

# LA EMISIÓN DE FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA *a*: UNA HERRAMIENTA PARA LA DETECCIÓN DEL EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN EL APARATO FOTOSINTÉTICO DE LA PAPA

*Carolina Salazar  
María Teresa Pino  
Paulina Villagra*

La fotosíntesis se inicia cuando la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y carotenoides) que existen en las hojas de las plantas. Parte de la energía que absorben estos pigmentos es transferida como energía de excitación y se emplea en la producción ATP y NADPH, las cuales son esenciales en la síntesis de carbohidratos en la planta. Sin embargo, durante la fotosíntesis no toda la energía absorbida es utilizada para producir estos compuestos, parte de la energía se disipa como calor, y en menor grado se re-emite como fluorescencia. Esta distribución de la energía en los tres procesos ocurre simultáneamente, de tal forma que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultará en la disminución de los otros dos. Es por ello, que el estudio de la fluorescencia de la clorofila se considera una herramienta útil para distinguir diferentes efectos en la limitación de la fotosíntesis (Maxwell y Johnson, 2000).

La emisión de fluorescencia de los sistemas fotosintéticos cambia continuamente con el ambiente. Estrés ambiental como temperaturas extremas, sequía, cambios en la intensidad lumínica, salinidad, y otros afectan la función de los sistemas fotosintéticos de manera directa o indirecta, afectando por tanto a la emisión de fluorescencia.

Por ello, los cambios de la emisión de la fluorescencia, son útiles para estudiar los mecanismos de respuesta a este tipo de estrés incluso en forma temprana (González Moreno *et al.*, 2008; Roháček *et al.*, 2008). Sin embargo, su aplicación e interpretación requiere conocer la teoría de fluorescencia de clorofilas, conocer los instrumentos que permiten su medición y la elección correcta del protocolo a seguir.

## ¿CÓMO Y QUÉ SE MIDE EN LA FLUORESCENCIA DE CLOROFILA?

El análisis de fluorescencia de la clorofila tiene la ventaja de ser una técnica no destructiva, sencilla y de rápida respuesta. Para ello se utiliza un fluorómetro, un equipo capaz de medir la fluorescencia en vegetales y obtener una serie de parámetros que indican los diferentes fenómenos que ocurren a nivel de los fotosistemas en las hojas. Los sistemas más comunes de medición de la fluorescencia de la clorofila son el fluorómetro no modulado y el fluorómetro modulado. El fluorómetro no modulado tiene como referencia los estudios de Kaustky y colaboradores en los años 60's, en donde los cambios en fluorescencia por iluminación de hojas preadaptadas a oscuridad están cualitativamente correlacionados con cambios en la asimilación de CO<sub>2</sub> y en la tasa fotosintética (Maxwell y Johnson, 2000; Gonzalez Moreno *et al.*, 2008).

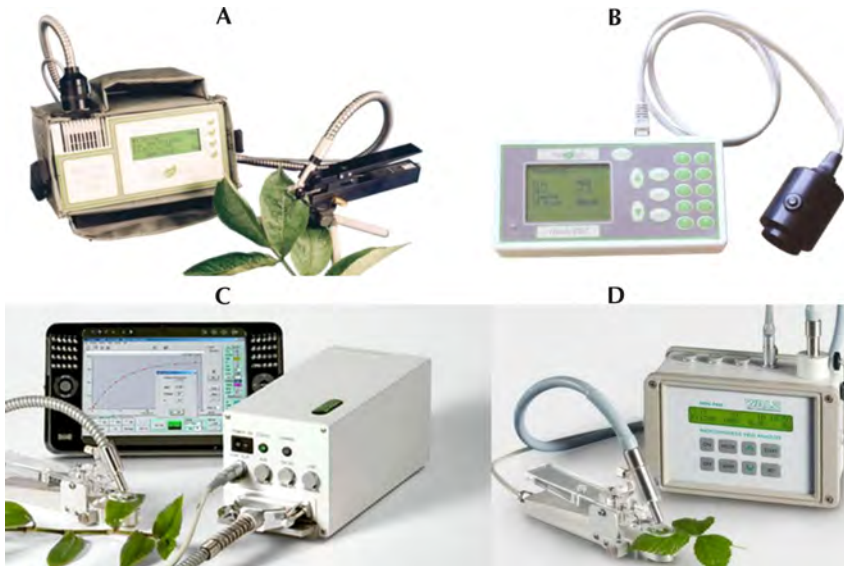
Cuando la hoja es adaptada a oscuridad, las quinonas (QA) oxidadas al máximo y los centros de reacción del PSII están abiertos, es decir, están en capacidad de realizar reducciones fotoquímicas de QA, luego de ser expuestas a un rayo de 0,1  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se produce un nivel mínimo de fluorescencia Fo, un pulso de luz rojo lejano que excita preferiblemente al fotosistema II (PSII) y remueve electrones de QA, se aplica antes de la medición de Fo; luego la hoja es expuesta a pulsos cortos de luz actínica de alta densidad de flujo fotónico (cientos de  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) de tal manera que QA llega a su máximo de reducción y máximo nivel de fluorescencia Fm. Los cen-

tros de reacción del fotosistema II (PSII) con la QA reducida están ahora “cerrados”. La diferencia entre  $F_m$  y  $F_o$  es definida como  $F_v$ , y la relación de  $F_v/F_m$  puede ser usada para estimar el rendimiento cuántico máximo de reducción de QA es decir de la fotoquímica del PSII. La relación  $F_v/F_m$  es un buen indicador de plantas expuestas a diversos estreses bióticos y abióticos cuando están en presencia de luz (Maxwell y Jonson, 2000; Baker, 2008, Brestic y Zivcak, 2013).

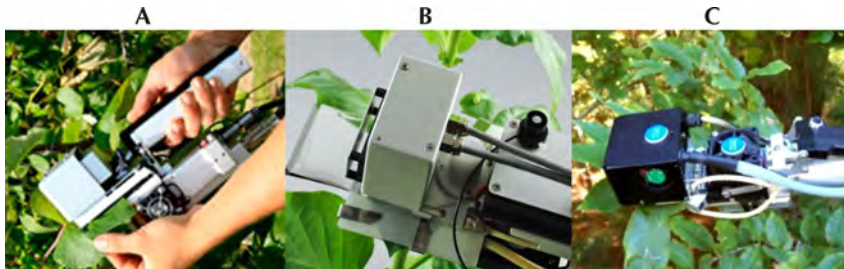
El fluorómetro modulado se basa en que una hoja en continua luz actínica tiene un nivel de fluorescencia  $F'$ . El cual aumenta a un nivel máximo de fluorescencia cuando la hoja es expuesta a un corto pulso de luz saturante que reduce al máximo la QA.

La diferencia entre  $F_m'$  y  $F'$  se denomina  $F_q'$  (aunque hay varias denominaciones como  $F_v'$ ). La relación  $F_q'/F_m'$  es teóricamente proporcional al rendimiento cuántico de la fotoquímica del PSII y este es equivalente al rendimiento cuántico del flujo lineal de electrones de los centros de reacción del fotosistema II. Por otra parte, y teniendo el cuidado necesario en las mediciones y características de la muestra a medir, se puede establecer una relación lineal entre la eficiencia de operación del PSII y el transporte lineal de electrones que utiliza la relación  $F_q'/F_m'$  para estimar la tasa de transporte de electrones no cíclico en el PSII. En ciertas circunstancias  $F_q'/F_m'$  es un buen indicador de cambios en el rendimiento cuántico de asimilación de  $CO_2$  por la hoja ( $\Phi CO_2$ ) pero no debe ser usada para estimar tasas absolutas de asimilación de  $CO_2$  (Baker, 2008; Brestic y Zivcak, 2013).

Existen varias compañías que fabrican fluorómetros, entre ellos están Hansatech Instruments (modelos Handy-PEA; M-PEA; FSM2) y Walz Company (modelos Mini-PAM; PAM 2500) (**Figura 6.1**). Actualmente, algunos equipos de medición de intercambio gaseoso poseen, de forma opcional, la posibilidad de añadir un fluorómetro que permite obtener los valores de intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofilas, en la misma medición (**Figura 6.2**).



**Figura 6.1.** Fluorómetros. A, B: FMS2 y Handy-PEA, respectivamente, de Hansatech Instruments. C,D: PAM 2500 y Mini-PAM, de Walz Company. Imágenes obtenidas desde páginas web de ([www.hansatech.com](http://www.hansatech.com) y [www.walz.com](http://www.walz.com))



**Figura 6.2.** Equipos de medición de intercambio gaseoso, con cabezal de fluorescencia (opcional) incorporado. A) Li-6400 XT LI-COR®. B) GFS3000 Walz Company. C) CIRAS 3 PPSYSTEM. Imágenes obtenidas desde páginas web ([www.licor.com](http://www.licor.com); [www.walz.com](http://www.walz.com) y [www.ppsystem.com](http://www.ppsystem.com))

## MEDICIÓN DE FLUORESCENCIA Y PARÁMETROS DE FLUORESCENCIA

Para la medición de fluorescencia se debe adaptar previamente las hojas a oscuridad durante 10-30 minutos. Para lo cual, los fluorómetros cuentan con pinzas (Figura 6.3) de medición en oscuridad que permiten luego del tiempo de aclimatación medir la fluorescencia en la superficie de la hoja. Posteriormente, la hoja debe ser iluminada con una luz de baja intensidad (que no produzca en la hoja disipación de energía por vías fotoquímicas), para no producir fluorescencia. De esta forma, se puede obtener el valor de fluorescencia basal en condiciones de oscuridad ( $F_o$ ) (Tambussi y Graciano, 2010). Si, llevamos este valor a lo antes descrito sobre los centros de reacción,  $F_o$  representa la fluorescencia cuando la totalidad de los centros de reacción del PSII están abiertos y el aceptor primario está oxidado (Roger y Weiss, 2001). A modo de ejemplo, un fluorómetro Hansatech, utilizando una luz modulada amarilla, provista por una luz LED, con una PPF de  $1,15 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , proporciona una luz en la superficie de la hoja que logra mantener la fluorescencia a nivel de  $F_o$  (Ögren y Baker, 1985).



**Figura 6.3.** Pinzas de adaptación a oscuridad adaptable a fluorómetros, según modelo. A) Walz Company. B) LI-COR®. C) Walz Company. D) Hansatech Instruments. Imágenes obtenidas desde páginas web ([www.licor.com](http://www.licor.com); [www.walz.com](http://www.walz.com) y [www.ppsystem.com](http://www.ppsystem.com))

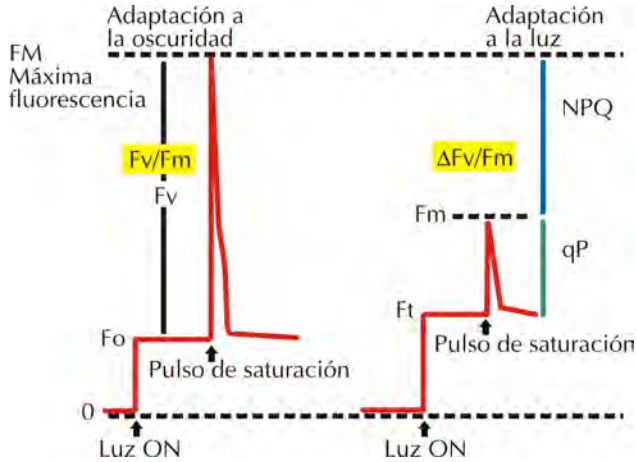
La hoja en oscuridad, si ha tenido la aclimatación suficiente, tiene los centros de reacción abiertos. Si se aplica un pulso de luz hiper-saturante, la fluorescencia alcanza un máximo, a lo que se denomina Fluorescencia máxima ( $F_m$ ). Este incremento desde  $F_o$  a  $F_m$ , se debe a que se produjo una saturación de la vía fotoquímica, producto del pulso de luz hiper-saturante, produciéndose el cierre

de aceptores primarios del PSII, es decir las QA (Quinona A) están reducidas y los centros de reacción cerrados (Tambussi y Graciano, 2010; Roger y Weiss, 2001). Si luego del pulso hiper-saturante, se ilumina la hoja con radiación fotosintéticamente activa (luz actínica continua), se produce una nueva señal de fluorescencia basal,  $F_s$ . Si se aplica un nuevo pulso de luz saturante, pero ahora las hojas no están en oscuridad y no tiene los centros de reacción abiertos completamente, se produce una nueva fluorescencia máxima, denominada  $F_m$  (Tambussi y Graciano, 2010). Finalmente, si se elimina la luz actínica y se aplica una luz de rojo lejano, se promueve la reoxidación de los aceptores de electrones, y se obtiene un valor de fluorescencia basal denominado  $F_o$  (Tambussi y Graciano, 2010; Gonzalez Moreno *et al.*, 2008). De lo antes descrito, podemos inferir que un Fluorómetro PAM como se denominas por las siglas de pulso, amplitud y modulación constan de cuatro fuentes de luz: (i) Luz roja de baja intensidad; (ii) pulsos de luz actínica de alta intensidad; (iii) luz actínica continua y (iv) luz rojo lejano. Además de un detector de fluorescencia para el registro de la fluorescencia emitida (Roháček *et al.*, 2008; Gonzalez Moreno *et al.*, 2008).

Los diferentes parámetros de fluorescencia (**Tabla 6.1**) que proporcionan los fluorímetros nos permiten evaluar si la planta está sufriendo algún tipo de estrés o pérdida de rendimiento antes de que tenga síntomas visibles.

**Tabla 6.1.** Parámetros básicos de fluorescencia calculados a partir de los datos obtenidos después de aplicar el método de pulso saturante (adaptado de Tambussi y Graciano 2010).

Parámetro	Abreviatura	Fórmula
Fluorescencia variable en oscuridad	Fv	$Fv = Fm - Fo$
Fluorescencia variable a la luz	Fv'	$Fv' = Fm' - Fo'$
Cambio de fluorescencia (provocado por el cierre del PSII)	$\Delta F' (= Fq')$	$Fq'^{\wedge} = Fm'^{\wedge} - Fs$



**Figura 6.4.** Representación esquemática de los parámetros de fluorescencia medidos en hojas previamente oscurecidas y posteriormente iluminadas utilizando la técnica de fluorescencia modulada. (Adaptado de Schreiber (1997) y de Schubert (2015)).

A partir, de los valores y cálculos básicos, se calculan variables funcionales, que hacen referencia al estado del fotosistema de la planta. Estos parámetros se detallan en la **Tabla 6.2**.

Considerando que el  $F_o$ , es la fluorescencia basal a oscuridad, donde los centros de reacción están abiertos; cuando ocurre un incremento en  $F_o$ , una menor cantidad de centros de reacción están abiertos, a pesar de la ausencia de luz. En este caso, es reconocido que frente a un estrés severo, se produce la activación de mecanismos de quenching no fotoquímico, reflejados en el valor del NPQ (Roháček *et al.*, 2008). Otra relación entre parámetros de fluorescencia es  $F_m/F_o$ , que dependen del potencial de agua de la hoja. Mientras bajo condiciones de sequía esta relación disminuye, hasta alcanzar valores de 1, las plantas al ser nuevamente regadas vuelven al estado óptimo con valores cercanos a 3 (Hansatech, 1996). Algunos estudios en otras especies, como la vid sugieren que  $F_s/F_o$  serían un buen método de detección temprana de estrés hídrico en la planta

**Tabla 6.2.** Parámetros de fluorescencia de clorofilas. Fórmulas de cálculo y observaciones sobre su relación con el funcionamiento de proceso fotosintético (Adaptado de Tambussi y Graciano 2010).

Parámetro	Abrev.	Fórmula	Observaciones
Rendimiento Fotoquímico máximo del PSII	Fv/Fm	$= (Fm - Fo)/Fm$	Indica la fracción de energía del total absorbida por los complejos antena que queda disponible luego de la disipación intrínseca a la antena. Se obtiene de hojas aclimatadas a oscuridad. En hojas maduras y sanas, los valores normales son cercanos a 0,8. Su disminución indicaría pérdida de la función fotosintética.
Rendimiento cuántico efectivo del PSII (Eficiencia real)	$\phi_{PSII}$	$= \Delta F'/Fm'$	Mide la proporción de luz utilizada en transporte de electrones con respecto a la luz absorbida. Valores entre 0 y 0,8. (Genty <i>et al.</i> , 1989).
Eficiencia fotoquímica efectiva o intrínseca del PSII	Fv'/Fm'	$= (Fm' - Fo')/Fm'$	Señala la eficiencia en la captura de excitación, por los centros abiertos del PSII. Una disminución de este parámetro sugiere que existe un nivel de disipación no térmica superior.
Quenching No Fotoquímico	NPQ	$= \frac{(Fm - Fm\Delta)}{Fm'}$	Señala la energía que es disipada como calor (Bilger y Björkman, 1990). Su valor en oscuridad es de 0, para plantas sanas su valor varía entre 0 y 4.
Quenching fotoquímico	qP	$= \frac{(Fm\Delta' - Fs)}{(Fm\Delta' - Fo\Delta')}$	Indica la proporción de centros abiertos del PSII. Es la estimación de la atenuación fotoquímica. Su valor es entre 0 (alta irradiancia) y 1 (oscuridad).
Tasa de transporte electrónico	ETR	$= \phi_{PSII}$ **PPDF x 0,5 a	Estimación de la tasa de transporte electrónico.

\*\*PPFD: Flujo fotónico fotosintético incidente; a: absorbancia (fracción de luz absorbida por la hoja; 0,84); 0,5: fracción de luz absorbida por el PSII. Es importante destacar, que al ser estos parámetros en su mayoría tasas, carecen de unidades.



e incluso podría ser útil como guía de riego (Flexas *et al.*, 2002). Por otra parte, el índice rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) ha sido definido como un estimador de la integridad del complejo PSII/LHC; este permanecería relativamente inalterado a bajos contenidos relativos de agua (RWC), y sería afectado sólo cuando las plantas experimentan estrés hídrico prolongado (Flagella *et al.*, 1998; Tambussi *et al.*, 2002; Rosenqvist y van Kooten, 2003). Además, el transporte de electrones (ETR), tiene valores relativamente altos a niveles bajos de RWC, y ETR decrece cuando la conductancia estomática cae a valores tan bajos como  $0.10-0.15 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Flexas *et al.*, 2002; Lawlor y Cornic, 2002).

## FLUORESCENCIA DE CLOROFILAS Y ESTRÉS ABIÓTICOS EN PAPAS

En papas, varios estudios han mostrado una asociación entre la emisión de fluorescencia y la respuesta a estrés hídrico (Wilcox y Ashley, 1982; Prange, 1986). En un estudio en papa (cv Desireé) en el que se evaluó el efecto del estrés osmótico por 24h con polietilenglicol (-0,3MPa), sugirió que los parámetros de fluorescencia de clorofilas proporcionan una mayor comprensión de los efectos del estrés osmótico en la fotosíntesis. Mientras, las plantas bajo estrés rápidamente disminuyeron su potencial hídrico y conductancia estomática, los valores transitorios de fluorescencia de clorofila ( $F_0$ ,  $F_p$  y  $F_T$ ) aumentaron, sugiriendo que los aceptores de electrones del PSII se redujeron más rápido que en PSI (Prange, 1986). De igual forma, Havaux (1993) señala que en papas (cv Kenebec) creciendo en condiciones de invernadero, las altas temperaturas y el estrés hídrico causaron una disminución de  $\phi P ((F_m - F_s)/F_m)$  respecto al control, con valores de 0,53 en plantas de papas sometidas sólo a estrés hídrico y con valores de 0,49 en plantas de papas sometidas a estrés hídrico y térmico. Finalmente, sugieren la siguiente secuencia de eventos en papas sometidas a estrés por altas temperaturas; inhibición del rompimiento de la molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  ( $>32^\circ\text{C}$ ), disminución de la eficiencia y alteración del flujo de electrones después de QA y PSI.

Zrust *et al.* (1994) evaluaron el efecto del estrés hídrico desde la plantación a inicio de la tuberización en dos cultivares de papas (Radka y Desireé). Los resultados mostraron una disminución en la tasa de fotosíntesis neta y en los rendimientos en conjunto con la disminución de la fluorescencia variable en oscuridad ( $F_v$ ) en hojas e un incremento de fluorescencia basal en condiciones de oscuridad ( $F_o$ ). Jefferies (1994) al evaluar el efecto del déficit hídrico en el cultivar de papas Maris Piper en condiciones de campo, mostró que un 62% de agua disponible en el suelo disminuyó la conductancia estomatosa, sin efectos significativos sobre el funcionamiento del PSII, ni en el balance entre el quenching fotoquímico (qP) y quenching no-fotoquímico (NPQ).

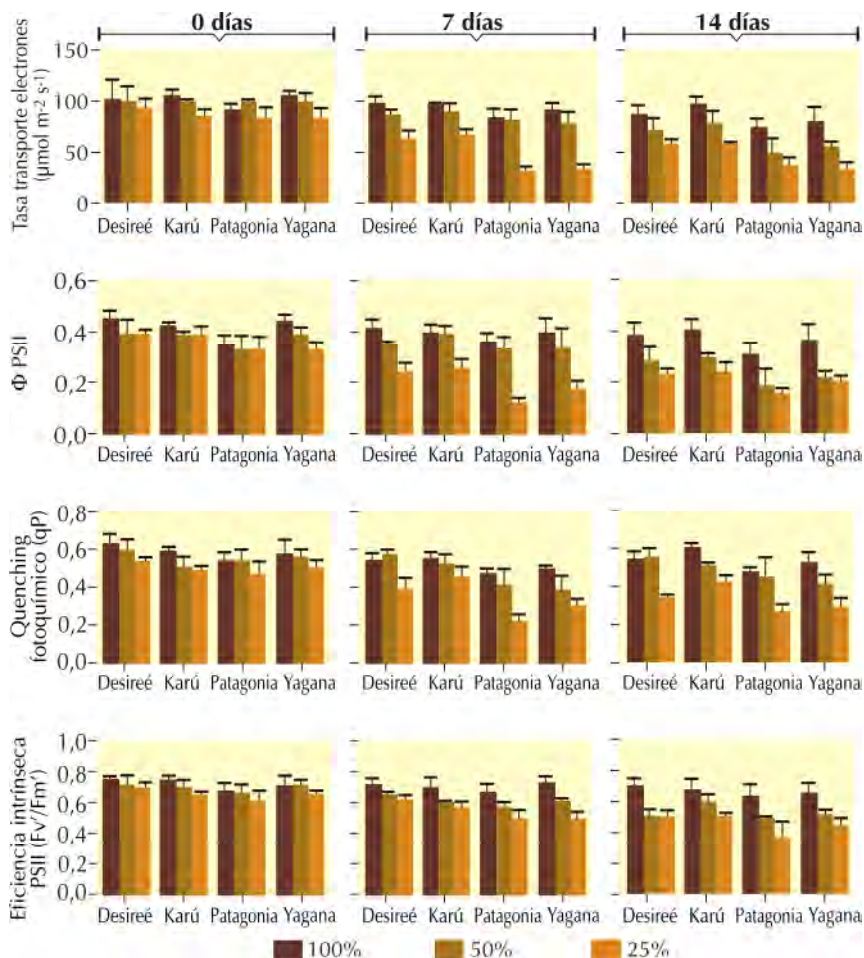
Por otra parte, Ranalli *et al.* (1997) evaluaron el efecto del estrés hídrico en la temperatura de la canopia y en la emisión de fluorescencia de Clorofila a, en el cultivar Desireé y en cinco líneas avanzadas de papas. Mientras en el tratamiento regado se mantuvo a una tensión de 50kPa a 15 cm de profundidad, en el tratamiento de déficit hídrico se cubrió el suelo con polietileno. Los resultados mostraron que mientras  $F_v/F_m$  disminuyó con déficit hídrico, la temperatura de la hoja incrementó. Sin embargo, observaron diferencias en la fluorescencia de clorofila y en la temperatura entre genotipos sometidos a déficit hídrico, sugiriendo que la respuesta varía entre genotipos.

Tourneux *et al.* (2003) evaluaron el efecto del déficit hídrico en varios cultivares de papa proveniente de los Andes de Bolivia en función del déficit hídrico relativo de la hoja, potencial hídrico de la hoja ( $RWD=100$ -contenido relativo de agua en la hoja), conductancia estomática y fluorescencia de la clorofila. Los resultados similares al estudio anterior muestran que la respuesta varía entre genotipos. Respecto a los parámetros de fluorescencia de clorofila,  $F_v/F_m$  sólo

se vió afectado cuando el RWD fue superior al 40%. Otro estudio sugirió que  $F_v/F_m$  no se relacionaría directamente con el rendimiento de papas bajo condiciones de sequía (Schafleitner *et al.*, 2007). Estudios recientes en papas indican que algunos parámetros de fluorescencia de clorofilas pueden ser un indicador rápido para estudiar la capacidad fotosintética bajo estrés hídrico (Anithakumari *et al.*, 2012). Básicamente las plantas de papas bajo condiciones óptimas obtuvieron valores  $F_v/F_m$  cercanos a 0.8. Sin embargo, bajo sequía este valor disminuyó, indicando pérdida de la función fotosintética. Este daño fue reversible, ya que al re-hidratar las plantas, estas lograron recuperar los valores de  $F_v/F_m$  óptimos, sugiriendo que el estrés hídrico en plantas de papa puede afectar el funcionamiento del fotosistema (Anithakumari *et al.*, 2012).

INIA Chile ha evaluado el efecto de tres tratamientos de estrés hídrico sobre ETR,  $\Phi$  PSII, qP, y  $F_v'/F_m'$  en cuatro genotipos de papas durante las últimas tres temporadas. Las plantas fueron sometidas desde tuberización a tres niveles de disponibilidad hídrica a nivel de suelo (100% de riego (control), 50% de riego y 25% de riego) bajo condiciones controladas de invernadero. Los genotipos más susceptibles a déficit hídrico desde el punto de vista del rendimiento por planta fueron los cultivares Patagonia y Yagana, además, todos los cultivares disminuyeron significativamente la mayoría de los parámetros de fluorescencia con estrés hídrico severo (25% de riego); particularmente después de dos semanas de estrés. Los resultados se muestran en la **Figura 6.5**.

En conclusión, es factible usar los parámetros de fluorescencia de clorofilas a en papas, con el fin de realizar un seguimiento frente a estrés abiótico. El principal problema que tiene esta metodología es el elevado precio de equipos fluorómetros y la escasez de personal capacitado para interpretar los datos que proporcionan.



**Figura 6.5.** Emisión de Fluorescencia de clorofila a en los cvs de papa Desireé, Karú, Patagonia, y Yagana, a los 0, 7 y 14 días bajo diferentes tratamientos de déficit hídrico controlado. Donde, ETR (Tasa electrónica de transporte);  $\Phi$ PSII (Eficiencia real del fotosistema II); qP (Quenching fotoquímico);  $F_v'/F_m'$  (Eficiencia intrínseca del PSII). Este experimento fue realizado en condiciones de invernadero ( $24 \pm 3^\circ\text{C}$ ) en INIA La Platina durante dos temporadas. Los tratamientos de estrés hídrico fueron 100% de riego (control), 50% de riego y 25% de riego, donde el control equivale al 100% de reposición de la evapotranspiración diaria.

## LITERATURA CONSULTADA

- Anithakumari, A. M., Nataraja, K. N., Visser, R. G., and van der Linden, C. G. (2012).** Genetic dissection of drought tolerance and recovery potential by quantitative trait locus mapping of a diploid potato population. *Molecular Breeding*, 30(3), 1413-1429.
- Brestic, M., and Zivcak, M. (2013).** PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. *In: Molecular Stress Physiology of Plants* (pp. 87-131). Springer India.
- Flagella, Z., Campanile, R. G., Stoppelli, M. C., De Caro, A., and Di Fonzo, N. (1998).** Drought tolerance of photosynthetic electron transport under CO<sub>2</sub>-enriched and normal air in cereal species. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 753-759
- Flexas, J., Escalona, J. M., Evain, S., Gulías, J., Moya, I., Osmond, C. B., and Medrano, H. (2002).** Steady-state chlorophyll fluorescence (Fs) measurements as a tool to follow variations of net CO<sub>2</sub> assimilation and stomatal conductance during water-stress in C3 plants. *Physiologia Plantarum*, 114(2), 231-240.
- Hansatech Instruments Ltd. (1996).** An Introduction to Fluorescence Measurements with the Plant Efficiency Analyser (PEA). Pentney, Norfolk, England: Hansatech.
- Havaux, M. (1993).** Characterization of thermal damage to the photosynthetic electron transport system in potato leaves. *Plant Science*, 94(1), 19-33.
- Jefferies, R. A. (1994).** Drought and chlorophyll fluorescence in field-grown potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, 90(1), 93-97. doi: 10.1111/j.1399-3054.1994.tb02197.x
- Lawlor, D. W., and Cornic, G. (2002).** Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), 275-294. doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x

- Maxwell, K., and Johnson, G. N. (2000).** Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.
- Gonzalez Moreno, S. G., Vela, H. P., and Alvarez, M. O. S. (2008).** La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-129.
- Ögren, E., and Baker, N. R. (1985).** Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light. *Plant, Cell and Environment*, 8(7), 539-547. doi:10.1111/j.1365-3040.1985.tb01691.x
- Prange, R. K. (1986).** Chlorophyll fluorescence in vivo as an indicator of water stress in potato leaves. *American Journal of Potato Research*, 63(6), 325-333.
- Ranalli, P., Candilo, M. D., and Bagatta, M. (1997).** Drought tolerance screening for potato improvement. *Plant Breeding*, 116(3), 290-292. doi:10.1111/j.14390523.1997.tb00999.x
- Roger, M. J. R., and Weiss, O. (2001).** Fluorescence techniques. In: Handbook of Plant Ecophysiology Techniques SE - 10. Reigosa Roger, M. (Ed). *Springer Netherlands*, 155–171.
- Roháček, K., Soukupová, J., and Barták, M. (2008).** Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. Plant Cell Compartments-Selected Topics. *Research Signpost, India*, 661(2), 41–104.
- Rosenqvist, E., and van Kooten, O. (2003).** Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. In: Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology, DeEll JR, and Tioonen. PMA., (Eds). *Kluwer Academic Publishers, Boston*, 31–77.

- Schafleitner, R., Gutierrez, R., Espino, R., Gaudin, A., Pérez, J., Martínez, M., Domínguez, A., Tincopa, L., Alvarado, C., Numberto, G., and Bonierbale, M. (2007).** Field screening for variation of drought tolerance in *Solanum tuberosum* L. by agronomical, physiological and genetic analysis. *Potato Research*, 50(1), 71-85.
- Schreiber, U. (1997).** *Chlorophyll Fluorescence and Photosynthetic Energy Conversion*. Heinz Walz GmbH, Effeltrich. 73 pp.
- Schubert, N. (2015).** FOTOBIOLOGÍA. In <http://slideplayer.es/slide/2737423/> (último acceso diciembre 2015).
- Tambussi, E. A., Casadesus, J., Munné-Bosch, S., and Araus, J. L. (2002).** Photoprotection in water-stressed plants of durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum*): changes in chlorophyll fluorescence, spectral signature and photosynthetic pigments. *Functional Plant Biology*, 29(1), 35-44.
- Tambussi, E., and Graciano, C. (2010).** La fluorescencia modulada de la clorofila: método del pulso saturante. In: *Técnicas de Medición en Ecofisiología Vegetal*, Fernández, M.E. and Gyenge, J.E. (Eds), INTA. Argentina, 119–126.
- Tourneux, C., Devaux, A., Camacho, M., Mamani, P., and Ledent, J. F. (2003).** Effects of water shortage on six potato genotypes in the highlands of Bolivia (I): morphological parameters, growth and yield. *Agronomie*, 23(2), 169-179.
- Wilcox, D. A., and Ashley, R. A. (1982).** The potential use of plant physiological responses to water stress as an indication of varietal sensitivity to drought in four potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *American Potato Journal*, 59(11), 533-545.
- Zrust, J., Vacek, K., Hála, J., Janácková, I., Adamec, F., Ambroz, M., Dian, J., and Vacha, M. (1994).** Influence of water stress on photosynthesis and variable chlorophyll fluorescence of potato leaves. *Biologia Plantarum*, 36(2), 209-214.