



Influencia del etil-uretano sobre los meristemas de «*Faba vulgaris*» (*Vicia faba*)

POR LOS DOCTORES

JOSE LOUSTAU GOMEZ DE MEMBRILLERA

Catedrático de la Facultad de Ciencias

Y ANGEL ORTUÑO MARTINEZ

Profesor Adjunto

I

INTRODUCCIÓN

En los laboratorios y campos de experiencias de Genética, es objeto preferente de estudio la acción de los diversos agentes idioquinéticos, tanto físicos como químicos, sobre los cromosomas y sus genes, prescindiéndose, en general, del análisis de los fenómenos citoplásmicos que correlativamente se producen. Estos agentes, adecuadamente empleados, no limitan sus efectos al desencadenamiento o producción de mutaciones cromosómicas y alteraciones nucleares, sino que dan también lugar a modificaciones estructurales citoplásmicas, manifestadas por cambios morfológicos y funcionales en condriosomas, dictiosomas u otros orgánulos celulares.

Pretendiendo analizar esta acción citoplásmica en plantas cultivadas, realizamos experiencias y trabajos en los laboratorios de Biología y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de nuestra Universidad de Murcia, y los hechos observados confirman, en efecto, aquella presunción; de tal modo que la influencia del agente idioquinético sobre los orgánulos citoplásmicos es evidente y demostrable no sólo morfológicamente sino también funcionalmente, como detallaremos en la presente publicación tratando concretamente de la acción de disoluciones de etil-uretano sobre el desarrollo de las células meristemáticas de *Faba vulgaris* (*Vicia faba*) o haba común.



Nos anima la idea de llegar a obtener de este modo razas fisiológicas nuevas, caracterizadas por peculiaridades constantes en su actividad metabólica, lo que ha de traducirse en mutaciones bioquímicas en la naturaleza y proporción relativa de los productos elaborados por sus protoplasmas, no interesándonos, por el momento, los caracteres meramente morfológicos. Pretendemos, por consiguiente, llegar a obtener variedades nuevas de plantas cultivadas, siguiendo un camino distinto al ordinario empleado por la mayoría de los investigadores que persiguen el mismo fin. Nuestro punto de partida no ha de ser la presencia de un carácter morfológico nuevo o de un conjunto de caracteres de esta naturaleza, sino la aparición de una modificación funcional, con su consiguiente trascendencia en el metabolismo y sus productos.

De ordinario, en los trabajos de Genética dirigidos hacia la búsqueda de variedades especiales, se comienza por fijar germinalmente caracteres morfológicos bien ostensibles, nuevos o combinados de un modo nuevo; y después de obtenida la variedad morfológica es cuando se procede a estudiar sus propiedades fisiológicas y ecológicas, como si aquella modificación morfológica tuviera el carácter de preliminar indispensable para efectuar el estudio fisiológico.

Nosotros nos hemos propuesto seguir, en cuanto sea posible, un método distinto, casi opuesto, en el estudio de la influencia mutante de agentes idioquinéticos de naturaleza química; y así consideramos como carácter primario o principal la modificación fisiológica que aquel agente determina, lo que se averigua estudiando los productos del metabolismo o un determinado producto de los considerados como esenciales o fundamentales, lo cual bastará de momento, toda vez que la correlación química, esencial en la materia viviente, determinará las correlativas modificaciones en los otros constituyentes fundamentales del protoplasma. En este artículo nos concretamos al análisis de las variaciones en la elaboración de lípidos, provocadas por el etil-uretano sobre la actividad de células parenquimatosas muy jóvenes de *Faba vulgaris*.

Sobre genética de caracteres meramente fisiológicos o bioquímicos, han realizado estudios e investigaciones (algunas notabilísimas), diversos biólogos, bien que persiguiendo fines o guiados por propósitos distintos a los nuestros. Tratándose de experiencias de esta naturaleza, no es posible dejar de mencionar los notabilísimos trabajos realizados por el Prof. G. W. BEADLE y sus colaboradores (1) sobre el mohó *Neurospora crassa*, Hongo Ascomiceto de micelio haploide, como es corriente en los hongos, y heterotálico. El micelio de este mohó, que es de color anaranjado y vegeta suprafóticamente sobre substancias feculentas, crece y se

(1) Technique of obtaining *Neurospora* Mutants. Chemical Activities of Fungi by Jackson W. Foster. Academic Press Inc., New York, 1949, pág. 228.

multiplica asexualmente, bastándole un hidrato de carbono en su substrato para elaborar, utilizando sustancias inorgánicas con los necesarios bioelementos, todos los aminoácidos que precisan para componer sus proteínas.

La conjugación de núcleos haploides de sexualidad distinta sólo se realiza al constituir sus ascas y siendo esta especie heterotálica se precisa el contacto entre micelios de sexualidad diferente, aunque aparentemente no se distingan. El núcleo del asca viene pues a ser diploide, pero inmediatamente, para formar las ascosporas, sufre las divisiones de meiosis, resultando ya haploides las ascosporas y por tanto los micelios producidos por su germinación. La conjugación de los núcleos en el asca permite la posibilidad de combinaciones nuevas de los cromosomas al distribuirse para formar las series haploides de las ascosporas. El número n de estas series es 7.

La haploidia del talo, para el estudio de caracteres genéticos, tiene la ventaja de que toda mutación producida ha de manifestarse inmediatamente, sin que aparezca recesividad, ya que la acción del correspondiente gene no puede estar contrarrestada por la de un aleomorfo que lo domine, no existiendo cromosomas homólogos. El hongo se cultiva bien en medio artificial que contenga sales inorgánicas, azúcar y pequeñas cantidades de biotina (vitamina del complejo B). Así, con los fosfatos, nitratos o sales amoniacales y el carbono orgánico del azúcar, este moho sintetiza aminoácidos y con ellos construye su propia materia protoplásmica.

El Prof. BEADLE, sometiendo las esporas de este moho a la acción de rayos X (y también a los ultravioletas) ha conseguido provocar mutaciones fisiológicas muy características por mostrar incapacidad para la síntesis de algún aminoácido indispensable, que es la *arginina* en unas variedades, el *triptofano* en otras (a causa de haber perdido la facultad de fabricar *indol*), etc. Así, por la acción de agentes idioquinéticos, dicho biólogo ha obtenido en este Ascomiceto varias razas estables genéticamente, caracterizadas por sus especiales cualidades metabólicas y no por variaciones en la morfología de su talo o micelio.

Notable carácter fisiológico de raza fué hallado y minuciosamente estudiado en el infusorio *Paramecium aurelia* por el Prof. T. M. SONNEBORN, de la Universidad de Indiana. En este infusorio, tan común y abundante, hay una raza calificada de *asesina* (*killer*), que produce y exuda una sustancia llamada *paramicina*, la cual, difundándose, aun en cantidades pequeñísimas, en el agua en que viven, envenena y mata a todo *Paramecium* de otra raza que allí pueda encontrarse. Ninguna particularidad morfológica revela en el infusorio esta característica fisiológica, tan útil en la lucha por la vida de la especial raza que la posee.

El Prof. SONNEBORN, estudiando genéticamente tan notable carácter,

puso de relieve que es de herencia citoplásmica, pero influida por un gene cromosómico. Encontró también que existen algunas razas resistentes a tan extraordinario y específico veneno; pero no es este el lugar adecuado para exponer y discutir los fenómenos bioquímicos y otros detalles que el estudio de tan curioso carácter ha revelado.

Claro es que toda modificación química en un protoplasma viviente implica una correlativa modificación morfológica. Realmente la morfología y estructura de un organismo son consecuencia o traducción de su composición química: esta composición no será estática sino dinámica, como dinámica es también la morfología, siempre cambiante según la dimensión «tiempo». Pero una modificación intensa o importante en la actividad química y metabólica de un organismo puede determinar una morfología no muy ostensible, al menos en los caracteres macroscópicos. Si se atiende, pues, con preferencia a estos caracteres macroscópicos se corre el riesgo de despreciar modificaciones fisiológicas que pueden ser importantes.

Esta es, pues, la razón que nos ha inducido a seguir un método contrario, fisiológico en el sentido de observar preferentemente caracteres químicos manifestados en la actividad metabólica, y relacionarlos con variaciones en la morfología microscópica celular, despreciando por el momento, caracteres macroscópicos cuya relación de causa a efecto respecto a las variaciones metabólicas no se muestran de un modo indudable, claro o evidente. Estas investigaciones biológicas, en las que han de realizarse trabajos bioquímicos, fisiológicos y citológicos coordinados, exigen inevitablemente mucho tiempo y numerosas y variadas experiencias para poder llegar a conclusiones definitivas. Por el momento, pues, nuestras conclusiones serán sólo provisionales. Pero hemos de señalar la importancia no sólo científica y teórica, sino práctica y económica, que ofrece la obtención de razas fisiológicas de las plantas cultivadas, como también de los animales domésticos. Caracterizadas estas razas por diferir de las corrientes en su actividad metabólica, ello determina variaciones más o menos intensas en la composición y estructura de sus protoplasmas. Tales distintas propiedades fisiológicas pueden determinar inmunidad contra el ataque de muchos agentes patógenos (bacterias, hongos, virus, etc.) que atacan a variedades cultivadas, y tan sensibles a variaciones en la composición citoplásmica.

La variación en las propiedades fisiológicas ha de ser motivo de cambio de otras características orgánicas como, por ejemplo, en las exigencias ecológicas y en el retardo o aceleración del ciclo ontogénico. Por consiguiente el cultivo de estas variedades fisiológicas podrá realizarse en condiciones óptimas en suelos no adecuados y en épocas no a propósito para las variedades actuales.

De mayor importancia bajo el punto de vista económico es en estas variedades fisiológicas el aumento del poder nutricional de la planta y de sus semillas, en razón a su mayor riqueza en lípidos, por una parte, y en proteínas por otra. En este artículo sólo nos ocuparemos del aumento de riquezas en lípidos. Y no menos interés ofrece el conseguir aumentar el rendimiento en la fructificación y en el desarrollo total de la planta.

En este artículo daremos cuenta de los primeros resultados obtenidos estudiando de la manera indicada la especie botánica Haba común (*Faba vulgaris* o *Vicia faba*), de la variedad ordinaria cultivada en Murcia. Después de sometidas las semillas a la acción del agente idioquinético, actuando en las concentraciones y tiempos que indicaremos, se hacen germinar en soluciones hidropónicas unos lotes y en agua pura con el agente a estudiar, en otros. Las plántulas muy jóvenes son inmediatamente objeto de estudios micrográficos por una parte y bioquímicos por otra. Los resultados obtenidos tanto del estudio micrográfico como del bioquímico se comparan con los datos que arrojan las mismas experiencias realizadas partiendo de semillas no tratadas por el agente idioquinético.

En este artículo limitamos este estudio a las plántulas muy jóvenes, nutridas exclusivamente o casi exclusivamente con las reservas almacenadas en sus cotiledones y movilizadas durante la germinación por la actividad de numerosas diastasas hidrolizantes, que llevan los polisacáridos a monosacáridos, las proteínas a aminoácidos o a polipéptidos relativamente sencillos y los lípidos complejos al aislamiento de sus grupos fosforados y simplificación de sus moléculas grasas, fácilmente oxidadas durante el intenso fenómeno respiratorio tan característico de la germinación.

Estas moléculas relativamente simples, y por ello solubles, son las que circulan por el embrión, llegan a los meristemos y tejidos en vías de formación, desarrollo y diferenciación, y constituyen las materias primas para la intensa actividad metabólica constructiva de las jóvenes células. Ahora, la influencia del agente idioquinético se manifestará por una parte modificando la morfología de orgánulos celulares y aún el desarrollo total celular, y por otra en la proporción de las materias orgánicas elaboradas, que vienen a formar parte del citoplasma porque éstas las almacena en forma de reservas.

II

OBSERVACIONES MICROGRÁFICAS COMPARADAS

Con el calificativo de «normales» designamos las células de raicillas procedentes de semillas no sometidas a tratamiento previo alguno, sino puestas a germinar directamente en agua pura o en un líquido de cultivo hidropónico durante tres días, al cabo de los cuales las puntas de las raicillas fueron cortadas e inmediatamente sumergidas en el reactivo fijador, para continuar después las manipulaciones precisas, hasta obtener las adecuadas preparaciones microscópicas.

Los caracteres micrográficos presentados por estas células que decimos «normales», los utilizamos como tipo para compararlos con los ofrecidos por células análogas procedentes de plántulas nacidas de semillas que se sometieron, durante 24 horas, a la acción de disoluciones valoradas de etil-uretano, inmediatamente antes de colocarlas en el agua pura o en la disolución hidropónica para su germinación, ya de la misma manera que las normales y, por tanto, a los tres días se recolectan las puntas de sus raicillas para tratarlas con el reactivo fijador y utilizarlas como piezas histológicas en la obtención de preparaciones microscópicas. El estudio de estas preparaciones es indispensable para poder determinar la influencia que aquel agente idioquinético ha ejercido en el desarrollo y morfología de los orgánulos celulares, lo que se aprecia con claridad comparando estas preparaciones con las análogas de células normales.

En uno y otro caso hemos empleado dos métodos muy distintos de preparación de las piezas histológicas: uno el de practicar y montar finas secciones microtómicas; otro, el de preparar las células disociadas, sueltas, aisladas unas de otras.

El primer método es el ordinario, tan conocido, para conseguir cortes

muy finos de la pieza histológica a estudiar, previamente fijada, deshidratada e incluida en parafina. Como se trata del método general de obtención de secciones finas, cuya técnica es detalladamente descrita en todos los manuales de Micrografía, sólo haremos aquí algunas indicaciones acerca de particularidades no esenciales, sino simples modificaciones de la marcha a seguir.

Es conveniente insistir sobre la necesidad de vigilar cuidadosamente la fijación de la pieza o fragmento orgánico que va a ser sometido a las sucesivas manipulaciones de esta técnica. Cuestión de gran importancia es la de elección del reactivo fijador a emplear en cada caso. De ello trataremos más tarde. La deshidratación es conveniente que sea lenta, muy gradual y cuidadosa; como esta operación siempre ocasiona una contracción, es interesante para nuestro estudio conseguir que ésta sea relativamente pequeña y, sobre todo, que no ocasione deformidad morfológica en orgánulos celulares. Por consiguiente, interesa no apresurar el paso de la pieza por la serie de alcoholes, de graduación creciente hasta llegar al absoluto, y también, sin apresuramiento, ir empleando las mezclas de alcohol y xileno, xileno puro, xileno con parafina, parafina en xileno hasta llegar lentamente a la parafina pura.

El enfriamiento rápido del bloque de parafina se consigue bien con agua fría. Las secciones pueden hacerse con un buen microtomo cualquiera, pero tiene ventajas el usar el Minot, con el que se consiguen largas cintas formadas por las finas secciones, adheridas unas a otras por sus bordes. Debido a su aspecto, estas cintas son llamadas «tenias» por los micrógrafos. Interesa obtener secciones de varios valores en cuanto a su espesor, para elegir los más útiles en cada caso, así como también orientar la pieza de manera que los cortes resulten tangenciales, longitudinales o transversales. En otros casos, sin embargo, pueden convenir algunos oblicuos.

En nuestras preparaciones, para adherir las finas secciones histológicas al vidrio porta-objetos, hemos empleado siempre la disolución acuosa débil de gelatina con bicromato potásico, calentando con cuidado el porta, cuando contiene ligera capa de esta solución con los cortes; así se consigue la completa extensión de éstos, que en la cinta o «tenia» siempre están más o menos arrugados. Después, se coloca el porta verticalmente para hacer escurrir el líquido sobrante, y en esta posición se deja a la luz durante 24 ó más horas, con lo cual se insolubiliza la tenue capa de gelatina bicromatada, que fija las secciones al vidrio porta. A continuación se procede a lavados sucesivos con xileno o con tolueno para quitar por completo la parafina que impregna los cortes. Conseguido ésto, se lavan los portas con alcohol absoluto, haciendo de este modo desaparecer todo resto de xileno o de tolueno y se procede a la hidrata-



ción con la serie de alcoholes de concentración decreciente, hasta llegar al agua destilada.

Entonces se procede a la tinción o coloración de las secciones. Nosotros siempre preferimos comenzar con el método de la hematoxilina férrica, y para ello empleamos alumbre de hierro como mordiente, lavando bien a continuación y bañando los cortes con hematoxilina hasta observar fuerte ennegrecimiento. Después, para diferenciar convenientemente la coloración, se puede emplear la disolución de alumbre de hierro, el ácido clorhídrico diluído, la disolución de perborato sódico o simplemente el bicarbonato, que actúa más lentamente. Con el bicarbonato o con el perborato se consigue, además, el viraje del color a un bello azul.

Para el montaje definitivo, de hacerlo en bálsamo, que es lo mejor, es necesario deshidratar, comenzando con la serie de alcoholes de concentración creciente hasta llegar al absoluto. Enseguida se coloca sobre los cortes una gota de esencia de clavos o de bergamota para aclarar y, a continuación, el bálsamo de Canadá disuelto en xileno, encima la laminilla cubre-objetos que se someterá a débil presión hasta que el exceso de bálsamo rebose por los bordes y cierre por completo el preparado.

Procediendo del mismo modo, puede emplearse, en lugar de la hematoxilina, el carmín como colorante histológico (carmín alumínico, carmín clorhídrico u otra combinación) usando también como mordiente el alumbre de hierro o el alumbre alumínico, en cuyo caso el proceso de coloración es lento. Otros colorantes, de los conocidos con el nombre general de colores de la hulla o de anilina, son útiles para revelar la presencia de algunas sustancias o de ciertas estructuras. Con ellos ocurre que, durante el proceso de deshidratación para el montaje en bálsamo, los alcoholes arrastran por completo el color. En estos casos lo mejor es renunciar al empleo del bálsamo y montar el preparado sin deshidratar, sea en glicerina, en goma-glicerina o en gelatina glicerinada, la ventaja de este último medio de montaje es la posibilidad de conservar bien la preparación durante años si se tiene la precaución de rebordearla cuidadosamente con un betún o barniz adecuado.

El ilustre citólogo y micrógrafo español P. PUJOLA, S. J., ha descrito un modo de montar en bálsamo secciones teñidas con colorantes que no toleran el lavado con alcoholes. Consiste en cubrir la preparación, ya teñida, con una tenue capa de disolución sirupsa de goma arábiga y dejar secar al aire. La goma impregna los cortes, éstos no tardan en secarse y se puede entonces depositar sobre ellos la gota de bálsamo y encima la laminilla cubre-objetos. Este procedimiento sencillo, útil en muchos casos, tiene el inconveniente de dar lugar a arrugamiento y contracción de

estructuras celulares finas, como consecuencia de la desecación de la goma.

En nuestro estudio, tratándose de observaciones inmediatas o a plazo no muy largo, preferimos por sencillo y rápido montar las preparaciones en gelatina glicerizada, sobre todo, cuando han sido teñidas empleando Sudán III o Escarlata R, como conviene hacer para marcar la localización de grasas y lipoides en los orgánulos celulares.

A veces resulta útil realizar la coloración en masa de la pieza histológica a seccionar. Esto puede hacerse inmediatamente después de la fijación, antes de proceder a la deshidratación para incluirla en parafina. Con hematoxilina férrica se obtiene bien la coloración en masa; para ello, una vez fijada, se mantiene la pieza durante una o más horas en disolución de alumbre de hierro, se lava después repetidamente y con lentitud, y se coloca por último en la disolución de hematoxilina, que se renovará si se observa alteración o disminución en la intensidad del color. Al día siguiente se procede ya a la deshidratación, inclusión en parafina, etc.

Entre las varias ventajas que esta previa coloración del bloque determina, no es de desdeñar el que a simple vista se perciban bien las secciones en la cinta o «tenia» obtenida con el Minot. Por su color oscuro se destacan de la parafina que las circunda. Las zonas ricas en células jóvenes apretadamente dispuestas, se localizan bien por su intenso color y todo ello permite el elegir las mejores partes de la «tenia» para las preparaciones. Una vez pegados estos cortes al porta y limpios de parafina, se procede a la diferenciación del color por regresión, como de ordinario, o bien, si conviniera, a intensificarlo con nueva hematoxilina. También puede interesar la decoloración total lavando repetidamente con alumbre de hierro, para emplear después cualquier otro colorante.

La observación de estas finas secciones de los extremos de raicillas que empleamos en este estudio, nos muestra su estructura general y la distribución de los distintos tipos de células, en vías de diferenciación para formar tejidos definitivos, así como las zonas meristemáticas de donde proceden. La figura 1 es reproducción de microfotografía de una de estas preparaciones, vista con débil aumento con el fin de abarcar gran extensión del corte, que, como se indica, es una sección longitudinal practicada en la zona meristemática de raicilla de *Faba vulgaris* a los tres días de germinación.

El segundo procedimiento para confeccionar buenas preparaciones utilizables en este estudio micrográfico, es para nosotros más interesante que el de cortes, por cuanto nos permite observar las células, que son objeto de nuestra investigación completa, no seccionadas o fragmentadas. Esto lo conseguimos con facilidad siguiendo estrictamente el método de

disociación, que hace años publicamos en un trabajo dedicado al estudio citológico de núcleos y nucleolos de células vegetales (1).

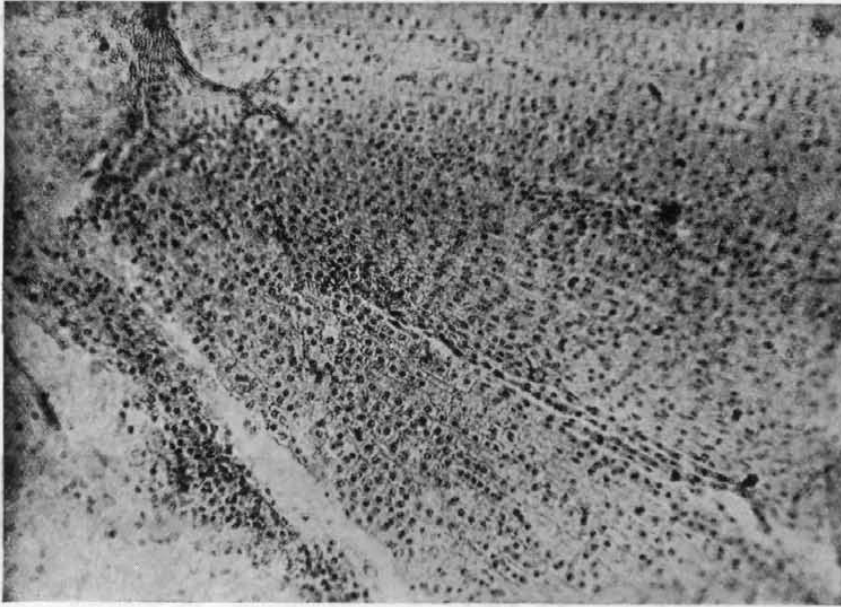


FIGURA 1.—Micrografía de sección longitudinal de la región meristemática de raíz la de *Faba vulgaris* ($\times 50$). Por su débil amplificación, esta fotografía ha podido abarcar extenso campo del corte, permitiendo por ello mostrar el aspecto general de esta zona de células muy jóvenes dispuestas a iniciar su diferenciación en tejidos definitivos. A tan débil aumento no pueden apreciarse detalles estructurales de las células. Claramente se ve que algunas parecen no poseer núcleo, apariencia debida a su sección por la cuchilla del microtomo a través del espacio entre núcleo y membrana, restando el aquél en el fragmento celular del corte gemelo. Por análoga razón otras ofrecen núcleo puntiforme por resultar seccionado este orgánulo en dos partes muy desiguales, restando en este corte la más pequeña. La misma causa es la razón de que parezcan alternar con las ordinarias algunas células aparentemente muy pequeñas. Estos, y otros que no señalamos, son enojosos inconvenientes que, para nuestro estudio, puede ofrecer el método de cortes histológicos.

Son aquí igualmente válidas las razones que allí expusimos y nos obligaron entonces a idear y ensayar procedimientos y artificios para conseguir buenas preparaciones de células meristemáticas y parenquimatosas jóvenes, enteras y completas, de manera que pudieran ser observadas y estudiadas en todos sus detalles nucleares y citoplásmicos, empleando sin inconvenientes los objetivos de inmersión de más fuerte aumento.

En efecto, para nuestro trabajo es fundamental poder apreciar con la mayor exactitud posible los tamaños, relaciones recíprocas, proporciones relativas, etc., de los distintos orgánulos celulares. En las preparaciones

(1) J. LOUSTAU: *Estudios sobre el Nucleolo en Células Vegetales*.—Anales de la Universidad de Murcia, 1943. Págs. 1-130 y 20 figuras. El método de disociación se describe en las págs. 94-99.

de cortes microtómicos finos, tales observaciones son inevitablemente difíciles e inseguras, por cuanto células y núcleos resultan seccionados por la cuchilla del microtomo según regiones o zonas distintas de unas células a otras, de manera que parecen alternar núcleos grandes, normales, con otros pequeños aparentemente, porque la sección ha separado sólo un segmento del órgano; y del mismo modo, en una misma fila celular aparecen intercaladas algunas diminutas entre otras de apariencia normal, etc. Tanto por éstas como por otras razones que indicaremos más tarde, todos los datos sobre tamaños de núcleos y nucleolos que citamos han sido determinados valiéndonos de preparaciones de células disociadas.

El aspecto general de estas preparaciones, que estimamos muy útiles en estudios citológicos, puede apreciarse en la figura 2, que es reproducción de una microfotografía a débil aumento de parte de uno de aquellos preparados micrográficos, mostrando un conjunto de tales célu-

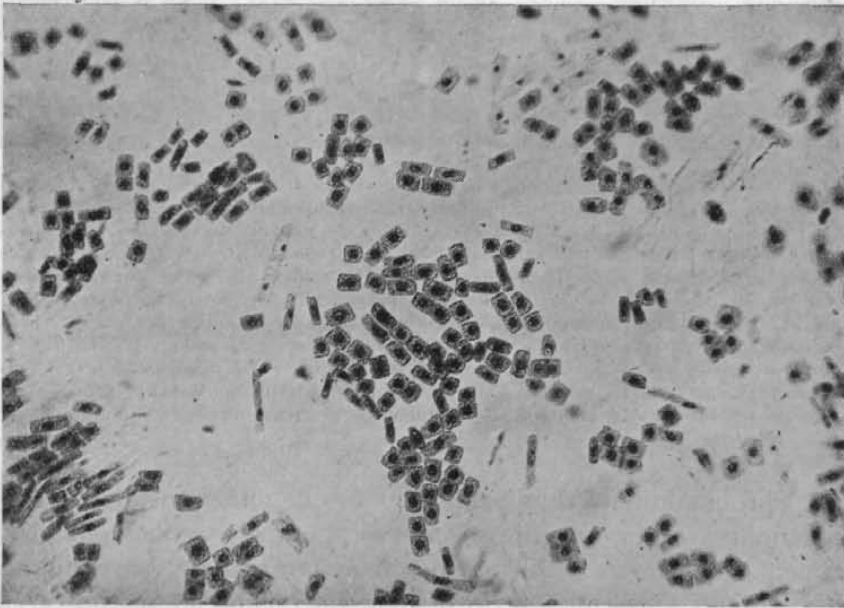


FIGURA 2.—Células meristemáticas de raíz de *Faba vulgaris*, disociadas con arreglo al método mencionado en el texto. Microfotografía obtenida con aumento de sólo 70 diámetros, con el fin de abarcar área relativamente extensa de la preparación micrográfica y percibir las ventajas de este método, que permite observar las células enteras, completas, dispuesta en una simple capa, dejando analizar todos sus detalles citoplásmicos y nucleares, sin las mutilaciones consiguientes a su corte por la cuchilla del microtomo. Por su escaso aumento, esta fotografía no es adecuada para observar detalles estructurales finos de citoplasmas o núcleos, aunque en conjunto deja percibir estados iniciales de la diferenciación histológica. Así se ven con claridad algunas células muy alargadas (destinadas a formar hacecillos conductores y tejidos de sostén) muy diferentes de otras cuadrangulares o rectangulares (paralelepípedicas en realidad) que se convertirán en parenquimatosas y son las que preferentemente estudiaremos.

las, bien que en la figura, por su pequeña amplificación, no se perciban detalles estructurales, que pueden verse bien señalados en las siguientes figuras, núms. 3 a 10.

En estudios cariológicos, modernamente se emplea mucho un procedimiento de disociación y aplastamiento de células meristemáticas, para conseguir se estiren y extiendan en un plano los elementos morfológicos nucleares, aunque resulten, como consecuencia, esparcidos y aún deshechos. Para ésto suele emplearse el ácido acético (el carmín acético si se desea estudiar particularidades cromosómicas), aplastando inconsideradamente la pequeña pieza histológica aprisionada entre porta y cubre. Es, pues, éste un método grosero, sólo útil en casos muy especiales, pues rompe por completo la relación entre los orgánulos celulares y aun destruye la morfología propia de estos pequeños constituyentes de la materia viva. En histología vegetal se ha empleado mucho la disociación, a base de emplear reactivos enérgicos, para estudiar los elementos de la madera o de los haces esclerenquimatosos. En histología animal se hace uso de la disociación mecánica, en ciertos casos, para aislar fibras musculares u otros elementos.

En nuestro método de disociación, la pequeña pieza histológica se deposita cuidadosamente sobre el porta, ya coloreada y sin cemento intercelular; así, al montar la preparación, las células se deslizan suavemente unas sobre otras hasta colocarse en un plano, obedeciendo a una muy ligera presión sobre el cubre. De este modo conservan plenamente su integridad y su forma propia, aunque resulten alteradas sus primitivas posiciones. Aquel deslizamiento suave sólo puede conseguirse montando la preparación en gelatina glicerizada o en glicerina y presionando sobre el cubre débilmente y con ligero movimiento de balanceo. Si esta presión se exagera las células se fragmentan, esparciéndose su contenido. No hemos logrado obtener preparaciones de este tipo montadas en bálsamo de Canadá; pues en este medio las células tienden a aglutinarse y no se extienden en capa, sino que se rompen y fragmentan al presionar sobre el cubre.

En el texto antes citado, ya advertimos que siempre deben compararse estas preparaciones de células disociadas con otras de secciones microtómicas del mismo material histológico, que son indispensables para enseñarnos el lugar o posición que corresponde a los varios tipos de células en el conjunto del órgano, puesto que al deslizarse unas sobre otras ya disociadas y disponerse en capa simple, aquellas relaciones han de resultar alteradas. Además, la observación comparada de preparaciones según ambos métodos del mismo material, nos revela diferencias considerables en los valores obtenidos al medir dimensiones de células, núcleos y nucleolos. La causa de esto es la contracción que sufren las células y

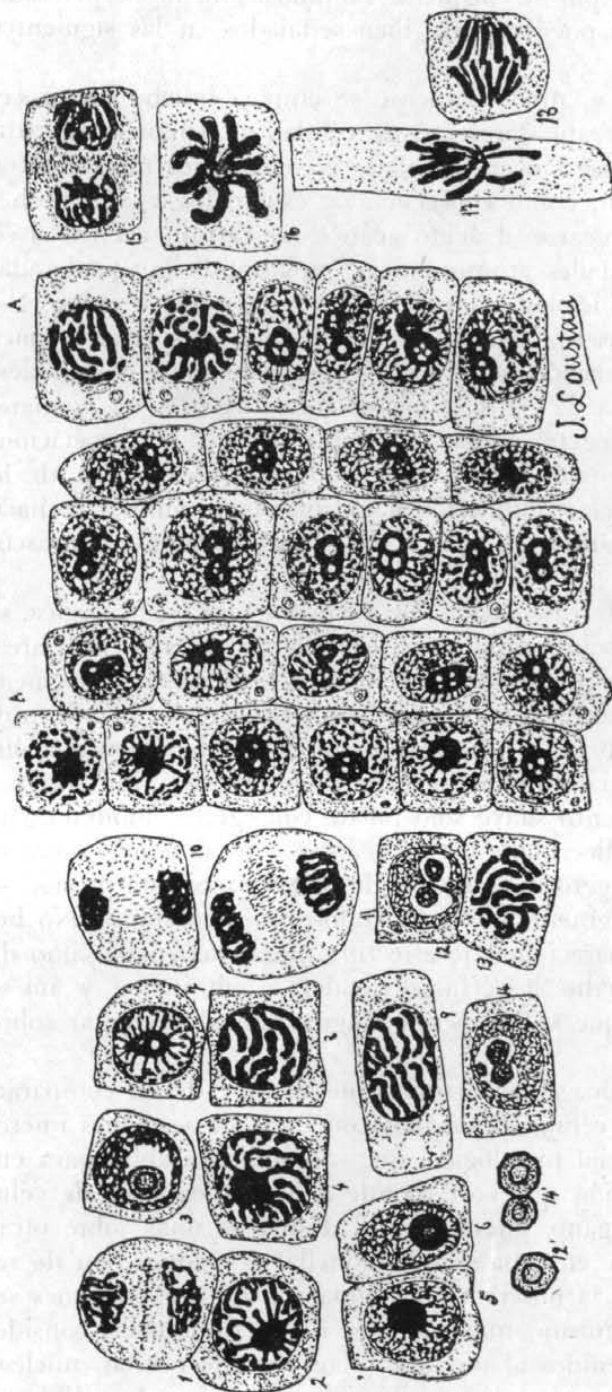


FIGURA 3.—Dibujo directo ($\times 750$) con cámara clara de diversas células de un meristemo disociado de raíz normal de *Faba vulgaris*. En la preparación se empleó el fijador Zenke (compuesto de sublimado, bicromato potásico y ácido acético) y por ello se conservó bien la estructura nuclear, pero no la citoplásmica, cuyo condrioma está excesivamente alterado. Se han dibujado varias células, señaladas con el núm. 1 a 18, que presentan sus núcleos en distintos estados de cariocinesis. En 12' y 14' se indica el aspecto de los nucleolos de las células señaladas con los mismos números. Las cinco filas de células AA en partes aun coherentes por sus membranas laterales, se hallan en intercisis o iniciando la profase, dejando percibir las conexiones entre el nucleolo y la red cromática.

En conjunto, esta figura, como igualmente las tres siguientes, muestran el aspecto de estas preparaciones de células disociadas, conservadas enteras y completas, permitiendo la observación de todos los detalles morfológicos, contar los cromosomas, medir sus tamaños, etc. Compárense estas figuras con las 7 á 10, que son reproducción de microfotografías de preparaciones por disociación, ya de meristemos normales, ya de 1's que fueron influidos por disoluciones de cisteína.

sus orgánulos durante el proceso de deshidratación e inclusión en parafina, sobre todo si no se realiza con suficiente lentitud. La contracción puede llegar hasta un 15 ó 20 por ciento y tener lugar con perfecta regularidad, por lo que no se altera la morfología de las diversas partes de la célula.

Por estas razones, para las medidas micrométricas que figuran en este trabajo, nos hemos valido siempre de preparaciones por el método de disociación, con el fin de evitar obtener valores inferiores a los reales y vencer la dificultad que supone analizar cuidadosamente si la célula que se observa en cada caso ha sido o no mutilada por la cuchilla del microtomo.

En este artículo, como antes hemos dicho, tratamos de dar a conocer la influencia del etil-uretano, como agente idioquinético modificador del metabolismo en *Faba vulgaris*, con indicación de las variaciones citológicas que determina. Es la observación comparada de células de plantas normales con las análogas procedentes de plántulas que sufrieron la acción del etil-uretano, lo que nos permite apreciar la influencia de este agente idioquinético sobre el desarrollo, morfología y relaciones recíprocas de los diversos orgánulos nucleares y citoplásmicos. Para revelar químicamente la mutación metabólica, nos hemos valido de los lipoides elaborados por las jóvenes células a expensas de las reservas seminales y hemos determinado la cantidad de lípidos en las células tratadas con el agente idioquinético y en las no tratadas, comparando los resultados y relacionándolos con lo que la observación micrográfica nos revela.

A consecuencia de esto, surge un interés especial por algunos elementos citoplásmicos, condriosómicos ó dictiosómicos, que se muestran particularmente afectados o modificados por influencia del etil-uretano que actuó sobre el embrión en las circunstancias y proporciones que indicaremos después. La necesidad de revelar en las células no sólo la localización de sus lípidos, sino su relativa proporción, es otra de las razones que nos han inducido a valernos para este estudio de preparaciones por disociación, puesto que al confeccionarlas no se emplean reactivos disolventes de grasas, que en cambio intervienen en el método de cortes tras inclusión en parafina. En éste es preciso emplear el xileno repetidamente, y este líquido, a la vez que disuelve la parafina, arrastra los lípidos en gran proporción, aunque no totalmente por su fuerte adherencia a ciertas estructuras celulares dictiosómicas.

Es bien sabido que para conseguir buenas y útiles preparaciones micrográficas, adecuadas al estudio que se pretenda realizar, es de capital importancia emplear el reactivo fijador conveniente, cuya elección dependerá de las especiales particularidades morfológicas que nos interese revelar o hacer resaltar.

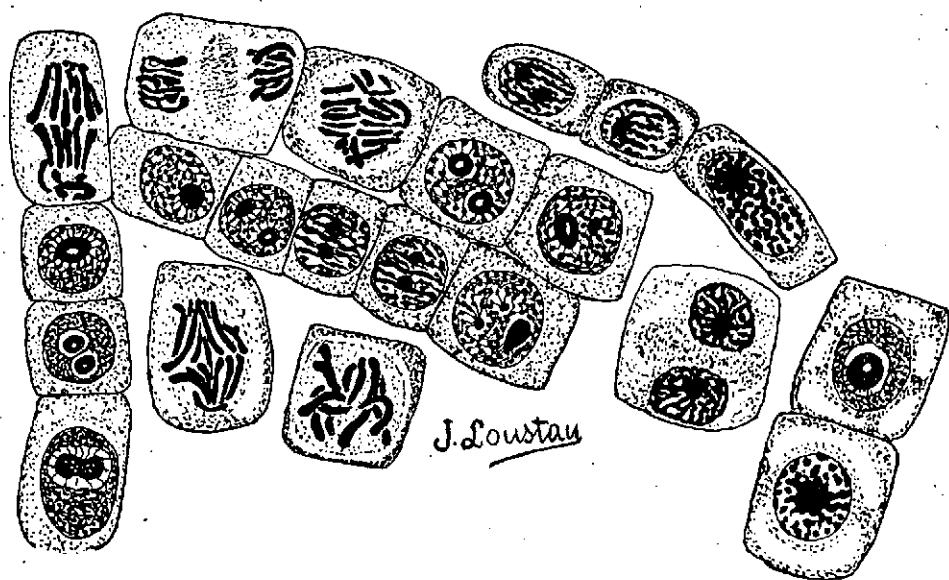


FIGURA 4.—Dibujo directo con cámara clara de células meristemáticas normales, de raíz de *Faba vulgaris*, amplificadas ($\times 750$). El meristemo fué tratado con el fijador Zencke y preparado por disociación. El método de coloración fué el ordinario de hematoxilina férrica. Las células aquí dibujadas presentan aspectos varios dentro de las diversas fases de la actividad cariocinética propia de los meristemas. Obsérvese la perfecta fijación de los núcleos, cromosomas y nucleolos, en contraste con la mala conservación de los orgánulos y estructuras citoplásmicas, que resultan muy alteradas por la acción del ácido acético del líquido Zencke.

Todos los fijadores, al matar rápidamente las células coagulando sus proteínas, alteran más o menos profundamente las estructuras citoplásmicas y nucleares. Pero el grado o intensidad de la alteración producida, así como el orgánulo, u orgánulos, que preferentemente la sufren, varía mucho según la naturaleza química del fijador, su concentración, momento de su empleo, etc. Por su gran importancia, esta cuestión ha sido muy estudiada y muy discutida. De ella se han ocupado notables publicaciones de técnica histológica y citológica, llegando a suscitarse vivas y apasionadas controversias sobre la estructura real de los protoplasmas y su desfiguración por el empleo de fijadores (2). La observación de células vivas, especialmente con los modernos microscopios, capaces de distinguir estructuras por muy débiles diferencias de índices de refracción dentro del campo microscópico, nos enseña la variación que el reactivo fijador introduce en la estructura real. En todo trabajo micrográfico es, pues, preciso indicar la técnica seguida en la fijación, para evitar posibles confusiones al tratar de comprobar observaciones y descripciones.

(2) Sobre este interesante asunto, véase: J. LOUSTAU: *Estructura de la Materia viva*.—Publicaciones de la Universidad de Murcia, 1948, 110 págs. y 8 figs.—Véase también la antes citada publicación sobre Nucleolos en Células Vegetales.

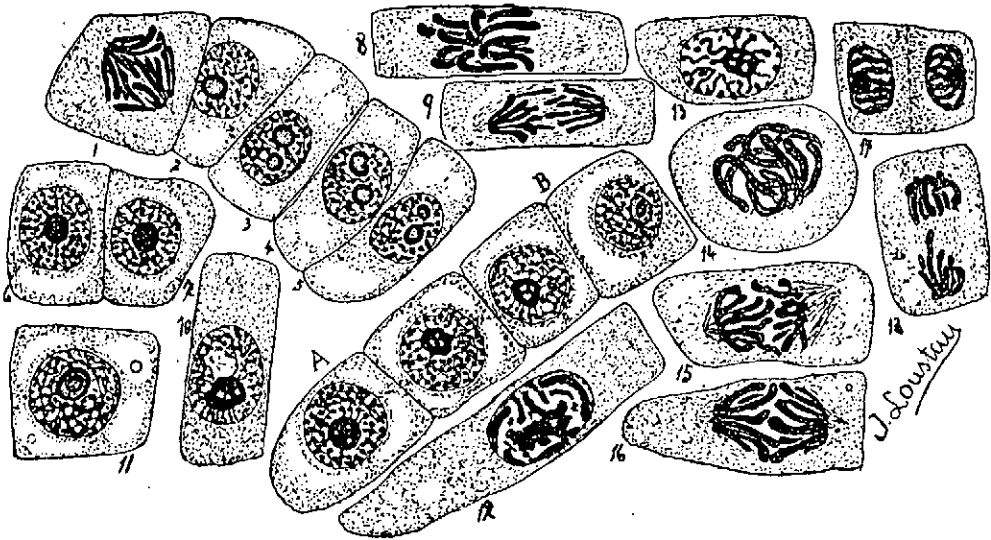


FIGURA 5.—Células normales, de la región meristemática de raíz de *Faba vulgaris*, dibujadas con cámara clara a la ampliación de 750 diámetros, directamente de preparación por disociación, coloreada con hematoxilina férrica y previamente fijada con el líquido Zencke. En esta figura, complementaria de las dos anteriores, se muestran células cuyos núcleos intercinéticos están iniciando la profase, tales como los de la fila AB y los núms. 2 a 7, 10, 11 y los tres primeros de la fila AB. Estado profásico ya avanzado se observa en las células 12, 13 y 14, metafásico en la 8, anafásico en la 1, 9, 15 y 16, y telofásico en la 17 y 18. Estas preparaciones permiten estudiar detalladamente la morfología y estructura de la materia viva protoplásmica en las distintas fases de la vida y evolución celular.

Si el objeto de estudio es preferentemente el núcleo y sus orgánulos (cromosomas, nucleolo) convendrá usar fijadores que al coagular y endurecer, no alteren morfológicamente estos elementos nucleares, ni los modifiquen de modo a perturbar su posible coloración por reactivos apropiados, para hacer resaltar sus particularidades, sin preocuparnos en este caso de evitar que el citoplasma celular, por el contrario, resulte profundamente alterado, cosa que a veces puede convenir si con ello se consigue mejor visibilidad del núcleo.

Así ocurre, por ejemplo, cuando se emplea el fijador ZENCKE (que es una mezcla de sublimado, bicromato potásico y ácido acético), tan adecuado para el núcleo; pero en cambio el condrioma resulta destruido (como con cualquier otro fijador que contenga ácido acético). Ahora bien, esta alteración del condrioma permite que, ultimada la preparación, las estructuras nucleares se perciban muy claramente. Las figuras 3, 4 y 5 son reproducciones de dibujos directos, con cámara clara, de células meristemáticas disociadas de raíz de *Faba vulgaris*, normales, fijadas con reactivo ZENCKE. Sus núcleos (red nuclear, cromosomas, nucleolos, etc.) no se han alterado y se muestran perfectamente teñidos por la hematoxilina férrica. En cambio el citoplasma aparece finamente granu-

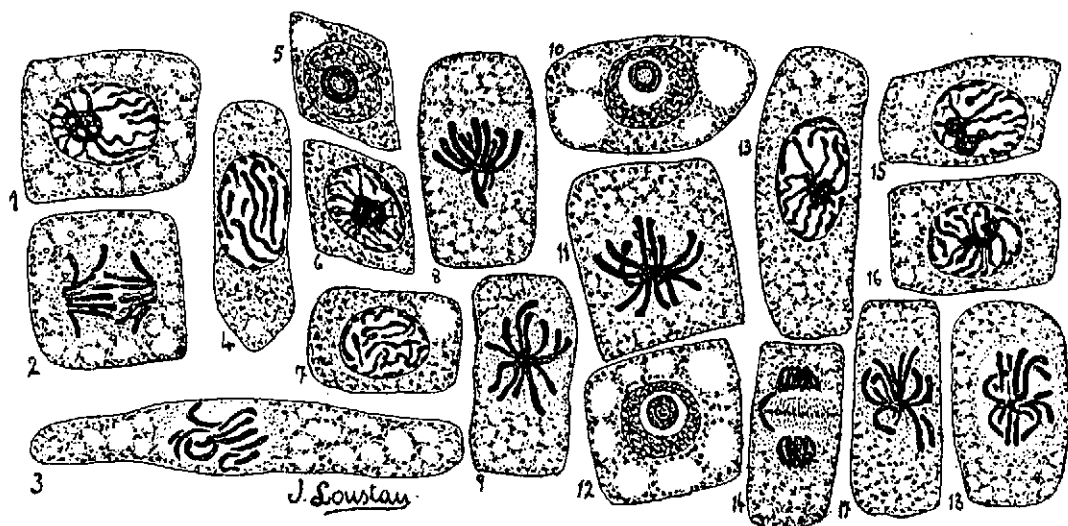


FIGURA 6.—Células disociadas, normales, de meristemo de la raíz de *Faba vulgaris*, directamente dibujadas con cámara clara y amplificación de 800 diámetros, de preparación por disociación, previa fijación del meristemo con ácido crómico, seguido de postromización con bicromato potásico. Como colorante se empleó la hematoxilina férrica.

Obsérvese la diferencia en el aspecto del citoplasma, entre las células aquí dibujadas y las de las anteriores tres figuras. El dibujo muestra claramente que la fijación con ácido crómico no destruye el condrioma citoplásmico, a diferencia de lo ocurrido al emplear el Zencke. No obstante, resulta algo alterado, y por ello, si se desea mejor conservación, debe emplearse el picro-formol (reactivo Bouin) pasando después a la disolución de bicromato potásico. En este dibujo se han seleccionado células en fases interesantes y varias de cariocinesis para mostrar cómo el ácido crómico es igualmente buen fijador de las estructuras nucleares y para ello se ha prescindido de presentar los condriosomas situados frente a ellas que pudieran prestarse a confusión.

lar, muy poco teñido, con pequeñas y abundantes vacuolas, pero sin dejar ver claramente su condrioma, ya que éste ha sido muy alterado y destruido por el ácido acético, que es uno de los esenciales componentes de este reactivo fijador.

Comparemos estas anteriores figuras con la n.º 6, que es igualmente reproducción de un dibujo con cámara clara, de células de una preparación micrográfica semejante a las anteriores; pero en ella se empleó como fijador del meristemo el ácido crómico seguido de bicromato potásico. Al emplear este fijador, no sólo las estructuras nucleares han sido respetadas, sino también las citoplásmicas, bien que no con mucha perfección. En este caso, el condrioma, bien perceptible, puede estorbar algo a la buena visibilidad del núcleo y elementos nucleares, cosa que no se aprecia en la figura por no haber sido dibujados los condriosomas situados frente a la faz anterior de aquél.

En nuestro estudio, es muy importante conservar inalterados los condriosomas y dictiosomas en cuantas preparaciones micrográficas hemos

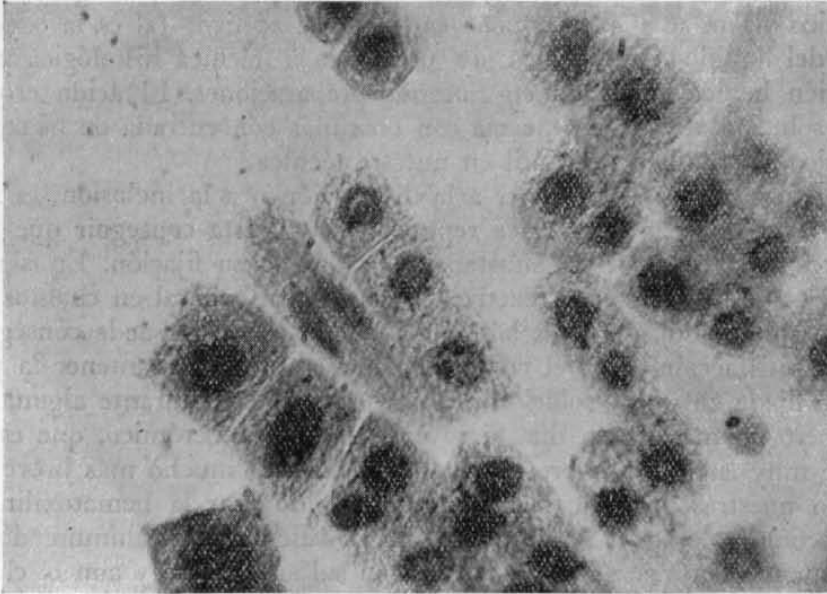


FIGURA 7.—Microfotografía de células disociadas, normales, de la zona meristemática de raíz de *Faba vulgaris* ($\times 800$), procedente de germinación durante tres días de semilla no sometida a la influencia del etil-uretano. El meristemo fué fijado con picro-formol. La coloración empleada fué la hematoxilina férrica, montándose la preparación en gelatina glicerizada por el método de disociación. Exactamente el mismo fijador y método de coloración y disociación ha sido el usado en las preparaciones correspondientes a las siguientes figuras 8, 9 y 10. La fotografía permite ver células meristemáticas pequeñas, poliédricas, isodiamétricas, a la vez que otras mayores, ya iniciando su transformación en parenquimatosas y mostrando en su citoplasma un denso condrioma de elementos normalmente desarrollados. Se enfocaron también un par de células muy alargadas, correspondientes al cilindro central y que multiplicándose formarán al fin elementos conductores y fibrosos.

empleado y emplearemos con el propósito de revelar las modificaciones citoplásmicas que determinan dosis distintas, que más tarde indicaremos, del etil-uretano actuando como agente idioquinético. Teniendo esto en cuenta, hemos utilizado preferentemente el picroformol o reactivo BOVIN (mezcla de formol con disolución saturada de ácido pícrico) que es buen fijador citoplásmico y no altera ostensiblemente la morfología nuclear. Se le puede añadir un 1 % de ácido acético sin grave inconveniente, con lo que mejora la fijación del núcleo; pero en nuestro caso es preferible prescindir de este ácido y usar picro-formol puro, en el cual, sin inconveniente, puede permanecer sumergida la pieza histológica durante tiempo indefinido, pues este reactivo actúa a la vez como conservador, cosa que no ocurre con otros fijadores.

El ácido ósmico (reactivo caro y de manejo peligroso) al 1 % es excelente fijador que además actúa sobre los lípidos, ennegreciéndolos y facilitando así su observación en el citoplasma. Más perfecta es la fijación

si esta disolución de ácido ósmico se mezcla con otra análoga de ácido crómico y aun se añade pequeña cantidad de acético; tal es la composición del líquido FLEMMING, muy usado en la técnica histológica y que también hemos empleado en nuestras preparaciones. El ácido crómico en disolución al 2 %, en mezcla con otra más concentrada de bicromato potásico, es también muy útil en nuestra técnica.

Siempre, antes de proceder a la disociación o a la inclusión, es necesario lavar la pieza histológica repetidamente, hasta conseguir que desaparezca toda traza de las sustancias usadas en su fijación. En algunos casos, como ocurre con el reactivo ZENCKE (y en general en cuantos contienen sublimado), sólo tras largos y repetidos lavados puede conseguirse esto a satisfacción. Para el condrioma es siempre útil mantener la pieza recién fijada en una disolución de bicromato al 1 % durante algunas horas, pero no más de un día. Si se emplea el ácido crómico, que es oxidante muy enérgico, es preciso que su acción sea mucho más breve.

En nuestras preparaciones hemos preferido usar la hematoxilina férrica como coloración fundamental. El mordiente es el alumbre de hierro, aunque también se puede emplear el sulfato ferroso y aun el cloruro de hierro. Se facilita mucho la tinción del condrioma si, inmediatamente del lavado para separar el exceso de alumbre, se trata la preparación con sulfoalizarinato sódico, que no solamente tiñe, sino que refuerza la retención del hierro adsorbido por las estructuras coloidales condriosómicas y, por tanto, la posterior fijación de la hematoxilina. El viraje de ésta al color azul se consigue con bicarbonato o con perborato sódico, que además actúan como diferenciadores lentos, según antes se indicó.

El sulfoalizarinato sódico actúa como verdadero mordiente si para teñir el condrioma se emplea, no la hematoxilina, sino la Rubina S (Fuchsina ácida) o el Violeta cristal, que son los colorantes clásicos de estos orgánulos citoplásmicos. Para demostrar la presencia y localización de lípidos, los mejores colorantes son el Sudán III y el Escarlata R. Con ellos puede ensayarse la doble coloración, si previamente se tiñó con hematoxilina débil; pero su color queda enmascarado si la grasa ha sido ennegrecida por el ácido ósmico o si está mezclada con estructuras proteínicas y éstas han sido fuertemente teñidas por la hematoxilina.

Estimamos suficiente lo expuesto como indicación de la técnica micrográfica empleada para este estudio, aunque no hemos precisado detalles ni nos hemos detenido en descripciones particulares. Siendo nuestro propósito establecer la relación entre mutaciones bioquímicas o metabólicas provocadas y correlativas modificaciones estructurales del protoplasma, hemos cuidado que las observaciones comparadas, que nos enseñen aquella correlación, sean siempre realizadas valiéndonos de preparaciones rigurosamente confeccionadas con idéntica técnica, para eliminar la

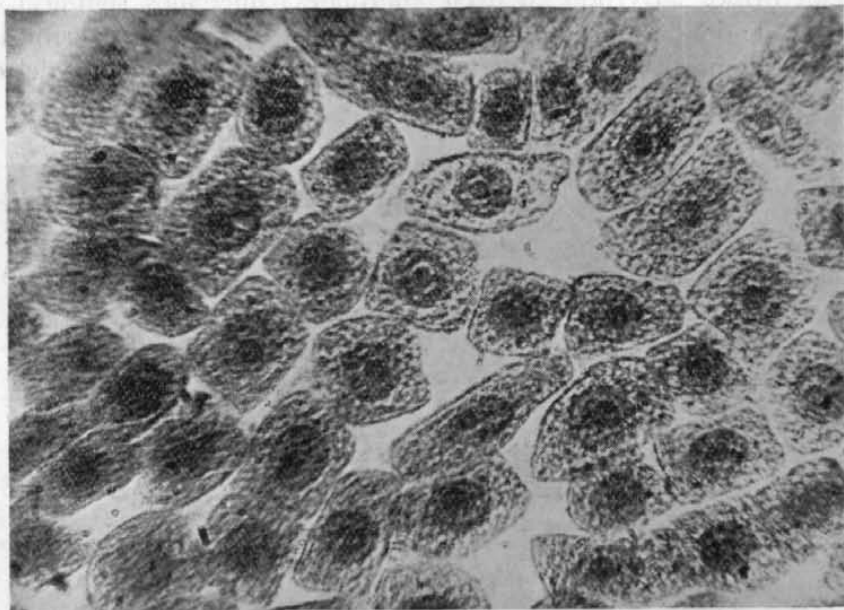


FIGURA 8.—Microfotografía de células meristemáticas disociadas de raíz de *Faba vulgaris*, procedente de semilla que se sometió a la acción del etil-uretano en disolución al 0,5 % durante 24 horas y seguidamente mantenida germinando durante tres días. Transcurrido este plazo, se cortaron las zonas cercanas a las puntas de las raicillas en crecimiento, se fijaron con picroformol, se prepararon por el método de disociación, se tiñeron con hematoxilina férrica y se montaron en gelatina glicerinada. Si se compara con la microfotografía de la fig. 7 se observará que los núcleos han aumentado de tamaño, pero no sus nucleolos, y en el citoplasma se percibe claramente la hipertrofia de muchos de sus orgánulos corpusculares, trátese de condriosomas o de dictiosomas. La ampliación, idéntica a la de la figura anterior y a la de las dos siguientes, es de 800 diámetros.

sospecha de que la variación percibida puede ser artefacto provocado por el cambio de fijador o por las condiciones, edad, etc. de la pieza histológica o por cualquier otra circunstancia más o menos accidental.

Las microfotografías reproducidas en las figuras 7, 8, 9 y 10 son reproducciones de microfotografías de células meristemáticas disociadas de raíz de *Faba vulgaris*, preparadas siguiendo la misma técnica y en idénticas condiciones. Las puntas de las raíces se recolectaron a los tres días de iniciarse la germinación de la correspondiente semilla; fueron fijadas con picroformol, se les sometió a las manipulaciones de disociación, se colorearon con hematoxilina férrica y se montaron en gelatina glicerinada. Las microfotografías se obtuvieron con el mismo aparato y todas amplificadas 800 diámetros. Sin recelo alguno, son pues, perfectamente comparables.

La figura 7 reproduce la microfotografía de una preparación por disociación de células meristemáticas normales de la raíz de dicha planta

y, según hemos advertido, al decir «normales» queremos significar que la semilla de donde proceden no fué sometida a la acción de agente idioquinético alguno. El grabado permite apreciar bien el desarrollo del condrioma, en modo alguno hipertrofiado.

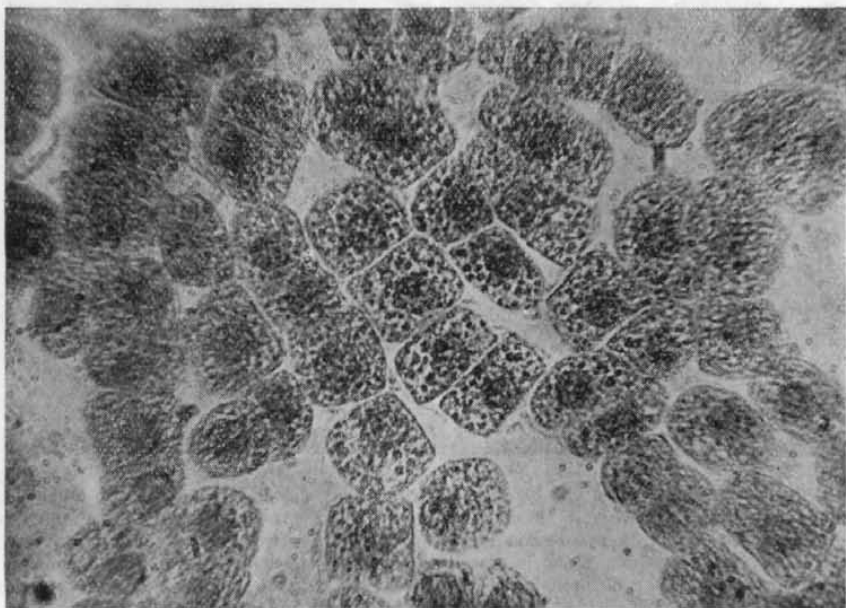


FIGURA 9.—Microfotografía de células meristemáticas disociadas de raíz de *Faba vulgaris*, procedente de semillas que fueron sometidas durante 24 horas a la influencia del etil-uretano en disolución al 1%, máxima concentración posible, tras la cual esta substancia es completamente letal. Inmediatamente después, las semillas se mantuvieron en germinación durante tres días, manifestándose gran lentitud en el desarrollo, con deformidad en las raicillas así producidas. A continuación se prepararon como en el caso de las mencionadas en las figuras anteriores. Obsérvese que por efecto de la elevada concentración del agente idioquinético, se ha producido considerable reducción en el volumen de los núcleos (a la inversa de lo sucedido si la concentración no excede del 0,5 %) y también de los nucleolos (en los cuales la reducción tiene lugar ya a la concentración del 0,5 %). En cambio los orgánulos citoplásmicos, condriosómicos o dictiosómicos, se han hipertrofiado lo mismo o más que en el caso de la figura anterior. En algunos de estos orgánulos, que por su posición han resultado bien enfocados, puede verse su estructura, compuesta de una zona cortical gruesa bien teñida con la hematoxilina y una esférula central clara, que fija fuertemente el Sudán III o el Escarlata R, por su gran riqueza en lípidos.

Las figuras 8, 9 y 10 son microfotografados de preparaciones de análogas células meristemáticas disociadas, pero procedentes de ejemplares de raíces producidas por semillas que se sometieron a la acción de disoluciones de etil-uretano. En ellas es muy perceptible la hipertrofia de condriosomas. Basta para evidenciarlo comparar estos grabados con el de la figura 7.

En la figura 8 se fotografiaron células de la zona meristemática de la

raíz de *Faba vulgaris* procedente de semilla que se mantuvo sumergida durante 24 horas en una disolución de etil-uretano al 0,5 % e inmediatamente después se hizo germinar en líquido hidropónico durante tres días, al cabo de los cuales se recolectaron las raicillas producidas, se fijaron con picro-formol y se prepararon del modo descrito antes.

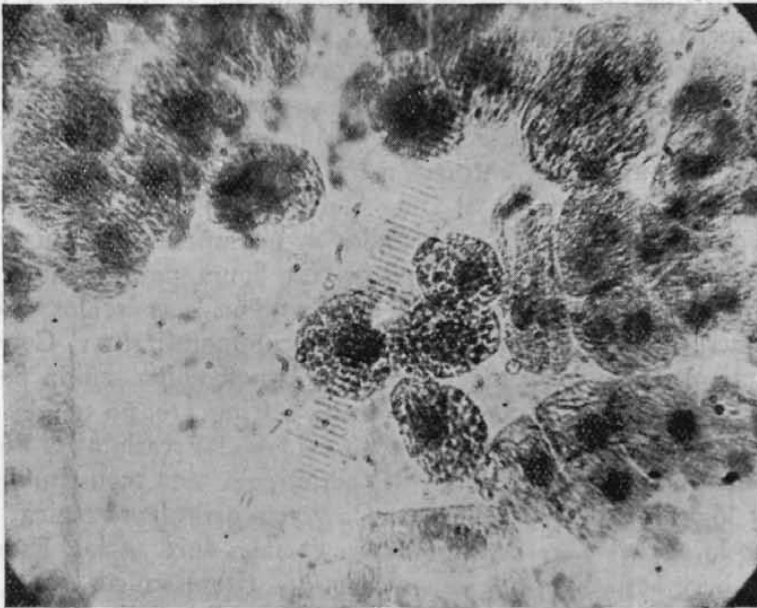


FIGURA 10.—Microfotografía de células meristemáticas disociadas de raíz de *Faba vulgaris*, desarrolladas al germinar durante tres días semillas que previamente, durante 24 horas, fueron sometidas a la acción del etil-uretano en disolución al 1 %, exactamente lo mismo que en el caso de la figura 9, preparadas por disociación de la misma manera y vistas con el mismo aumento de 800 diámetros.

En ésta se fotografió juntamente la escala micrométrica ocular y resultaron bien enfocadas 4 células, cuyos orgánulos citoplásmicos hipertrofiados permiten ver fácilmente la estructura vesicular que indicamos en la descripción de la figura anterior. Obsérvese también la ostensible reducción de tamaño que tiene lugar tanto en los núcleos como en los nucleolos, consecuencia de la acción del agente idioquinético a tan elevada concentración, como es, para estos efectos, la del 1 %.

Exactamente el mismo tratamiento se empleó en los ejemplares utilizados en las preparaciones correspondientes a las microfotografías representadas en las figuras 9 y 10; pero con la diferencia de que las respectivas semillas en las 24 horas anteriores a su germinación fueron tratadas con disolución de etil-uretano al 1 %, es decir, a doble concentración que en el caso representado en la figura anterior. La escala micrométrica ocular fué también enfocada en esta figura 10. Claro es que el enfoque sólo es bueno en el centro del campo fotográfico y por esto son las células allí situadas las que mejor dejan percibir sus detalles estructu-

rales. Diremos también que la concentración del 1 % en la disolución de etil-uretano es ya letal o está al borde de la letalidad y la germinación subsiguiente se realiza con dificultad y con deformidad de la plántula producida. Pero interesó emplear tan elevada dosis del agente idioquinético para observar en las células sus máximos efectos.

En las fotografías de las figuras 8, 9 y 10 los gruesos corpúsculos citoplásmicos que tan claramente se observan son condriosomas o dictiosomas hipertrofiados por la influencia del agente idioquinético que actuó sobre la semilla previamente a su germinación. La comparación con la microfotografía de la figura 7 no deja sobre ello duda alguna, puesto que la técnica micrográfica seguida ha sido idéntica en los cuatro casos. Podemos, pues, sentar la afirmación de que el etil-uretano, convenientemente usado, determina en el curso del desarrollo celular la formación de estructuras distintas a las normales y, claramente un microgigantismo de ciertos elementos citoplásmicos. La figura permite apreciar una estructura vesicular en muchos de estos gruesos corpúsculos citoplásmicos que resultaron bien enfocados al microfotografiarlos: Constan de una zona cortical o corteza relativamente gruesa, bien teñida por la hematoxilina, y una parte central clara, más refringente, no teñida por este reactivo, pero coloreable por el Sudán III o el Escarlata R. Por tanto, deducimos que la parte central del corpúsculo está constituida por lipoides y lógicamente suponemos que la zona cortical proteínica, que por completo la envuelve, es la elaboradora de tales sustancias. Esta estructura nos hace sospechar que estos orgánulos citoplásmicos, tan hipertrofiados por la acción del etil-uretano, son en realidad dictiosomas.

Los análisis químicos, cuyos resultados y conclusiones mencionaremos en otro lugar, demuestran igualmente una notable acción excitante sobre la actividad metabólica elaboradora de lípidos, determinada por el etil-uretano. La dosis óptima del reactivo idioquinético para estos efectos es, como después veremos, bastante inferior a la empleada en el tratamiento de los ejemplares estudiados micrográficamente.

El etil-uretano, actuando sobre la semilla dispuesta para germinar según el modo ya indicado, ejerce también acción excitante en el desarrollo de partes u orgánulos nucleares, con el consiguiente aumento del volumen total del núcleo. Micrográficamente hemos medido los volúmenes de sus núcleos en millares de células, valiéndonos siempre de preparaciones por disociación y guardando las precauciones de identidad de método técnico para compararlas.

En la Tabla I se anotan los volúmenes hallados midiendo los núcleos en un millar de células de las zonas meristemáticas de raíces de *Faba vulgaris*, normales, es decir, que no experimentaron la acción del agente idioquinético y fueron recolectadas y preparadas a los tres días de germi-

nación de las correspondientes semillas. Se trata, pues, de las mismas células parcialmente microfotografiadas en la figura 7. Obsérvese en la tabla que el valor modal o moda corresponde a la clase $1.124 \mu^3$; pero son también frecuentes los valores que difieren del modal en $200 \mu^3$ en más o en menos.

La Tabla II indica de análogo modo, los valores hallados midiendo el volumen nuclear en 1.000 células de preparaciones micrográficas de meristemos de idénticas raíces, pero de plántulas procedentes de semillas que experimentaron la acción del etil-uretano a la concentración de 0,5%. Observemos que ahora el valor modal corresponde a la clase de $1.386 \mu^3$ de volumen, con una caída brusca en el número de núcleos de mayor dimensión. En cambio son frecuentes los valores inferiores al modal en 200 y aún en 400 micras cúbicas. Por consiguiente, la influencia del etil-uretano, a la concentración expresada, se manifiesta en el núcleo por considerable aumento en su volumen, viniendo a convertirse en modal el valor que en las células normales corresponde al máximo, pero sin que ello implique la formación de otro máximo que pueda obedecer a una curva de Galton ordinaria. El grabado de la figura 8 representa células idénticas a las aquí referidas.

Si en la disolución empleada en el tratamiento previo de las semillas de *Faba vulgaris* aumentamos la concentración del etil-uretano, llegando hasta el 1 %, que es el límite tras el cual se llega a la completa letalidad, se observa, en cuanto al desarrollo volumétrico de los núcleos celulares, un fenómeno contrario al que apreciamos en el caso anterior. Es decir, ahora el valor modal de los volúmenes nucleares retrocede hasta la clase $372 \mu^3$ de volumen y son también frecuentes valores que difieren del modal en 200 micras cúbicas en más o en menos, según indican los datos consignados en la Tabla III. Por consiguiente, de una manera brusca, al acercarnos al límite letal en la concentración del agente idioquinético, su acción respecto al núcleo cambia, de manera que de excitante se ha convertido en fuertemente deprimente, determinando un verdadero enanismo nuclear. Los grabados de las figuras 9 y 10 representan células cuyos núcleos se hallan en este caso.

Trazando con los anteriores datos los correspondientes polígonos de frecuencia y combinando en la misma gráfica los tres distintos casos de las Tablas I, II y III, se aprecia a primera vista el efecto excitante o deprimente sobre el desarrollo nuclear, según que la concentración del etil-uretano en la disolución empleada fuera de 0,5 % o del 1 %. (Fig. 11).

La escala de valores (que en biometría se llaman «clases») de los volúmenes se marca en la línea horizontal inferior, o eje de abscisas, en micras cúbicas. En los lugares correspondientes a los valores hallados en la medición directa, se trazan ordenadas (líneas de puntos en la figura).

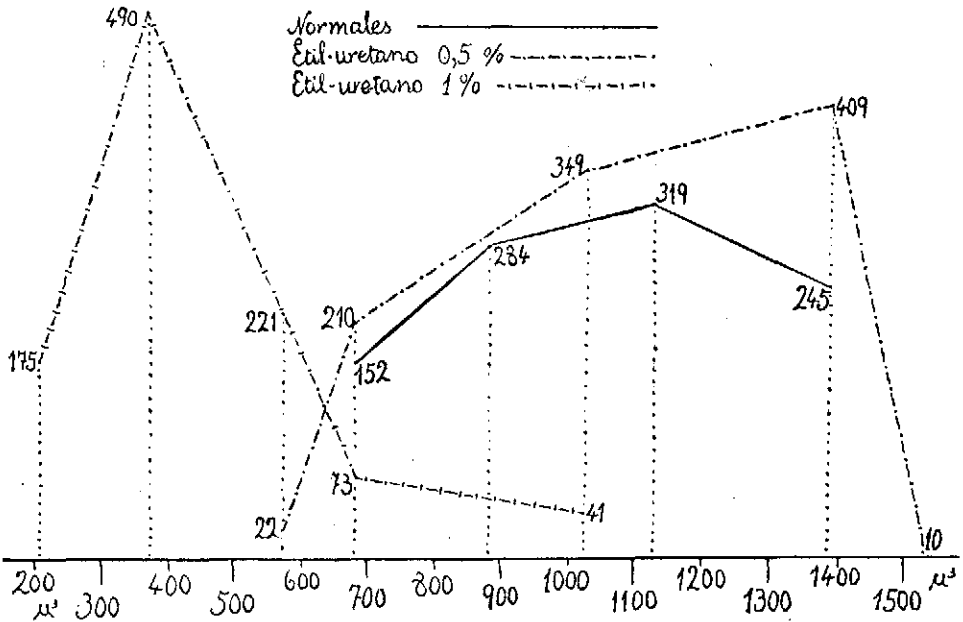


FIGURA 11.—Polígonos de frecuencia, como representación gráfica de la variabilidad en el valor del volumen nuclear de células meristemáticas de raíz de *Faba vulgaris* en los tres distintos casos expresados en las Tablas I, II y III. En la figura, se superponen los tres polígonos correspondientes, señalados con líneas diferentes, según se indica en el dibujo. En la línea horizontal de abscisas se ha señalado una escala de valores en micras cúbicas. Las clases que constan en las referidas tablas se marcan con líneas de puntos perpendiculares al eje de abscisas en el lugar que indica su valor y de longitud proporcional a la frecuencia, indicada también por la cifra escrita en el extremo de cada perpendicular, los puntos así señalados se unen por rayas diferentes en cada caso, para indicar la gráfica de variabilidad. La figura muestra con claridad el cambio que experimenta la moda o valor modal por la influencia del etil-uretano, en dirección al microgigantismo si la concentración no excede del 0,5 % y, por el contrario, más enérgicamente en dirección al microenanismo si la concentración de tal agente es del 1 %.

proporcionales al número (que en biometría se dice «frecuencia») de núcleos que lo presentan del total de los medidos. La frecuencia por mil la señalamos, además, por la cifra correspondiente. Uniendo los puntos así marcados por una línea, que resultará quebrada, se obtiene el llamado *polígono de frecuencia*, equivalente a la gráfica que expresa la variación. Como en nuestra figura superponemos tres polígonos, tal línea la señalamos *continua* en el caso de núcleos de células normales (Tabla I), con línea de *punto y raya* para los núcleos que fueron influenciados por el etil-uretano al 0,5 % (Tabla II) y con línea de *raya y trazado cruzado* cuando los núcleos experimentaron la influencia de este agente en disolución al 1 % (Tabla III).

Si después de considerar el núcleo en conjunto, medimos los volúmenes, observaremos fenómenos distintos. En la Tabla IV se anotan los re-

TABLA I

Variabilidad en el *volumen de núcleos* de células meristemáticas en raíces de *Faba vulgaris*, normales, a los tres días de germinación. Medidas en preparaciones por disociación.

CLASES Volúmenes	FRECUENCIA Número	PROPORCION %
681,8 μ^3	152	15,2
885,6 μ^3	284	28,4
1.124,6 μ^3	319	31,9
1.386,3 μ^3	245	24,5
	1.000	

TABLA II

Variabilidad en el *volumen de núcleos* de células meristemáticas en raíces de *Faba vulgaris*, desarrolladas a los tres días de germinación de semillas previamente tratadas durante 24 horas por una disolución de *etil-uretano al 0,5%*. Medidas en preparaciones por disociación.

CLASES Volúmenes	FRECUENCIA Número	PROPORCION %
576,6 μ^3	22	2,2
681,8 μ^3	210	21,0
1.023,4 μ^3	349	34,9
1 386,3 μ^3	409	40,9
1.530,1 μ^3	10	1,0

TABLA III

Variabilidad en el *volumen de núcleos* de células meristemáticas en raíces de *Faba vulgaris*, preparadas a los tres días de la germinación de semillas que fueron previamente tratadas durante 24 horas por una disolución de *etil-ureta-no al 1 %*. Medidas en preparaciones por disociación.

CLASES Volúmenes	FRECUENCIA Número	PROPORCION %
207,8 μ^3	175	17,5
372,6 μ^3	490	49,0
575,6 μ^3	221	22,1
681,8 μ^3	73	7,3
1.023,4 μ^3	41	4,1
	1 000	

sultados obtenidos al medir los nucleolos de los núcleos normales citados en la Tabla I. El valor modal del volumen nucleolular en estas células es de 64 micras cúbicas; pero son también muy frecuentes los de volumen mitad menor. En cambio, apenas pasan de un 10 % los menores de $32 \mu^3$ o los mayores de $64 \mu^3$.

En la Tabla V se anotan los volúmenes de los nucleolos que forman parte de los núcleos valorados en la Tabla II, es decir, correspondientes a células meristemáticas de raíz de *Faba vulgaris* influenciadas por la acción del etil-uretano al 0,5 %. El valor modal del volumen nucleolular corresponde ahora a la clase $32,8 \mu^3$ ($33 \mu^3$ próximamente), esto es, al volumen mitad menor del modal en nucleolos normales. Por consiguiente, en el desarrollo del nucleolo el etil-uretano al 0,5 % actúa como deprimente o freno, al contrario que en el núcleo total, donde claramente produce una acción excitante.

En la Tabla VI se anotan los volúmenes nucleolulares correspondientes a los núcleos que se citan en la Tabla III, referentes a células meristemáticas de las tantas veces mencionada planta, que experimentaron la influencia del etil-uretano a la concentración 1 %. Como se ve, se acentúa considerablemente la reducción del tamaño de los nucleolos. La moda corresponde ahora al volumen 13,5 micras cúbicas. La depresiva influencia del agente idioquinético a esta concentración, es bien manifiesta tanto en el nucleolo como en la totalidad del núcleo.

De un modo semejante a lo trazado antes para expresar gráficamente estos hechos, en la figura 12 representamos, combinándolos, los polígonos de frecuencia referentes a los volúmenes nucleolulares citados en las Tablas IV, V y VI. Resalta claramente en esta figura como en el volumen del nucleolo el valor modal se desplaza hacia la izquierda (que es la dirección hacia el enanismo) a medida que aumenta la concentración del agente idioquinético. A la derecha (dirección de mayor tamaño o gigantismo) se halla la moda de los nucleolos de células normales. Muy a la izquierda, hacia el enanismo, se sitúa la moda del volumen de nucleolos que fueron influenciados por el etil-uretano en su concentración máxima del 1 %. Y entre uno y otro extremo está el valor modal de nucleolos que experimentaron aquella acción del mencionado agente a la concentración de 0,5 %. Si trazáramos una línea que uniera las tres cumbres de la figura total, su oblicuidad ascendente hacia la izquierda (enanismo) indica la intensidad de la acción depresiva, sobre este orgánulo, del etil-uretano y su variación con la concentración.

Comparando las dos figuras 11 y 12 se aprecia inmediatamente la diferente conducta, en cuanto a su desarrollo, de los núcleos en relación con sus respectivos nucleolos, consiguiente a la acción de concentraciones distintas del agente idioquinético que estudiamos. Observamos que en

TABLA IV

Variabilidad en el *volumen de los nucleolos* correspondientes a los núcleos de las células meristemáticas normales de raíz de *Faba vulgaris*, a los tres días de germinación, sin tratar con disolución de etil-uretano. Corresponde a los núcleos de la Tabla I.

CLASES Volúmenes	FRECUENCIA Número	PROPORCION %
13,5 μ^3	135	13,5
32,8 μ^3	255	25,5
63,9 μ^3	500	50,0
80,3 μ^3	110	11,0
	1 000	

TABLA V

Variabilidad en el *volumen de los nucleolos* correspondientes a los núcleos citados en la Tabla II, de células meristemáticas de raíz de *Faba vulgaris* procedente de la germinación durante tres días de semilla previamente tratada durante 24 horas con disolución al 0,5 % de etil-uretano.

CLASES Volúmenes	FRECUENCIA Número	PROPORCION %
21,9 μ^3	116	11,6
32,8 μ^3	625	62,5
63,9 μ^3	202	20,2
80,3 μ^3	57	5,7
	1.000	

TABLA VI

Variabilidad en el *volumen de los nucleolos* correspondientes a los núcleos mencionados en la Tabla III, pertenecientes a células meristemáticas de raíces de *Faba vulgaris*, desarrolladas durante tres días de germinación de semillas tratadas previamente durante 24 horas con disolución de etil-uretano al 1 %.

CLASES Volúmenes	FRECUENCIA Número	PROPORCION %
4,1 μ^3	80	8,0
13,5 μ^3	691	69,1
21,9 μ^3	229	22,9
	1.000	

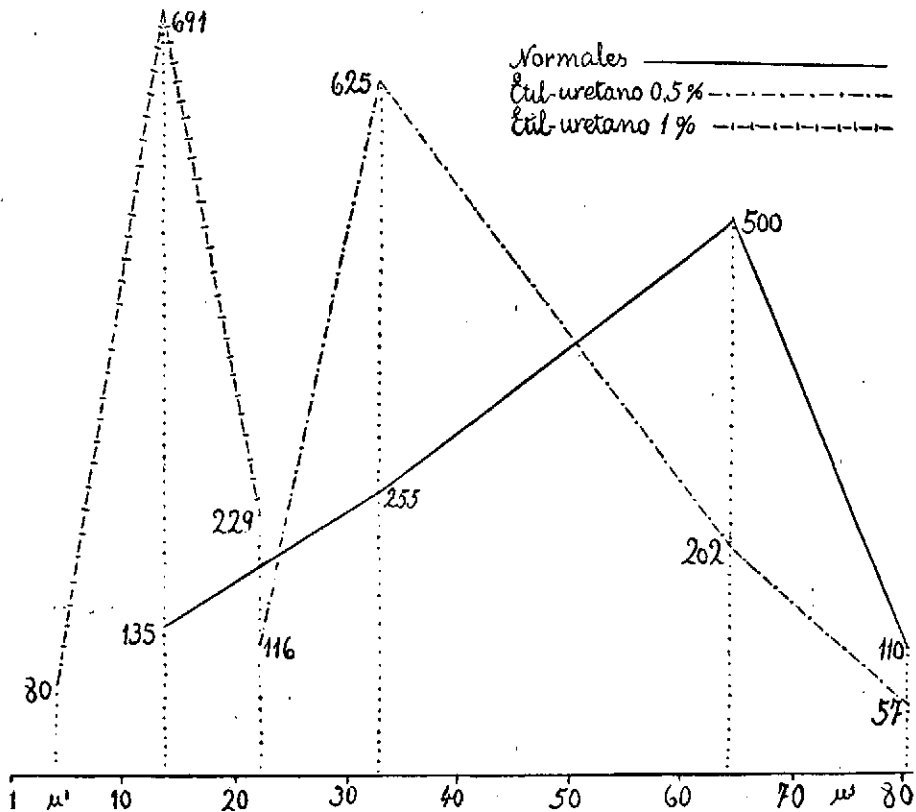


FIGURA 12.—Polígonos de frecuencia indicando gráficamente la variabilidad del valor del volumen de los nucleolos de células meristemáticas de raíz de *Faba vulgaris*, según los datos que figuran en las Tablas IV, V y VI. Los tres polígonos han sido dibujados en una sola figura, del mismo que hemos hecho en la 11 y señalando los tres distintos casos en forma igual. Para los nucleolos, tratándose de orgánulos muy pequeños, la escala de clases ha de ser otra, como se marca en el eje de abscisas en micras cúbicas. La figura muestra cómo la acción del etil-uretano es siempre de tendencia inhibitoria del desarrollo de los nucleolos, tendiendo, por consiguiente, a desplazar su valor modal en la dirección del microenanismo y tanto más cuanto mayor es la concentración del etil-uretano, al contrario de lo ocurrido en los núcleos, donde sólo a la gran concentración del 1% esta substancia actúa como deprimente de su desarrollo, en tanto que al 0,5 es claramente excitante y desplaza el valor modal del volumen de los núcleos en la dirección del microgigantismo.

los núcleos normales la moda ocupa una posición central y el etil-uretano al 0,5% determina ligero desplazamiento del valor modal hacia la derecha, es decir, con tendencia al gigantismo. Lo contrario ocurre en el nucleolo, que ya a esta concentración desvía su moda a la izquierda. Pero si la concentración del agente es del 1%, tanto el núcleo como el nucleolo desplazan su valor de la moda hacia el enanismo. Entonces hay concordancia entre el nucleolo y el conjunto nuclear en cuanto a su desarrollo.

El etil-uretano hasta una concentración máxima del 0,5%, actuando

sobre la semilla durante el tiempo indicado, ejerce sobre los núcleos una influencia excitante del desarrollo con tendencia al microgigantismo. Pero si la concentración de aquel reactivo aumenta, se produce la inversión de tal influencia, que de excitante cambia en fuertemente depresiva. Pero sobre una de sus partes esenciales, los nucleolos, el agente idioquinético ejerce siempre acción depresiva sobre su desarrollo y con tanta mayor intensidad cuanto mayor es su concentración.

En el condrioma, el agente idioquinético produce siempre acción excitante del desarrollo de todos o de muchos de sus elementos, tanto obrando al 0,5 % como al 1 %, según puede observarse en las figuras 8, 9 y 10. Por consiguiente, sobre condriosomas y dictiosomas la influencia del etil-uretano es siempre contraria a la que ejerce sobre el desarrollo de los nucleolosomas o elementos integrantes del nucleolo. Aquellos se hipertrofian y éstos se reducen. La dificultad que ofrece medir en preparaciones micrográficas elementos tan pequeños como son estos orgánulos, apreciando diferencias de tamaño de fracciones de micra, nos ha hecho renunciar al intento de reflejar, estadísticamente en tablas de variabilidad y gráficamente en polígonos de frecuencia, la oscilación de los valores modales de estos condriosomas.

En cuanto a la notable reducción del nucleolo por el influjo del etil-uretano aun a pequeña concentración, cuando, por el contrario, el núcleo resulta más desarrollado, pudiera ser debida a una retención de nucleolosomas en la red cromática como uno de los efectos que el agente idioquinético determina. En nuestro antes citado trabajo sobre morfología y conducta de los nucleolos llegábamos a la conclusión de que tal orgánulo nuclear está integrado por otros granulares, muy pequeños, del tamaño de ínfimas mitocondrias, que llamábamos nucleolosomas; éstos pasan a los cromosomas durante la profase y son segregados y vienen a formar nuevos nucleolos en telofase. Pudiera ocurrir, que por la influencia del agente idioquinético, esta segregación telofásica se verificará sólo parcialmente, permaneciendo en la red cromática muchos nucleolosomas. Por ello el nucleolo resultará menor, aun habiendo aumentado el volumen total nuclear. De ser así, el fenómeno se manifestará también bioquímicamente si, como suponemos, los nucleolosomas son orgánulos catalíticos que sintetizan aminoácidos y polipéptidos.

Otra hipótesis explicativa de los hechos señalados puede fundamentarse en el fenómeno, revelado y estudiado por varios notables biólogos, de emigración de nucleolosomas al citoplasma, atravesando la membrana nuclear y viniendo a sumarse a los elementos del condrioma. Cabe pues, en nuestro caso, admitir la posibilidad de que el agente idioquinético haya actuado como inductor de una fuerte emigración de nucleolo-

somas al citoplasma. Esto, además, daría razón de hipertrofia condriosómica correlativa a la considerable reducción nucleolosómica, que tiene lugar tanto a menor como a mayor concentración del reactivo.

III

INTRODUCCIÓN A LA PARTE EXPERIMENTAL

En el estudio sobre la influencia de los uretanos en la fisiología celular podemos citar como precursores a WARBURG y a CLARK, quienes observaron en los huevos fecundados de erizo de mar un retraso en la partición cuando eran sometidos a estos agentes químicos. MANGENOT en sus investigaciones sobre la acción de los ésteres del ácido carbámico en animales y plantas reconoce un comportamiento análogo en ambos reinos. HADDOW y SEXTON (1) en sus trabajos experimentales demostraron la acción inhibitoria de los uretanos en la germinación de semillas. KURT HOHL (2) en sus estudios micrográficos realizados en el Instituto de Botánica General de la Universidad de Zurich sobre la acción de los uretanos en la mitosis de células meristemáticas de raíces de *Faba vulgaris* y del *Allium Cepa*, afirma que los uretanos actúan no en la profase celular, sino en la metafase (metafase bloqueada o stathmocinesis), impidiendo la separación de los cromosomas en la estrella madre, formando un ovillo grande con doble número de cromosomas, semejante a los obtenidos por DUSTIN (3) estudiando acciones carioclásticas de alguna sustancias, entre éstas la *colchicina*. BASTRUP-MADSEN (4) ve esta celuloestasia en la reproducción de los fibroblastos. Por todo ello, al revisar la bibliografía, los uretanos quedan definidos como sustancias bloqueadoras de la mitosis celular.

Nosotros admitimos que la acción bloqueante de la mitosis celular que posee el etil-uretano tenga en cierto sentido una relación íntima con

(1) HEDDOW y SEXTON: *Nature*, 1946, 157, 500.

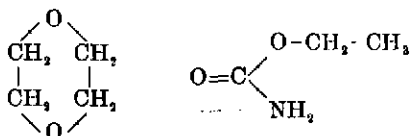
(2) KURT HOHL: Die Beinflussung der Mitose durch Urethan. *Exper.*, 1947, III, Fasc. 3, 108.

(3) PIERRE DUSTIN: Some New Aspects of Mitosis poisoning. *Nature*, 1947, 159, 792.

(4) P. BASTRUP-MADSEN: Einfluss von Urethan auf die Teilung von Fibroblasten. *Acta pathol. scand.*, 1949, 26, 93.

los radicales hidrófilos y lipófilos de su estructura molecular. Posee dos radicales libres, uno hidrofílico ($-\text{NH}_2$), y otro lipófilo ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), y un grupo bloqueado por estos dos radicales de naturaleza hidrofílica ($-\text{COO}-$).

La acción mitoclástica del uretano es en un todo parecida a la del dioxano e incluso la tensión superficial (a). Esta posee en su estructura molecular cuatro grupo lipófilos ($-\text{CH}_2-$) y dos hidrófilos ($-\text{O}-$).



Cuando la molécula de etil-uretano se dirige hacia la célula para ser absorbida, inicialmente provoca un cambio físico-químico en la membrana, causa de alteraciones protoplásmicas más profundas; más tarde, al disolverse este agente químico en el agua del jugo celular hará descender la tensión superficial de ésta por efecto del aumento de superficie provocado por acto de presencia del uretano y sus moléculas, dirigiéndose a la superficie, ejercerán una presión sobre las partículas coloidales que por adherencia originarían la adsorción. Podríamos considerar al uretano como un puente de contacto entre su disolución acuosa y las estructuras inframicroscópicas celulares de naturaleza lipoproteicas, lipoglucídicas y lipoideas en general, existiendo entre los radicales de la molécula de etil-uretano una reciprocidad entre la solubilidad en el agua y la solubilidad en las estructuras lipídicas del protoplasma celular.

Cuando el uretano ejerce su acción a dosis mínimas sobre la célula se podría admitir como una estructura biocatalítica formada entre un biocoloide y un cristaloides, como un soporte coloidal, apofermento, y un grupo activo, cofermento (en nuestro caso el uretano), causando una excitación y aumento de funcionalismo celular, que lleva consigo un aumento del volumen nuclear. Si se sobrepasa la dosis óptima de etil-uretano, entonces actúa este agente bloqueando los grupos capaces de adsorber las sustancias oxidables, lo que llevaría consigo la inhibición de la respiración celular y procesos bioquímicos metabólicos con disminución de volumen nuclear.

La acción mitoclástica del uretano no queda claramente definida en nuestras experiencias actuales, en todo caso débilmente, pero sí podemos anticipar que su mecanismo de acción es más complejo y amplio, teniendo lugar en todo el protoplasma celular y principalmente en los cor-

(a) La tensión superficial del dioxano al 2% es de unas 30 dinas/cms.

púsculos con cierta autonomía dentro de la célula en cuyas estructuras químicas forman parte los lípidos simples y complejos.

Pretendemos relacionar en nuestros estudios experimentales la estructura microscópica e inframicroscópica de la célula con la influencia cuantitativa de agentes químicos o físicos, existiendo siempre, sea cual fuere el agente, una dosis de acción permanente compatible con la vida celular y que consideramos de gran importancia su investigación.

PARTE EXPERIMENTAL

1.º *Estudio de la influencia del etil-uretano a la concentración del 0,05 % y 0,1 % en el desarrollo de plántulas de Faba vulgaris cultivadas sobre soluciones hidropónicas.*

En esta primera parte, las plántulas de *Faba vulgaris* en cultivo disponen para su desarrollo de los elementos macroscópicos y vestigiales de la solución hidropónica (1) y de los principios nutritivos que se encuentran en los cotiledones en cantidades suficiente para asegurar el crecimiento durante 30 días, tiempo de estas experiencias.

Método experimental.—Se pusieron varios lotes de semillas de *Faba vulgaris* en agua y disoluciones de etil-uretano al 0,05 % y 0,1 % respectivamente, durante 24 horas. Seguidamente se colocó cada lote en el germinador correspondiente. Transcurridos tres días, las semillas germinadas fueron puestas en tubos de ensayo de boca en embudo, de tal manera que cada tubo sólo tuviese una sola plántula con su correspondiente disolución hidropónica en los lotes de plántulas tipo o normales; en las restantes, uretano al 0,05 % y 0,1 % adicionado a dicho medio nutritivo. Solamente fueron controladas aquellas plántulas que crecieron, adaptándose a estas condiciones de cultivo. Las disoluciones se renovaron en días sucesivos con objeto de mantener constante la concentración.

Durante 30 días se midió diariamente en cada planta la longitud del tallo y raíz principal. Al finalizar el tiempo propuesto se midió la longitud total del tallo, entrenudos, raíz principal y secundarias y número de éstas.

En todas las experiencias se procuró mantener idénticas las condiciones de cultivo: edad de las semillas, tratamiento previo, las concentraciones del agente químico en estudio, luz y temperatura.

Las plantas de cada lote fueron desecadas para realizar el estudio analítico de los lípidos.

(1) E. G. MULDER: Investigations on the Nitrogen nutrition of pea plants. *Plant and Soil*, I, núm. 2, pág. 200. August., 1948.

Se tomó como criterio los valores medios de las medidas del crecimiento de tallos, raíces principales, raíces secundarias y su número, y contenido en lípidos. (Tablas VII, VIII, IX, X y XI).

SOLUCIÓN HIDROPÓNICA

Agua destilada	1 litro	
KH_2PO_4	0,279	grs.
K_2HPO_4	0,193	grs.
KNO_3	0,200	grs.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,108	grs.
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,225	grs.
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	15	mgs.
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,6	mgs.
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,15	mgs.
H_3BO_3	0,15	mgs.
Na_2MoO_4	0,06	mgs.

Valoración de lípidos: Las raíces, tallos y cotiledones de cada lote de plántulas en estudio fueron triturados separadamente hasta la obtención de polvo finamente dividido. Siguiendo el método de HERTWIG, fueron extraídos los lípidos con etanol absoluto-cloroformo (v/v) en aparato de Soxhlet. Una vez pesados los lípidos totales de las raíces, tallos y cotiledones, se calculó el contenido y % correspondiente a cada órgano (Tabla XI).

Conclusiones

1.^a Las plántulas cultivadas en disoluciones nutritivas de etil-uretano al 0,05 % y 0,1 %, presentan caracteres morfológicos, aunque no fisiológicos, semejantes a las *normales*.

2.^a Las plántulas desarrolladas en disoluciones de *uretano* al 0,05 % y 0,1 % tienden a expresar matemáticamente una función exponencial de crecimiento semejante, aunque con distintos valores, a las cultivadas en condiciones nutritivas *normales*.

3.^a La concentración óptima para el desarrollo de plántulas de *Faba vulgaris* es del 0,05 % de etil-uretano.

4.^a Los mayores contenidos y porcentajes en lípidos de los tallos, raíces y cotiledones corresponden a las plántulas que fueron cultivadas en soluciones hidropónicas con *uretano* al 0,05 %.

TABLA VII

Valores medios de las medidas del crecimiento de *tallos y raíces principales* de las plántulas cultivadas en disolución hidropónica.

NORMALES

Días	Tallos cms.	Raíces principales cms.	Tallos y Raíces principales cms.
4	0,5	0,9	1,4
5	0,5	1,0	1,5
6	0,6	1,2	1,8
7	0,7	1,5	2,2
8	0,7	2,0	2,7
9	0,8	2,5	3,3
10	1,0	3,0	4,0
11	1,5	3,5	5,0
12	2,0	4,5	6,5
13	2,0	5,3	7,3
14	3,3	7,2	10,5
15	4,0	9,0	13,0
16	4,0	11,0	15,0
17	5,5	12,5	18,0
18	6,0	13,0	19,0
19	8,0	15,0	23,0
20	10,0	17,0	27,0
21	11,0	18,0	29,0
22	13,0	18,0	31,0
23	14,0	18,5	32,5
24	16,5	19,0	35,0
25	18,0	19,0	37,0
...
30	23,0	21,0	44,0

TABLA VIII

Valores medios de las medidas del crecimiento de los *tallos y raíces principales* de las plántulas cultivadas en disolución hidropónica con

URETANO AL 0,05 %

Días	Tallos cms.	Raíces principales cms	Tallos y Raíces principales cms
4	0,5	0,8	1,3
5	0,5	1,0	1,5
6	0,5	1,5	2,0
7	0,7	2,2	2,9
8	1,0	3,0	4,0
9	1,0	3,0	4,0
10	1,4	3,0	4,4
11	2,0	4,0	6,0
12	2,5	6,0	8,5
13	2,6	7,5	10,5
14	3,0	9,5	12,5
15	4,5	11,5	16,0
16	5,5	14,5	20,0
17	6,5	17,0	23,5
18	9,0	19,0	28,0
19	11,0	21,0	32,0
20	14,5	20,5	35,0
21	18,0	23,0	41,0
...
...
30	33,5	29,0	62,5

TABLA IX

Valores medios de las medidas del crecimiento de los *tallos y raíces principales* de las plántulas cultivadas en disolución hidropónica con

URETANO AL 0,1 %

Días	Tallos cms.	Raíces principales cms.	Tallos y Raíces principales cms.
4	0,5	0,7	1,2
5	0,5	0,8	1,3
6	0,5	1,0	1,5
7	0,7	1,6	2,3
8	0,8	2,2	3,0
9	1,0	3,3	4,3
10	1,3	4,0	5,3
11	1,8	5,5	7,3
12	2,0	8,5	10,5
13	2,7	9,0	11,7
14	3,0	10,5	13,5
15	4,5	11,5	16,0
16	5,7	12,7	18,4
17	7,0	14,0	21,0
18	10,0	15,5	25,5
19	12,0	17,0	29,0
20	14,5	18,0	32,5
21	17,0	19,0	36,0
...
30	32,0	29,0	61,0

TABLA X

Valores medios de las medidas a los 30 días de las longitudes del *tallo*, *raíz principal* y *raíces secundarias* y número de éstas, como consecuencia de la actividad meristemática

Tallos cms.	Raíz pral. cms.	Raíces secund. cms.	Medidas totales cms.	N.º raíces secund. cms.
PLANTULAS NORMALES				
23	21	197,8	241,8	41
PLANTULAS EN URETANO AL 0,05 %				
33,5	29	236,4	298,9	53
PLANTULAS EN URETANO AL 0,1 %				
32	29	209,6	270,6	41
ENTRENUDOS EN PLANTULAS				
Normales.		1 - 1 - 3 - 5 - 5 - 6 - 2,5		
Etil-uretano al 0,05 %		1,5 - 1,5 - 4 - 6,5 - 9 - 7 - 2,5		
Etil-uretano al 0,1 %		2 - 2,5 - 4 - 7,5 - 8,5 - 4		

TABLA XI

	Normal	Uretano 0,05 %	Uretano 0,1 %
Peso del tallo	0,3238	0,4808	0,5054
Lípidos	0,0542	0,0854	0,0636
% de lípidos del tallo.	16,7387	17,7620	12,5840
Peso de la raíz	0,2112	0,2854	0,2704
Lípidos de la raíz	0,0302	0,0440	0,0208
% de lípidos de raíces	14,2992	15,4173	7,6923
Peso de los cotiledones	0,6950	0,6090	0,7344
Lípidos de los cotiledones	0,0736	0,0812	0,0762
% de lípidos en cotiledones	10,5899	13,3333	10,3758
Peso de los tegumentos (cutículas).	0,2898	0,2898	0,2502
Lípidos en los tegumentos	0,0322	0,0170	0,0292
% de lípidos en tegumentos	11,1111	5,8661	11,6466
Peso del tallo y raíces	0,5350	0,7662	0,7758
Lípidos del tallo y raíces	0,0844	0,1294	0,0854
% de lípidos del tallo y raíces.	15,79%	16,88%	10,87%
Peso del tallo, raíces y cotiledones.	1,2300	1,3752	1,5102
Lípidos tallo, raíces y cotiledones	0,1580	0,2106	0,1606
% de lípidos tallo, raíces y cotiledones	12,84%	15,31%	10,63%
Tallo, raíces, cotiledones y tegumentos	1,5198	1,6650	1,7604
Lípidos en raíces, cotiledones y tegumentos	0,1902	0,2276	0,1898
% de lípidos en raíces, cotiledones y tegumentos	12,51%	13,36%	10,78%

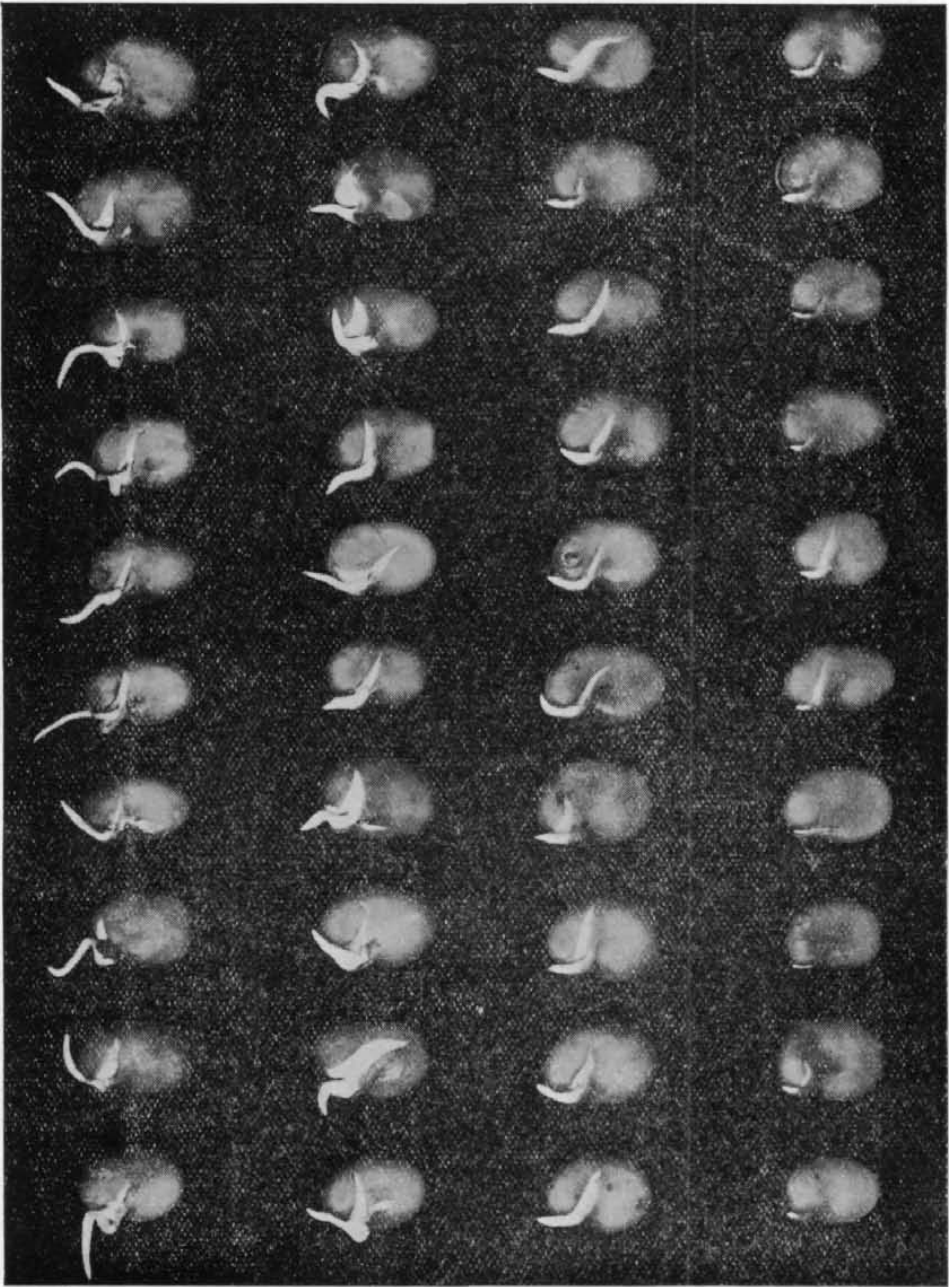


FIGURA 13.—Una de las experiencias que sirvió como material para el estudio micrográfico de las células meristemáticas en raíces de plántulas de *Faba vulgaris* normales y bajo la influencia de etil-uretano a las concentraciones del 0,5%, 1% y 1,5%. Obsérvese la disminución en longitud de las raíces a medida que aumenta la dosis del agente químico en estudio.

2.º Estudio de la influencia del etil-uretano a la concentración del 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % y 1 % en el desarrollo de plántulas de *Faba vulgaris* cultivadas sobre disoluciones acuosas exclusivamente de etil-uretano.

En esta segunda parte, las plántulas de *Faba vulgaris* en cultivo solamente disponen para su desarrollo, durante los 30 días que duran estas experiencias, de las sustancias y elementos nutritivos que se encuentran en los cotiledones.

Método experimental. Los lotes de semillas de *Faba vulgaris* fueron puestos en disoluciones acuosas de etil-uretano al 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % y 1 % respectivamente, durante 24 horas (fig. 13). Después de este tiempo se pusieron los lotes en sus germinadores durante tres días. Las semillas

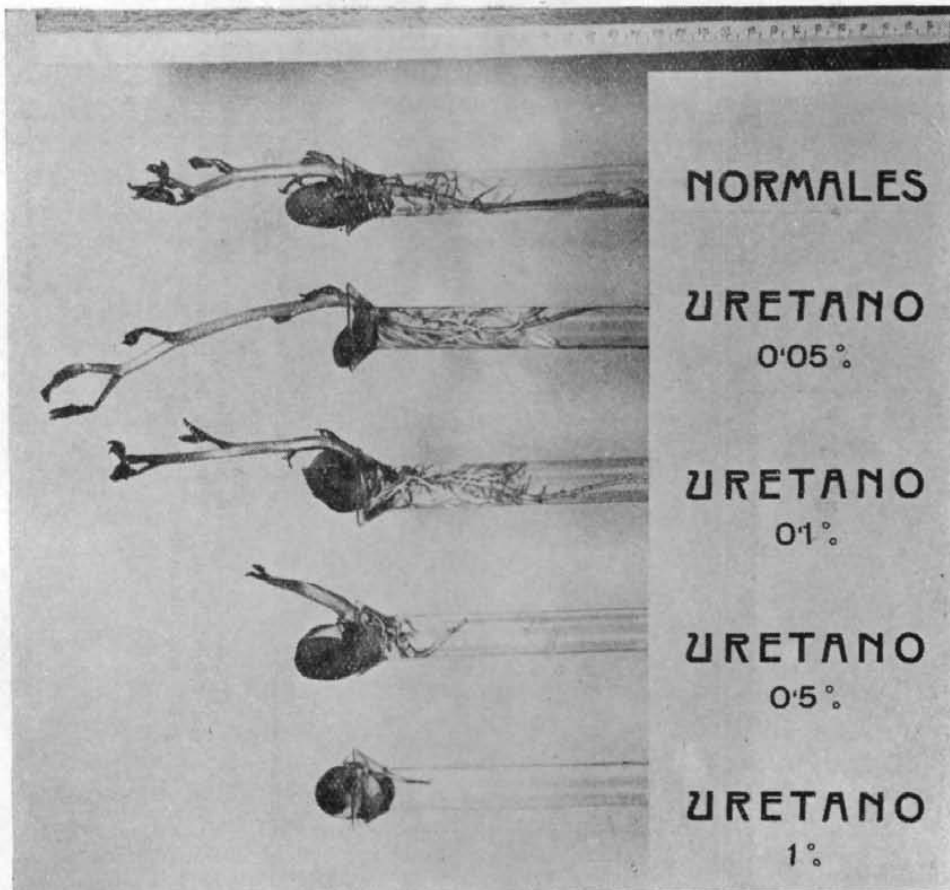


FIGURA 14.—Plántulas de *Faba vulgaris* colocadas en tubos de ensayo de boca en embudo con disoluciones de sales nutritivas y etil-uretano al 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % y 1 %, respectivamente.

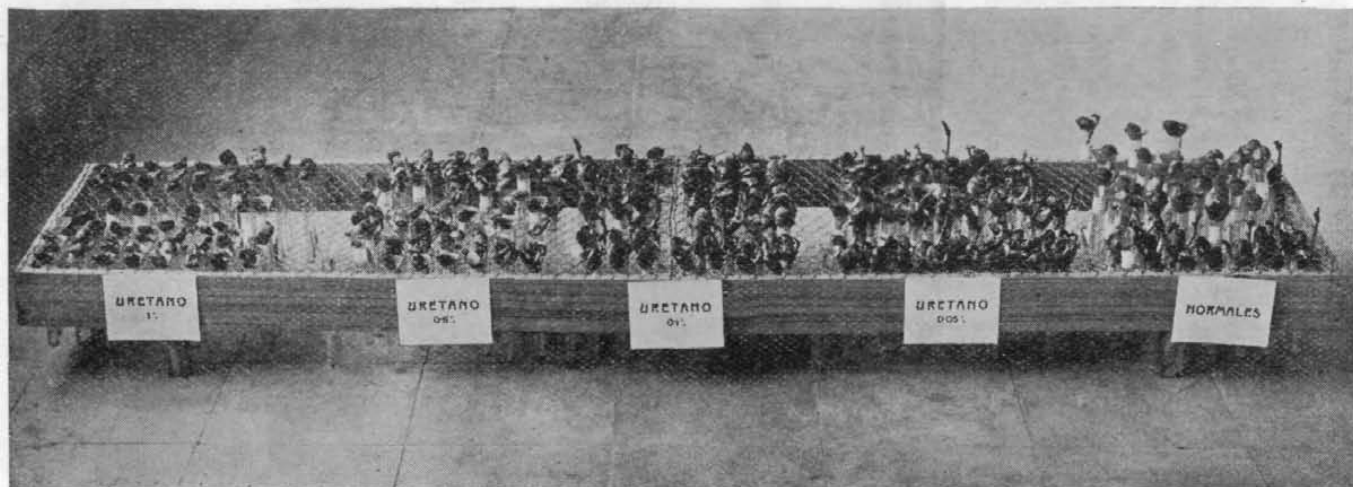


FIGURA 15.—Lotes de plántulas de *Faba vulgaris*, correspondientes a una de las experiencias del estudio de la influencia del etil-uretano a la concentración del 0,05%, 0,1 % 0,5 % y 1 % respectivamente.

que germinaron se colocaron cada una en tubo de ensayo de boca en embudo con su correspondiente disolución de uretano (fig. 14). Como consecuencia de esta distribución resultaron cinco lotes, cuatro con etil-uretano a concentración distinta en orden creciente, y uno con agua como lote de referencia o *normal* (figs. 15, 16, 17 y 18). Análogamente a las experiencias de la primera parte experimental, para mantener constante las concentraciones del agente en estudio se renovaron las disoluciones en días sucesivos. En todas estas experiencias se mantuvieron idénticas las condiciones de cultivo.

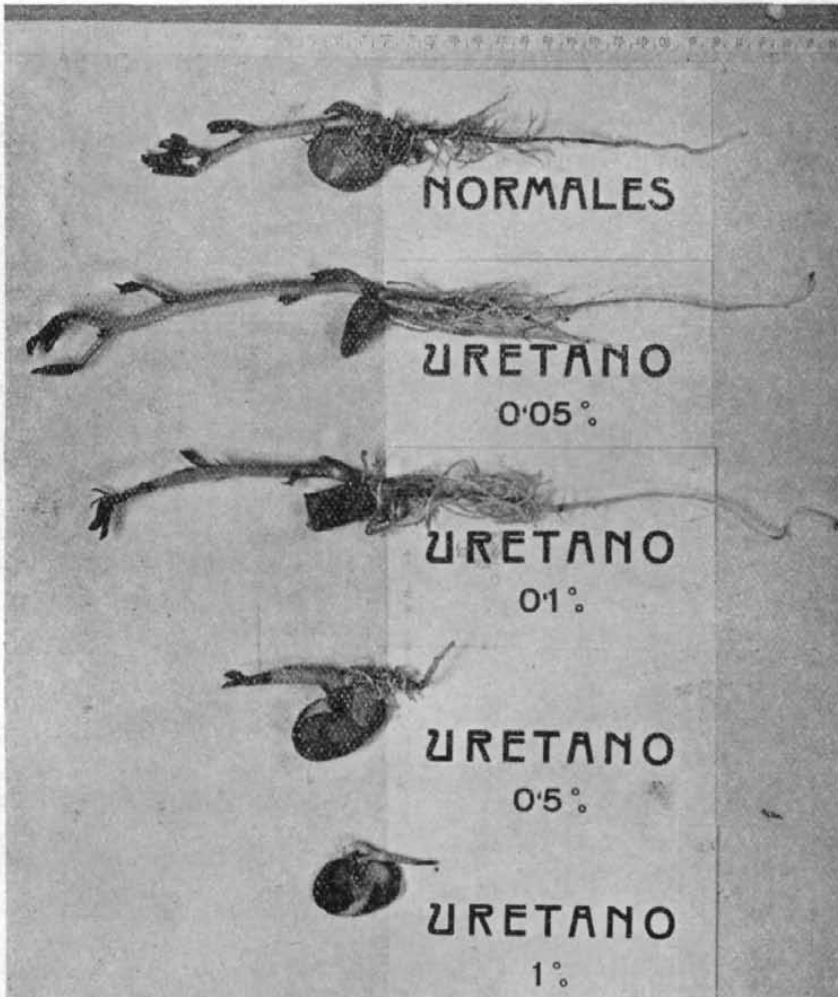


FIGURA 16.—Plántulas de *Faba vulgaris* de una de las experiencias correspondientes al estudio de la influencia del etil-uretano a las concentraciones del 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % y 1 % en el desarrollo de plántulas cultivadas sobre disoluciones acuosas.



FIGURA 17.—Modificaciones de los tallos y raíces en plántulas pertenecientes a uno de los lotes de semillas germinadas de *Faba vulgaris* cultivadas sobre disoluciones acuosas de uretano al 0,5 %.



FIGURA 18.—Plántulas de *Faba vulgaris* con modificaciones manifiestas de tallos y raíces cuando son cultivadas en disoluciones acuosas de uretano al 0,5 %.

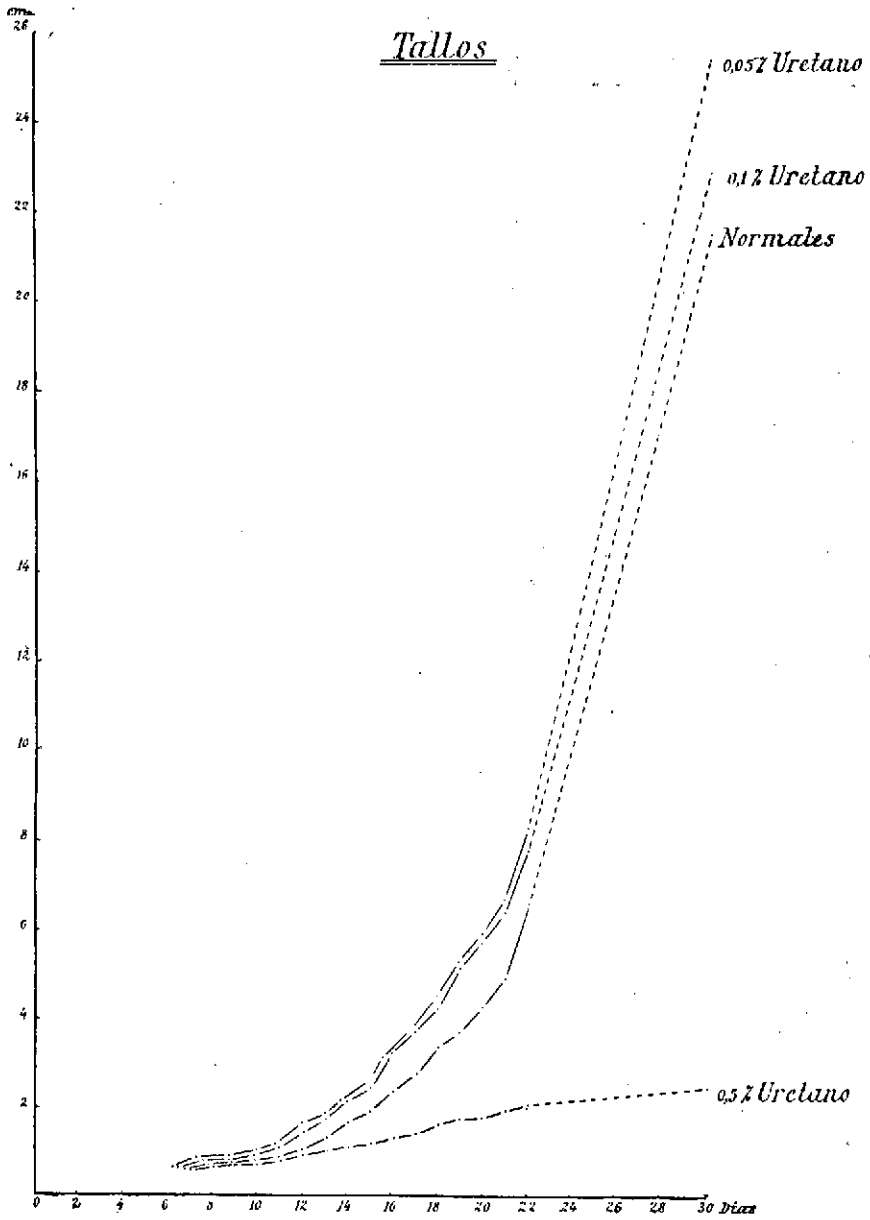


FIGURA 19



Diariamente se midió en cada planta la longitud del tallo y raíz principal. A los treinta días se midió la longitud total del tallo, entrenudos, raíz principal y secundarias, y número de éstas. Las plántulas de cada lote se desecaron para realizar más tarde la valoración de lípidos. Se tomó como criterio los valores medios de las medidas del crecimiento de tallos, raíces principales, raíces secundarias y su número, y contenido en lípidos. (Tablas desde las XII a la XXIV y Fgs. 19, 20 y 21).

TABLA XII

NORMALES

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática del TALLO

Días											Valores medios totales
7	0,6	0,7	0,6	0,5	0,5	0,7	0,6	0,7	0,8	0,5	0,62
8	0,6	0,7	0,8	0,9	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5	0,74
9	0,6	0,7	0,8	1,0	0,7	0,8	0,9	0,8	0,8	0,5	0,76
10	0,7	0,8	0,9	1,0	0,7	0,8	1,0	0,8	0,8	0,5	0,80
11	0,8	1,0	0,9	1,5	0,7	1,0	1,5	1,0	1,0	0,5	0,89
12	1,0	1,2	1,0	2,3	0,8	1,0	1,5	1,2	1,3	0,5	1,08
13	1,2	1,6	1,1	2,4	0,8	1,2	2,0	1,3	1,5	0,6	1,37
14	1,5	2,0	1,3	3,5	0,9	1,5	2,5	1,5	1,8	0,7	1,72
15	2,0	2,0	1,5	4,0	1,5	1,5	2,5	1,5	2,0	1,0	1,95
16	2,5	2,3	1,7	4,5	2,5	2,0	3,5	1,7	2,0	1,2	2,39
17	3,0	3,5	2,0	5,0	2,5	2,0	3,5	2,0	2,5	1,5	2,75
18	4,0	3,8	3,0	5,5	3,0	3,0	4,5	2,0	2,5	2,0	3,33
19	5,5	1,0	3,5	6,0	3,5	3,5	5,5	3,0	3,0	2,6	3,71
20	6,2	1,0	4,2	7,0	4,2	3,7	6,5	3,5	3,5	3,0	4,28
21	7,0	1,0	5,0	8,0	5,0	4,0	7,5	4,0	4,0	3,5	4,90
22	10,0	1,3	6,0	10,0	6,5	8,0	9,0	5,0	5,5	5,0	6,63
.....											
.....											
.....											
30	26,0	24,0	21,0	28,0	19,0	19,0	12,5	21,0	19,0	22,0	21,50

TABLEA XIII
URETANO 0,05 %

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática del TALLO

Días											Valores medios totales
7	0,7	0,8	0,6	0,5	0,7	0,7	0,6	0,9	0,5	0,9	0,69
8	1,0	1,0	0,6	0,5	0,7	0,7	0,7	1,0	0,5	1,2	0,79
9	1,0	1,0	0,6	0,5	0,8	0,7	0,9	1,0	0,7	1,3	0,85
10	1,0	1,3	0,7	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,7	1,02
11	1,0	1,5	0,9	0,6	1,0	1,0	1,3	1,4	1,2	2,0	1,19
12	1,5	2,0	1,3	0,7	1,5	1,5	2,0	2,0	1,5	2,5	1,65
13	1,7	2,2	1,4	0,8	1,7	1,7	2,7	2,5	1,6	2,5	1,88
14	2,0	2,4	1,5	1,0	2,0	2,0	3,5	3,0	1,7	2,5	2,15
15	2,0	2,5	2,5	1,5	2,5	2,5	4,0	3,5	2,0	3,5	2,65
16	3,5	2,5	2,5	1,5	2,5	3,0	5,0	4,0	2,5	4,0	3,10
17	5,0	3,0	2,5	2,0	3,5	4,0	5,0	4,5	3,0	5,0	3,75
18	6,5	4,5	3,0	2,0	4,0	4,0	6,0	5,5	4,0	6,0	4,55
19	7,5	5,0	3,0	2,5	5,0	5,0	6,5	6,5	5,0	7,0	5,30
20	8,2	5,5	3,5	3,5	5,2	5,7	6,7	7,2	6,0	8,2	5,97
21	9,0	6,0	4,0	4,5	5,5	6,5	7,0	8,0	7,0	9,5	6,70
22	11,0	8,0	5,0	6,5	6,0	8,0	9,5	9,0	9,0	11,0	8,30
30	33,0	29,0	20,0	21,0	22,5	24,0	29,0	28,0	21,0	26,5	25,40

TABLEA XIV
URETANO 0,1 %

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática del TALLO

Días											Valores medios totales
7	0,8	0,8	0,5	0,6	0,9	0,7	0,7	0,6	0,5	0,5	0,66
8	1,2	1,2	0,6	0,6	1,0	0,7	0,7	0,6	0,5	0,5	0,78
9	1,3	1,0	0,9	0,7	1,0	0,7	0,7	0,7	0,5	0,7	0,82
10	1,5	1,5	0,9	1,0	1,2	0,7	0,7	0,9	0,6	0,8	0,98
11	2,0	2,0	1,0	1,5	1,5	0,7	0,8	0,9	0,7	0,8	1,19
12	2,2	2,3	1,5	1,5	2,0	0,7	1,0	1,3	1,0	1,0	1,45
13	2,6	2,6	2,0	2,2	2,2	0,8	1,2	1,6	1,5	1,2	1,79
14	3,0	3,0	2,5	3,0	2,5	0,9	1,5	2,0	2,0	1,5	2,19
15	3,0	4,0	2,5	3,0	2,5	1,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,45
16	4,5	5,5	3,0	3,5	3,5	2,0	2,5	2,5	2,5	2,5	3,20
17	5,0	6,0	3,5	4,0	4,5	3,0	3,0	3,0	2,5	2,5	3,70
18	5,5	7,0	4,0	4,5	5,0	3,0	3,5	3,0	3,0	4,0	4,25
19	6,0	8,0	5,0	5,5	6,0	3,5	4,0	4,5	3,5	5,5	5,15
20	7,0	9,0	5,5	5,7	7,0	4,0	4,5	4,9	4,0	6,2	5,78
21	8,0	10,0	6,0	6,0	8,0	4,5	5,0	5,3	4,5	7,0	6,43
22	9,0	11,5	7,5	7,0	8,5	7,0	8,0	6,0	5,5	8,0	7,80
30	21,0	27,0	24,0	24,0	25,0	22,0	21,0	22,0	20,0	23,0	22,90

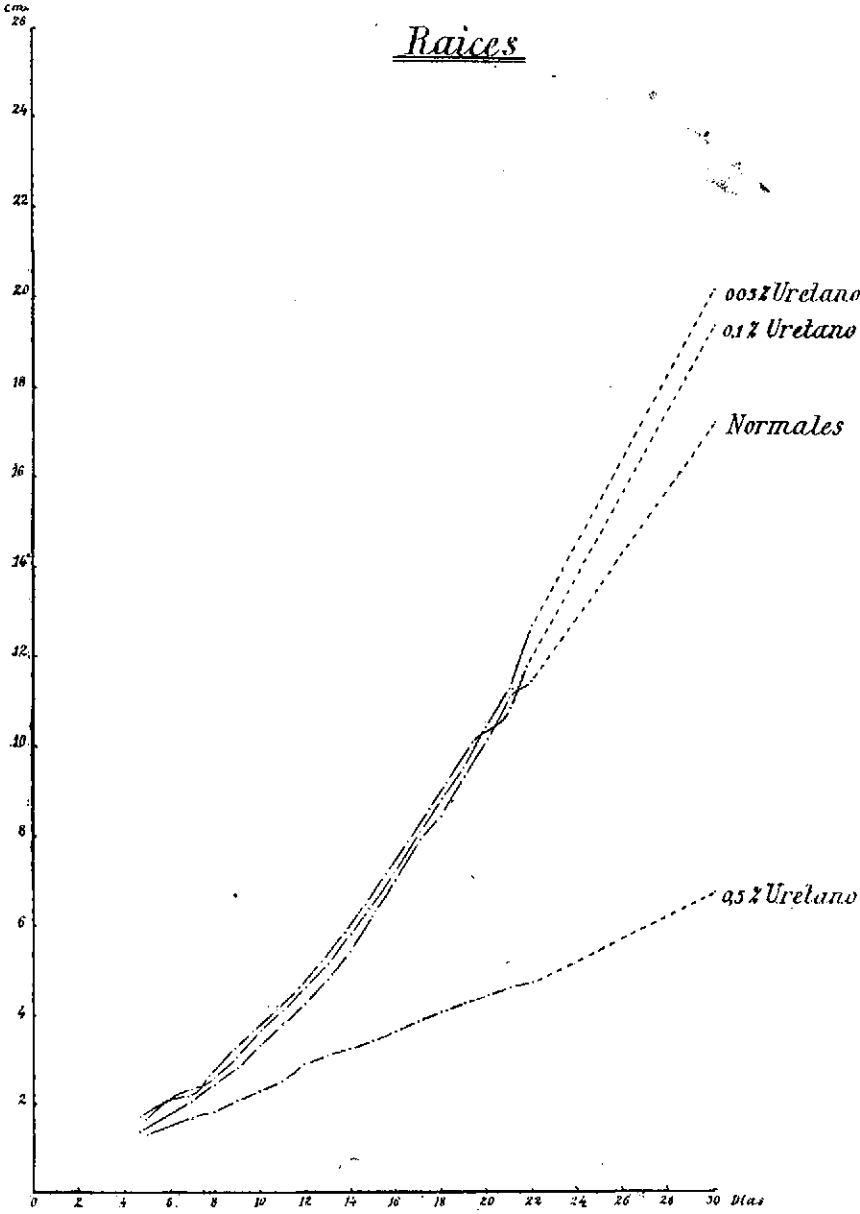


FIGURA 20



TABLA XV
URETANO 0,5 %

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática del TALLO

Días											Valores medios totales
7	0,5	0,5	0,6	0,7	0,8	0,6	0,5	0,7	0,5	0,6	0,60
8	0,7	0,5	0,7	0,7	1,0	0,8	0,9	0,7	0,5	0,6	0,71
9	1,0	0,6	0,7	0,7	1,0	0,8	1,0	0,7	0,5	0,6	0,76
10	1,0	0,6	0,7	0,7	1,0	0,9	1,0	0,7	0,5	0,6	0,77
11	1,0	0,6	0,8	0,7	1,0	1,0	1,0	0,7	0,5	0,7	0,80
12	1,0	0,9	1,0	0,8	1,0	1,0	1,4	0,9	1,0	0,7	0,97
13	1,2	0,9	1,0	0,9	1,2	1,0	1,4	0,9	1,0	0,8	1,03
14	1,5	1,0	1,1	1,0	1,3	1,0	1,5	1,0	1,0	0,9	1,13
15	1,5	1,3	1,3	1,0	1,5	1,3	1,5	1,0	1,0	1,0	1,24
16	1,5	1,4	1,3	1,3	1,5	1,5	2,0	1,0	1,0	1,0	1,35
17	1,5	1,5	1,5	1,5	2,0	1,5	2,0	1,3	1,0	1,0	1,48
18	1,5	1,5	1,5	1,7	2,0	1,5	2,5	1,5	1,0	1,8	1,65
19	1,5	1,5	1,8	2,0	2,5	1,5	2,5	1,5	1,1	1,8	1,77
20	1,5	1,5	1,8	2,0	2,5	1,5	2,5	1,5	1,1	1,8	1,77
21	1,5	1,5	2,0	2,0	2,5	2,0	2,5	2,0	1,5	1,8	1,93
22	1,5	1,5	2,0	2,5	2,5	2,0	3,0	2,0	1,5	1,8	2,03
30	1,7	1,5	2,0	2,0	3,5	4,0	3,5	2,5	1,7	2,5	2,49

TABLA XVI
NORMALES

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática de la RAIZ principal

Días											Valores medios totales
5	1,3	1,1	1,4	1,2	1,0	1,7	2,2	1,9	1,1	1,0	1,39
7	2,2	1,7	2,3	2,0	1,0	2,9	3,1	2,8	1,5	1,1	2,06
8	2,8	2,4	2,6	2,3	2,2	3,3	3,2	3,0	1,7	1,1	2,46
9	3,3	2,7	3,0	3,0	2,5	3,6	3,5	3,5	2,0	1,1	2,82
10	4,0	3,5	3,5	3,5	3,0	4,0	4,0	4,0	2,5	1,3	3,33
11	5,0	3,5	3,9	4,0	3,5	4,6	4,3	4,3	3,0	2,0	3,81
12	5,5	3,5	4,1	4,5	3,9	5,0	5,5	5,0	3,2	2,5	4,27
13	6,2	4,0	4,6	5,2	4,2	5,8	6,2	5,1	3,8	3,0	4,81
14	7,0	4,5	5,2	6,0	4,6	6,6	7,0	5,2	4,5	3,5	5,41
15	8,8	5,2	6,0	6,8	5,2	8,0	7,8	6,3	5,2	4,2	6,35
16	10,3	5,5	7,1	7,0	6,0	8,5	8,5	6,5	6,0	4,6	7,00
17	11,2	6,5	8,0	8,0	6,7	9,2	10,0	7,5	7,0	5,2	7,93
18	12,0	6,7	9,0	8,6	7,4	9,5	10,0	7,5	7,8	6,0	8,45
19	13,3	8,0	9,8	9,5	8,0	10,0	10,5	8,5	9,0	6,6	9,32
20	14,4	9,0	10,9	10,5	9,0	10,5	11,0	8,9	9,7	7,7	10,16
21	15,5	10,0	12,0	11,5	10,0	11,0	11,5	9,3	10,5	8,8	11,01
22	15,5	10,5	12,5	12,5	10,3	11,0	12,0	9,3	11,5	9,5	11,46
30	21,0	17,5	17,0	15,5	19,5	16,0	16,5	15,0	16,0	18,0	17,20

TABLA XVII
URETANO 0,05 %

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática de la RAIZ principal

Días											Valores medios totales
5	2,4	2,2	1,0	1,5	2,0	1,5	1,3	1,3	1,8	2,2	1,73
7	2,4	2,6	1,5	2,3	3,2	2,1	1,6	2,3	2,5	2,7	2,32
8	3,2	3,0	1,5	2,4	3,6	2,2	1,7	2,3	3,0	3,8	2,67
9	3,5	3,8	1,6	3,0	4,0	3,0	2,0	2,7	3,5	4,0	3,11
10	4,2	4,2	2,2	5,7	4,5	3,0	2,2	3,0	4,0	4,0	3,70
11	4,9	4,9	2,7	4,6	5,2	3,5	3,0	3,7	4,5	4,0	4,10
12	5,5	5,5	3,0	5,4	5,6	3,8	3,5	4,5	5,0	4,1	4,59
13	6,4	6,2	3,5	6,2	6,3	4,0	4,0	5,0	5,7	4,6	5,19
14	7,3	7,0	4,0	7,0	7,0	4,2	4,5	5,5	6,5	5,2	5,82
15	8,0	7,2	4,5	7,5	7,5	5,0	5,0	6,5	7,5	6,0	6,47
16	9,5	8,0	4,8	8,5	8,0	5,0	5,5	7,5	8,5	6,5	7,18
17	10,5	8,5	5,1	9,5	9,2	5,5	6,0	9,2	9,5	7,2	8,02
18	12,5	9,0	5,5	10,5	9,2	6,0	6,5	10,5	11,0	7,6	8,83
19	13,0	9,5	6,0	11,0	10,0	6,5	7,0	12,0	12,5	8,0	9,55
20	14,0	10,7	6,2	11,5	10,7	7,2	7,2	13,5	14,5	8,7	10,42
21	15,0	12,0	6,5	12,0	11,5	8,0	7,5	15,0	16,5	9,5	11,35
22	17,0	13,0	8,5	12,0	12,0	9,5	10,5	16,0	17,5	11,2	12,72
30	24,0	14,0	20,0	20,5	20,0	20,0	19,0	19,0	24,0	21,0	20,15

TABLA XVIII
URETANO 0,1 %

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática de la RAIZ principal

Días											Valores medios totales
5	2,2	3,0	1,7	1,5	1,6	1,0	1,7	1,6	1,5	2,0	1,78
7	3,5	4,0	2,5	2,0	2,0	1,2	2,3	2,0	2,0	2,2	2,37
8	4,0	4,0	3,0	2,1	2,5	1,5	2,8	2,0	2,0	3,0	2,69
9	4,5	4,0	3,3	2,5	3,0	1,5	3,0	2,3	2,5	3,7	3,03
10	6,0	4,0	4,0	3,0	3,5	2,5	3,8	2,5	3,0	4,0	3,63
11	6,0	5,0	4,5	3,5	4,0	3,1	4,2	2,9	3,5	4,3	4,10
12	7,5	5,0	5,0	4,0	4,5	3,8	4,7	3,2	3,7	4,5	4,59
13	8,5	5,7	5,5	4,5	5,0	4,6	5,3	3,6	4,2	5,1	5,20
14	9,5	6,5	6,0	5,0	5,5	5,5	6,0	4,0	4,8	5,7	5,85
15	11,0	7,0	6,5	5,5	6,3	6,0	7,0	4,5	5,5	6,0	6,53
16	12,5	7,0	7,0	6,3	6,8	7,5	7,5	5,0	5,8	6,0	7,14
17	14,0	8,0	7,3	6,7	7,3	8,7	8,2	5,5	6,1	7,0	7,88
18	15,0	8,4	8,0	7,5	8,0	10,0	9,0	5,8	7,0	7,5	8,62
19	16,5	8,5	8,0	8,5	9,0	11,0	9,5	6,0	7,4	8,0	9,24
20	17,5	9,7	8,7	9,5	9,5	11,5	10,2	6,5	6,4	9,0	10,05
21	18,5	11,0	9,5	10,5	10,0	12,0	11,0	7,0	9,5	10,0	10,90
22	18,5	12,5	10,5	12,0	11,2	12,5	12,0	8,0	10,0	11,5	11,87
30	25,0	24,0	18,0	15,0	18,0	22,0	18,0	16,5	17,0	20,0	19,35

TABLE XIX
URETANO 0,5 %

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática de la RAIZ principal

Días											Valores medios totales
5	1,6	1,0	1,5	1,5	1,3	1,3	1,2	1,9	1,0	1,9	1,42
7	2,2	1,2	1,5	2,0	1,6	1,6	1,7	2,0	1,1	2,2	1,71
8	2,5	1,2	1,5	2,5	1,8	1,7	2,0	2,0	1,2	2,4	1,88
9	2,5	1,4	2,0	2,5	2,0	1,8	2,6	2,2	1,4	2,5	2,09
10	3,2	1,8	2,2	2,5	2,3	2,0	2,9	2,4	1,5	2,6	2,34
11	3,3	1,9	2,4	2,5	2,5	2,2	3,5	2,5	1,7	2,9	2,54
12	3,6	2,5	2,5	2,7	2,7	2,3	4,0	3,0	3,0	3,0	2,93
13	3,8	2,6	2,7	3,1	2,8	2,5	4,1	3,0	3,0	3,1	3,07
14	4,0	2,7	3,0	3,5	3,0	2,8	4,3	3,0	3,0	3,3	3,26
15	4,0	3,0	3,0	4,0	3,0	3,0	4,5	3,5	3,0	3,5	3,45
16	4,5	3,5	3,0	4,5	3,0	3,0	4,7	3,7	3,0	3,7	3,66
17	4,6	3,7	3,7	5,0	3,3	3,0	4,8	4,0	3,0	3,8	3,89
18	4,7	4,0	3,9	5,5	3,3	3,5	5,0	4,0	3,0	4,0	4,09
19	5,0	4,2	4,2	6,0	3,5	3,5	5,2	4,2	3,0	4,0	4,28
20	5,1	4,6	4,3	6,2	3,7	3,7	5,3	4,3	3,0	4,1	4,43
21	5,2	5,0	4,5	6,5	4,0	4,0	5,5	4,5	3,0	4,2	4,64
22	5,2	5,3	4,7	6,5	4,0	4,0	5,6	5,0	3,0	4,2	4,75
30	7,0	12,0	7,5	6,5	5,5	5,7	7,2	7,0	3,7	6,0	6,81

TABLE XX
NORMALES

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática del TALLO Y RAIZ principal

Días											Valores medios totales
7	2,8	2,4	2,9	2,5	1,5	3,6	3,8	3,5	2,3	1,6	2,68
8	3,4	3,1	3,4	3,2	2,9	4,1	4,0	3,8	2,5	1,6	3,20
9	3,9	3,4	3,8	4,0	3,2	4,4	4,4	4,3	2,8	1,6	3,58
10	4,7	4,3	4,4	4,5	3,7	4,8	5,0	4,8	3,3	1,8	4,13
11	5,8	4,5	4,8	5,5	4,2	5,6	5,8	5,3	4,0	2,5	4,70
12	6,5	4,7	5,1	6,8	4,7	6,0	7,0	6,2	4,5	3,0	5,35
13	7,4	5,6	5,7	7,6	5,0	7,0	8,2	6,4	5,3	3,6	6,18
14	8,5	6,5	6,5	9,5	5,5	8,1	9,5	6,7	6,3	4,2	7,13
15	10,8	7,2	6,5	10,8	6,7	9,5	10,3	7,8	7,2	5,2	8,30
16	12,8	7,8	8,8	11,5	8,5	10,5	12,0	8,2	8,0	5,8	0,39
17	14,2	10,0	10,0	13,0	9,2	11,2	13,5	9,5	9,5	6,7	10,63
18	16,0	10,5	12,0	14,1	10,4	12,5	14,5	9,5	10,3	8,0	11,78
19	18,8	9,0	13,3	15,5	11,5	13,5	16,0	11,5	12,0	9,2	13,03
20	20,6	10,0	15,1	17,5	13,2	14,2	17,5	12,4	13,2	10,7	14,44
21	22,5	11,0	17,0	19,5	15,0	15,0	19,0	13,3	14,5	12,3	15,91
22	25,5	11,8	18,5	22,5	16,8	19,0	21,0	14,3	17,0	14,5	18,09
30	47,0	41,5	38,0	43,5	38,5	35,0	29,0	36,0	35,0	40,0	38,70

TABLA XXI

URETANO 0,05 %

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática del TALLO Y RAIZ principal

Días											Valores medios totales
7	3,1	3,4	2,1	2,8	3,9	2,8	2,2	3,2	3,0	3,6	3,01
8	4,2	4,0	2,1	2,9	4,3	2,9	2,4	3,3	3,5	5,0	3,45
9	4,5	4,8	2,2	3,5	4,8	3,7	2,9	3,7	4,2	5,3	3,96
10	5,2	5,5	2,9	6,2	5,5	4,0	3,2	4,0	5,0	5,7	4,72
11	5,9	6,4	3,6	5,2	6,2	4,5	4,3	5,1	5,7	6,0	5,29
12	7,0	7,5	4,3	6,1	7,1	5,3	5,5	6,5	6,5	6,6	6,24
13	8,1	8,4	4,9	7,0	8,0	5,7	6,7	7,5	7,3	7,1	7,07
14	9,3	9,4	5,5	8,0	9,0	6,2	8,0	8,5	8,2	7,7	7,98
15	10,0	9,7	7,0	9,0	10,0	7,5	9,0	10,0	9,5	9,5	9,12
16	13,0	10,5	7,3	10,0	10,5	8,0	10,5	11,5	11,0	10,5	9,48
17	15,5	11,5	7,6	11,5	12,7	9,5	11,0	13,7	12,5	12,2	11,77
18	19,0	13,5	8,5	12,5	13,2	10,0	12,5	16,0	15,0	13,6	13,38
19	20,5	14,5	9,0	13,5	15,0	11,5	13,5	18,5	17,5	15,0	14,85
20	22,2	16,2	9,7	15,0	15,9	12,9	13,9	20,7	20,5	16,9	16,39
21	24,0	18,0	10,5	16,5	17,0	14,5	14,5	23,0	23,5	19,0	18,05
22	28,0	21,0	13,5	18,5	18,0	17,5	20,0	25,0	26,5	22,2	21,02
30	57,0	43,0	40,0	41,5	42,5	44,0	48,0	47,0	45,0	47,5	45,55

TABLA XXII

URETANO 0,1 %

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática del TALLO Y RAIZ principal

Días											Valores medios totales
7	4,3	4,8	3,0	2,6	2,9	1,9	3,0	2,6	2,5	2,7	3,03
8	5,2	5,2	3,6	2,7	3,5	2,2	3,5	2,6	2,5	3,5	3,47
9	5,8	5,0	4,2	3,2	4,0	2,2	3,7	3,0	3,0	4,4	3,85
10	7,5	5,5	4,9	4,0	4,7	3,2	4,5	3,4	3,6	4,8	4,61
11	8,0	7,0	5,5	5,0	5,5	3,8	5,0	3,8	4,2	5,1	5,29
12	9,7	7,3	6,5	5,5	6,5	4,5	5,7	4,5	4,7	5,5	6,04
13	11,1	8,3	7,5	6,7	7,2	5,4	6,5	5,2	5,7	6,3	6,99
14	12,5	9,5	8,5	8,0	8,0	6,4	7,5	6,0	6,8	7,2	8,04
15	14,0	11,0	9,0	8,5	8,8	7,5	9,0	6,5	7,5	8,0	8,98
16	17,5	12,5	10,0	9,8	10,3	9,5	10,0	7,5	8,3	8,5	10,34
17	19,0	14,0	10,8	10,7	11,8	11,7	11,2	8,5	8,6	9,5	11,58
18	20,5	15,4	12,0	12,0	13,0	13,0	12,5	8,8	10,0	11,5	12,87
19	22,5	16,5	13,0	14,0	15,0	14,5	13,5	10,5	10,9	13,5	14,39
20	24,5	18,7	14,2	15,2	16,5	15,5	14,7	11,4	12,4	15,2	15,83
21	26,5	21,0	15,5	16,5	18,0	16,5	16,0	12,3	14,0	17,0	17,33
22	27,5	24,0	18,0	19,0	19,7	19,5	20,0	14,0	15,5	19,5	19,67
30	46,0	51,0	42,0	39,0	43,0	44,0	39,0	38,5	37,0	43,0	42,25

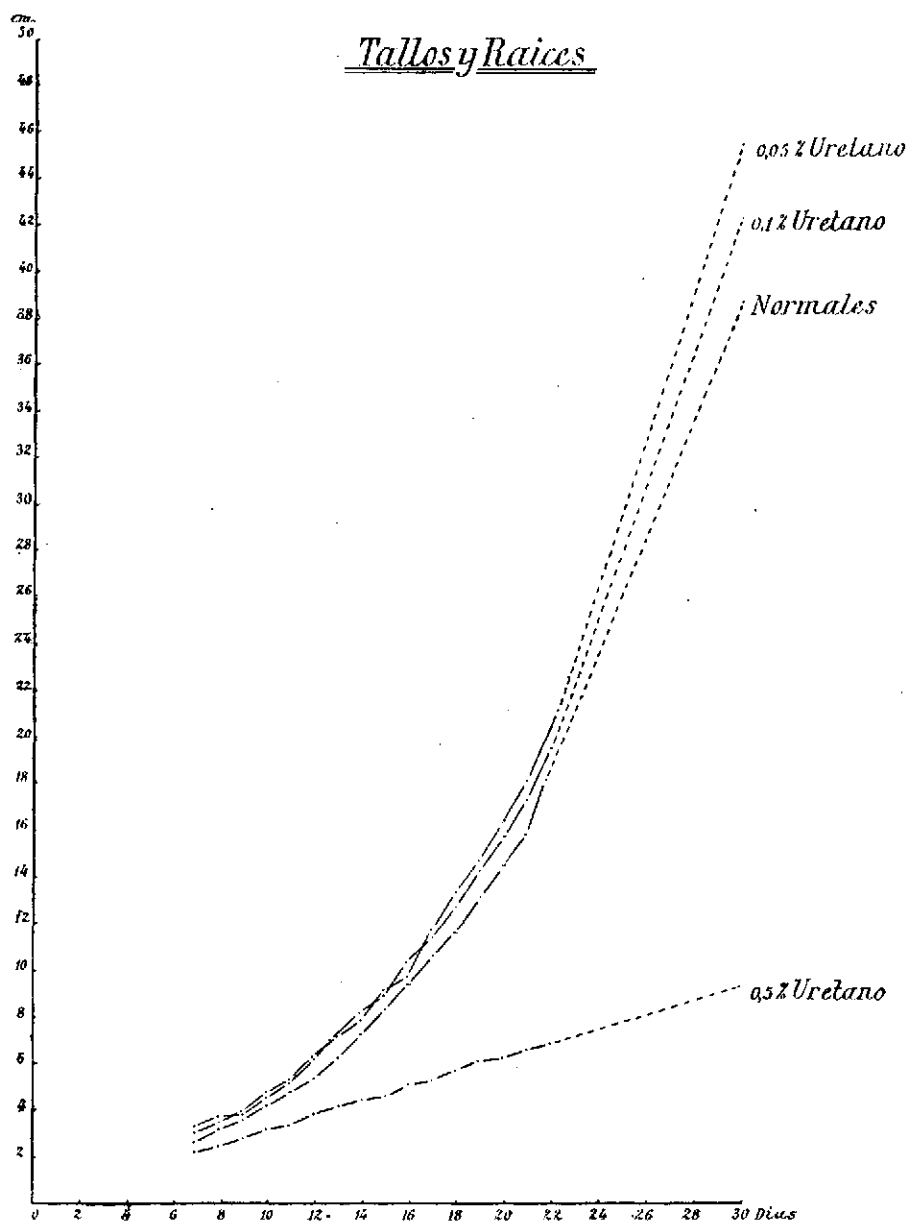


FIGURA 21

TABLA XXIII

URETANO 0,5 %

Valores medios de las medidas del crecimiento por actividad meristemática del TALLO Y RAIZ principal

Días	Valores medios totales										
7	2,7	1,7	2,1	2,7	2,4	2,2	2,2	2,7	1,6	2,8	2,31
8	3,2	1,7	2,2	3,2	2,8	2,5	2,9	2,7	1,7	3,0	2,59
9	3,5	2,0	2,7	3,2	3,0	2,6	3,6	2,9	1,9	3,1	2,85
10	1,0	0,6	0,7	0,7	1,0	0,9	1,0	0,7	0,5	0,6	3,11
11	4,3	2,5	3,2	3,2	3,5	3,2	4,5	3,2	2,2	3,6	3,34
12	4,6	3,4	3,5	3,5	3,7	3,3	5,4	3,9	4,0	3,7	3,90
13	5,0	3,5	3,7	4,0	4,0	3,5	5,5	3,9	4,0	3,9	4,10
14	5,5	3,7	4,1	4,5	4,3	3,8	5,8	4,0	4,0	4,2	4,39
15	5,5	4,3	4,3	5,0	4,5	4,3	6,0	4,5	4,0	4,5	5,69
16	6,0	4,9	4,3	5,8	4,5	4,5	6,7	4,7	4,0	4,7	5,01
17	6,1	5,2	5,2	6,5	5,3	4,5	6,8	5,3	4,0	4,8	5,37
18	6,2	5,5	5,4	7,2	5,3	5,0	7,5	5,5	4,0	5,8	5,74
19	6,5	5,7	6,0	8,0	6,0	5,0	7,7	5,7	4,1	5,8	6,05
20	6,6	6,1	6,1	8,2	6,2	5,2	7,8	5,8	4,1	5,9	6,20
21	6,7	6,5	6,5	8,5	6,5	6,0	8,0	6,5	4,5	6,0	6,57
22	6,7	6,8	6,7	9,0	6,5	6,0	8,6	7,0	4,5	6,0	6,78

30	8,7	13,5	9,5	8,5	9,0	9,7	10,7	9,5	5,4	8,5	9,30

Valoración de lípidos: Como en el estudio experimental anterior, seguimos el método de HERTWIG para la extracción de los lípidos de las raíces, tallos y cotiledones. Pesados los lípidos totales de cada órgano, se calculó el contenido y % correspondiente. (Tabla XXIV).

TABLA XXIV

COTILEDONES NORMALES

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso de un par de cotiledones, valor medio 0,60866 grs.

Lípidos de los cotiledones, valor medio 0,04595 grs.

% de lípidos de los cotiledones, 7,54 %.

COTILEDONES - URETANO 0,05 %

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso de un par de cotiledones, valor medio	0,58658 grs.
Lípidos de los cotiledones, valor medio.	0,03846 grs.

% de lípidos de los cotiledones, 6,56 %

COTILEDONES - URETANO 0,1 %

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso de un par de cotiledones, valor medio	0,56096 grs.
Lípidos de los cotiledones, valor medio	0,03400 grs.

% de lípidos de los cotiledones, 6,06

COTILEDONES - URETANO 0,5 %

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso de un par de cotiledones, valor medio	1,05780 grs.
Lípidos de los cotiledones, valor medio	0,03894 grs.

% de lípidos de los cotiledones, 3,68 %

TALLOS NORMALES

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso del tallo, valor medio	0,40998 grs.
Lípidos del tallo, valor medio	0,03972 grs.

% de lípidos del tallo, 9,63 %

TALLOS URETANO 0,05 %

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso del tallo, valor medio	0,4170 grs.
Lípidos del tallo, valor medio	0,0354 grs.

% de lípidos del tallo 8,48 %

TALLOS URETANO 0,1 %

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso del tallo, valor medio	0,38404 grs.
Lípidos del tallo, valor medio	0,03960 grs.

% de lípidos del tallo, 10,31 %

TALLOS URETANO 0,5 %

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso del tallo, valor medio	0,07112 grs.
Lípidos del tallo, valor medio	0,01232 grs.

% de lípidos del tallo 17,32 %

RAICES NORMALES

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso de la raíz principal y secundarias, v. m.	0,1864 grs.
Lípidos de la raíz principal y secundarias, v. m.	0,01004 grs.

% de lípidos 5,38 %

RAICES URETANO 0,05 %

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso de la raíz principal y secundarias, v. m. 0,1952 grs.

Lípidos de la raíz principal y secundarias, v. m. 0,01212 grs.

% de lípidos 6,20 %

RAICES URETANO 0,1 %

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso de la raíz principal y secundarias, v. m. 0,1633 grs.

Lípidos de la raíz principal y secundarias, v. m. 0,0756 grs.

% de lípidos 4,62 %

RAICES URETANO 0,5 %

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso de la raíz principal y secundarias, v. m. 0,07442 grs.

Lípidos de raíz principal y secundarias, v. m. 0,00748 grs.

% de lípidos 10,05 %

RAICES URETANO 1 %

Varios lotes de 100 plantas de *Faba vulgaris* en idénticas condiciones hidropónicas, luz y temperatura.

30 días de cultivo.

Análisis de lípidos:

Peso de la raíz principal y secundarias, v. m. 0,01542 grs.

Peso de lípidos de la raíz principal y secundarias 0,0024 grs.

% de lípidos 15,56 %

CONCLUSIONES GENERALES

1.^a Las plántulas cultivadas sobre disoluciones acuosas de etil-uretano al 0,05 % y 0,1 % presentan caracteres morfológicos semejantes a las normales, pero no fisiológicas.

2.^a Los tallos y raíces de las plántulas cultivadas sobre disoluciones acuosas de uretano al 0,05 % y 0,1 % tienen tendencia a desarrollar matemáticamente funciones exponenciales de crecimiento con valores mayores, pero semejantes a las de tipo normal.

3.^a Los tallos y raíces de las plántulas de *Faba vulgaris* en disoluciones acuosas de uretano al 0,5 %, en su crecimiento, tienen tendencia a desarrollar funciones matemáticas rectilíneas.

4.^a La concentración óptima de etil-uretano para el desarrollo de plántulas de *Faba vulgaris* en disoluciones acuosas es del 0,05 %, aunque respecto de las raíces fuese en un principio del 0,1 %, on al final del tiempo de nuestras experiencias que correspondió también al 0,05 %.

5.^a Las modificaciones morfológicas de los tallos y raíces de las plántulas de *Faba vulgaris* se presentan claramente a la concentración de uretano del 0,5 %, verdadera zona de variaciones o mutaciones. (Figuras 18 y 19).

6.^a La concentración de inhibición funcional y de crecimiento corresponde al 1 % de etil-uretano.

7.^a Los porcentajes y contenido de lípidos totales en los tallos crecen a medida que aumenta la concentración de uretano, correspondiendo los mayores valores a la concentración del 0,1 y 0,5 %.

8.^a Los lípidos totales de las raíces de las plántulas cultivadas en disoluciones acuosas de uretano aumentan en contenido y porcentaje respecto de las de tipo normal a la concentración del 0,05 %, disminuye en las correspondientes al 0,1 %, y poseen un aumento progresivo en las desarrolladas al 0,5 % y 1 % respectivamente, obteniéndose los valores máximos.

9.^a En los cotiledones, el porcentaje en lípidos totales va disminuyendo a medida que la concentración de uretano aumenta, obteniéndose los valores mínimos a la concentración del 0,5 %.

10.^a Existe una estrecha correspondencia entre las manifestaciones morfológicas y fisiológicas que presentan las plántulas de *Faba vulgaris* según la concentración de etil-uretano y los cambios de estructuras microscópica y submicroscópica, como se deduce por el estudio bioquímico respecto de los lípidos, así como por el micrográfico.

Expresamos nuestro sincero reconocimiento y gratitud al Dr. A. Soler por su valioso apoyo y asesoramiento en la realización y publicación de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- LOUSTAU, J.: *Estudios sobre el Nucleolo en Células Vegetales*. Publicaciones de la Universidad de Murcia, 1943.
- ORTUÑO, A.: *Estudio del metabolismo hidrocarbonado del Aspergillus ochraceus bajo la influencia de agentes químicos*. Publicaciones de la Universidad de Murcia, 1952.
- MANGRANÉ, D.: *Bioquímica de la Anestesia*. Espasa-Calpe, S. A. Madrid, 1941.
- WORK, T. y E.: *Quimioterapia y sus bases actuales*. Aguilar, S. A. de Ediciones. Madrid.
- WALLACE, T. y MARSH, R.: *Science and Fruit*. University of Bristol, 1953.
- FOSTER, J.: *Chemical activities of fungi*. Academic Press Inc. New York, 1949.
- BLADBERGROOEN, W.: *La Fisicoquímica en la Medicina y en la Biología*. Espasa-Calpe, S. A. Madrid, 1946.
- ADAMS, R., JENSEN, C. y ALTHOUSE, P.: *Fundamentos de Bioquímica agrícola*. Salvat Editores, S. A. Barcelona-Madrid, 1954.
- SÁNCHEZ, E.: *Pitogenética*. Salvat Editores, S. A. Barcelona-Madrid, 1955.
- JOHNSON, F. H., FYRING, H. y KEARNS, W.: *A quantitative theory of synergism and antagonism among diverse inhibitors, with special reference to sulfanilamide and urethane*. Arch. Biochem., 3, 1, 1943.

Trabajos sobre la narcosis de los organismos vegetales:

- CORNET.: *Compt. rend. Soc. Biol.*, 105, 387, 389 (1930).
- DE CLERQ.: *Chem. Zent.*, 1 (1931).
- WALACE.: *Amer. Journ. Bot.*, 18, 215 (1931).
- BANCROFT y RUTZLER.: *J. Phys. Ch.*, 36, 273 (1932).
- MASCRE y POUSSET.: *Bull. Sci. Pharm.*, 40, 35, 257 (1933).
- FREIBURG.: *Arch. Wiss. Bot.*, 20, 659 (1933).
- LIEBISCH.: *Angew. Chem.*, 46, 635 (1933).
- DENBER.: *Science*, 79, 389 (1934).