

## ESTRÉS VEGETAL

María Dina García, cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora. 1998.

### INTRODUCCION Y CONCEPTO.

En los últimos 10 años se incrementó enormemente el número de publicaciones científicas que aparecieron en revistas de botánica, fisiología vegetal, ecofisiología y bioquímica vegetal relacionadas con el estrés vegetal y su detección.

La mayoría de los autores usan el término de "estrés vegetal" en un sentido muy amplio, lo cual justifica establecer una unificación del concepto de estrés vegetal. Esto es correcto ya que una multitud de agentes de estrés con diferentes modos de acción pueden inducir, además de efectos muy específicos, una respuesta igual o muy similar en la planta. Las plantas no tienen muchas posibilidades de respuesta ante un estrés, pero además de una aclimatación específica, responden en general con un crecimiento o respuesta de adaptación del tipo alta-luminosidad o baja-luminosidad. De la literatura se desprende, sin embargo, que varios autores consideran casi cada pequeña modificación y cambio de vías metabólicas, respuestas de crecimiento y patrones de desarrollo de la planta como respuestas y efectos del estrés. En este sentido, los términos "estrés vegetal" y "respuesta al estrés" son exagerados. El término estrés no debería aplicarse a meros y rápidos reajustes del flujo metabólico, por ejemplo a la tasa fotosintética o de respiración o transpiración inducidos por cambios en la densidad de flujo fotónico (luz de sol  $\leftrightarrow$  nubosidad), una disminución en la temperatura o un incremento en la humedad del aire. Las plantas están aclimatadas a tales disparadores del metabolismo celular y actividades fisiológicas que ocurren frecuentemente y responden de manera flexible a las condiciones ambientales cambiantes. Además, los cambios diurnos en las actividades metabólicas, patrones de crecimiento y división celular que se encuentran regularmente en los cambios día - noche en el atardecer y noche - día en la mañana, no representan efectos de estrés, y pueden ser considerados como una reordenación en las actividades metabólicas y de crecimiento de acuerdo a la ocurrencia de ciertos procesos metabólicos preferentemente durante el día o la noche. Además, las plantas no sólo responden a cambios ambientales mediante una rápida aclimatación, sino por adaptaciones particulares a largo plazo, por ejemplo el tamaño y grosor de la hoja, la densidad estomática, la estructura y función de los cloroplastos, los niveles enzimáticos ya sea con alta o baja luminosidad durante el crecimiento. De acuerdo con el tipo y naturaleza de las aclimataciones, éstas pueden tener lugar entre 1 o 2 días hasta una semana. Con tales respuestas de adaptación las plantas pueden evitar los límites impuestos por el estrés y adaptarse de una manera óptima a condiciones ambientales nuevas y cambiantes.

Las plantas a menudo están expuestas a eventos de estrés repentinos o a largo plazo los cuales reducen la actividad celular y el crecimiento de las plantas al mínimo, a pesar de su capacidad para una rápida aclimatación de los flujos metabólicos y otros tipos de respuestas de adaptación más lentas así como ciertos mecanismos de tolerancia al estrés. Esto puede llevar a un daño severo y eventualmente causar la muerte celular si los mecanismos para enfrentar o reparar el estrés se ven demasiado exigidos. Existen muchos factores naturales o antropogénicos de estrés los cuales, dependiendo de su intensidad y duración, pueden causar daño a las plantas. Los factores de estrés también pueden ser clasificados como bióticos o abióticos. Con el fin de diferenciar entre respuesta regular de aclimatación y adaptación, por un lado, y efectos del estrés, factores causantes de estrés y limitaciones impuestas por el estrés, por otro lado, se necesita un concepto unificado general de estrés vegetal. En los pasados 60 años, los conceptos de estrés vegetal han sido sucesivamente desarrollados por varios autores. Este concepto parece ser apenas conocido por la comunidad botánica, aunque el término estrés está siendo usado en el presente en muchas publicaciones. Durante la primer "Vegetation Stress Conference", en Munich, junio de 1995, el concepto de estrés vegetal actual fue presentado como una charla introductoria y también se expone aquí al comienzo del volumen sobre estrés vegetal. Esta revisión no solamente examina los diferentes ensayos sobre estrés sino que también da algunos ejemplos de detección de estrés en plantas, por ejemplo las técnicas no destructivas de fluorescencia de la clorofila.

### Definición de estrés vegetal

H. Selye (1936, 1956) desarrolló el concepto general de estrés para organismos vivos, que puede ser resumido en los 2 conceptos siguientes: "Todos los agentes pueden actuar como estresantes, produciendo estrés y una acción específica" y "Existen respuestas específicas y respuestas generales no específicas para cada estrés". J. Levitt (1980) definió estrés como: "Cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para los organismos vivos".

Sobre la base de varias observaciones en plantas, y también bajo la inclusión del concepto original de resistencia a la sequía de Stocker (1932 y 1947), el ecofisiólogo vegetal Larcher (1987) resumió el concepto de estrés vegetal y enunció que “Todos los organismos experimentan estrés, aunque el camino mediante el cual lo expresan difiere de acuerdo a su nivel de organización”. A partir del punto de vista botánico, él describió estrés como “un estado en el cual las demandas crecientes sobre una planta tienden a una desestabilización inicial de las funciones, seguido por una normalización y resistencia mejorada” y también “Si se exceden los límites de tolerancia y la capacidad de adaptación se satura, el resultado puede ser un daño permanente e incluso la muerte”. Larcher (1987) manifestó que “el estrés contiene elementos destructivos y constructivos y que es un factor de selección como así también una fuerza conductora para mejorar la resistencia y evolución adaptativa.”

### **Eu-estrés y dis-estrés**

Lichtenthaler (1988) siguió con el propósito que W. Larcher le había dado en una discusión personal y extendió el concepto de estrés vegetal diferenciando entre eu-estrés y dis-estrés, en cuyo caso eu-estrés es un estrés activador y estimulante y un elemento positivo para el desarrollo de la planta, mientras que dis-estrés es un estrés severo y real que causa daño, por lo tanto tiene un efecto negativo sobre la planta y su desarrollo. Como formulara Lichtenthaler (1988): “un estrés suave puede activar el metabolismo celular, incrementar la actividad fisiológica de una planta, y no causar ningún efecto dañino aún a largo plazo. Tal estrés suave y estimulante es favorable para la planta”. En cualquier caso uno debe considerar que el estrés es un tema dependiente de la dosis. A dosis bajas convenientes, un agente estresante, por ejemplo un herbicida, puede estimular el metabolismo y crecimiento celular, como se ha observado en el caso de varios herbicidas y reguladores del crecimiento vegetal. Entonces, muy bajas dosis de un agente de estrés y de un xenobiótico pueden, de hecho, tener el efecto opuesto a las dosis altas. Pero la generalización de este concepto para todos los agentes estresantes aún debe ser probada. Sin embargo, a una concentración 10 ó 100 veces mayor, los mismos xenobióticos causarán daño a la planta e inducirán senescencia temprana y finalmente la muerte si el agente de estrés no se retira. Tales concentraciones dañinas del agente de estrés y todas las otras limitaciones causadas por estrés a altas dosis son negativas para la fisiología y desarrollo de las plantas y por lo tanto representan un estrés definido en el término de dis-estrés. Dentro de este concepto, el estrés real aparece cuando se excede un cierto umbral de un agente estresante, el cual ya no puede ser compensado por la planta. Cuando este umbral de tolerancia al estrés o resistencia al estrés se ha pasado, un corto período de alto nivel de estrés induce el mismo daño que un largo período de bajo nivel de estrés. La aplicación de la "relación dosis del agente de estrés-efecto del estrés" parece obvia, pero no ha sido probada en todos los casos, por lo tanto se requiere más investigación en el tema.

Uno debería tener en mente que la transición entre eu-estrés y dis-estrés es fluida. La posición relativa del umbral de tolerancia al estrés depende no solamente de la especie vegetal sino también del tipo de agente estresante aplicado y de la predisposición de la planta, esto es la condición de crecimiento y vitalidad antes de que el agente de estrés comience a actuar. Las plantas también difieren en su capacidad de detectar el estrés. Esto puede ser ilustrado con el ejemplo de la aplicación de herbicidas en cultivos agrícolas con el fin de eliminar malezas. Muchos cultivos poseen la capacidad de detoxificar los herbicidas mediante la introducción de un grupo hidroxilo al anillo aromático del herbicida, el cual es entonces glicosilado y convertido en un compuesto inactivo que ya no puede unirse a su proteína de reconocimiento. Sin embargo, esta capacidad detoxificadora a menudo no está presente en las malezas a ser controladas por lo que causa su muerte. En la figura 1 se muestra el ejemplo de la aplicación del herbicida bentazón, el cual bloquea el transporte fotosintético de electrones mediante su unión con la proteína de ligamiento la  $Q_B$  en el Fotosistema II. Luego de la aplicación de bentazón, la tasa fotosintética inicialmente decae en las plantas de maíz y trigo tanto como en las malezas *Galium* y *Sinpsis*. Luego de varias horas, la capacidad fotosintética de maíz y trigo se restablece, ya que ambas especies poseen la capacidad de hidroxilar, glicosilar y detoxificar el bentazón. Como consecuencia, las malezas poseen una tolerancia mucho menor al estrés que las plantas de maíz y trigo, las cuales poseen la vía metabólica capaz de detoxificar al herbicida.

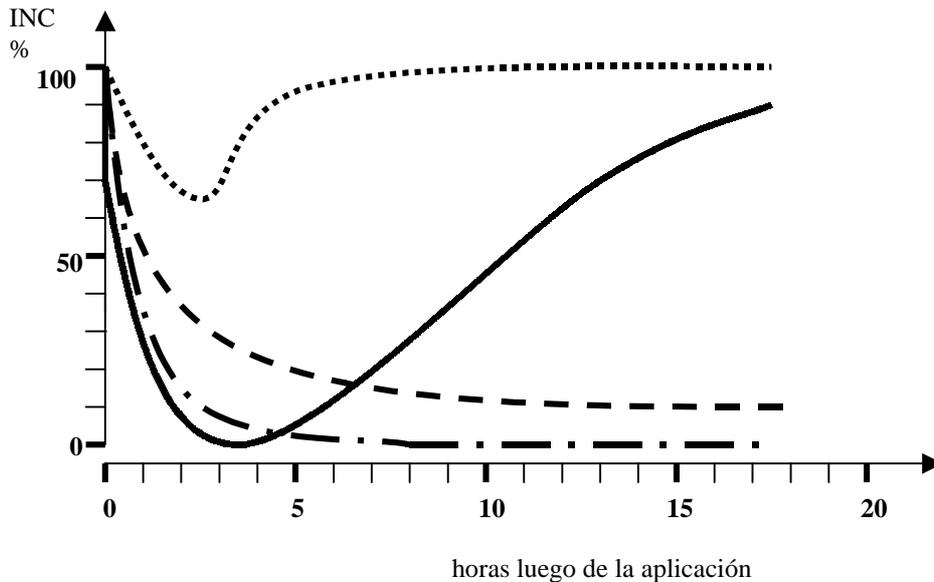
## Concepto de estrés en física y botánica

De acuerdo con la definición física, los significados de los términos estrés, tensión y daño son los siguientes:

Estrés: es un estado de la planta bajo la condición de una fuerza aplicada (causa)

Tensión o deformación: es la respuesta al estrés y a la fuerza aplicada a la planta (esto es la expresión o efecto del estrés antes del daño).

Daño: es el resultado de un estrés demasiado alto, el cual ya no puede ser compensado.



**Figura 1.** Inhibición de la asimilación fotosintética en plantas de cultivos de maíz y trigo y de las malezas *Galium* sp. y *Sinapsis* sp., luego de pulverizar las hojas con el herbicida bentazón en dosis equivalentes a  $1 \text{ kg ha}^{-1}$ .

..... MAIZ  
———— TRIGO  
- - - - GALIUM  
- . - . SINAPSIS

En botánica y fisiología vegetal, el término tensión se usa raramente y a menudo no se conoce. Tensión normalmente se conoce como respuestas al estrés. Sobre la base del concepto de estrés en física, queda claro que puede haber estrés y tensión en plantas, y que un daño no necesariamente ocurre aún cuando la planta sufre largos períodos de estrés y continua tensión. Con una tensión específica (y limitada vitalidad) la planta puede sobrevivir también bajo continuas limitaciones por estrés, aunque lo hace con actividades metabólicas y tasas de crecimiento muy reducidas. Por ejemplo, en la Northern Black Forest en Herrenalb, un pino (*Pinus silvestris* L.) de 170 años de edad crece en el portal y paredes de la iglesia de un monasterio Románico primitivo, aproximadamente 4 m sobre el suelo, pero sus raíces se encuentran solamente en las rocas de esta pared, hasta 2 m sobre el suelo y no tienen acceso al suelo ni al agua. Por lo tanto, bajo continuo estrés, (principalmente estrés hídrico) y tensión, este pino funcionó de manera tal que creció hasta los 9 m de altura en los 170 años y visualmente aparece como un árbol totalmente intacto y sano. Las limitaciones del crecimiento debido a esta ubicación están documentadas por muchas menos agujas en el año, tanto como por ramificaciones más cortas y finas, en comparación con pinos que crecen en mejores condiciones. La reducción del área de la hoja o aguja, o sea de la superficie de transpiración, es uno de los principales mecanismos para superar el estrés hídrico que se ha encontrado en árboles de hoja ancha y coníferas.

## Las diferentes fases inducidas por el estrés

En base al concepto original de estrés de Selye (1936,1956) y tomando en cuenta los resultados de Stocker (1932, 1956), uno debe diferenciar tres fases en las respuestas de las plantas al estrés, a las cuales ha sido agregada una cuarta respuesta por Lichtenthaler (1988). Antes de la exposición al estrés las plantas se encuentran en una situación fisiológica estándar, la cual es un óptimo dentro del conjunto de límites impuestos por las condiciones de crecimiento, luz y aporte de minerales del lugar. Los agentes estresantes o eventos complejos de estrés tenderán a las tres fases de respuesta y, por último, a la fase de regeneración, luego de quitar el agente de estrés, si el daño no ha sido demasiado severo. Las siguientes son las cuatro fases consecutivas:

### 1. Fase de respuesta: reacción de alarma

(Al principio del estrés)

- Desviación de la norma funcional
- Disminución de la vitalidad
- Los procesos catabólicos exceden el anabolismo

### 2. Fase de restitución: estado de resistencia

(Continúa el estrés)

- Proceso de adaptación
- Proceso de reparación
- Rustificación (reactivación)

### 3. Fase final: estado de agotamiento

(estrés a largo plazo)

- Intensidad del estrés demasiado alta
- Sobrecarga de la capacidad de adaptación
- Enfermedad crónica o muerte

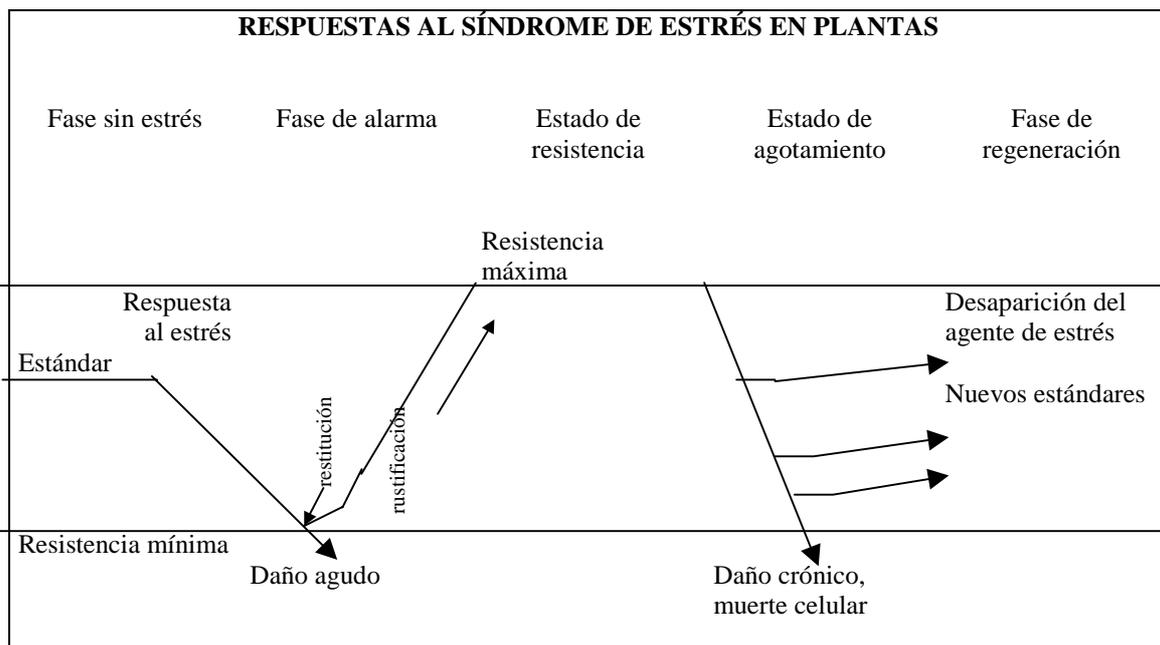
### 4. Fase de regeneración: regeneración parcial o completa de la función fisiológica cuando el agente estresante desaparece y el daño no fue demasiado grave.

Al comienzo del estrés las plantas reaccionan con una disminución de varias funciones fisiológicas, tales como el funcionamiento de la fotosíntesis, transporte y acumulación de metabolitos y/o absorción y translocación de iones. Debido a esta disminución de las actividades metabólicas, las plantas se desvían de su **fisiología estándar normal** y declina su vitalidad. En las plantas que no poseen mecanismos de tolerancia al estrés o cuyos mecanismos de tolerancia son escasos, rápidamente ocurrirá daño agudo, por lo tanto tendrán una **resistencia mínima** baja (figura 2).

Durante esta fase de alarma la mayoría de las plantas activarán, sin embargo, sus mecanismos de enfrentamiento al estrés mediante aclimataciones rápidas de sus flujos metabólicos y por activación de sus procesos de reparación y adaptaciones metabólicas y morfológicas a largo plazo. Esta fase también se conoce con el nombre de **síndrome de alarma general** (SAG). El SAG también puede valer para el síndrome de aclimatación general o síndrome de adaptación general. Los procesos de reparación y adaptaciones no solamente tenderán a la **restitución** de las funciones fisiológicas previas sino también a una rustificación de las plantas mediante el establecimiento de **un nuevo estándar fisiológico**. Este es un estado óptimo de fisiología o nuevo estándar fisiológico bajo las condiciones ambientales cambiadas, el cual corresponde al **máximo de resistencia** de las plantas (Figura 2). Ante un largo período de estrés y una dosis que provoca una sobrecarga de los mecanismos de enfrentamiento al estrés, el estado de agotamiento (fase final) muestra de qué manera la fisiología y vitalidad se pierden progresivamente. Esto causa daño y finalmente muerte celular. Sin embargo, cuando los agentes de estrés se quitan en el momento justo antes de que el proceso de senescencia se torne dominante, las plantas se regenerarán y ajustarán a nuevos estándares fisiológicos (**fase de regeneración**). El momento y **estado de agotamiento** en que los agentes estresantes se remueven define el nuevo estándar fisiológico hacia el cual se moverán las plantas, entre el mínimo y máximo de resistencia (Fig. 2).

El período que la planta permanezca en el nuevo estándar fisiológico depende de factores externos e internos. En plantas a campo, este es definitivamente no demasiado largo. Los cambios endógenos en el programa de desarrollo de las plantas siempre han estado asociados con cambios en su programa fisiológico y actividad, lo cual resulta, nuevamente, en un nuevo estándar fisiológico. Además, los siguientes eventos de estrés se harán visibles rápidamente y estos requieren nuevamente una reordenación del estándar fisiológico de la planta a un nuevo "óptimo" dentro del conjunto de posibilidades limitadas por las restricciones del estrés. Uno podría pensar que la exposición de las plantas al estrés es un evento

común, que puede ocurrir diariamente, ya que existen muchos agentes que causan estrés, los cuales a menudo actúan simultáneamente. Por lo tanto, el estrés y la tensión son eventos rutinarios en la vida de una planta. El hecho de que la planta se encuentre bajo estrés y tensión continuos, sin embargo, no significa que necesariamente deba ocurrir un daño. Si el estrés no es demasiado largo en duración o alto en intensidad, las plantas se orientarán ellas mismas dentro del rango marcado por el **máximo y mínimo** de resistencia (Fig. 2), y en tales casos los síntomas de daño no se detectan. Con respecto a tales hallazgos se debe diferenciar entre la detección del estrés y la tensión por un lado y la detección de síntomas claros de estrés por otro lado. Ambos procesos pueden requerir diferentes métodos de detección, ya que los métodos de detección de daños pueden no permitir controlar el estrés y la tensión en plantas. Si se quiere tener medida del estrés y tensión con el fin de evitar daño y garantizar un crecimiento y rendimiento óptimos, no se debe esperar hasta que los síntomas de daño se detecten visualmente, sino responder mucho antes. Esto requiere una detección temprana del estrés y la tensión en plantas.



**Figura 2.** Concepto general de secuencias de fases y respuestas inducidas en plantas por exposición al estrés. Las plantas que crecen en condiciones fisiológicas estándar responderán y combatirán el estrés. Luego de la remoción del agente de estrés, se pueden alcanzar nuevos estándares fisiológicos que dependerán tanto del momento de remoción del estrés como de la duración e intensidad del estrés.

### Restricciones impuestas por el estrés y agentes de estrés.

Existen varios eventos causantes de estrés y una multitud de agentes de estrés durante el ciclo de vida de las plantas. Los diferentes tipos de factores de estrés que actúan sobre las plantas terrestres se listan en la tabla 1, agrupados en naturales y antropogénicos. También es válido clasificar los factores de estrés en bióticos y abióticos. Con respecto a la nueva declinación en gran escala de árboles y bosques que se detectó en 1983 en el hemisferio Norte (Europa, USA, Rusia, China) y que aún está en progreso, fue interesante contrastar los factores antropogénicos de estrés (muchos de los cuales aparecieron en los últimos 40 años) contra muchos factores de estrés natural bióticos y abióticos, a los cuales estuvieron expuestos los árboles durante un largo tiempo. Uno debe considerar que los factores de estrés listados en la tabla 1 raramente actúan en forma individual y separadamente sobre la planta. En general, varios factores de estrés actúan simultáneamente, por ejemplo la combinación frecuente de estrés por calor, agua y alta irradiancia que se produce en períodos secos, soleados y calurosos durante el verano. Además, a menudo actúan factores primarios de estrés o eventos de estrés que reducen considerablemente la vitalidad de las plantas, tales como contaminación del aire seguidos por factores secundarios de estrés,

tales como coleópteros de la corteza u hongos específicos, los cuales disminuyen aún más la vitalidad de la planta y pueden eventualmente llevar a volcar un árbol.

Tabla 1. Lista de factores de estrés natural y antropogénico que actúan sobre la vegetación terrestre.

- I. Factores naturales de estrés:**
- **Alta irradiancia** (fotoinhibición, fotooxidación),
  - **Calor** (incremento de la temperatura),
  - **Bajas temperaturas** (enfriamiento),
  - **Heladas inesperadas y tardías,**
  - **Falta de agua** (problemas de desecación),
  - **Deficiencia natural de minerales** (p. Ej. deficiencia de nutrientes),
  - **Largos períodos de lluvia,**
  - **Insectos,**
  - **Patógenos virales, fúngicos y bacterianos.**
- II. Factores antropogénicos de estrés:**
- **Herbicidas, pesticidas y fungicidas,**
  - **Contaminantes del aire** (p. Ej. SO<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>),
  - **Ozono (O<sub>3</sub>) y smog fotoquímico,**
  - **Formación de especies de oxígeno altamente reactivo** (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),
  - **Fotooxidantes** (p. Ej. peroxiacilnitratos),
  - **Lluvia ácida, humo ácido, rocío ácido,**
  - **pH ácido del suelo y agua,**
  - **Deficiencia mineral** del suelo, a menudo inducida por la lluvia ácida (deficiencia de cationes K, Mg, Ca, a menudo Mn y a veces Zn),
  - **Exceso de Nitrógeno** (depósitos secos y húmedos de NO<sub>3</sub>),
  - **Acumulación de metales pesados** (cadmio, plomo),
  - **Sobreproducción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,**
  - **Incremento de radiación UV,**
  - **Incremento del nivel de CO<sub>2</sub> y cambio global del clima.**

### Adaptación a la luz y tolerancia al estrés

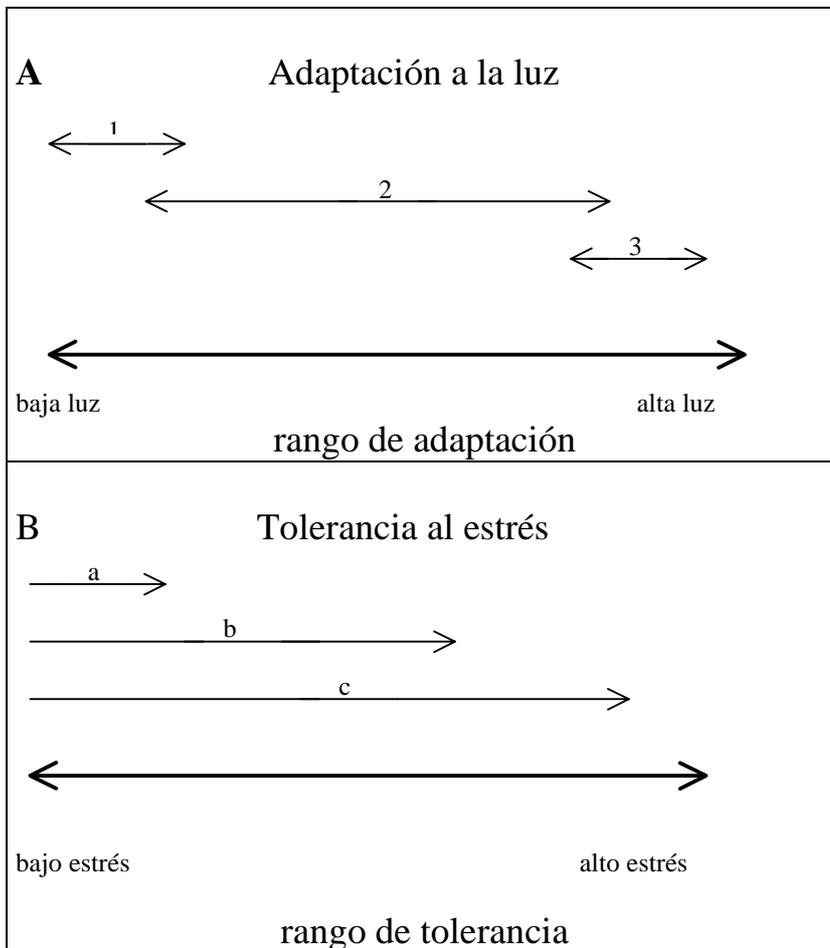
Las plantas pueden adaptar su morfología foliar tanto como su aparato fotosintético a la intensidad de luz incidente. Esta respuesta de adaptación se visualiza mejor en la formación de hojas de sol (alta irradiancia) y de sombra (baja irradiancia) en los árboles, las cuales no solo poseen diferente morfología y composición química sino también diferentes tasas de fotosíntesis. Las plantas de sol y las hojas de sol exhiben un área foliar menor (menor tasa de transpiración) y son más gruesas (p. ej. , tienen más largas las células del parénquima en empalizada, o dos filas de células en empalizada como en el árbol de haya) que las hojas sombreadas o las hojas de plantas de sombra. Las plantas y hojas de sol poseen cloroplastos característicos, con mayores tasas de conversión cuántica fotosintética y de asimilación neta de CO<sub>2</sub> y también un mayor punto de compensación luz y un mayor punto de saturación de luz de todo el proceso fotosintético. Los cloroplastos tipo sol o alta luz poseen mucho menores cantidades de las proteínas LHCP de las clorofilas a/b captadoras de luz, un menor grado de apilamiento de los tilacoides, menos tilacoides por cloroplasto, pero más cadenas de transporte de electrones y centros de reacción con relación a la clorofila total, comparados con los cloroplastos tipo sombra. Los últimos, en cambio, exhiben apilamientos de grana mucho más altos y anchos y han invertido en una gran antena captadora, lo cual compensa la disminución de luz en su ubicación sombreada o de baja irradiancia.

La modificación de hojas y cloroplastos tipo sol o tipo sombra es una verdadera respuesta de adaptación de las plantas. La modificación de hoja de sol y de sombra sólo puede ser expresada durante el crecimiento de la hoja, pero la adaptación de la ultraestructura del cloroplasto y de la función fotosintética en respuesta a una condición de alta luz (sol) o baja luz (sombra) durante el período de crecimiento se puede producir a lo largo de todo el período vegetativo y tarda alrededor de una semana la conversión de completa de cloroplastos de sol en cloroplastos de sombra y *viceversa*. Estas adaptaciones ya sean a alta o baja irradiancia, tienen sentido desde un punto de vista fisiológico. Las plantas de sol y las hojas de sol están mejor adaptadas a una exposición a altas irradiancias que las plantas

y hojas de sombra. Las hojas de sol con una exposición extrema a la luz plena del sol pueden reducir sus proteínas LHC a muy bajas cantidades lo cual evita la absorción de luz excesiva que no podría ser utilizada para la conversión cuántica fotosintética.

En otras palabras, las plantas de sol y las hojas de sol están mucho mejor protegidas contra el estrés producido por altas irradiancias que las plantas u hojas de sombra. Debido a una cutícula más gruesa, más flavonoides en su epidermis, etc., ellas están también mejor protegidas contra el estrés o daño producido por las radiaciones UV-A y UV-B, como se muestra por medio del espectro de excitación fluorescente. Esto indica que la adaptación de las hojas y cloroplastos a alta luz está también asociada con una mayor tolerancia al estrés.

La capacidad de adaptación de las plantas a la luz está determinada genéticamente. Muchas plantas crecen en la sombra de otras o en lugares con baja irradiancia y se llaman "plantas de sombra". Su capacidad de adaptación es relativamente baja y ellas no pueden crecer o directamente no sobreviven a pleno sol en el campo (plantas del grupo 1 en la figura 3A). Otras plantas, la mayoría de los cultivos, son plantas de sol, las cuales necesitan una alta irradiancia para tener un razonable crecimiento y rendimiento en granos, pero su capacidad de adaptación es más bien estrecha (plantas grupo 3 en la figura 3A). Además, existen plantas que poseen un amplio rango de adaptación, tales como los árboles de haya (planta del grupo 2), con sus hojas tipo sol y hojas tipo sombra y una extrema capacidad de modificación de la función y ultraestructura de los cloroplastos.

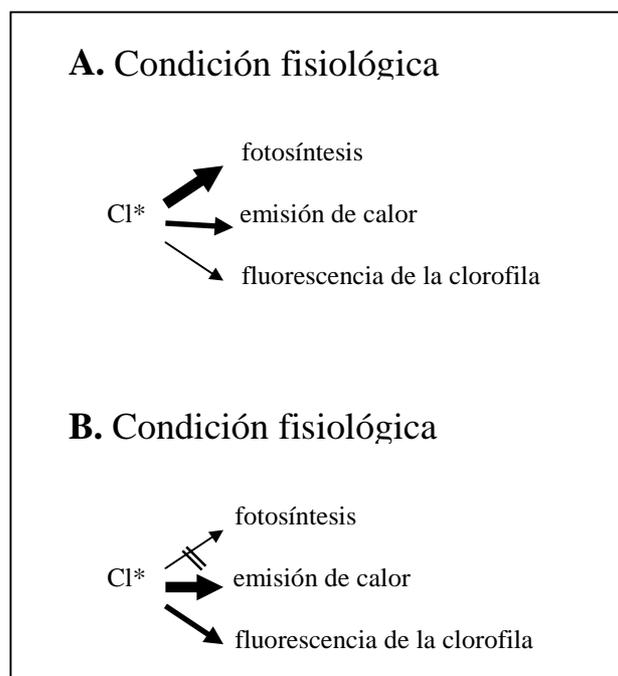


**Figura 3.** Adaptación a la luz y rango de tolerancia al estrés en plantas. **A)** La capacidad de adaptación de hojas y cloroplastos a condiciones de crecimiento con alta luz o baja luz es baja para las plantas del grupo 1 y 3 y alta para las del grupo 4. **B)** Las plantas a, b y c poseen tolerancia al estrés baja, media o alta, respectivamente.

Cuanto mayor es el rango de capacidad de adaptación de la planta, ésta está mejor protegida contra varios factores de estrés. Las "plantas de sol" (grupo 3 en la figura 3A), estarán bajo estrés cuando la irradiancia caiga debajo de su rango de adaptación genéticamente posible. Las "plantas de sombra" (grupo 1 en la figura 3A), en cambio, están bajo estrés cuando la irradiancia excede su capacidad de adaptación. Sin embargo, las plantas con un amplio rango de capacidad de adaptación (grupo 2) pueden responder de manera muy flexible a los cambios en la irradiancia, por lo tanto están mucho mejor protegidas contra el estrés producido por alta luz y la fotoinhibición. Este principio básico de rango de capacidad de adaptación y tolerancia relativa al estrés expuesto aquí para adaptación a la luz, también puede ser aplicado a todas las otras respuestas de adaptación que la planta pueda tener. Así como la capacidad de adaptación de las plantas está determinada genéticamente, también lo está la capacidad de tolerancia. Las plantas pueden poseer tolerancia al estrés baja, media o alta, como se muestra en la figura 3B. Aunque el proceso de adaptación a la luz es un factor esencial en la tolerancia relativa al estrés de una planta, existen muchos más factores que determinan la tolerancia total al estrés, tales como los mecanismos para enfrentar el estrés, y su capacidad de procesos de reparación. La flexibilidad del metabolismo celular y su rápida aclimatación a los cambios de las condiciones ambientales es el primer paso esencial para evitar el estrés. En plantas con una baja tolerancia al estrés, la capacidad de los diferentes mecanismos capaces de enfrentar el estrés es muy baja, inclusive algunos de los mecanismos pueden directamente no existir. Por lo tanto, dichas plantas alcanzan muy rápidamente un estado de daño agudo, debido a que su mínimo de resistencia al estrés ya se ha acortado a un bajo umbral de estrés.

### Mecanismos para superar el estrés

Existen varios mecanismos a través de los cuales las plantas son capaces de enfrentar un estrés. Éstos dependen del tipo y grado del estrés, como acumulación de prolina durante un período de sequía o salinidad, la acumulación de polioles (p. ej., manitol, sorbitol, etc.) durante condiciones de estrés hídrico, la formación de proteínas en respuesta al estrés por calor, la formación de compuestos que recogen los radicales libres (ascorbato, glutatión,  $\alpha$ -tocoferol), incremento del nivel de superóxido dismutasa, formación de pigmentos que absorben la luz UV-A y UV-B en la capa epidérmica, los cuales protegen el aparato fotosintético del mesófilo de la hoja contra el daño por radiación UV, o dentro de los tilacoides la rápida fotorreducción (en minutos) del carotenoide violaxantina a zeaxantina que interviene en la fotoprotección del aparato fotosintético en condiciones de alta radiación.



**Figura 4.** Desexcitación de estados excitados de la clorofila *a* por conversión cuántica fotosintética (fotosíntesis), emisión de calor y fluorescencia roja lejana de la clorofila *a*. A) Bajo condiciones fisiológicas y B) bajo condiciones de estrés. El grosor de la flecha indica la proporción relativa de los tres procesos de desexcitación.

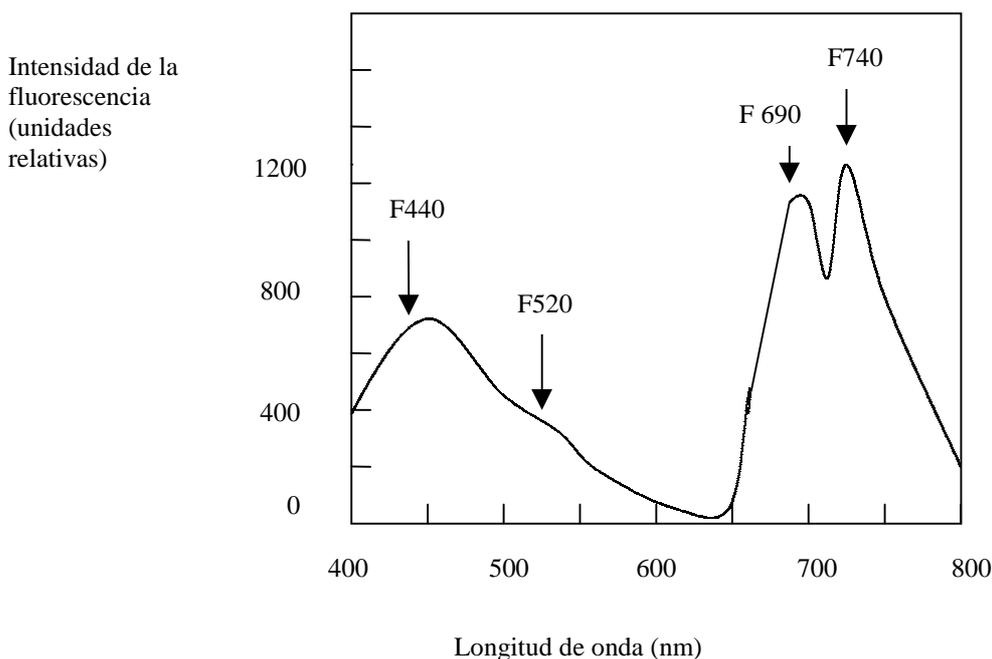
Aquellas plantas que son particularmente tolerantes a la fotoinhibición, tales como el tabaco áurea mutante Su/su, llegan a duplicar su cantidad de zeaxantina por biosíntesis *de novo* dentro de las 5 horas de exposición a una alta irradiancia. El mecanismo exacto de acción fotoprotectora de la zeaxantina no se conoce aún, pero se ha observado, en algunos casos, una influencia indirecta sobre la disminución de la intensidad de la fluorescencia de la clorofila. Sin embargo, varios procesos de extinción de la fluorescencia de la clorofila se producen independientemente de la zeaxantina.

Otro posible mecanismo propuesto para explicar la acción fotoprotectora de la zeaxantina es una oxidación no enzimática de la zeaxantina a violaxantina, ya sea por especies altamente reactivas de oxígeno ( $^1O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$ ) formadas en condiciones de alta irradiancia y/o mediante la detoxificación de grupos epoxy formados en los dobles enlaces de los lípidos de los tilacoides. También han sido propuestos como un mecanismo esencial en la preservación de tasas de fotosíntesis razonables, aunque reducidas, bajo intensidades excesivas de luz, la desactivación parcial de los centros del Fotosistema II por fotoinhibición, un proceso que protege el resto de los centros del Fotosistema II de la fotodestrucción. Por lo tanto, la fotoinhibición parcial garantiza una asimilación neta de  $CO_2$  que permite el crecimiento y desarrollo de la planta aún en condiciones de alta irradiancia.

## DETECCIÓN DE ESTRÉS MEDIANTE FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA.

### Introducción

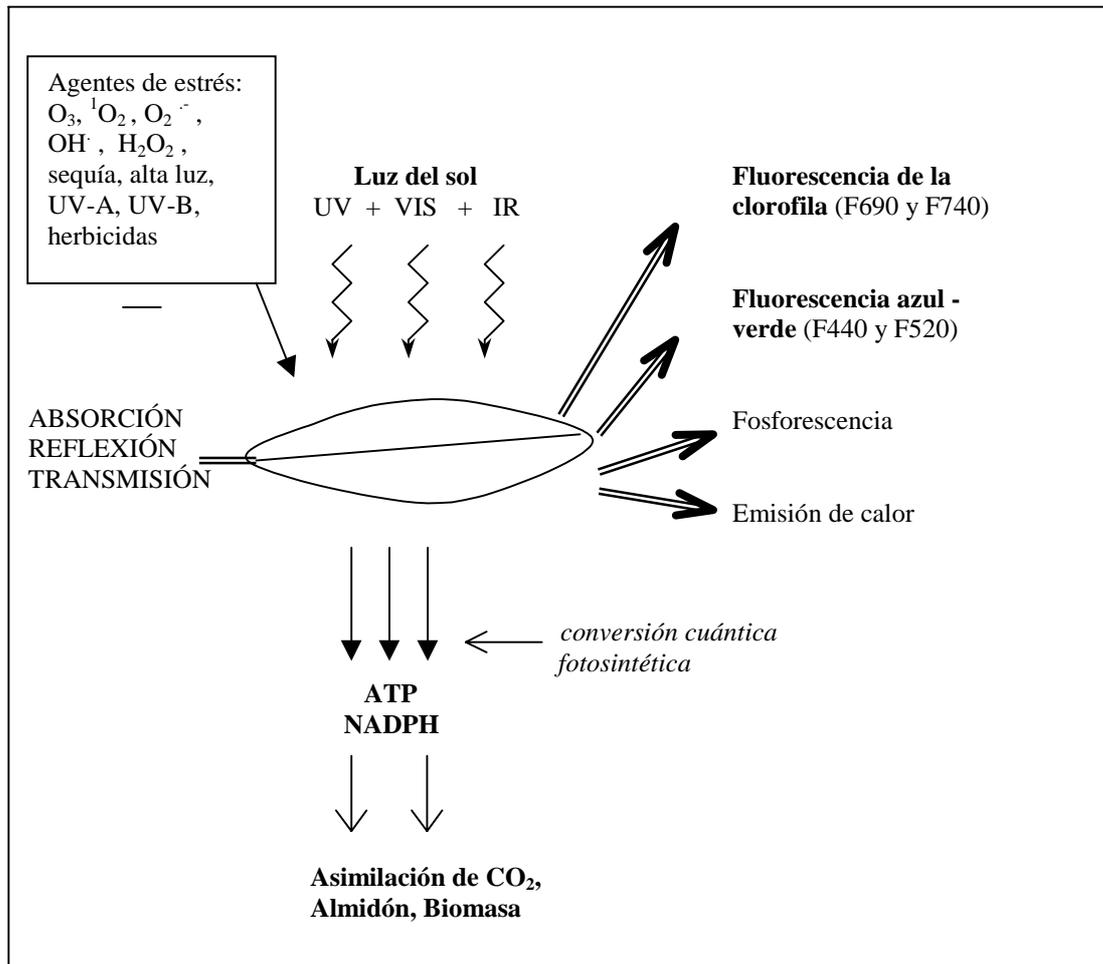
Las condiciones de estrés y el daño inducido por estrés en plantas pueden detectarse usando métodos ecofisiológicos clásicos de medición de tasas de fotosíntesis, respiración y transpiración, conductividad estomática y potencial hídrico, tanto como contenido y relación de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides) o la concentración de metabolitos que aparecen en condiciones de estrés. La mayoría de los factores de estrés, aun si ellos no afectan directamente la composición del aparato fotosintético o sus funciones, afectarán el proceso fotosintético a largo plazo



**Figura 5.** Espectro de emisión de fluorescencia inducida por láser UV de una hoja de maíz, con picos en el azul (F440), verde (F520), rojo (F690) y rojo lejano (F740) de la región del espectro. Se indican las cuatro bandas de fluorescencia aplicadas en la captación de imágenes de fluorescencia y detección de estrés en plantas.

En condiciones fisiológicas, alrededor del 80 al 90% de la energía luminosa absorbida por la clorofila *a* se disipará a partir de la clorofila *a* excitada ( $Cl^*$ ) vía conversión cuántica fotosintética, mientras que la pérdida de excitación por transmisión de calor (5 a 15%) y fluorescencia rojo y rojo lejano de la clorofila (0,5 a 2%) es mucho menor (figura 4A). Bajo estrés, la conversión cuántica fotosintética declina y, de

manera correspondiente, aumentan considerablemente la emisión de calor y la fluorescencia de la clorofila (figura 4B).

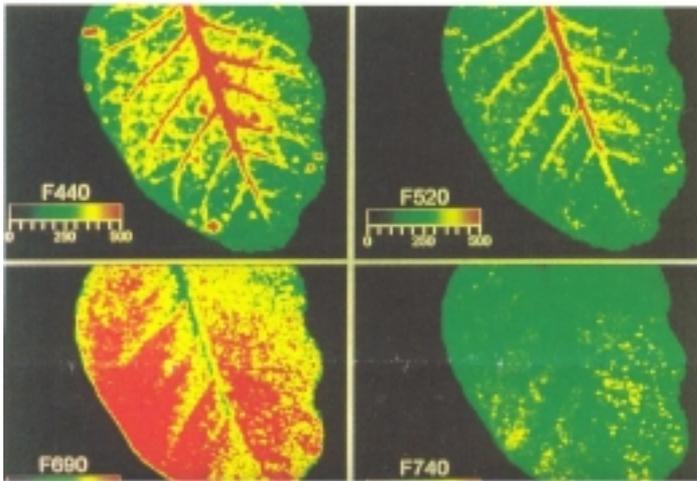


Esquema del flujo de energía de fotones en hojas vegetales

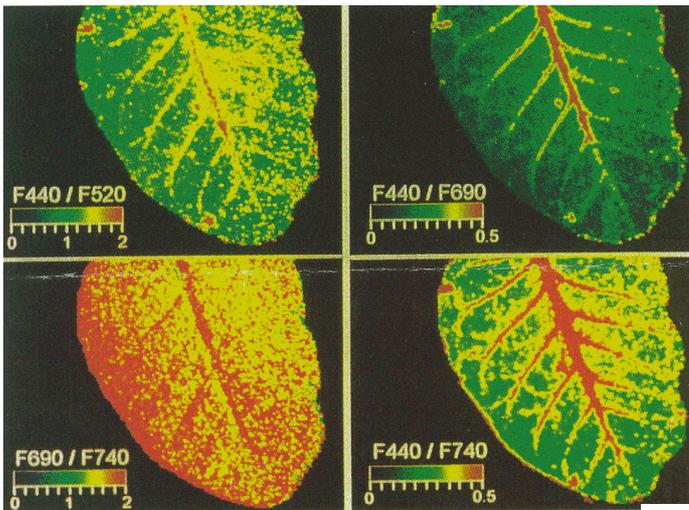
**Figura 6.** Esquema del flujo fotónico de energía y disipación en hojas de plantas, la cual es modificada (ya sea bloqueada o mejorada) por una multitud de agentes naturales o antropogénicos de estrés, tales como especies altamente reactivas de oxígeno, herbicidas, radiación UV-A y UV-B o alta irradiación o sequía. Una declinación inducida por estrés en la fisiología de la hoja y en la conversión cuántica fotosintética puede ser monitoreada por mediciones no destructivas de la fluorescencia rojo + rojo lejano de la clorofila y la fluorescencia azul - verde.

### Flujo fotónico de energía en hojas

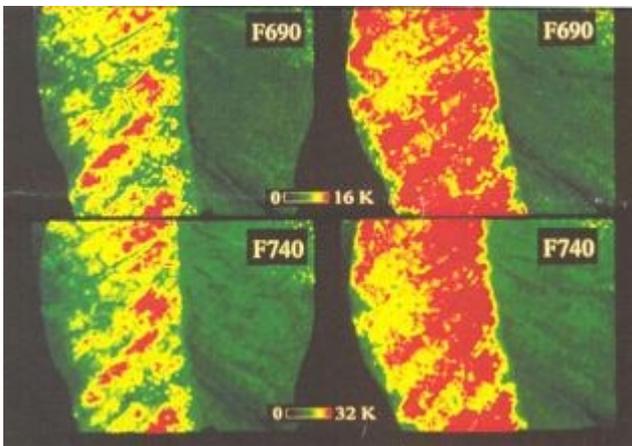
El estrés vegetal modifica de múltiples maneras el flujo de energía de fotones (luz del sol) a través de la hoja, de manera tal que cambia las propiedades de absorción, reflexión y transmisión. El estrés también modifica las proporciones relativas de energía luminosa absorbida, la cual se usa en conversión cuántica fotosintética, fluorescencia de la clorofila, fluorescencia verde - azul y/o emisión de calor, como se muestra en la figura 6. Por esta razón, la cinética e imágenes de la fluorescencia rojo - rojo lejano de la clorofila y de la fluorescencia azul - verde pueden usarse para detección de estrés en plantas.



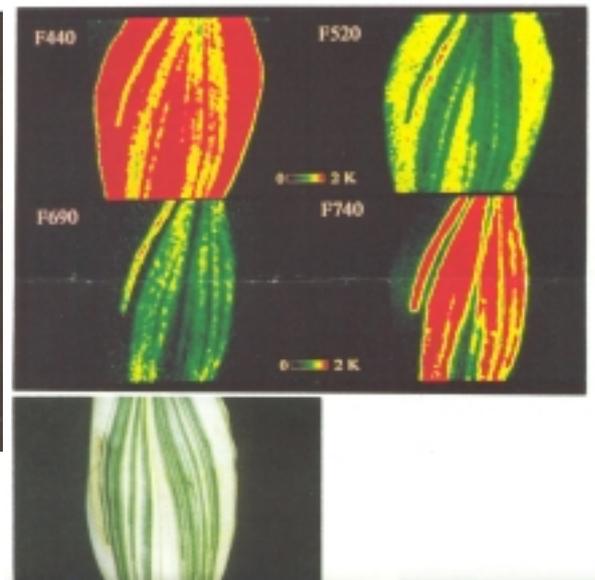
**Fig. 8.** Imágenes de la fluorescencia inducida por UV-láser (LIF) en el azul (F440), verde (F520), rojo (F690) y rojo lejano (solamente las dos últimas corresponden a fluorescencia de la clorofila), tomadas de la cara abaxial de una hoja verde del mutante de tabaco aurea (Su/su). La intensidad de la fluorescencia está representada por una escala en falsos colores que va desde el azul oscuro (menor intensidad) al rojo (mayor intensidad), pasando por el verde y el amarillo).



**Fig. 9.** Imágenes de las relaciones de la fluorescencia inducida por UV-láser (LIF) de azul/verde (F440/F520), azul/rojo (F440/F690), rojo/rojo lejano, azul/rojo lejano (F440/F770), tomadas de la cara abaxial de una hoja verde del mutante de tabaco aurea (Su/su). La intensidad de la fluorescencia está representada por una escala en falsos colores que va desde el azul oscuro (menor intensidad) al rojo (mayor intensidad), pasando por el verde y el amarillo).



**Fig. 10.** Imágenes LIF de la evolución de la absorción del herbicida diuron (MCPU, inhibe el fotosistema 2), en la parte izquierda de hojas de tabaco verde. La intensidad de la fluorescencia incrementa desde el azul oscuro al rojo, pasando por el verde y el amarillo.



**Fig. 11. A.** Imágenes de fluorescencia de la clorofila en escala de falsos colores, **B.** Foto color de la planta variegada en blanco y verde *Campelia zonaria* L. Note que las fluorescencias de la clorofila (F690 y F740) solo se emiten de las líneas verdes, mientras que los 2 bordes blancos no están visibles en la imagen LIF.

## **Detección de estrés mediante la fluorescencia inducida por láser (método LIF)**

Luego de la excitación con radiación ultravioleta, las hojas verdes no solamente emiten fluorescencia en el rojo y rojo lejano sino que también muestran una emisión de fluorescencia en el rango visible y casi en el infrarrojo del espectro, entre los 400 y 800 nm. El espectro de emisión de fluorescencia de las plantas posee una banda azul en el rango de los 430 a 440 nm (F440), una banda verde entre los 520 y 530 nm (F520), un máximo rojo entre los 684 y 695 nm (F690) y un máximo en el rojo lejano entre los 730 y 740 nm (F740) (figura 5). Las fluorescencias rojo y rojo lejano emanan de las moléculas de clorofila *a* ligadas a las proteínas de los tilacoides fotoquímicamente activos de los cloroplastos en las células del mesófilo de las hojas. En contraste, la emisión de fluorescencia azul y verde proviene principalmente de varios compuestos fenólicos de las paredes celulares de la epidermis abaxial. Las nervaduras principales y secundarias también contribuyen considerablemente a la emisión de fluorescencia azul-verde de las hojas. Si bien los métodos de medición de la fluorescencia proveen información valiosa sobre el estado de salud o exposición al estrés del aparato fotosintético, ellos tienen la desventaja esencial de poder evaluar solamente un punto de la hoja por medida, y se necesitaría determinar las señales de fluorescencia de varios puntos de la hoja para obtener un cuadro real del estado funcional o daño del aparato fotosintético y su función. Las diferencias locales en la emisión de fluorescencia tanto como los gradientes de fluorescencia en la superficie de la hoja, que representan verdaderos síntomas de estrés, no pueden ser detectados por los datos de medidas puntuales. Aún cuando se midieran varios puntos de las hojas, el estrés y el daño se determinarían recién en un estado relativamente avanzado.

## **Detección de estrés por imagen de la fluorescencia inducida por láser ( $\lambda = 355$ nm)**

Con el fin de evitar este problema se ha desarrollado, en estrecha relación con físicos, el primer sistema de alta resolución de fluorescencia inducida por láser (método de imagen LIF), el cual permite tomar las imágenes de fluorescencia de la clorofila F690 y F740 simultáneamente en todos los puntos de la hoja. También se han incluido en las imágenes la fluorescencia azul (F440) y verde (F520). En contraste a la fluorescencia de la clorofila, las fluorescencias azul y verde no muestran ninguna variación sino que permanecen constantes durante la cinética de inducción de fluorescencia inducida por láser. A continuación se describe el sistema de captación de imágenes LIF y algunos ejemplos de su aplicación:

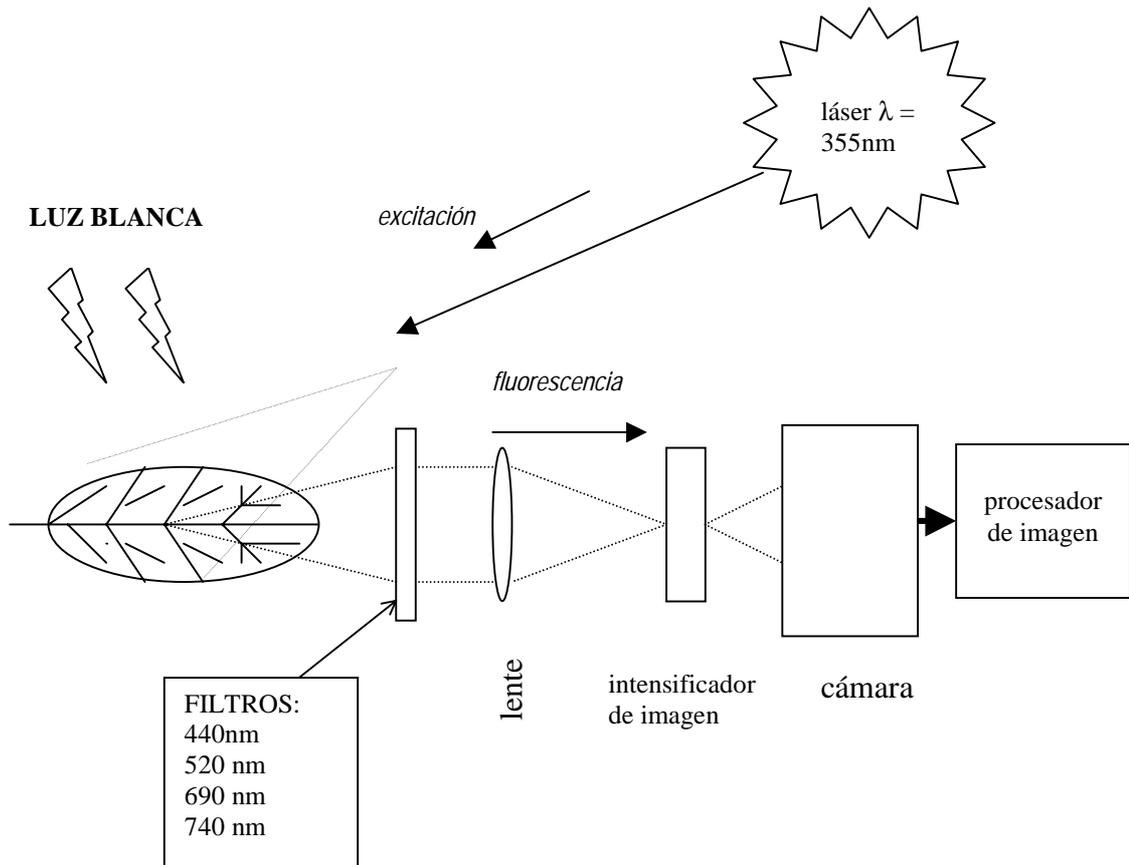
### **1. Metodología**

El sistema de captación de imagen es un sistema de alta resolución (figura 12) para examinar hojas y plantas enteras. Contiene las siguientes partes:

- Fuente de excitación: es un láser que emite a 355 nm de longitud de onda. Los pulsos de UV-A se emiten a una tasa de repetición ajustable y tienen una energía de 10  $\mu$ J. El rayo láser se expande para que abarque toda la superficie foliar.
- Fuente de luz fotosintéticamente activa: emite luz blanca adicional con un flujo de fotones de 1000  $\mu$ mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> que simula las condiciones de luz de día.
- Sistema sensor de emisión de la imagen de la fluorescencia, a una distancia de 0,5 m.
- Filtros de interferencia intercambiables (para seleccionar longitudes de onda de 440 nm, 520 nm, 690 nm o 740 nm).
- Intensificador de imagen con un lente.
- Cámara digital.
- Computadora que posee un software adecuado para procesar la imagen, que incluye corrección de la imagen para una excitación desuniforme, formación de imágenes de las relaciones de fluorescencia y cálculo de las intensidades de fluorescencia. También permite seleccionar regiones rectangulares de tamaños ajustables y determinar su promedio de intensidad de fluorescencia y desviación estándar. Para los valores cuantitativos que se muestran en las figuras o tablas se usaron áreas de 100 a 400 píxeles. La resolución de la imagen LIF (tamaño de pixel) depende de la distancia de la hoja a la cámara digital y mide 0,25 mm<sup>2</sup> a una distancia de 0,5 m. Las intensidades de fluorescencia en el azul, verde, rojo y rojo lejano de las imágenes LIF se presentan en falsos colores (Fig. 8), con una escala que va del azul oscuro (0 de fluorescencia), pasando por el verde y amarillo hasta el rojo (la mayor intensidad de fluorescencia). Además, las imágenes de las relaciones de fluorescencia (imágenes de las relaciones LIF, Fig. 9) azul/rojo, azul/rojo lejano, rojo/rojo lejano y azul/verde se presentan usando el mismo procedimiento de colores falsos desde el azul (punto cero) al rojo como mayor valor de la relación de fluorescencias. Las diferentes

intensidades de fluorescencia de las imágenes LIF y los diferentes valores de las relaciones de fluorescencia de las imágenes LIF también se pueden presentar en escalas de gris desde el negro (fluorescencia 0 o valor 0) hasta el blanco (fluorescencia máxima o valor máximo). Sin embargo, las imágenes en colores falsos proveen una visión mucho mejor de los gradientes en la superficie de la hoja que las escalas de gris.

Este sistema permite tomar grandes áreas foliares, de 25 a 30 cm transversalmente y en diámetro longitudinal, o varias hojas más pequeñas. Además, podría ser operado a distancias de varios metros a partir de las hojas. Con láseres más potentes y un telescopio, este sistema ha sido usado para tomar imágenes de buena resolución a una distancia de 100 m. Esta posibilidad lo convierte en un equipo potencialmente útil como instrumento de campo para censar vegetación terrestre.



**Figura 12.** Esquema del sistema de imagen de la fluorescencia inducida por láser para distancias cercanas y censado remoto de hojas y plantas enteras.

## 2. Aplicaciones

### a. Imágenes de relaciones LIF

Por medio del procesamiento de imágenes por computadora también se pueden imprimir señales de fluorescencia en la forma de diferentes relaciones de fluorescencia, éstas son imágenes de relaciones LIF. De esta manera, pueden formarse las siguientes relaciones de fluorescencia: azul/rojo, azul/rojo lejano, verde/rojo, verde/rojo lejano, azul/verde, verde/azul y las relaciones de fluorescencia de la clorofila rojo/rojo lejano y rojo lejano/rojo. Las imágenes de estas relaciones (figura 9) proveen una información abundante sobre las intensidades relativas de las diferentes fluorescencias.

### **a.1. Relación de fluorescencia rojo/rojo lejano**

Los valores de la relación de fluorescencia de la clorofila rojo/rojo lejano están inversamente correlacionados con el contenido de clorofila de las hojas. Esto se debe a la reabsorción parcial de la fluorescencia emitida en 690 nm, la cual se superpone con las bandas de absorción de la clorofila. Este no es el caso de la banda de fluorescencia de la clorofila en 740 nm. En las plantas C3 con hojas bifaciales esta relación se aplica particularmente a la excitación y censado de la fluorescencia de la clorofila en la cara adaxial de la hoja. El hecho es que la fluorescencia emitida proviene principalmente de la mitad de la hoja que ha sido excitada. En plantas con hojas bifaciales la cara adaxial contiene las células parenquimáticas en empalizada densamente dispuestas, con un gran número de cloroplastos. Por este motivo la mitad superior tiene un contenido de clorofila mucho mayor que la cara abaxial, compuesta por parénquima esponjoso, con grandes espacios intercelulares. Como consecuencia, la relación de fluorescencia rojo/rojo lejano de la cara adaxial refleja aproximadamente el total de contenido de clorofila de las hojas, no así la cara abaxial.

### **a.2. Relaciones de fluorescencia azul/verde y verde/azul**

En el tabaco áurea Su/su (planta tolerante a la fotoinhibición) se encontró que la fluorescencia azul generalmente es mayor (particularmente en las zonas vasculares) que la emisión de fluorescencia verde, como se observa en la Fig. 8 (compare F440 con F520). La imagen de la relación LIF azul/verde (Fig. 9) muestra que la fluorescencia azul es particularmente alta en las regiones vasculares, comparada con la fluorescencia verde.

La disminución en los valores de F440/F520 coincide con el aumento de los valores de la relación inversa F520/F440 y reflejan el gradiente en el contenido de clorofila por unidad de área foliar a partir de las nervaduras (con el menor contenido de clorofila: 12  $\mu\text{g cl } a + b \text{ por cm}^2$ ) hacia las partes exteriores libres de nervaduras, cerca del límite de la hoja con el mayor contenido de clorofila que varía entre 15 y 18  $\mu\text{g por cm}^2$ . Este gradiente en los valores de las relaciones de fluorescencia azul/verde y verde/azul indican que la intensidad de la fluorescencia azul decrece con el incremento del contenido de clorofila y carotenoides de las diferentes posiciones de la hoja. De hecho, la fluorescencia azul emitida (F430/F450) es reabsorbida *in vivo* por las clorofilas y carotenoides, los cuales exhiben una amplia absorción en la región azul entre 430 y 470 nm. La fluorescencia verde (F520 a F530), en cambio, es mucho menos afectada por la reabsorción de los pigmentos fotosintéticos. Por lo tanto, su proporción relativa con respecto a la fluorescencia azul aumenta desde las nervaduras hacia las partes de la hoja libres de nervaduras, pero nunca excede la intensidad de la fluorescencia azul.

Sin embargo, se debe considerar también otro punto que es independiente de las diferencias en el contenido de clorofila y carotenoides, tal como el hecho de que las nervaduras principales y secundarias la cara abaxial de la hoja del tabaco áurea sobresalen de la superficie de la hoja. Como consecuencia, la fluorescencia azul-verde, la cual se refleja, refracta y dispersa varias veces antes de dejar la epidermis de la hoja, en las nervaduras posee una probabilidad mucho mayor de dejar la hoja sin reabsorción por clorofilas y carotenoides, en comparación a la fluorescencia azul-verde emitida en las zonas intercostales libres de nervaduras.

Además, en las nervaduras principales y secundarias, la emisión de fluorescencia azul-verde de las paredes de las células del haz vascular contribuye considerablemente a la emisión total de fluorescencia azul-verde en la hoja. En contraste, en las regiones exteriores de las hojas, donde los haces vasculares muy delgados están completamente embebidos y rodeados por las células verdes del mesófilo, la emisión de fluorescencia azul y verde es mucho menor. Allí, emana principalmente a partir de las paredes celulares de la epidermis de la hoja, ya que la fluorescencia azul-verde emitida por las paredes celulares de los haces vasculares y de las células verdes del mesófilo es reabsorbida por las clorofilas y carotenoides, como ha sido demostrado con anterioridad mediante datos de medidas puntuales.

## **b. Imagen LIF de la absorción del herbicida diuron**

El diuron o DCMU es eficiente como inhibidor del transporte de electrones catalizado por el Fotosistema II, mediante la unión con el sitio de ligamiento de la  $Q_B$ , en lugar del compuesto  $Q_B$  endógeno, la plastoquinona-9. Como consecuencia, la conversión cuántica fotosintética de la energía luminosa absorbida decae, dando origen a un considerable incremento en la emisión de fluorescencia rojo-rojo lejano, tal como se demostró con anterioridad mediante datos de mediciones puntuales. Con las imágenes LIF se puede obtener una vista más realista de la absorción gradual del DCMU y la progresiva inhibición de la conversión cuántica fotosintética. Con este objetivo, se aplicó una solución de DCMU en agua con 1% de etanol ( $5 \times 10^{-5}$  M) en la cara abaxial de la mitad izquierda de una hoja de tabaco de 20 cm de longitud unida a la planta. La mitad derecha no tratada representa el control. La fluorescencia se excitó y evaluó en la cara adaxial. Luego de 10 minutos de aplicado el herbicida, las bandas de fluorescencia F690 y F740 tuvieron un incremento significativo en la mitad tratada de la hoja, el cual se acentuó luego de 30 minutos. En contraste, en la mitad no tratada de la hoja las fluorescencias F690 y F740 permanecieron bajas como al comienzo del experimento. Las imágenes LIF demostraron claramente que el herbicida fue absorbido y distribuido de manera heterogénea en las células verdes del mesófilo y no fue transportado a la mitad no tratada de la hoja (figura 10).

Estos datos demuestran que las imágenes LIF pueden ser aplicadas rutinariamente en estudios referentes a la velocidad de absorción y penetración tanto como al transporte o translocación de herbicidas y otros químicos que afecten el proceso fotosintético. La emisión de fluorescencia azul y verde de la mitad de la hoja tratada con diurón aumentó ligeramente (10%) en comparación con el control no tratado. Por lo tanto, la fluorescencia azul-verde puede ser usada como un estándar interno para comparar la fluorescencia de la clorofila. Como consecuencia del tratamiento con el herbicida, las relaciones de fluorescencia azul/rojo y azul/rojo lejano disminuyeron alrededor de 4 veces, mientras que la relación de fluorescencia de la clorofila rojo/rojo lejano aumentó significativamente (hasta el 30%) solamente en las zonas de la hoja inhibidas por el diurón.

La relación azul/verde no cambió luego del tratamiento con diurón. Las relaciones de las imágenes LIF azul/rojo y azul/rojo lejano fueron muy sensibles aún a pequeños cambios en la emisión de fluorescencia de la clorofila. Por lo tanto son indicadores muy útiles de los cambios en la conversión cuántica fotosintética y en las tasas de transporte de electrones. Las relaciones LIF también son indicadores válidos de otros factores de estrés que afectan el aparato fotosintético. Las relaciones LIF verde/rojo y verde/rojo lejano mostraron cambios equivalentes a las relaciones azul/rojo y azul/rojo lejano y también son muy sensibles e indicadores útiles del tratamiento con herbicida u otros factores de estrés que afecten la función fotosintética.

## **c. Emisión de fluorescencia de tejidos variegados**

Existen muchas plantas con hojas variegadas, las cuales pueden ser de color verde y amarillo o verde y blanco. Estas plantas contienen diferentes formas de plastidios. Algunos plastidios forman clorofilas y carotenoides y son, por lo tanto, cloroplastos funcionales, mientras que otros son solamente capaces de formar algunos carotenoides amarillos (tal como se encuentra en las partes amarillas de las hojas variegadas en verde y amarillo) y otros son incapaces de acumular carotenoides y clorofilas, tales como los leucoplastos incoloros en las partes blancas de las hojas variegadas en verde y blanco. Durante las numerosas divisiones celulares que se producen en el transcurso del desarrollo de una planta y de una hoja, las diferentes formas de plastidios pueden comenzar a separarse. En las plantas variegadas en verde y blanco, esto eventualmente da lugar a líneas de células y tejidos blancos (líneas verticales) los cuales poseen solamente leucoplastos y son incapaces de acumular clorofilas y carotenoides.

Las células epidérmicas de la mayoría de las plantas superiores contienen leucoplastos y están libres de clorofilas y carotenoides, excepto las células estomáticas que poseen cloroplastos.

En *Campelia zonaria* L., especie variegada en blanco y verde, en las zonas completamente verdes la emisión de fluorescencia azul-verde fue significativamente menor (-33%), mientras que la emisión de fluorescencia rojo/rojo lejano fue, tal como se esperaba, mucho mayor que en las partes blancas de las hojas (figura 11).

## **BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA**

- Lichtenthaler H. K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148: 4-14.
- Lichtenthaler H. K. , Lang M., Sowinska M., Heisel F., Miehé, J. A. 1996. Detection of vegetation stress via a new high resolution fluorescence imaging system. *J. Plant Physiol.* 148: 599-612.
- Montaldi E. R. 1995. Cap. XVII. Fisiología del estrés, en "Principios de Fisiología Vegetal". Ediciones Sur.
- Salisbury F. B., Ross C. W. 1994. Cap. 26: Fisiología en condiciones de estrés. En "Fisiología Vegetal", ed. Grupo Editorial Iberoamérica (traducción al castellano de la obra *Plant Physiology*, Fourth Edition por Salisbury F. B., Ross C. W.).