiblemente, en presencia de niveles normales de CK, la señal de la herida inicial se transmite a la vía de biosíntesis de JA y MeJA, que reprime la producción de SA y MeSA. La respuesta de las plantas a las heridas parece estar modulada por un equilibrio apropiado entre los niveles de JA y SA. En este contexto, las CK pueden funcionar como un interruptor molecular que dirige la señal de la herida a los canales de JA (MeJA) o SA. (Sano *et al.*, 1996). En nuestro estudio, las CK se han mantenido a unos niveles muy bajos y ligeramente oscilantes a lo largo del tiempo, lo cual se traduce en que no se induzca la producción de JA ni MeJA. Aunque sus concentraciones son ínfimas, hay que destacar que estas hormonas actúan a muy bajas concentraciones dentro de la planta.

Con respecto a las auxinas, en nuestro caso AIA e IBA, presentan un comportamiento idéntico una con respecto a la otra, fluctuante, en el que a medida que transcurre las 6 horas estas decrecen en concentración. Si nos basamos en los estudios de Cheong *et al.* (2002), los genes que responden a auxinas son regulados negativamente por heridas. Aunque auxinas, principalmente el AIA, poseen el control de muchos procesos importantes de desarrollo en las plantas (Bartel, 1997; Normanly & Bartel, 1999), se conoce poco sobre la función de la auxina en las

respuestas de estrés por heridas o defensa frente a herbívoros (Cheong *et al.*, 2002).

6. CONCLUSIONES

Tras el trabajo realizado y en base a los resultados obtenidos, se pasa a concluir de la siguiente manera:

Este trabajo ha permitido la puesta a punto en los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén de una nueva técnica cuantitativa de medición mediante HPLC-MS QqQ. A partir de este momento será posible medir hormonas vegetales diferentes en extractos de plantas utilizando los equipos del GSYA en la Universidad de Jaén.

A raíz de la medición de las hormonas en tomate control se puede concluir que las plantas, en condiciones basales tienen concentraciones de auxinas 10 veces superiores a las de ABA, 100 veces más abundantes que las giberelinas GA₃ y salicilatos, o 1000 veces más elevadas que la trans-zeatina y hasta 10000 veces superiores a las concentraciones de los jasmonatos.

En la cuantificación de hormonas vegetales en plantas de tomate a las que se hicieron heridas a diferentes tiempos, se observa que hay un aumento masivo de ABA, siendo máxima su concentración a las 6 horas tras el daño, lo cual sugiere que esta hormona está jugando un papel crucial en la respuesta frente a este tipo de estrés.

Las giberelinas GA₃ frente al estrés por heridas producen una respuesta rápida aumentando significativamente su concentración a tiempos cortos para descender hasta su estado basal en 6 horas tras el daño mecánico.

No hay diferencias significativas en cuanto a las oscilaciones de JA, MeJA, MeSA y trans-zeatina cuando las plantas se sometieron a estrés por heridas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. (2002). Fitopatología. Editorial Limusa, S. A. de C. V. Grupo Noriega Editores. 98-109 pp.

Akiyama, K., Matsuzaki, K. I., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043), 824.

Alcántara-Durán, J. (2016). *Optimización de un método para la determinación de una mezcla de compuestos orgánicos en suplementos alimenticios mediante HPLC* (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de Jaén, Jaén, España

Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., & Höfte, M. (2008). Global switches and fine-tuning—ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 709-719.

Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.

Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Capítulo 29: Fisiología de las plantas y el estrés (2nd ed.) Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, 577-597 pp.

Bartel, B. (1997). Auxin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 48(1), 51-66.

Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.C., Roux, C., Becard, G., & Séjalon-Delmas, N. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS biology*, 4(7), e226.

Bonaventure, G., VanDoorn, A., & Baldwin, I. T. (2011). Herbivore-associated elicitors: FAC signaling and metabolism. *Trends in plant science*, 16(6), 294-299.

Chávez Suárez, L., Álvarez Fonseca, A., & 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*, 33(3), 47-56.

Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior*, 4(6), 493-496.

- Cheong, Y. H., Chang, H. S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T., & Luan, S. (2002). Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant physiology*, 129(2), 661-677.
- Chung, H. S., Koo, A. J., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., Jones, A. D., & Howe, G. A. (2008). Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant physiology*, 146(3), 952-964.
- Cuevas-Velázquez, C. L., & Covarrubias-Robles, A. A. (2011). Las proteínas desordenadas y su función: una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. TIP. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 14(2), 97-105.
- Dicke, M., & Baldwin, I. T. (2010). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in plant science*, 15(3), 167-175.
- Erb, M., Meldau, S., & Howe, G. A. (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in plant science*, 17(5), 250-259.
- Felton, G. W., & Tumlinson, J. H. (2008). Plant–insect dialogs: complex interactions at the plant–insect interface. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 457-463.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual review of plant biology*, 59, 387-415.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant signaling & behavior*, 5(1), 26-33.
- Glauser, G., Dubugnon, L., Mousavi, S. A., Rudaz, S., Wolfender, J. L., & Farmer, E. E. (2009). Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M109.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205-227.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J., & Wasternack, C. (2000). Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene

oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *The Plant Journal*, 24(1), 113-126.

Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Miersch, O., & Wasternack, C. (2003). Enzymes of jasmonate biosynthesis occur in tomato sieve elements. *Plant and Cell Physiology*, 44(6), 643-648.

Heil, M., & Karban, R. (2010). Explaining evolution of plant communication by airborne signals. *Trends in ecology & evolution*, 25(3), 137-144.

Hilleary, R., & Gilroy, S. (2018). Systemic signaling in response to wounding and pathogens. *Current opinion in plant biology*, 43, 57-62.

Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 41-66.

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* 648, 215-225.

Jiménez, A. (2011). *Efecto matriz en la determinación de polifenoles en vino por UPLC-MS* (Trabajo de Fin de Estudios). Universidad de La Rioja, La Rioja, España.

Kim, T.H., Bohmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J.I. (2010). Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Absciscic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annual Review of Plant Biology* 61, 561-591.

Kamiya, Y. (2010) Plant Hormones: Versatile Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Biology* 61.

Klee, H., & Estelle, M. (1991). Molecular genetic approaches to plant hormone biology. *Annual review of plant biology*, 42(1), 529-551.

Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A. F., Altabella, T., & Galston, A. W. (2003). Polyamines in plants: an overview. *J Cell Mol Biol*, 2, 1-12.

- Koo, A. J., Gao, X., Daniel Jones, A., & Howe, G. A. (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 59(6), 974-986.
- Legendre, L., Rueter, S., Heinstein, P.F., & Low, P.S. (1993). Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol.* 102, 233-240.
- Li, L., Li, C., Lee, G. I., & Howe, G. A. (2002). Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6416-6421.
- Li, N., & Karin, M. (1999). Is NF- κ B the sensor of oxidative stress?. *The FASEB Journal*, 13(10), 1137-1143.
- Luna-Esquivel, E. N., Ojeda-Barrios, D. L., Guerrero-Prieto, V. M., Ruíz-Anchondo, T., & Martínez-Téllez, J. J. (2014). Poliaminas como indicadores de estrés en plantas. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 20(3), 283-295.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J.L., & Dietrich, R. A. (2000). The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. *Nature genetics*, 26(4), 403.
- McSteen, P., & Zhao, Y. (2008). Plant Hormones and Signaling: Common Themes and New Developments. *Developmental Cell* 14, 467-473.
- Meldau, S., Erb, M., & Baldwin, I. T. (2012). Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. *Annals of botany*, 110(8), 1503-1514.
- Mielke, K., Forner, S., Kramell, R., Conrad, U., & Hause, B. (2011). Cell-specific visualization of jasmonates in wounded tomato and Arabidopsis leaves using jasmonate-specific antibodies. *New Phytologist*, 190(4), 1069-1080.
- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., & Ohashi, Y. (1998). Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology*, 39(5), 500-507.

Normanly, J., & Bartelt, B. (1999). Redundancy as a way of life-IAA metabolism. *Current opinion in plant biology*, 2(3), 207-213.

Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J., & Ryan, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 13(1), 179-191.

Qaiser, H., Shamsul, H., & Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 14-25.

Reymond, P., & Farmer, E. E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current opinion in plant biology*, 1(5), 404-411.

Reymond, P., Weber, H., Damond, M., & Farmer, E. E. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(5), 707-719.

Robledo-Esqueda, M. N., Lozoya Saldaña, H., & Colinas León, M. T. (2012). Inducción de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.) contra *Phytophthora infestans* Mont. de bar y por fungicidas. *Interciencia*, 37(9).

Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2), 112-121.

Santner, A., & Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. *Nature* 459, 1071-1078.

Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57, 431-449.

Sano, H., Seo, S., Koizumi, N., Niki, T., Iwamura, H., & Ohashi, Y. (1996). Regulation by cytokinins of endogenous levels of jasmonic and salicylic acids in mechanically wounded tobacco plants. *Plant and cell physiology*, 37(6), 762-769.

- Sato, C., Aikawa, K., Sugiyama, S., Nabeta, K., Masuta, C., & Matsuura, H. (2011). Distal transport of exogenously applied jasmonoyl–isoleucine with wounding stress. *Plant and cell physiology*, 52(3), 509-517.
- Schilmiller, A. L., & Howe, G. A. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 369-377.
- Sequeira, J. C. (1992). Técnicas serológicas e bio-moleculares de diagnóstico de virus e de viróides em plantas. *Summa Phytopathol.*, 18, 79-110.
- Srivastava, L. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment*. Academic Press Elsevier science. London, 772 pp.
- Stennis, M.J., Chandra, S., Ryan, C.A., & Low, P.S. (1998). Systemin potentiates the oxidative burst in cultured tomato cells. *Plant Physiol.* 117, 1031-1036.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J., ... & Wasternack, C. (2003a). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato—amplification in wound signalling. *The Plant Journal*, 33(3), 577-589.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., ... & Wasternack, C. (2003b). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 51(6), 895-911.
- Sun, J. Q., Jiang, H. L., & Li, C. Y. (2011a). Systemin/jasmonate-mediated systemic defense signaling in tomato. *Molecular Plant*, 4(4), 607-615.
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in plant science*, 17(5), 260-270.
- Ton, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in plant science*, 14(6), 310-317.
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Motoyuki, A., & Matsuoka, M. (2007). Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58, 183-98.

- Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nature protocols*, 5(6), 986.
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16(1), 86.
- Walling, L. (2009). Adaptive defense responses to pathogens and insects. In: Loon LV ed. *Plant innate immunity*. Amsterdam, Elsevier.
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany*, 111(6), 1021-1058.
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel & Miersch, O. (2006). The wound response in tomato–role of jasmonic acid. *Journal of plant physiology*, 163(3), 297-306.
- Wu, J., Wang, L. & Baldwin, I. (2008) Methyl jasmonate-elicited herbivore resistance: does MeJA function as a signal without being hydrolyzed to JA?. *Planta* 227: 1161–1168.
- Zimmermann, M. R., Maischak, H., Mithöfer, A., Boland, W., & Felle, H. H. (2009). System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant Physiology*, 149(3), 1593-1600.