

La superficie específica foliar en genotipos del género *Triticum* y su relación con el intercambio gaseoso

R.R. FILGUEIRA^{1,2}, G.O. SARLI¹, J.R. JATIMLIANSKY^{1,2},

L.L. FOURNIER¹ & S.I. GOLIK³

¹ Area Física Biológica, ² CONICET, ³ Area Cerealicultura, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, CC 31, (1900) La Plata, Argentina. E-mail: filgueira@infovia.com.ar.

FILGUEIRA, R.R., G.O. SARLI, J.R. JATIMLIANSKY, L.L. FOURNIER & S.I. GOLIK. 1998. La superficie específica foliar en genotipos del género *Triticum* y su relación con el intercambio gaseoso. Rev. Fac. Agron., La Plata 103 (2): 177-184.

Se determinaron experimentalmente la superficie específica (área superficial por unidad de masa), la tasa fotosintética aparente máxima y la conductancia al vapor de agua de la hoja bandera de cuatro cultivares de *Triticum aestivum*, uno de *Triticum spelta* y otro de *Triticum dicoccum*, cultivados en invernáculo, con la finalidad de establecer la interacción entre estos parámetros, en condiciones de riego normal y de estrés hídrico. Los valores de superficie específica, medidos por adsorción de nitrógeno (temperatura 77,3 K), variaron entre 2,9 y 6,0 m² g⁻¹ lo que dio como resultado valores de superficie interna foliar mayores que los determinados por los métodos geométricos convencionales basados en microscopía óptica. Se atribuyeron estas diferencias a la capacidad de la técnica empleada para poner en evidencia una superficie interna extremadamente rugosa a nivel molecular, resultante de la intrincada estructura de la pared celular a través de la cual se realiza el intercambio gaseoso. La tasa fotosintética medida varió entre 5,0 y 29,3 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹, mientras que la conductancia al vapor de agua varió entre 74,3 y 457,3 mmol H₂O m⁻² s⁻¹. Se encontraron diferencias significativas entre algunos cultivares para la superficie específica, la tasa fotosintética y la conductancia al vapor de agua, en los diferentes tratamientos. También se encontró correlación positiva entre la tasa fotosintética y la conductancia al vapor de agua. No se encontró correlación alguna entre el área interna foliar y la fotosíntesis o la conductancia foliar.

Palabras clave: *Triticum*, superficie específica foliar, tasa fotosintética, conductancia foliar.

FILGUEIRA, R.R., G.O. SARLI, J.R. JATIMLIANSKY, L.L. FOURNIER & S.I. GOLIK. 1998. Relations between specific leaf surface and gas exchanges in *Triticum* genotypes. Rev. Fac. Agron., La Plata 103 (2): 177-184.

Specific surface (surface area per gram of material), photosynthetic rate and water vapor conductance of the flag leaf of four *Triticum aestivum*, one *Triticum spelta* and one *Triticum dicoccum* cultivars, grown in a greenhouse, were studied in order to establish the correlation among them in normal watered condition and under drought stress. The specific surface values obtained in our experiments by physical adsorption of nitrogen (temperature 77.3 K), ranged from 2.9 to 6.0 m² g⁻¹ and were higher than values obtained by conventional geometric methods based on optical microscopy. Differences were attributed to the ability of the technique to measure the roughness of the cellular wall of the mesophyll cells through which gas exchange take place. The measure of photosynthetic rate ranged from 5.0 to 29.3 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹, and the water vapor conductance ranged between 74.3 and 457.3 mmol H₂O m⁻² s⁻¹. Significant statistical differences were found among cultivars in specific surface, photosynthetic rate and water vapor conductance, for both treatments. Although, a positive correlation was found among photosynthetic rate and water vapor conductance, no correlation was found between specific surface and photosynthetic rate or water vapor conductance.

Key words: *Triticum*, specific surface of leaves, photosynthetic rate, leaf conductance.

INTRODUCCIÓN

El aumento en el rendimiento en el trigo ha sido conseguido a través de una mayor partición de la materia seca hacia el grano, con poca ganancia en la producción de biomasa aérea total (Evans *et al.*, 1975). Futuros aumentos en el rendimiento por esta vía tropiezan con un límite fisiológico difícil de superar (Austin *et al.*, 1980). Según Nelson (1988), no parece que se hubieran logrado grandes avances en el incremento del rendimiento mediante la selección de genotipos con mayor eficiencia fotosintética, a pesar que se considera fundamental para mejorar la productividad del cultivo.

En plantas de una misma especie, la variabilidad en la actividad fotosintética foliar ha sido atribuida a diferencias anatómicas y/o fisiológicas (Austin *et al.*, 1982; Parker & Ford, 1982; Sharkey, 1985). En el trigo, como en otras plantas C3, el incremento en la eficiencia del proceso bioquímico de la fotosíntesis está asociado con el intercambio de CO₂ (Evans *et al.*, 1975). La selección dentro de la especie ha permitido aumentar fuertemente el rendimiento. En los trigos modernos, éste difiere en calidad y cantidad respecto al rendimiento en las formas primitivas. La hoja bandera es mayor en los trigos modernos que en las formas primitivas jugando un rol importante en la provisión de fotoasimilados hacia el grano. Sin embargo, algunos resultados han sido aparentemente contradictorios. Por ejemplo, los trigos modernos presentan menor actividad fotosintética por unidad de superficie foliar (externa) en relación con los primitivos, que tienen menor rendimiento (Evans *et al.*, 1975). No se conoce si hay diferencias a nivel de la superficie interna foliar, entre los trigos modernos y antiguos.

Es por ello que la superficie celular en contacto con la fase gaseosa interna de la hoja (superficie interna), resulta un parámetro importante a determinar para comprender la di-

námica del intercambio gaseoso, en particular la del CO₂.

Se ha informado que, en el trigo, la relación entre la superficie interna y el volumen celular foliar se incrementa en las hojas superiores respecto a igual relación en las hojas inferiores de la macolla (Chonan, 1965), lo que podría guardar relación con una mayor provisión de fotoasimilados hacia el grano desde la hoja bandera (Evans *et al.*, 1975). La metodología para estimar la superficie interna se ha basado en la utilización de figuras geométricas simples y microscopía óptica (Turrell, 1936; Chonan, 1965; Nobel, 1991; Kebede *et al.*, 1992). La pared celular, que está constituida por celulosa, hemicelulosa y pectina junto con glucoproteínas estructurales (Alberts *et al.*, 1989; Nobel, 1991), presenta intersticios que se forman entre las microfibrillas de celulosa y que tienen una dimensión del orden de 5 a 30 nm que están fuera del rango de resolución del microscopio óptico. Cascarini de Torre *et al.* (1978; 1984) han utilizado la adsorción física de nitrógeno en tejidos foliares como una alternativa para medir la superficie específica (superficie interna/masa fresca foliar) a partir de la cual calcularon la relación entre la superficie interna (o del mesófilo)(S^{mes}) y la superficie externa foliar (S). La relación S^{mes}/S es de uso habitual en análisis estructurales foliares comparativos (Nobel, 1991). La técnica para medir la superficie específica se basa en la adsorción física de gases sobre sólidos a temperatura constante. Las isothermas resultantes del experimento son interpretadas con el conocido modelo BET (Brunauer *et al.*, 1938). Este método es ampliamente utilizado, por su precisión y por detectar rugosidades superficiales a nivel molecular, en la determinación de superficies específicas de sólidos porosos (ver, por ejemplo, Gregg & Sing, 1982).

Se ha informado que la actividad fotosintética foliar en las plantas sometidas a déficit hídrico es significativamente menor que en las

plantas sin estrés hídrico (Kirkham & Kanemasu, 1983; Morgan *et al.*, 1993; Beltrano *et al.*, 1994). Sin embargo y hasta la fecha, no se ha analizado cómo influye a nivel molecular el déficit hídrico sobre la superficie interna foliar del trigo y cómo está relacionada con las tasas fotosintética y transpiratoria tanto en los *Triticum* primitivos como en los *Triticum* modernos.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar posibles diferencias intra e interespecíficas de: (a) superficie específica foliar, (b) intercambios instantáneos de CO₂ (fotosíntesis aparente) y (c) conductancia foliar al vapor de agua, entre diferentes representantes del género *Triticum* en tratamientos con y sin déficit hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon dos especies hexaploides (ABD/ABD): de *Triticum aestivum* L., adaptado al cultivo intensivo, los cultivares Buck Yapeyú, Buck Ñandú, Buck Charrúa y Buck Ombú y de *Triticum spelta* L., adaptado al cultivo extensivo, el cultivar album. Se empleó una especie tetraploide (AB/AB): *Triticum dicoccum* L. cultivar fuchsii emparentada con los trigos primitivos. Las semillas de *T. spelta* y de *T. dicoccum* fueron cedidas gentilmente por el Ing. Agr. Enrique Antonelli del Instituto de Genética del INTA (Castelar).

Fueron sembradas el 2 de julio de 1994 en cajas de Petri con algodón y papel de filtro humedecidos y después transplantadas en macetas de polietileno de 18 l de capacidad conteniendo tierra del horizonte A (un Argiudol Típico) con una densidad de dos plantas por maceta. El ensayo fue conducido en invernáculo, bajo irradiación solar, ordenando las macetas al azar en hileras de seis (una maceta por cultivar), con nueve repeticiones y a una distancia entre las macetas de 0,3 m. Cada maceta fue regada tres veces por se-

mana con 300 ml de agua con 0,3 g de N:P:K (15:15:6). Aproximadamente un mes antes de antesis, una parte del ensayo (cuatro repeticiones) fue sometida a restricción hídrica mediante la suspensión del riego regular. El estrés hídrico se constató determinando el contenido relativo de agua (CRA) foliar de la manera habitual: $[MFi - MS] 100 / [MFf - MS] = CRA$ donde MFi y MFf son las masas frescas inicial y saturada con agua y MS la masa seca (Kirkham & Kanemasu, 1983).

En antesis (Ombú: 27/10; Ñandú, Yapeyú, album: 28/10; Charrúa, fuchsii: 14/11), E69 según la escala de Tottman *et al.* (1979), se midió la actividad fotosintética aparente de la hoja bandera posicionándola de manera perpendicular a la radiación solar, hacia el mediodía (11-13 h), en condiciones de máxima irradiación (mayor de 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para c.a. 350 ml CO₂ l⁻¹, temperatura de la cubeta de 20-25°C, con un instrumento LI-6200 (LICOR Inc., USA) y luego la conductancia al vapor de agua en ambos tratamientos (N = 6, para cada cultivar en cada tratamiento).

Posteriormente, se tomaron muestras al azar de hojas banderas las que fueron colocadas en bolsas de polietileno humedecidas (plantas sin estrés hídrico), o sin agregado de agua (plantas con estrés hídrico), puestas en cajas refrigeradas y llevadas al laboratorio. Allí se midió la superficie específica de acuerdo a la metodología sugerida por Cascarini de Torre *et al.* (1978; 1984) con un instrumento de tipo volumétrico convencional construido en nuestro laboratorio. Esta técnica está basada en el proceso de adsorción física de gases sobre sólidos y, para ello, las muestras de hojas se fijan criogénicamente a 77,3 K para obtener una estructura sólida sobre la cual adsorber el gas utilizado como sonda. Previamente a este paso, se debe liberar la superficie a estudiar de posibles gases adsorbidos o de contaminantes orgánicos mediante tratamiento de vacío o elevando su temperatura (Brunauer *et al.*, 1938). Para mantener inalte-

rada la geometría celular y obtener una medida representativa del área de la superficie interna de la hoja, que se encuentra húmeda, Cascarini de Torre *et al.* (1978) descartaron el empleo de temperaturas elevadas como tratamiento de desorción y utilizaron para ello el vacío. En el presente trabajo, para cada determinación se cortaron 300 discos de 30 hojas bandera, de 8 mm de diámetro cada uno (alrededor de 0,015 m²), los que se introdujeron superpuestos en un tubo de vidrio de 10 mm de diámetro, cerrado en su base (portamuestras) y éste se lo conectó a una línea de vacío (presión aproximada 1,3 Pa) durante 5 min, a temperatura ambiente, para retirar los gases y el exceso de agua en los meatos y espacios intercelulares. A continuación, el portamuestras se sumergió en nitrógeno líquido (alrededor de 77,3 K), con lo cual la estructura geométrica se solidificó, procediéndose entonces a obtener la isoterma correspondiente. Por medio de la fijación criogénica, los componentes celulares fueron estabilizados físicamente en un lapso de pocas décimas de segundo, preservando la estructura de las células en su estado original (Gilkey & Staehlin, 1986). El paso siguiente fue medir el llamado espacio muerto dentro del portamuestras con gas helio y finalmente introducir en el mismo cantidades conocidas del adsorbato en pasos sucesivos, para obtener la isoterma de adsorción. Como adsorbato se utilizó el nitrógeno por reunir las siguientes ventajas: (a) no interaccionar con el tejido de las hojas congeladas, por lo que el proceso de adsorción es puramente físico, (b) poseer sección transversal pequeña ($s = 16,2 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$) lo que garantiza el flujo y posterior adsorción en todos los espacios intercelulares, aún los que no pueden apreciarse por microscopía óptica y (c) punto de ebullición suficientemente bajo para evitar la actividad biológica a través de las paredes celulares, principalmente el intercambio de O₂ y CO₂. Como patrón para calibrar el equipo se empleó carbón activado (Merck, Alemania). Para el cálculo de la superficie espe-

cífica foliar se emplearon las expresiones matemáticas (1) y (2) formuladas por Brunauer *et al.* (1938). La ecuación (1) es la siguiente:

$$\frac{p}{v(p_o - p)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{(C - 1)}{V_m C} \frac{p}{p_o} \quad (1)$$

donde: v es el volumen de gas adsorbido a la presión p; V_m, el volumen de gas en condiciones normales de temperatura y presión (CNTP) requerido para formar una monocapa sobre la superficie; C, una constante que incluye el calor de adsorción, y p_o, la presión de vapor saturado del adsorbato a la temperatura de la isoterma (por ej., 1102 Pa a 80,6 K). La representación gráfica del volumen adsorbido, v, versus la presión relativa, p/p_o, da como resultado una curva clásica tipo sigmoidea como fue informado por Cascarini de Torre *et al.* (1981), mientras que la representación gráfica de p/v(p_o - p) versus p/p_o da una recta. A partir de la pendiente [(C - 1)/V_m C] y de la ordenada al origen de esta recta (1/V_m C), se puede determinar el parámetro V_m. Una vez obtenido V_m, es posible calcular la superficie específica (S) del sólido por medio de la ecuación (2):

$$S = \frac{V_m s N}{V_o W} \quad (2)$$

donde: s es el área transversal de cada molécula del adsorbato; N, el número de Avogadro; W, la masa de la muestra, y V_o, el volumen de un mol de gas ideal en CNTP (22,4 l).

Experimentalmente, se tuvo en cuenta que la ecuación (1) es válida si se la emplea dentro del rango p/p_o desde 0,05 hasta 0,35. Las muestras se pesaron antes y después del tratamiento de adsorción para verificar las posibles pérdidas de agua, las cuales fueron siempre menores que el 3%, empleándose para los cálculos la masa fresca final. Las determina-

ciones se realizaron por triplicado para cada cultivar en las condiciones de estrés y sin estrés hídrico.

El estudio estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza y, cuando se obtuvieron diferencias significativas, los promedios fueron comparados por la prueba de Tukey al 0,05 de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron diferencias de superficie específica ($P \leq 0,05$) entre *T. spelta* y *T. aestivum* cv. Ombú en condiciones normales de riego no así con respecto a los otros genotipos. No se obtuvieron diferencias significativas de superficie específica entre tratamientos para cada cultivar (Tabla 1).

El incremento no significativo de la superficie específica observado en las plantas bajo estrés hídrico podría ser el resultado de la dis-

minución de su CRA (Tabla 2). Si bien tiempos de evacuación de gases mediante vacío de 5 y hasta 20 minutos no produjeron aumentos observables de superficie específica en *Triticum aestivum*, tiempos de evacuación de gases mayores de 20 minutos provocaron cambios celulares visibles con el microscopio electrónico de transmisión y aumentaron significativamente la superficie específica foliar.

En las plantas sin estrés hídrico, el rango de variación de los promedios de superficie específica fluctuó entre 2,9 y 5,8 $m^2 g^{-1}$, que es del mismo orden que el determinado para diez cultivares de *Triticum aestivum* (Golik *et al.*, 1995). Ocampo Sánchez (1980) y Ocampo Sánchez & Klinger (1983) al investigar la adsorción física de nitrógeno sobre hielo (amorfo y cristalino) con la técnica BET, con una finalidad distinta a la del presente estudio, obtuvieron valores de superficie específica similares a los nuestros (por ej., 3 $m^2 g^{-1}$ para el hielo amorfo). Se puede inferir que, en

Tabla 1. Promedios de superficie específica, tasa fotosintética y conductancia al vapor de agua de la hoja bandera en antesis, en seis genotipos del género *Triticum*.

Mean values of specific surface, photosynthetic rate and water vapor conductance in the flag leaf at anthesis in six *Triticum*.

Cultivar	superficie específica ($m^2 g^{-1}$)		tasa fotosintética ($mmol CO_2 m^{-2} s^{-1}$)		conductancia al vapor de agua ($mmol H_2O m^{-2} s^{-1}$)	
	sin estrés	con estrés	sin estrés	con estrés	sin estrés	con estrés
<i>T. aestivum</i> Ombú	5,8 bc	6,0 c	23,7 cd	5,0 a	201,0 b	85,4 a
<i>T. aestivum</i> Ñandú	3,6 ab	4,4 abc	21,0 c	8,8 ab	244,3 b	194,8 b
<i>T. aestivum</i> Charrúa	3,9 abc	4,5 abc	25,2 cd	8,5 ab	232,0 b	97,0 a
<i>T. aestivum</i> Yapeyú	4,4 abc	4,8 abc	22,4 c	10,5 b	185,3 b	88,6 a
<i>T. spelta</i> album	2,9 a	4,0 abc	19,4 c	10,1 ab	203,1 b	74,3 a
<i>T. dicoccum</i> fuchsii	4,5 abc	#	29,3 d	#	457,3 c	#
Error estándar	0,2		0,4		5,0	

Para cada parámetro, los promedios seguidos por la misma letra no difieren entre sí al 0,05 de probabilidad (Tukey). # No fue posible realizar la medición.

Tabla 2. Contenido relativo de agua (CRA) de la hoja bandera en antesis, en cinco genotipos del género *Triticum*.Relative water content (RWC) in the flag leaf at anthesis in five *Triticum*.

Cultivar	CRA (%)	
	sin estrés	con estrés
<i>T. aestivum</i> Ombú	86,5 b	56,8 a
<i>T. aestivum</i> Ñandú	87,3 b	43,2 a
<i>T. aestivum</i> Charrúa	79,6 b	49,3 a
<i>T. aestivum</i> Yapeyú	91,0 b	65,2 a
<i>T. spelta</i> album	89,4 b	42,4 a
Error estándar		9,2

Para cada cultivar, los promedios seguidos por letras distintas difieren entre sí al 0,05 de probabilidad.

nuestros estudios, al congelarse la matriz gelatinosa de la pared celular, que se encuentra altamente hidratada, la misma se comportaría respecto a la adsorción física de nitrógeno en forma similar al hielo amorfo. Las rugosidades de la pared celular congelada podrían ser detectadas por la adsorción física de nitrógeno permitiendo también reconocer diferencias bajo condiciones hídricas sin estrés (Tabla 1).

La relación entre la superficie interna y la superficie externa foliar (S^{mes}/S) osciló entre 240 y 460 $\text{m}^2 \text{m}^{-2}$ para 2,9 y 6,0 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, respectivamente, valores extremos de superficie específica. Aquellas relaciones son 8 a 10 veces mayores que las estimadas mediante microscopía óptica en el trigo por Nobel (1980; 1991) y por Kebede *et al.* (1992). La diferencia entre los valores de S^{mes}/S según el método utilizado para estimar la superficie interna (adsorción física o microscopía óptica), podría atribuirse a que uno de ellos puede detectar las rugosidades de la pared celular a escala molecular pero no el otro.

En las plantas sin estrés hídrico, los valores de la fotosíntesis aparente fueron similares a los informados en trigo para 340 $\text{ml CO}_2 \text{l}^{-1}$ y a 20°C por Kebede *et al.* (1992) y por Morgan

et al. (1993). La tasa fotosintética de la especie tetraploide se ubicó dentro de los promedios mayores. Coincidentemente, Austin *et al.* (1982) informaron que la tasa fotosintética (por unidad de superficie foliar) es mayor en los trigos primitivos que en los trigos de cultivo intensivo. Con respecto a la superficie específica de estos genotipos, no se observaron diferencias entre los trigos hexaploides y el tetraploide (Tabla 1). Esto sugeriría que las distintas actividades fotosintéticas reportadas no estarían relacionadas con la superficie del mesófilo que está en contacto con la atmósfera, sino con otras causas, probablemente bioquímicas.

La fotosíntesis aparente en las plantas con estrés hídrico fue significativamente menor ($P \leq 0,05$) que en las plantas sin estrés hídrico (Tabla 1) como fue informado por otros investigadores (Kirkham & Kanemasu, 1983; Morgan *et al.*, 1993; Beltrano *et al.*, 1994).

En las plantas sin estrés hídrico, la conductancia al vapor de agua fue significativamente mayor en la especie tetraploide que en las hexaploides. En la mayoría de los genotipos la conductancia al vapor de agua disminuyó significativamente bajo estrés hídrico como ha sido mencionado en la bibliografía

(Kirkham & Kanemasu, 1983). Las correlaciones lineales simples entre la fotosíntesis aparente y la superficie interna foliar, para las plantas con y sin estrés hídrico, o para todas las plantas sin considerar el tratamiento al que fueron sometidas, no fueron significativas. También fueron no significativas las correlaciones entre la conductancia al agua y la superficie interna. Ambos resultados confirman lo informado por Kebede *et al.* (1992). La conductancia al agua y la actividad fotosintética aparente correlacionaron significativamente ($P \leq 0,001$) ($r = 0,780$; $N = 98$) en coincidencia con el trabajo de Wong *et al.* (1979). Sin embargo, dicha relación no mostró una correlación significativa cuando se analizaron los parámetros dentro del tratamiento con estrés. Las menores tasas fotosintética y de conductividad al agua en las plantas con déficit hídrico (Tabla 1) podrían ser el resultado de la mayor resistencia al intercambio gaseoso a nivel del estoma, sin que se encuentren afectados los procesos a nivel celular (Nobel, 1991).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo económico de la Comisión Asesora para el Fomento de la Tecnología Agropecuaria (CAPFTA, Plan 250) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PID 3541/92).

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J.D. Watson. 1989. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., New York.
- Austin, R. B., J. Bingham, R. D. Blackwell, L. T. Evans, M. A. Ford, C. L. Morgan & M. Taylor. 1980. Genetics improvements in winter wheat yields since 1900 and associated physiological changes. Journal of Agricultural Science Cambridge 94:675-689.
- Austin, R. B., C. L. Morgan, M. A. Ford & S. G. Bhagwat. 1982. Flag leaf photosynthesis of *Triticum aestivum* and related diploid and tetraploid species. Annals of Botany (London) 49:177-189.
- Beltrano, J., A. Carbone & E. R. Montaldi. 1994. El estrés de sequía y la producción de etileno como determinantes del período de llenado del grano de trigo. III Congreso Nacional de Trigo y Primer Simposio Nacional de Cereales de siembra otoño-invernal. UNS y AIANBA, Bahía Blanca, Argentina. pp. 33-34.
- Brunauer, S., P. H. Emmett & E. Teller. 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. Journal of the American Chemical Society 60:309-319.
- Cascarini de Torre L.E., R.R. Filgueira & E.M. Sívori. 1978. Medición de la superficie interna de evaporación de hojas por adsorción de nitrógeno. Primera Reunión Argentina de Físicoquímica. pp.254-256.
- Cascarini, de Torre L. E., E. M. Sívori & R. R. Filgueira. 1981. Aplicación de la adsorción física para la determinación de superficies internas en hojas. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 57:55-63.
- Cascarini de Torre, L. E., E. M. Sívori & R. R. Filgueira. 1984. Use of the BET method to measure area of internal exposed surface of leaves. Photosynthetica 18:365-369.
- Chonan, N. 1965. Studies on the photosynthetic tissues in the leaves of cereal crops. I. The mesophyll structure of wheat leaves inserted at different levels of the shoot. Proceedings of the Crop Science Society, Japan 33:388-393.
- Evans, L. T., I. F. Wardlaw & R. A. Fischer. 1975. Wheat. En: Crop Physiology, some case histories. Evans L.T.Ed. Cambridge University Press, U.K. pp.101-150.
- Gilkey, J. C. & L. A. Staehlin. 1986. Advance in ultrarapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure. Journal of Electron Microscopy Technology 3:177-210.
- Golik, S. I., J. R. Jatimiansky, G. O. Sarli, R. R. Filgueira & S.J. Sarandón. 1995. La superficie interna foliar en diez cultivares de trigo pan (*Triticum aestivum* L.) y su relación con la tasa fotosintética. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 71:269-274.
- Gregg, S. J. & K. S. W. Sing. 1982. Adsorption, Surface Area and Porosity. Academic Press, London. 303 pp.
- Kebede, H., R. C. Johnson, B. F. Carver & D. M. Ferris. 1992. Physiological and anatomical features of two *Triticum dicoccoides* wheat accessions differing in photosynthetic rate. Crop Science 32:138-143.
- Kirkham, M. B. & E. T. Kanemasu. 1983. Wheat. En: Crop-Water Relations. Teare J.D. & M.M. Peet Ed. J. Wiley, New York. pp. 482-520.
- Morgan, J. A., D. R. Le Cain, T. N. Mc Caig &

- J. S. Quick.** 1993. Gas exchange, carbon isotopic discrimination and productivity in winter wheat. *Crop Science* 33:178-186.
- Nelson, C. J.** 1988. Genetic associations between photosynthetic characteristics and yield: review of the evidence. *Plant Physiology and Biochemistry* 26:543-554.
- Nobel, P. S.** 1980. Leaf anatomy and water use efficiency. En: *Adaptation of Plant to Water and High Temperature Stress*. Turner E.C. & P.J. Kramer Ed. J. Wiley, New York.
- Nobel, P. S.** 1991. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press, San Diego. 635 pp.
- Ocampo Sánchez, J.** 1980. Adsorption du CO₂ et de l'azote sur la glace. Thèse de Troisième Cycle. Université Scientifique et Médicale de Grenoble, France. 103 pp.
- Ocampo Sánchez, J. & J. Klinger.** 1983. Modification of the surface structure of ice during ageing. *The Journal of Physical Chemistry* 87:4167-4170.
- Parker M.L. & M.A. Ford.** 1982. The structure of the mesophyll of flag leaves of three *Triticum* species. *Annals of Botany (London)* 49:165-176.
- Sharkey, T. D.** 1985. Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: physics, physiology and rate limitations. *Botanical Review* 51:53-105.
- Tottman, D. R., R. J. Makepeace & H. Broad.** 1979. An explanation of the decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. *Annals of Applied Biology* 93:221-234.
- Turrell, F. M.** 1936. The area of the internal exposed surface of dicotyledon leaves. *American Journal of Botany* 23:255-263.
- Wong, S. C., I. R. Cowan & G. D. Farquhar.** 1979. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. *Nature* 282:424-426.