

Contribución al estudio de la cloroplastina y sus relaciones con la estructura de los cloroplastos (*)

POR
SIMON NAVARRO BLAYA

OBJETO

En la presente Memoria destacamos nuestro interés por el estudio de las moléculas lipoproteicas de los cloroplastos, íntimamente relacionadas con las clorofilas a y b, que definen una estructura biofísicoquímica fundamental, de considerable especificidad en los procesos fotosintéticos.

Nos ha parecido interesante esta investigación básica y aplicada, precisamente en parénquimas foliares normales y deficientes en algún oligoelemento, para poder controlar cultivos racionales en especies vegetales de interés agrícola, particularmente en el Sureste español, donde el principal factor limitante de la producción vegetal es el desequilibrio nutritivo que presentan las plantas sometidas corrientemente a cultivos intensivos, motivado por la naturaleza físico-química de los suelos y por la falta de una nutrición epigea e hipógea adecuada.

(*) Este trabajo es un resumen de la tesis redactada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias. Fue leída en junio de 1964, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Murcia.



ESTADO ACTUAL SOBRE LA ESTRUCTURA DE LOS CLOROPLASTOS

Los plastidios son orgánulos celulares, característicos del Reino Vegetal, aunque carecen de ellos las Protofitas y los Hongos. Entre las diversas clases existentes, han merecido especial atención los que expuestos a la luz gozan de la facultad de poder elaborar los pigmentos clorofilicos, situados en los plastidios mismos que los sintetizan, y que por ello se han denominado cloroplastos.

Estos orgánulos poseen estructura granular al microscopio óptico, cuya refringencia es mayor que la del citoplasma de las células vegetales autótrofas. La morfología, tamaño y estructura de los mismos es bien característica para no ser confundidos con los restantes orgánulos celulares. En las plantas superiores tienen el aspecto de corpúsculos esferoidales u ovoides, generalmente pequeños, pero siempre de forma y dimensiones definidas, según la especie vegetal que se considere.

Los cloroplastos constan de un estroma incoloro, en el que están embebidos unos gránulos diminutos que se encuentran en los límites de la visibilidad microscópica, los granos (grana), cuyo conjunto se halla envuelto por la membrana cloroplastidial. Las primeras investigaciones realizadas por Kuster (1), Guilliermond (2) y Hofmeister (3), basadas en la óptica coloidal, refutan totalmente aquella estructura, pues los modelos micrográficos empleados parecen demostrar que todos los elementos del protoplasma son fluidos, ópticamente vacíos y microscópicamente homogéneos; pero los documentos microfotográficos sobre cloroplastos, obtenidos por Hubert (4), Heitz (5, 6), Frey-Wyssling (7), Weier (8), Geitler (9),

Menke (10) y Strugger (11), han demostrado la distribución heterogénea de la clorofila en los plastidios, y la presencia de granos, que varían de tamaño desde 0,5 a 0,8 micras, con cierta especificidad, según la especie vegetal.

En los últimos años la estructura submicroscópica de los cloroplastos ha sido posible ponerla de manifiesto con la supermicroscopía electrónica, gracias a los trabajos de Frey-Wyssling y Steinmann (12), Wolken y Palade (13), Leyon y Wettstein (14), Vatter (15), Steinmann y Sjöstrand (16), y Hodge, McLean y Mercer (17), entre otros. Ellos han revelado, evidentemente, la membrana cloroplastidial, el estroma y la disposición de láminas y discos en los granos.

En cortes ultrafinos de cloroplastos, se ha observado que están formados por láminas paralelamente ordenadas (capas de lipoproteínas). Estas láminas recorren el cloroplasto en una extensión considerable; incluso pueden atravesarlo de un extremo a otro. En ciertas regiones se muestran con mayor densidad, porque además de dichas láminas continuas, existen otras formadas por bifurcaciones o repliegues de las principales, o cerradas sobre sí mismas, como vesículas aplastadas o discos de doble lámina. Estas diferenciaciones o espesamientos suelen desarrollarse de modo superpuesto, uno encima de otro, intercalados en las láminas continuas, en dirección perpendicular al eje de las mismas; corresponden a pilas de granos o a pilas de los discos que forman cada uno de los granos (figura 1).

Las láminas cloroplastidiales parecían relativamente simples en los primeros exámenes, pero a grandes aumentos, con sistemas de alta resolución, muestran estructura compuesta. Según Hodge, McLean y Mercer (17), en cada lámina cloroplastidial existe una zona proteica, denominada P, rodeada por dos capas L, en las que predominan los fosfolípidos y las clorofilas. Los bordes externos de este conjunto, o líneas C, están algo diferenciados (figura 1 [3]).

También en este sentido existen pruebas, dadas por Steinmann y Sjöstrand (16), de que en los cloroplastos, las laminillas de los granos están constituídas por una doble capa proteica con lípidos intercalados, y que las moléculas de clorofila forman capas monomoleculares entre lípidos y proteínas. Las moléculas clorofílicas estarían envueltas por capas de sustancias lipoideas de 50 Å de espesor, aproximadamente, e intercaladas entre capas de proteínas y agua de un espesor de 250 Å. La morfología molecular de esta fina o superior estructura se ha intentado explicar por el carácter hidrófilo de la molécula de clorofila, debido a los átomos de nitrógeno de los cuatro anillos pirrólicos y el magnesio enlazado de modo coordinado. Por otra parte, su larga cola de fitol es lipófila, y por consiguiente este pigmento es una molécula en forma de maza, con un polo

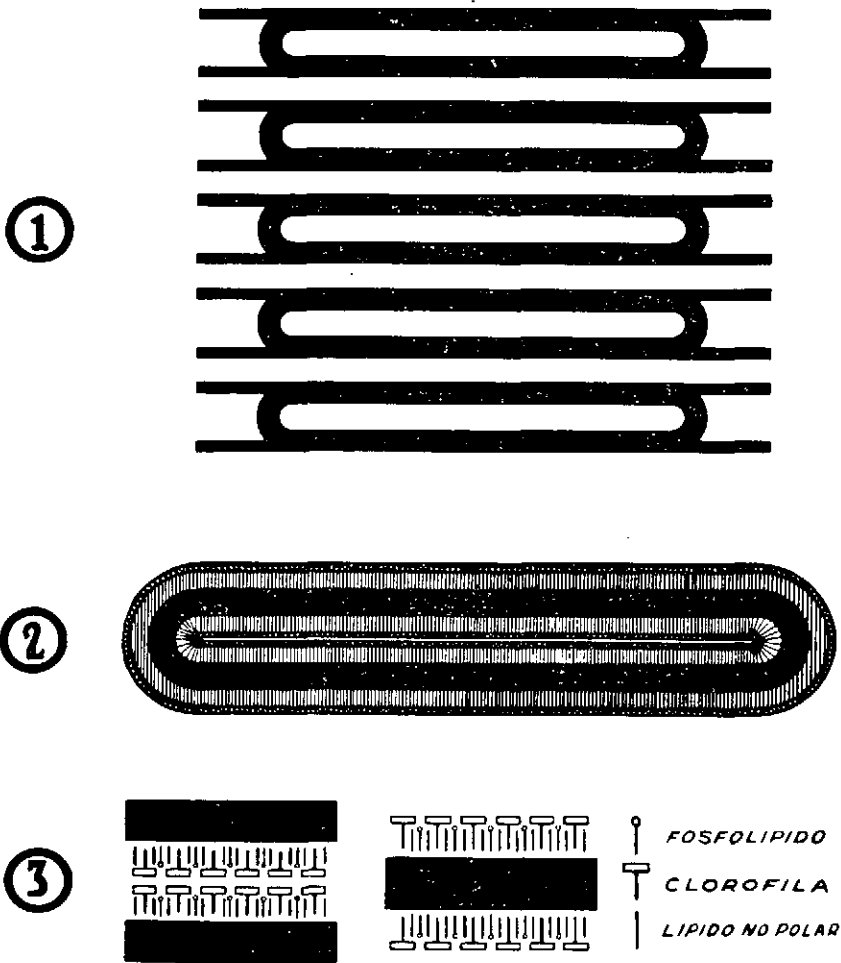


Figura 1

Esquema de la ultraestructura de los cloroplastos:

- (1) Disposición en pila de los discos granulares. (2) Disco con su doble lámina clorofilo-lipoproteica. (3) Interpretación molecular de la estructura fina o submicroscópica.

acusadamente lipófilo y otro lipófilo. La cadena de fitol o cola hidrófoba de la molécula de clorofila, se dispondría paralelamente a las cadenas hidrófobas de los fosfolípidos, y el polo hidrófilo de ésta se orientaría hacia el absorbente hidrófilo, dando lugar al sistema representado en la figura 2.

En el estroma de los cloroplastos pueden presentarse macromoléculas globulares de 250-300 Å de diámetro, dispuestas sobre los granos y entre ellos (figura 3).

Debido a la estructura cloroplastidial descrita, se comprenderá que



como sólo los granos (grana), contienen el pigmento clorofílico, solamente ellos manifiestan fluorescencia de clorofila, ofreciendo un color rojo brillante, mientras que el estroma plastidial queda oscuro. Así se ha podido demostrar, sin lugar a dudas, la distribución heterogénea de la clorofila, incluso en los cloroplastos ópticamente homogéneos, aunque no realmente.

La función de los cloroplastos en las células autótrofas consiste en permitir la fotosíntesis, la cual se desarrolla en los granos, es decir, en las capas clorofilo-lipoproteicas de los mismos. Así resulta que los granos son zonas especializadas que definen una estructura biofísico-química fundamental, de considerable especificidad y con límites propios dentro del cloroplasto.

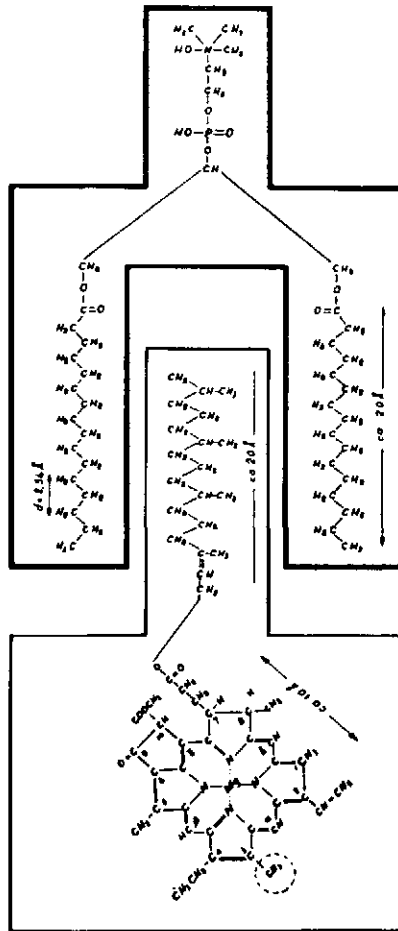


Figura 2
Orientación molecular clorofilo-lipoproteica



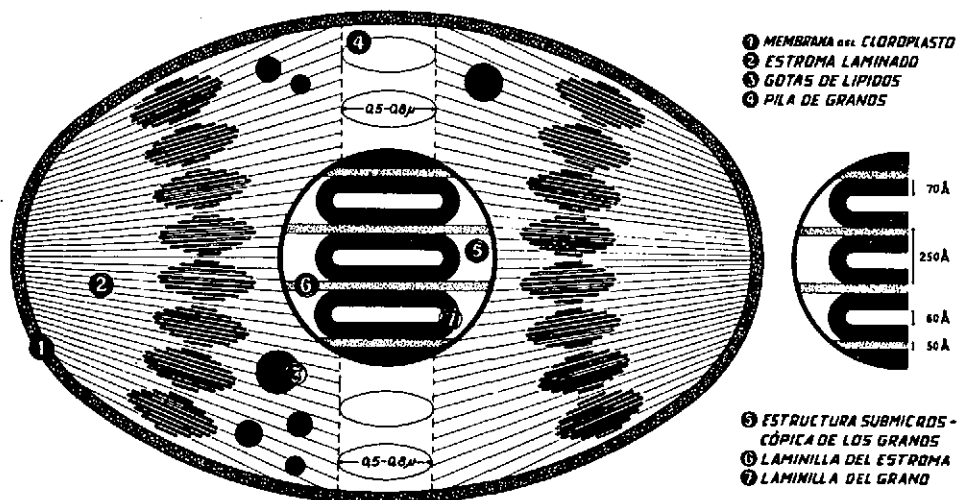


Figura 3
Interpretación de la ultraestructura de un cloroplasto

En las bacterias fotosintéticas, y también en las algas verde-azuladas, no se aprecian cloroplastos. Sin embargo, es posible hacer preparaciones en las que se ponen de manifiesto los pigmentos en pequeños orgánulos o cromatóforos, cuyos diámetros, de 0,3 a 0,5 micras, son demasiado pequeños para que se puedan estudiar perfectamente en el microscopio óptico; en el electrónico, estos orgánulos revelan estructuras discoidales semejantes a los granos de las estructuras plastidiales.

Las imágenes obtenidas por Leyon (18), con el microscopio electrónico, en los cloroplastos de las algas *Spirogyra* y *Mougeotia*, demuestran que poseen una estructura laminar, pero no se observan granos. También en cortes ultrafinos del alga flagelada *Euglena*, observados bajo el microscopio electrónico por Wolken y Palade (19), presentan cloroplastos constituidos por unas veinte láminas continuas, sin diferenciación acusada entre granos individuales. En todos estos casos, cada cloroplasto equivale a un grano único.

Existen, por tanto, dos tipos de cloroplastos: los cloroplastos granulares y los laminares. En los primeros, la estructura laminar es propia únicamente de los granos. Se ha propuesto denominar como tales cloroplastos a los granulares, y considerar a cada uno de los laminares como un solo grano.

Hoy suele convenirse en que todos los cloroplastos poseen estructura laminar. Como se ha descrito anteriormente, en las plantas inferiores las laminillas se extienden uniformemente por todo el cloroplasto; en cambio,

en las plantas superiores, las laminillas, aunque se extienden también por todo el cloroplasto, están más desarrolladas en ciertas zonas del mismo, que corresponden precisamente a los granos.

Numerosos trabajos sobre la estructura de los cloroplastos en plantas superiores, han sido publicados desde la introducción de la supermicrografía electrónica. Pero todavía es un tema de controversia la interpretación de los esquemas sobre la estructura molecular de los cloroplastos, particularmente con respecto a la distribución de los pigmentos fotosintéticos y su disposición en las laminillas lipoproteicas de los granos cloroplastidiales.

II

ESTUDIO MICROGRAFICO DE CLOROPLASTOS

En la actualidad se considera que las imágenes estructurales de los cloroplastos, son exclusivas de la supermicroscopía electrónica. Sin embargo, con el microscopio óptico y técnicas micrográficas originales, pretendemos estudiar formas y tamaños de cloroplastos, cuyas imágenes estructurales nos han de constituir valiosas apreciaciones, como preliminar necesario para la serie de investigaciones que nos proponemos realizar sobre el complejo clorofilo-lipoproteico de los granos, y sus relaciones con la estructura de los cloroplastos, cuya ruta de trabajo fue iniciada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Murcia, por los doctores Loustau, Ortuno y Carpena (20).

PARTE EXPERIMENTAL

1.—*Material y métodos*A) *Material biológico*

Como material biológico para esta parte experimental, hemos tomado las hojas de acelga (*Beta vulgaris* L.), tomatera (*Solanum lycopersicum* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.) y limonero (*Citrus limonum* Risso); en esta



última especie consideramos las hojas fisiológicamente normales, y cloróticas por deficiencia de hierro, cuyas diferencias de composición química hemos creído imprescindibles para el desarrollo de esta memoria (tabla I).

B) Técnicas operatorias.

a) *Técnica micrográfica por disociación física.*—Las hojas de acelga, tomatera y rábano, las seccionamos respectivamente en pequeñas tiras y las sometimos a su fijación con una disolución de formol al 8% en suero fisiológico, que tiene la ventaja de ser fijador y conservante del material biológico. En el caso de poner de manifiesto la estructura granular de los cloroplastos, hemos fijado previamente el material foliar con tetróxido de osmio al 0,25%. Seguidamente, tratamos estas pequeñas tiras con una disolución acuosa de sulfato ferroso al 0,1%, durante doce horas; por último, teñimos con hematoxilina al 1%. Para dar el tono de color violeta, característico del colorante mencionado, adicionamos previamente disolución acuosa de alumbre potásico Merck al 0,1%. Con ayuda de un molino homogeneizador tipo Multipimer, disociamos mecánicamente las células que forman los parénquimas foliares. Para ello, suspendemos los fragmentos de hojas en una disolución de bicarbonato sódico al 0,1%. Al cabo de tres minutos, logramos el grado conveniente de esta disociación física. Seguidamente, pasamos el material disociado a través de un tamiz de 200 mallas, y centrifugamos posteriormente a 5.000 r.p.m.

Para conseguir la preparación micrográfica definitiva, colocamos una pequeña parte del material disociado y teñido, en una gota de gelatina glicerínada, fundida sobre un portaobjetos; después de situar el cubreobjetos, presionamos suavemente, valiéndonos de un trozo de médula de saúco, a la vez que imprimimos un ligero movimiento de rotación o de oscilación.

Para medir los cloroplastos, fueron elegidos al azar campos microscópicos con ayuda de las tablas de números aleatorios.

b) *Técnica micrográfica de disociación química.*—Con esta técnica hemos sometido el material biológico, tanto de las hojas de limonero normales como cloróticas por deficiencia de hierro, a idénticas condiciones de manipulación respecto de la fijación, teñido, disociación celular de los parénquimas foliares, y montaje de las preparaciones micrográficas.

Las hojas verdes y cloróticas del limonero las seccionamos independientemente en pequeñas tiras, que sometemos a su fijación. Para ello, empleamos el ácido sulfosalicílico al 5%, en disolución acuosa de ácido pícrico al 1%; según el tamaño de los cortes, los hemos tenido en fijación

TABLA I

| Material | Hojas frescas | | Hojas secas 100-104° | | | | | | |
|-------------------------|---------------|--------------------------|----------------------|--------|--------|---------|---------|--------------|--------------|
| | Humedad % | Clorofila mgs. % grs. | N % | P % | K % | Ca % | Mg % | Fe p.p.m. | Mn p.p.m. |
| Acelgas | 89,5 | 380 | 5,02 | 0,35 | 2,04 | 2,08 | 1,15 | 162 | 70 |
| Tomatera | 82,5 | 480 | 4,02 | 0,43 | 1,90 | 4,65 | 0,75 | — | — |
| Rábano | 79,0 | 510 | 6,32 | 0,37 | 3,73 | 2,29 | 0,37 | 463 | 116 |
| Limonero (normal) | 54,6 | 1.010 | 2,34 | 0,12 | 0,83 | 3,85 | 0,45 | 128 | 18 |
| Limonero (clorótico) | 63,9 | 30 | 3,48 | 0,15 | 1,60 | 2,90 | 0,43 | 32 | 13 |



de cinco a diez días. Una vez fijadas las piezas, las hemos tratado durante doce horas con una disolución acuosa de sulfato ferroso al 0,5%. Seguidamente, lavamos con agua destilada hasta eliminar todo vestigio de sal ferrosa. Los parénquimas foliares así preparados, los disociamos con una disolución acuosa de oxalato amónico al 1%, calentada a 60° C, para disolver las sustancias pécticas que forman el cemento de unión situado entre la membrana de las células parenquimatosas. Prácticamente, al cabo de tres horas, alcanzamos el grado conveniente de esta disociación química, tras la cual manipulamos con sumo cuidado para evitar la disgregación de las piezas. A continuación, las tratamos con una disolución acuosa de alumbre potásico Merck al 0,1%, y teñimos intensamente este material biológico con hematoxilina al 1% durante veinticuatro horas. Después de este tiempo, practicamos cuidadosamente la diferenciación regresiva del colorante, para lo cual lavamos con una disolución de ácido clorhídrico N/1.000, de tal modo, que la diferenciación la detuvimos en el momento crítico, con disolución acuosa de bicarbonato sódico al 0,1%, y lavado posterior con agua destilada.

Como colorante de contraste hemos utilizado la rodamina B al 0,1%, en disolución acuosa.

c) *Técnica de desintegración celular.*—Para conseguir el homogeneizado celular, trituramos muy finamente el material foliar "in vivo", con un licuador Multipimer a 4.000 r.p.m., para desintegrar particularmente el condrioma, vacuoma y plastidoma (*). La suspensión bruta resultante, de color verde, formada por núcleos celulares, cloroplastos, mitocondrias y sus fracciones respectivas, microsomas y los jugos vacuolar y citoplásmico, la dividimos en dos partes, una de las cuales la pasamos a través de un filtro Whatman n.º 1.

Con el material obtenido mediante la aplicación de las técnicas expuestas, hemos realizado numerosas preparaciones micrográficas para estudiar la forma, tamaño y estructura de los cloroplastos y orgánulos constituyentes, de las distintas especies vegetales consignadas.

Todas las observaciones las hemos efectuado con un microscopio Dialux de la casa Leitz-Wetzler, binocular, con dispositivo para contraste de fases y cámara fotográfica Leica adaptable. Su equipo óptico nos ha permitido obtener aumentos comprendidos entre 450, 1.500 y 2.000.

d) *Experiencias de campo.*—Con el fin de estudiar la evolución de los cloroplastos en los parénquimas fotosintéticos, hemos partido de limoneros cloróticos, cuyas hojas contenían estados iniciales de formas cloro-

(*) Plastidoma, según Dangeard (1935), VI Internat. Bot. Cong. Proc., 2, 33.

plastidiales, los cuales sometimos a tratamientos de recuperación. Paralelamente, estudiamos micrográficamente la evolución cloroplastidial, conforme se iba corrigiendo el estado deficitario.

La experiencia consistió en suministrar Fe^{+2} a limoneros de veinte años, en estado agudo de clorosis férrica, por inyección en tronco de sulfato ferroso, ácido cítrico y hierro reducido, en la relación 100 : 10 : 1. Los árboles objeto del estudio recibieron 55,5 gramos de la mezcla indicada.

Los limoneros tratados vegetan en la Vega del Segura, sobre un suelo de elevado poder clorosante, pobre en materia orgánica, nitrógeno y fósforo; de contenido medio en potasio, y elevado en calcio y magnesio (tabla II).

El tratamiento se practicó el día 1 de marzo de 1963.

TABLA II

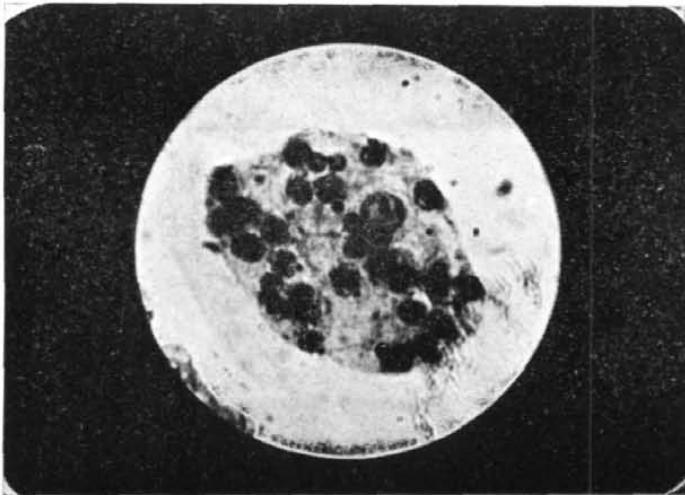
| Textura | Muestras | | | Observaciones |
|--|----------|-------|-------|---------------|
| | N.º 1 | N.º 2 | N.º 3 | |
| Capacidad de cambio total | 17,50 | 18,75 | 21,25 | Meq. % |
| pH _s (H ₂ O) | 7,95 | 8,10 | 7,90 | |
| pH _s (KCl) | 7,60 | 7,65 | 7,65 | |
| Carbonato cálcico total. | 33,5 | 34,0 | 22,5 | % |
| Carbonato cálcico activo | 12,0 | 14,0 | 11,0 | % |
| Materia orgánica. | 3,05 | 3,08 | 3,93 | % |
| Nitrógeno total | 0,156 | 0,136 | 0,218 | % |
| Fósforo asimilable | 34 | 24 | 34 | p.p.m. |
| Potasio ídem | 1,35 | 0,63 | 1,17 | Meq. % |
| Calcio ídem | 39,6 | 35,2 | 44,0 | " |
| Magnesio ídem | 6,0 | 4,0 | 6,0 | " |

El estudio analítico lo hemos realizado en las fases siguientes:

- 1.º) Inmediatamente antes del tratamiento.
- 2.º) En mayo. Los árboles mostraban síntomas manifiestos de restablecimiento.
- 3.º) En octubre del mismo año apreciamos curación completa de la deficiencia de hierro en los limoneros tratados.

2.—Resultados

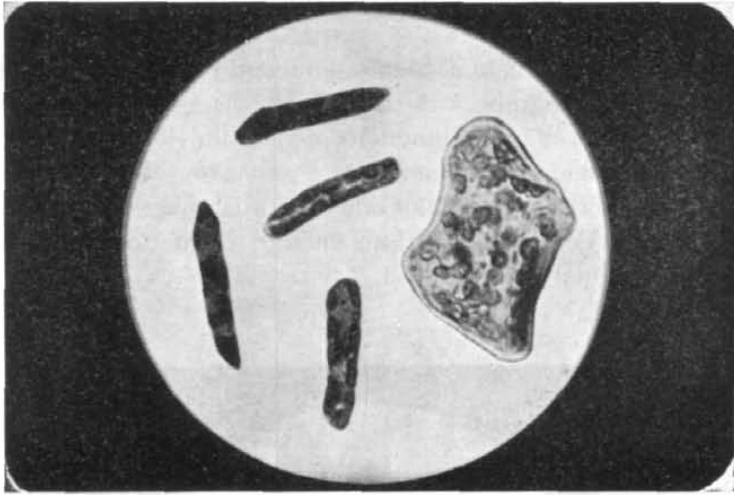
En esta parte experimental hemos empleado técnicas originales para las preparaciones micrográficas de las células de los parénquimas foliares de acelga, tomatera, rábano y limonero, con el fin de conseguir quedasen aisladas, enteras y completas, mediante disociación física o química. De esta manera, han podido ser extendidas en una sola capa entre porta y cubreobjetos, permitiéndonos precisar detalles estructurales y número de cloroplastos por célula (fotografías 1, 2 y 3).



Fotografía 1

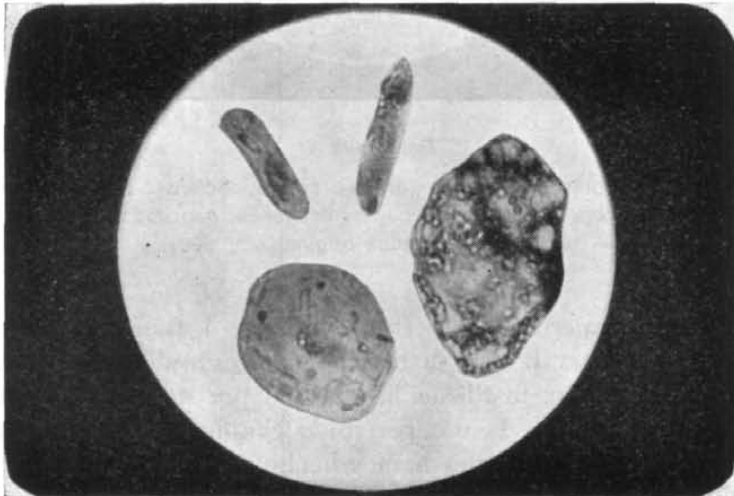
Núcleo, nucleolo, cloroplastos y granos (grana), correspondientes a una célula de parénquima esponjoso de hoja de limonero, cuyas imágenes han sido conseguidas con la técnica micrográfica original (x 1.500).

Las imágenes microscópicas (fotografías 4, 5, 6, 7 y 8), teñidas con hematoxilina-rodamina B, previa fijación con sulfosalicílico-pícrico o formol-tetróxido de osmio, justifican la elección por nosotros de estas técnicas micrográficas, ya que hemos percibido claramente la estructura cloroplastidial, en cuya arquitectura hemos hecho resaltar con cierta uniformidad el número y distribución de los granos, más o menos separados entre sí por el estroma homogéneo en que están inmersos, en tanto que la membrana cloroplastidial que los circunda, queda bien delimitada y débilmente teñida.



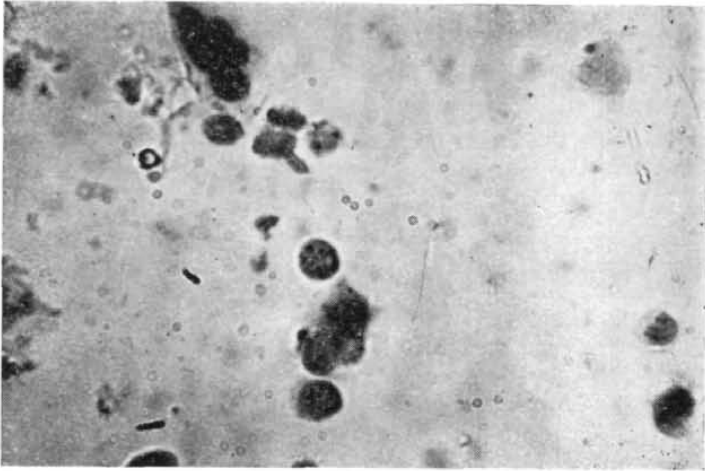
Fotografía 2

Células disociadas de los parénquimas de empalizada y esponjoso de hojas de limonero fisiológicamente normales (x 450).



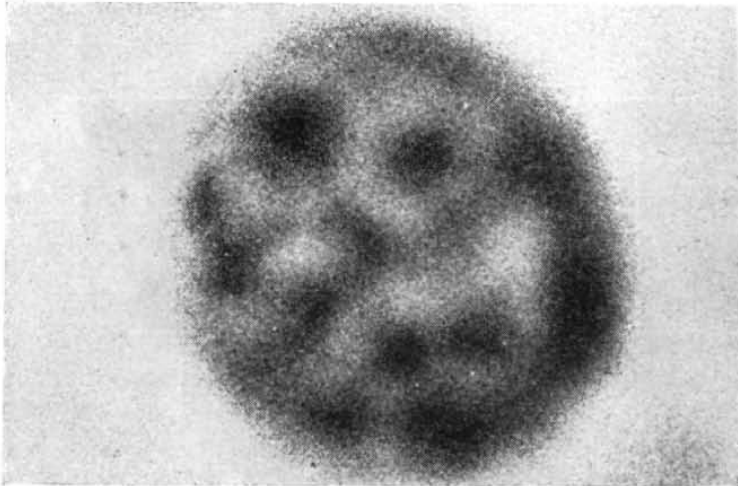
Fotografía 3

Células de parénquima en empalizada y esponjoso de hojas de limonero deficientes en hierro. Obsérvense los estados precursores de los cloroplastos (x 450).



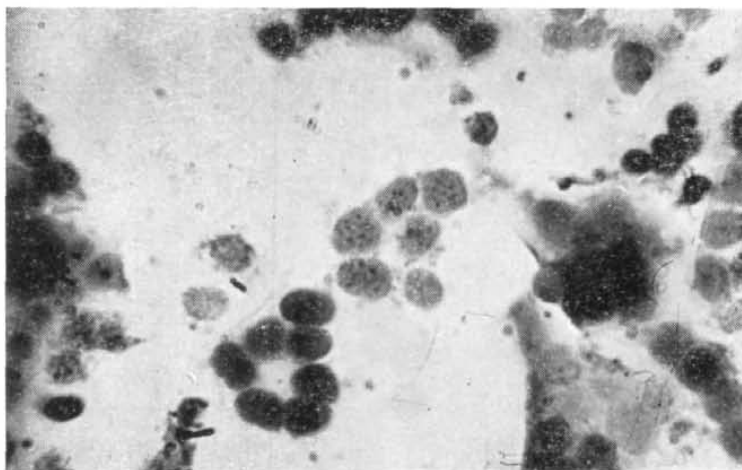
Fotografía 4

Cloroplasto de hoja de acelga en donde se pone de manifiesto la estructura granular del mismo, con nuestra técnica micrográfica original (x 1.000).



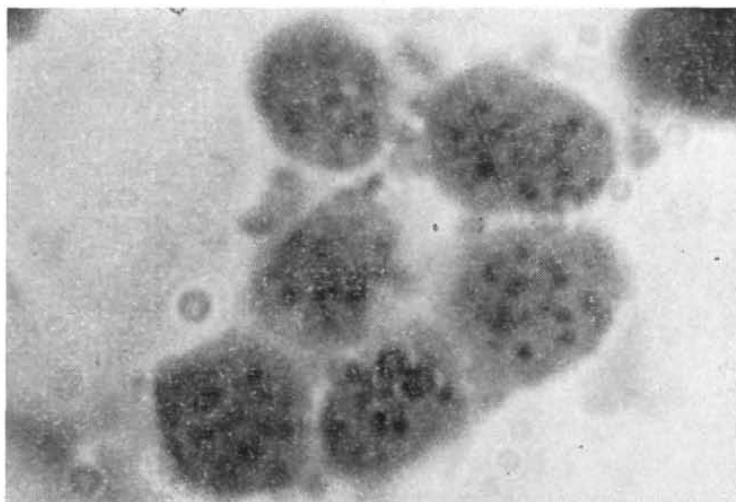
Fotografía 5

Ampliación fotográfica de un cloroplasto de hoja de acelga, en donde se pueden observar los granos cloroplastidiales en uno de los planos de enfoque del microscopio ordinario.



Fotografía 6

Conjunto de cloroplastos de hojas de acelga, en los que se han puesto de relieve los granos clorofilo-lipoproteicos, en uno de los planos de enfoque del microscopio ordinario (x 1.000).



Fotografía 7

Ampliación fotográfica de cloroplastos de hojas de acelga, en la que se ponen de relieve los granos cloroplastidiales, en uno de los planos de enfoque del microscopio ordinario.

En la tabla III exponemos los resultados de nuestro estudio micrográfico sobre los cloroplastos de hojas de acelga, tomatera y rábano, que hemos considerado como tipos de referencia para el control microscópico de los homogeneizados celulares.

Respecto a los tamaños, los valores más probables de los volúmenes cloroplastidiales, en los parénquimas foliares de las especies vegetales citadas, corresponden a las frecuencias máximas de 57,91, 17,16 y 57,91 micras cúbicas respectivamente.

En las tablas IV y V indicamos los resultados que hemos obtenido con nuestra técnica de desintegración celular, al controlar microscópicamente los homogeneizados celulares, "brutos" y "filtrados", respectivamente de hojas de acelga, tomatera y rábano. Los valores que damos en micras cúbicas corresponden a núcleos celulares, cloroplastos íntegros, mitocondrias y granos cloroplastidiales, todos dentro del poder resolutivo del microscopio ordinario.

TABLA III

Cloroplastos

| Hojas de acelga | | Hojas de tomatera | | Hojas de rábano | |
|-------------------------------|--------|-------------------------------|-------|-------------------------------|-------|
| Volúmenes de los cloroplastos | % | Volúmenes de los cloroplastos | % | Volúmenes de los cloroplastos | % |
| 2,14 μ^3 | 4,48 | 2,14 μ^3 | 9 | 2,14 μ^3 | 5,5 |
| 7,24 " | 11,78 | 7,24 " | 12,6 | 7,24 " | 7,0 |
| 17,16 " | 22,52 | 17,16 " | 34,4 | 17,16 " | 23,4 |
| 33,51 " | 23,05 | 33,51 " | 24,4 | 33,51 " | 23,8 |
| 57,91 " | 26,59 | 57,91 " | 18,2 | 57,91 " | 25,4 |
| 67,56 " | 7,20 | 67,56 " | 1,4 | 91,95 " | 10,2 |
| 77,21 " | 4,38 | | | 137,26 " | 4,7 |
| | 100,00 | | 100,0 | | 100,0 |

Los volúmenes de los cloroplastos han sido determinados con ayuda del micrómetro ocular, y aplicando la fórmula matemática del volumen del esferoide: $4/3 \pi r^3$, en unos casos, o del ovoide: $4/3 \pi a b^2$, en otros, según la forma de aquéllos.

TABLA IV
Homogeneizado celular (bruto)

| Hojas de acelga | | Hojas de tomatera | | Hojas de rábano | |
|-------------------------------|-------|-------------------------------|-------|-------------------------------|-------|
| Volúmenes de los cloroplastos | % | Volúmenes de los cloroplastos | % | Volúmenes de los cloroplastos | % |
| 0,03 μ^3 | 52,5 | 0,03 μ^3 | 63,0 | 0,03 μ^3 | 63,6 |
| 0,27 " | 29,1 | 0,27 " | 20,4 | 0,27 " | 21,2 |
| 0,90 " | 5,1 | 0,90 " | 2,6 | 0,90 " | 2,7 |
| 2,14 " | 2,8 | 2,14 " | 6,0 | 2,14 " | 3,4 |
| 7,24 " | 2,6 | 7,24 " | 4,0 | 7,24 " | 3,4 |
| 17,16 " | 2,7 | 17,16 " | 2,6 | 17,16 " | 2,9 |
| 33,51 " | 3,6 | 33,51 " | 0,9 | 33,51 " | 1,8 |
| 57,91 " | 1,6 | 57,91 " | 0,5 | 57,91 " | 1,0 |
| | 100,0 | | 100,0 | | 100,0 |

TABLA V
Homogeneizado celular (filtrado)

| Hojas de acelga | | Hojas de tomatera | | Hojas de rábano | |
|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|
| Volúmenes de los orgánulos | % | Volúmenes de los orgánulos | % | Volúmenes de los orgánulos | % |
| 0,03 μ^3 | 76,1 | 0,03 μ^3 | 86,3 | 0,03 μ^3 | 93,6 |
| 0,27 " | 20,8 | 0,27 " | 12,3 | 0,27 " | 6,4 |
| 0,90 " | 3,1 | 0,90 " | 1,4 | | |
| | 100,0 | | 100,0 | | 100,0 |

Una visión de conjunto de estos resultados, demuestra que la estructura submicroscópica de los cloroplastos es más lábil en las de hojas de acelga (*Beta vulgaris* L.), cuya desintegración la hemos conseguido en las condiciones descritas, que los correspondientes a parénquimas foliares de tomatera (*Solanum lycopersicum* L.) y rábano (*Raphanus sativus* L.).

En las tablas VI, VII, VIII y IX consignamos los resultados de los análisis químicos correspondientes a las hojas de limonero, en las tres fases descritas, es decir, a árboles cloróticos sometidos a tratamiento de recuperación, y a otros fisiológicamente normales de la misma finca experimental.

Un estudio detenido de los valores hallados pone de manifiesto los hechos siguientes:

1.º) Los niveles de nitrógeno en las hojas cloróticas, son notablemente superiores a los de las hojas fisiológicamente normales.

2.º) Los valores de fósforo son ligeramente menores en la hoja clorótica, aunque la variación es de poca cuantía.

3.º) El potasio presenta valores superiores en las hojas fisiológicamente normales y en las recuperadas por tratamiento.

4.º) Los contenidos de calcio y hierro son superiores en la hoja normal, y aumentan conforme progresa el proceso curativo.

5.º) Los niveles de magnesio y manganeso son superiores en la hoja clorótica, y van disminuyendo a medida que aumenta el proceso curativo.

TABLA VI

Hojas de limonero deficientes en hierro

| Muestra | N % | P % | K % | Ca % | Mg % | Fe p.p.m. | Mn p.p.m. |
|----------------|------|------|------|------|------|--------------|--------------|
| 1 | 2,63 | 0,12 | 0,87 | 3,44 | 0,49 | 46 | 42 |
| 2 | 2,64 | 0,12 | 0,13 | 2,42 | 0,61 | 53 | 34 |
| 3 | 2,90 | 0,11 | 1,08 | 2,23 | 0,73 | 57 | 30 |
| 4 | 2,67 | 0,11 | 0,86 | 3,05 | 0,85 | 55 | 29 |
| 5 | 2,79 | 0,09 | 0,87 | 3,69 | 0,53 | 67 | 29 |
| 6 | 2,91 | 0,10 | 0,82 | 3,45 | 0,48 | 61 | 31 |
| 7 | 2,94 | 0,12 | 0,89 | 3,19 | 0,57 | 56 | 28 |
| 8 | 2,66 | 0,11 | 0,78 | 2,85 | 0,39 | 47 | 20 |
| 9 | 2,91 | 0,11 | 0,96 | 3,65 | 0,40 | 58 | 31 |
| 10 | 2,85 | 0,09 | 0,98 | 3,30 | 0,48 | 50 | 21 |
| Valor medio | 2,80 | 0,11 | 0,93 | 3,13 | 0,53 | 55 | 29 |

TABLA VII

Hojas de limonero recuperado-I

| Muestra | N % | P % | K % | Ca % | Mg % | Fe p.p.m. | Mn p.p.m |
|----------------|------|------|------|------|------|--------------|-------------|
| 1 | 2,10 | 0,08 | 1,30 | 2,17 | 0,50 | 46 | 11 |
| 2 | 3,34 | 0,09 | 1,07 | 3,36 | 0,63 | 95 | 29 |
| 3 | 2,10 | 0,10 | 1,24 | 1,66 | 0,23 | 80 | 19 |
| 4 | 2,06 | 0,08 | 1,30 | 2,59 | 0,23 | 96 | 12 |
| 5 | 2,54 | 0,09 | 1,53 | 2,38 | 0,34 | 54 | 10 |
| 6 | 2,24 | 0,10 | 1,48 | 2,76 | 0,33 | 77 | 12 |
| 7 | 2,41 | 0,10 | 1,45 | 2,98 | 0,56 | 72 | 11 |
| 8 | 2,29 | 0,08 | 1,31 | 3,40 | 0,43 | 104 | 21 |
| 9 | 2,31 | 0,10 | 1,24 | 3,44 | 0,47 | 91 | 28 |
| 10 | 2,11 | 0,08 | 1,46 | 2,30 | 0,45 | 81 | 15 |
| Valor medio | 2,35 | 0,09 | 1,34 | 2,70 | 0,42 | 80 | 17 |

TABLA VIII

Hojas de limonero recuperado - II

| Muestra | N % | P % | K % | Ca % | Mg % | Fe p.p.m. | Mn p.p.m |
|----------------|------|------|------|------|------|--------------|-------------|
| 1 | 2,21 | 0,07 | 0,92 | 2,86 | 0,28 | 82 | 13 |
| 2 | 2,53 | 0,12 | 1,71 | 2,94 | 0,34 | 67 | 13 |
| 3 | 2,40 | 0,06 | 1,38 | 2,86 | 0,34 | 83 | 14 |
| 4 | 2,64 | 0,11 | 1,34 | 3,89 | 0,46 | 77 | 16 |
| 5 | 2,72 | 0,12 | 1,10 | 3,83 | 0,45 | 75 | 11 |
| 6 | 2,69 | 0,10 | 0,98 | 3,59 | 0,33 | 88 | 21 |
| 7 | 2,77 | 0,14 | 1,58 | 3,57 | 0,41 | 55 | 17 |
| 8 | 2,68 | 0,13 | 1,14 | 4,32 | 0,53 | 99 | 20 |
| 9 | 2,51 | 0,12 | 1,51 | 3,99 | 0,25 | 95 | 16 |
| 10 | 2,35 | 0,13 | 1,51 | 3,91 | 0,43 | 102 | 21 |
| Valor medio | 2,55 | 0,12 | 1,31 | 3,57 | 0,38 | 82 | 16 |

TABLA IX

Hojas normales de limonero (tipo)

| Muestra | N % | P % | K % | Ca % | Mg % | Fe p.p.m. | Mn p.p.m. |
|----------------|------|------|------|------|------|--------------|--------------|
| 1 | 2,40 | 0,06 | 1,38 | 2,86 | 0,34 | 83 | 14 |
| 2 | 2,64 | 0,11 | 1,34 | 3,89 | 0,46 | 77 | 16 |
| 3 | 2,72 | 0,12 | 1,10 | 3,83 | 0,45 | 75 | 11 |
| 4 | 2,69 | 0,10 | 0,98 | 3,59 | 0,33 | 88 | 21 |
| 5 | 2,77 | 0,14 | 1,58 | 3,57 | 0,41 | 55 | 17 |
| 6 | 2,68 | 0,13 | 1,14 | 4,32 | 0,53 | 99 | 20 |
| 7 | 2,74 | 0,14 | 1,40 | 3,99 | 0,40 | 98 | 17 |
| 8 | 2,51 | 0,12 | 1,51 | 3,99 | 0,25 | 95 | 16 |
| 9 | 2,35 | 0,13 | 1,51 | 3,91 | 0,43 | 102 | 21 |
| 10 | 2,18 | 0,13 | 1,27 | 3,59 | 0,29 | 67 | 11 |
| Valor medio | 2,56 | 0,12 | 1,32 | 3,75 | 0,39 | 84 | 16 |

En la tabla X resumimos el estudio micrográfico realizado en hojas cloróticas deficientes en hierro, es decir, correspondientes a la primera fase. En ella podemos apreciar que la mayor frecuencia corresponde a la ausencia de formas cloroplastidiales desarrolladas; la frecuencia máxima corresponde a 8,19.

En la tabla XI ofrecemos los valores correspondientes a hojas fisiológicamente normales, que consideramos como tipo. Respecto del número, la frecuencia máxima corresponde a 10 cloroplastidios por célula, y el volumen a 13,72.

En la tabla XII indicamos los resultados alcanzados en la segunda fase de los árboles sometidos a tratamiento, comprobándose la evolución favorable de las dos magnitudes investigadas. En efecto, el valor más frecuente para el número de cloroplastidios es de 8, y de 13,65 micras cúbicas para el volumen, notablemente superiores a los encontrados en la hoja clorótica.

En la tabla XIII se representa el resultado final de la experiencia; el valor más probable para el número de cloroplastidios es de 8, y respecto del volumen, 13,60 micras cúbicas. Ello indica que en la fase segunda se habían restablecido prácticamente las condiciones necesarias para el desarrollo evolutivo de los cloroplastos.

Finalmente, las fotografías 3 y 2 muestran respectivamente los estados precursores de los cloroplastos en las células de los parénquimas foliares de limoneros deficientes en hierro; y los cloroplastos perfectamente formados en las de los fisiológicamente normales.

TABLA X
Hojas de limoneros deficientes en hierro

| Parénquima en empalizada | | | |
|---------------------------------------|----|-----------------------------|-------|
| Número de los cloroplastos por célula | % | Volumen de los cloroplastos | % |
| 0 | 48 | 3,05 μ^3 | 9,72 |
| 1 | 17 | 4,94 " | 17,54 |
| 2 | 15 | 8,19 " | 33,33 |
| 3 | 9 | 10,40 " | 18,38 |
| 4 | 6 | 13,65 " | 15,78 |
| 5 | 4 | 17,15 " | 2,63 |
| 6 | 1 | 30,54 " | 1,75 |
| — | — | 36,65 " | 0,87 |

TABLA XI
Hojas normales de limonero (tipo)

| Parénquima en empalizada | | | |
|---------------------------------------|----|-----------------------------|-------|
| Número de los cloroplastos por célula | % | Volumen de los cloroplastos | % |
| 5 | 3 | 4,65 μ^3 | 3,42 |
| 6 | 4 | 6,40 " | 7,11 |
| 7 | 8 | 8,16 " | 9,85 |
| 8 | 10 | 10,41 " | 10,50 |
| 9 | 16 | 13,72 " | 29,53 |
| 10 | 21 | 18,01 " | 21,00 |
| 11 | 14 | 26,22 " | 9,91 |
| 12 | 11 | 30,62 " | 7,26 |
| 13 | 6 | 48,87 " | 1,00 |
| 14 | 5 | 57,24 " | 0,42 |
| 15 | 2 | — | — |

TABLA XII
Hojas de limonero recuperado - I

| Parénquima en empalizada | | | |
|---------------------------------------|----|-----------------------------|-------|
| Número de los cloroplastos por célula | % | Volumen de los cloroplastos | % |
| 1 | 1 | 3,05 μ^3 | 0,23 |
| 2 | 3 | 4,91 " | 1,49 |
| 3 | 4 | 6,56 " | 5,99 |
| 4 | 7 | 8,74 " | 13,49 |
| 5 | 12 | 10,38 " | 13,94 |
| 6 | 15 | 13,65 " | 24,13 |
| 7 | 18 | 18,44 " | 20,08 |
| 8 | 21 | 25,55 " | 7,94 |
| 9 | 13 | 30,54 " | 5,99 |
| 10 | 4 | 36,65 " | 5,24 |
| 11 | 2 | 48,87 " | 1,34 |
| — | — | 57,24 " | 0,14 |

TABLA XIII
Hojas de limonero recuperado - II

| Parénquima en empalizada | | | |
|---------------------------------------|----|-----------------------------|-------|
| Número de los cloroplastos por célula | % | Volumen de los cloroplastos | % |
| 1 | 2 | 3,05 μ^3 | 0,20 |
| 2 | 4 | 5,24 " | 0,89 |
| 3 | 5 | 6,56 " | 2,68 |
| 4 | 7 | 8,74 " | 9,23 |
| 5 | 11 | 10,56 " | 10,73 |
| 6 | 13 | 13,60 " | 21,60 |
| 7 | 16 | 18,42 " | 19,37 |
| 8 | 17 | 24,04 " | 16,84 |
| 9 | 11 | 34,31 " | 14,45 |
| 10 | 10 | 38,29 " | 3,27 |
| 11 | 2 | 48,87 " | 0,74 |
| 12 | 1 | — | — |
| 13 | 1 | — | — |

Las experiencias efectuadas por nosotros sobre la corrección de la deficiencia de hierro en limoneros cloróticos, demuestran filogenéticamente que los cloroplastos de los parénquimas foliares, pasan por unas fases evolutivas, en las primeras de las cuales presentan estructuras rudimentarias precursoras, que son similares a los orgánulos fotosintéticos y cloroplastos de las plantas inferiores (figura 4).

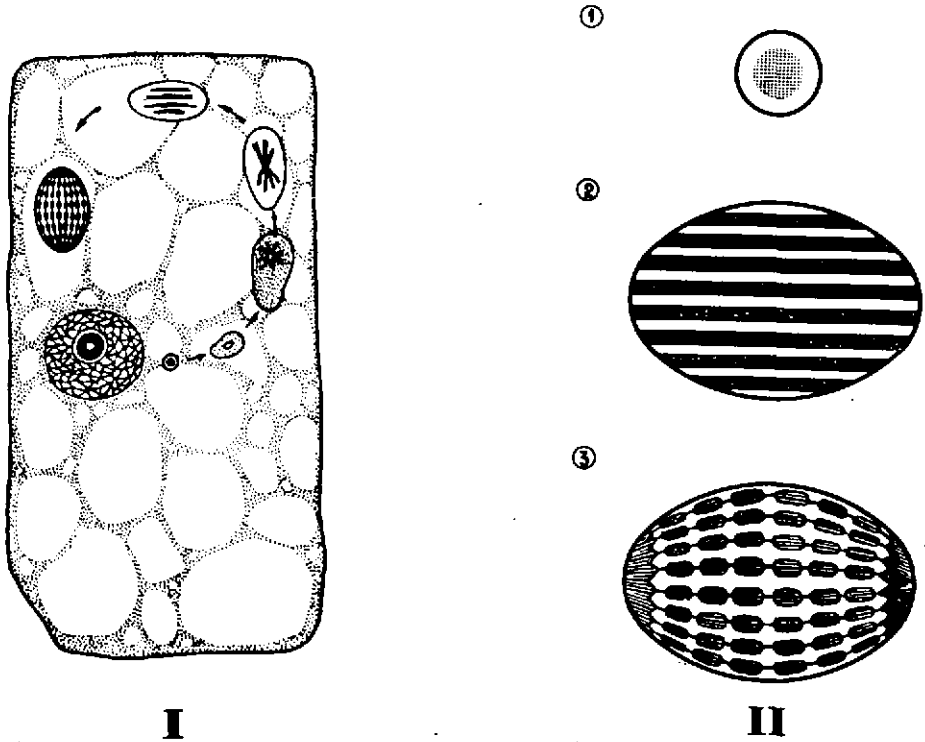


Figura 4

Representación esquemática de los estados evolutivos cloroplastidiales:

I.—Desarrollo de un cloroplasto: proplasto, iniciación de las laminillas plastidiales, formación de la cloroplastina en las láminas cloroplastidiales y cloroplasto totalmente desarrollado, con los granos.

II.—Cromatóforo (1); cloroplasto de algas con la característica estructura laminar (2), y cloroplasto granular en plantas superiores (3).

La naturaleza de aquellas formas precursoras (condriosomas plastidógenos, primordios o proplastos), es un tema muy debatido por distintos investigadores, como Guilliermond (21), Strugger (22), Muhlthaler (23), Wettstein (24) y Leyon (25). Pero es muy importante resaltar, a este res-

pecto, que el estado granular de la estructura microscópica de los cloroplastos de las plantas superiores, sólo llega a definirse claramente durante el proceso de la pigmentación clorofílica, tal como hemos comprobado micrográficamente en este estudio, debido a la formación del complejo clorofilo-lipoproteico o cloroplastina.

III

OBTENCION E IDENTIFICACION DE LA CLOROPLASTINA

En los granos cloroplastidiales, el complejo molecular formado por proteínas, lípidos y clorofilas, que desarrollan una actividad pigmentaria muy específica en la fotosíntesis, ha recibido distintos nombres. Mestre (26) le ha denominado compuesto complejo de filoclorina, y Stoll (27), elemento simplejo de cloroplastina; pero este último investigador ha hecho suya la nomenclatura de Willstätter y Rohdewald (28). Más tarde Stoll y Wiedman (29) consiguieron obtener este complejo clorofilo-lipoproteico en estado de cierta pureza, y lo designaron con el nombre de cloroplastina. Smith y Pickels (30), Smith (31) y Takashima (32) han determinado su peso molecular, pero los valores obtenidos son tan dispares que Krasnovski y Brin (33), y Wolken y Schwertz (34), ponen en duda el grado de pureza de la cloroplastina obtenida para estas determinaciones, posiblemente contaminada por otras proteínas cloroplastidiales o sustancias extrañas.

En extractos de cloroplastos de hojas de espinaca, preparados con disolución acuosa de digitonina, Nieman y Vennessland (35) (36), Bishop, Nakamura, Blat y Vennessland (37), y Nieman, Nakamura y Vennessland (38), han estudiado la actividad de la fotooxidasa del citocromo C. Posteriormente, Ardau y Vennessland (39) han logrado fraccionar esta fotooxidasa en dos componentes, factor 1 y factor 2, ambos necesarios para la actividad enzimática. Pero es interesante poner de manifiesto que cuando estos últimos investigadores adicionan cuidadosamente alcohol etílico a los extractos cloroplastidiales, previa filtración, les da un precipitado de color verde, que denominan factor 1 del citocromo C fotooxidasa. Como este componente es un complejo clorofilo-lipoproteico, lo han identificado como cloroplastina.

PARTE EXPERIMENTAL

1.—Material y métodos

A) *Experiencias preliminares*

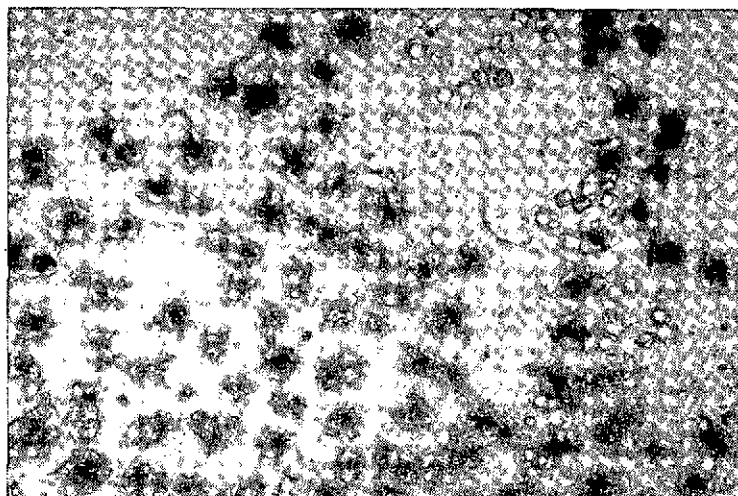
En los ensayos preliminares que hemos efectuado para la obtención de la cloroplastina en estado cristalino, creímos conveniente seguir el procedimiento descrito por Takashima (32), y posteriormente utilizado por otros investigadores como Shewattand y Evans (40), y Chiba y Noguchi (41), con el fin de adquirir una experiencia en esta ruta de trabajo que nos permitiese juzgar la técnica empleada.

El método de Takashima, aplicado por nosotros en homogeneizados foliares de distintas especies vegetales, como acelgas, rábanos, espinacas, perejil, naranjo, limonero, etc., es el siguiente:

Hojas frescas de acelgas: las trituramos cuidadosamente con arena de cuarzo, añadiendo gradualmente cinco volúmenes de disolución tampón de fosfatos M/50 ph 7. La mezcla la centrifugamos a 2.500 r.p.m. durante 20 minutos, y el líquido sobrenadante lo filtramos a través de papel de filtro corriente. En el filtrado opalescente y de color verde, observamos micrográficamente la presencia de granos cloroplastidiales en suspensión. A este líquido, añadimos alfa-picolina bajo agitación magnética, hasta conseguir una disolución de la misma al 55 %. La mezcla de granos y disolvente perdió inmediatamente su opalescencia inicial, dando lugar a una disolución clara, en la cual no pudimos detectar granos cloroplastidiales bajo el control microscópico.

La disolución la dializamos entonces durante 24 horas, frente a una disolución acuosa de alfa-picolina al 55 %, durante cuyo tiempo aparecieron cristales de carotenoides, que eliminamos por filtración. Al filtrado añadimos dioxano, hasta formar una disolución con una concentración del 20 % de este último. Mantuvimos la mezcla en frigorífico a 0° C, y al cabo de 6 días aparecieron cristales verde-oscuros. El conglomerado cristalino lo separamos por centrifugación, y lo disolvimos en disolución de alfa-picolina al 55 %, en tampón fosfato de pH 7. La disolución la filtramos a través de papel de filtro, y al filtrado añadimos dioxano hasta conseguir una disolución al 20 %, que colocamos seguidamente en nevera. La cloro-filo-lipoproteína recristalizó en la forma que exponemos en la fotografía 8.

Si se tiene en cuenta que la cloroplastina se halla confinada en los granos cloroplastidiales (figuras 1 y 3), hemos deducido que al utilizar como material biológico granos cloroplastidiales exclusivamente, obtendríamos cristales de cloroplastina de alta pureza.



Fotografía 8

Cristales de cloroplastina de hojas de acelga obtenidos por el método de Takashima (x 100).

Después de algunas tentativas previas en este sentido, y por medio de centrifugaciones fraccionadas a partir de homogeneizados celulares brutos, pudimos conseguir granos cloroplastidiales de notable pureza.

Con este material granular, no sólo hemos obtenido cloroplastina muy pura, sino también una economía de reactivos y reducción extraordinaria del tiempo de cristalización.

Conseguida, a nuestro juicio, una notable mejora del procedimiento de Takashima, tratamos de comprobar en una segunda fase experimental, si los reactivos utilizados por dicho investigador eran los más idóneos, o si por el contrario podíamos sustituirlos por otros que, por su acción, facilidad de adquisición y economía, presentaran mayores ventajas.

De los distintos disolventes específicos ensayados, sólo la piridina, de acción análoga a la alfa-picolina, nos dio resultados satisfactorios.

También hemos experimentado distintos detergentes orgánicos, como indican Wolken y Schwertz (34), Wolken y Mellon (42), Smith (31), Ke (43) y Eversole y Wolken (44), para la obtención de la cloroplastina; pero los resultados obtenidos no fueron convincentes.

Con todos los datos obtenidos en estas experiencias preliminares, pudimos llevar a feliz término la técnica operatoria para la obtención de cloroplastina, que exponemos a continuación.

B) *Método que proponemos para la obtención de cloroplastina de alta pureza*

Hojas frescas de acelgas, a las que eliminamos previamente los nervios principales, las sometimos en el laboratorio a un primer lavado con agua corriente, para separar la mayor parte de sustancias extrañas; después, las tratamos nuevamente con una disolución al 0,5 por 1.000 de neutronix (detergente no iónico), seguido de tres lavados con agua destilada. Finalmente, colocamos el material biológico entre hojas de papel de filtro, para eliminar el agua residual.

Los parénquimas foliares así preparados, los homogeneizamos con la ayuda de un aparato Multipimer. El homogeneizado obtenido lo pasamos a través de un tamiz de 250 mallas, que centrifugamos a 1.500 r.p.m., durante 2 minutos. Por último, filtramos la parte sobrenadante con papel Whatman n.º 1.

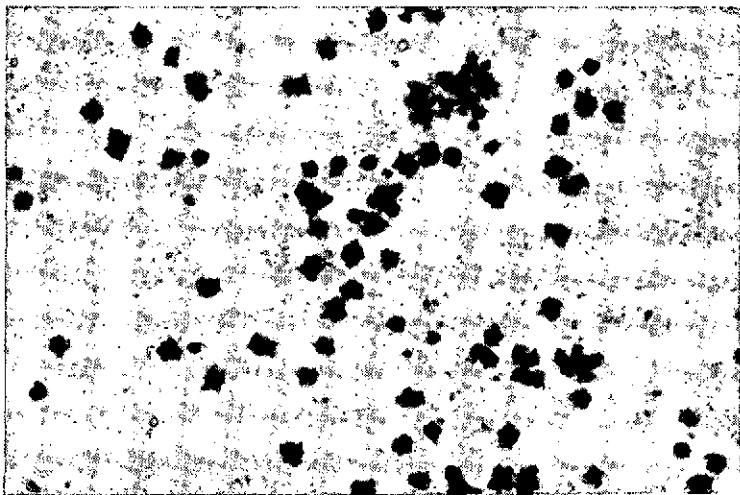
El filtrado opalescente y de color verde, constituido por una suspensión de granos cloroplastidiales en su mayor parte, como pudimos comprobar micrográficamente a 2.000 aumentos, lo centrifugamos a 3.000 r.p.m., durante 10 minutos. El depósito de granos obtenido, lo lavamos de nuevo con agua destilada. Esta operación la repetimos cuantas veces fue necesario, hasta conseguir un material granular de alta pureza bajo el control microscópico.

Al depósito de granos purificados, le adicionamos disolución de piridina al 55 %, lentamente y bajo agitación magnética. Durante esta operación, la suspensión de granos cloroplastidiales perdió su opalescencia y dio lugar a una disolución transparente de color verde, que dializamos durante 24 horas, frente a una disolución acuosa de piridina al 55 %, con un dializador provisto de papel de celofán como membrana semipermeable. Todos los carotenoides que aparecieron cristalizados en el fondo del dializador, una vez transcurrido este tiempo, los eliminamos por filtración a través de papel Whatman n.º 1.

A la disolución verde, dializada y filtrada, añadimos con agitación magnética dioxano, hasta conseguir una concentración del 20 % de este disolvente.

La disolución de cloroplastina, la colocamos en un frigorífico, a una temperatura de 0°. Al cabo de pocas horas, comprobamos micrográficamente la aparición de pequeños cristales aciculares de color verde (foto-

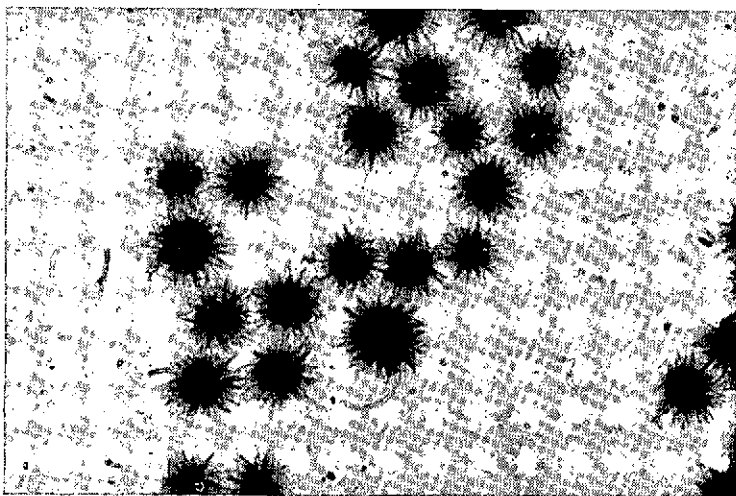
grafía 9), los cuales adquirieron los mayores tamaños a las 72 horas de mantener la disolución en frío.



Fotografía 9

Formas iniciales de cristalización de cloroplastina de hojas de acelga, a partir de granos cloroplastidiales exclusivamente (x 100).

Los cristales de cloroplastina, los separamos por centrifugación de la disolución madre. Seguidamente, al conglomerado cristalino lo lavamos



Fotografía 10

Cristales de cloroplastina puros, obtenidos de hojas de acelgas, a partir de granos cloroplastidiales exclusivamente (x 450)

tres veces con agua bidestilada, y lo redisolvimos en piridina al 55 %. Por adición de dioxano, como se ha descrito anteriormente y reposo en el aparato de la disolución, obtuvimos cristales de alta pureza (fotografía 7).



C) *Identificación de la cloroplastina*

Los cristales de cloroplastina obtenidos tal como indicamos en el apartado anterior, se nos presentan microscópicamente como formas acicu-lares, verdes, totalmente insolubles en el agua y en disoluciones salinas inorgánicas. En cambio, se nos disolvieron perfectamente en disoluciones acuosas de piridina al 50 %, y alfa-picolina a la misma concentración, y también en disoluciones acuosas de detergentes orgánicos, incluso a pequeña concentración.

Frente a disolventes orgánicos como alcohol etílico, acetona, alcohol metílico y éter etílico, nos originaron disoluciones verdes con precipitados incoloros. El precipitado, una vez centrifugado, lavado con agua destilada y tratado con disolución de hidróxido sódico al 10 %, nos dio reacciones positivas frente al reactivo de Millon (color rojo), Folin-Ciocalteau (azul), reacción xantoproteica (amarillo-anaranjado) y biuret (rosa) —Calvery (45), Herriot (46) y Kirk (47)—, por lo que deducimos su naturaleza proteica.

En la disolución verde sobrenadante, comprobamos espectrofotométricamente unos máximos de absorción de 340, 440 y 680 $m\mu$ que coinciden exactamente con los correspondientes a la clorofila (gráfica 1).

Por último, tratamos cristales de cloroplastina con el reactivo de Bloor (mezcla de alcohol etílico-éter etílico 3 : 1). Sobre el residuo obtenido después de la evaporación del disolvente, identificamos la fracción lipídica con Rhodamina B al 0,05 %, en disolución alcohólica —Wagner (48)—, y con azul de bromotimol —Jatzkewitz (49)—.

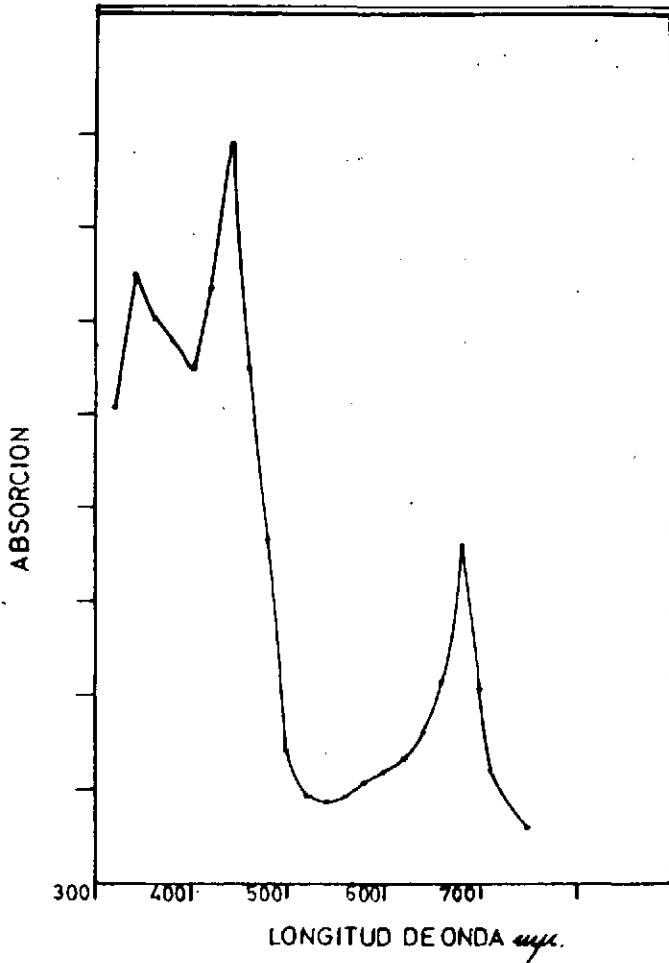
2.—*Resultados*

Hemos aplicado la técnica de Takashima para la obtención de cloroplastina en homogeneizados foliares de las distintas especies vegetales anteriormente consignadas. En todos los casos, logramos cristales de cloroplastina; pero el método de aquel investigador, reúne a nuestro juicio los inconvenientes siguientes:

1.º) La cloroplastina cristalizada que hemos obtenido es muy impura (fotografía 8).

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA
BIBLIOTECA





Gráfica 1

Espectro de absorción del extracto etéreo de la cloroplastina de hojas de acelga.

2.º) Nos ha sido preciso utilizar en los homogeneizados vegetales grandes cantidades de alfa-picolina y dioxano, para alcanzar las concentraciones de cloroplastina necesarias para su cristalización.

3.º) El proceso de cristalización nos ha parecido muy lento.

Los resultados obtenidos por nosotros al aplicar detergentes orgánicos, como preconizan Wolken y Schwertz (34) y otros autores ya citados, en la extracción de la cloroplastina y su correspondiente cristalización, a partir de homogeneizados foliares de distintas especies vegetales, no fueron sa-

tisfactorios debido a la serie de dificultades que se nos presentaron para la eliminación de las sustancias extrañas.

La técnica operatoria que hemos propuesto, inspirada en la de Takashima, a partir de granos cloroplastidiales exclusivamente, con piridina como disolvente, nos ha permitido obtener una cloroplastina cristalizada de alto grado de pureza (fotografía 9), con reducción extraordinaria del tiempo de cristalización y economía de reactivos.

IV

ESTUDIO ELECTROFORETICO DE LA CLOROPLASTINA

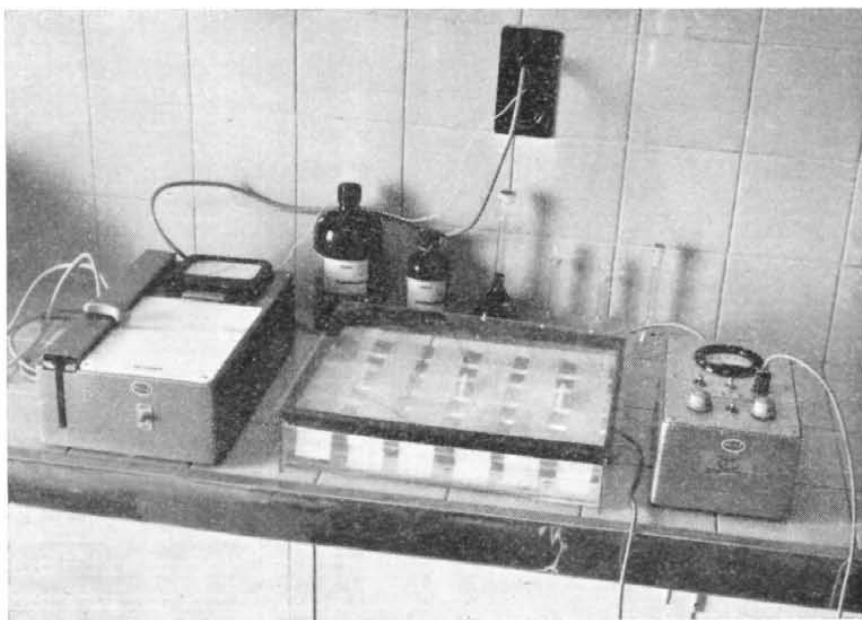
El presente estudio electroforético está inspirado en las propiedades que poseen la α -piridina, digitonina y detergentes de síntesis orgánica, en disolución acuosa, de solubilizar la cloroplastina cuando actúan directamente como agentes extractantes sobre los cloroplastos.

PARTE EXPERIMENTAL

1.—Material y métodos

A) Equipo electroforético

Para los corrimientos electroforéticos, hemos utilizado fundamentalmente un equipo EEL, de la casa Evans Electroselenium Limited, constituido por tres unidades: fuente de corriente, cubeta y lector (fotografía 11).



Fotografía 11
Equipo EEL para electroforesis sobre papel.

El papel que hemos empleado ha sido Whatman n.º 1 (0,15 mm. de espesor, 85 grs./m²), de 4 centímetros de ancho por 32 centímetros de longitud, con el cual hemos obtenido buenos resultados. También utilizamos el papel Schleicher & Schull n.º 2.043 a (0,16 mm. de espesor, 90 grs./m²), de características muy parecidas al anterior. Con estos tipos de papel hemos logrado excelentes desplazamientos; además poseen la particularidad de adsorber una cantidad mínima de colorante, y por ello la decoloración de las interzonas las hemos efectuado muy fácilmente.

En los ensayos preliminares, empleamos diversas disoluciones amortiguadoras a base de KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, así como la de veronal-veronal sódico de pH 8,6, utilizada normalmente para el desdoblamiento electroforético de las proteínas en el suero humano. De todas ellas elegimos la constituida por una mezcla de 2,5 volúmenes de KH_2PO_4 0,07 M., 7,5 volúmenes de veronal-veronal sódico (preparada ésta a base de veronal sódico: 8,82 gramos acetato sódico: 4,68 gramos, ácido clorhídrico N/10 : 80,8 mililitros, y agua destilada en cantidad suficiente hasta completar 2.000 mililitros). Esta disolución presenta un pH 8,9, y una fuerza iónica de 0,045.

B) *Material biológico*

En esta parte experimental hemos utilizado independientemente homogeneizados foliares de acelga y limonero fisiológicamente normal, y clorótico por deficiencia de hierro. A parte de estos homogeneizados foliares le adicionamos piridina y Mirelán, hasta conseguir una disolución al 50 % de la primera, y 0,15 % del segundo. Los líquidos filtrados, de color verde intenso los dos primeros, y amarillo el último, sirvieron como material de prueba para el estudio electroforético.

Simultáneamente, hicimos una serie de preparaciones con estos mismos materiales biológicos, que observamos a 1.500 y 2.000 aumentos en un microscopio Leitz, provisto de un micrómetro ocular con escala subdividida, para detectar la presencia o ausencia de orgánulos cloroplastidiales.

También hemos utilizado cloroplastina aislada directamente de granos cloroplastidiales de hojas de acelga, según técnica propuesta por nosotros en el capítulo III para la identificación electroforética de la misma.

C) *Técnica operatoria*

Aunque en líneas generales la técnica operatoria en la electroforesis sobre papel, es la misma en todos los aparatos, el método seguido por nosotros ha sido el siguiente:

Las tiras de papel las pasamos rápidamente a través de la disolución tampón, y a continuación las depositamos sobre papel de filtro seco, para eliminar el exceso de disolución. De esta manera, las bandas solamente humedecidas nos facilitan posteriormente la aplicación de la muestra a estudiar. Esta la depositamos en sentido transversal, con ayuda de un portaobjetos esmerilado, que mojamos en el problema, el cual pasa íntegramente del portaobjetos al papel, una vez puestos ambos en contacto. Esta operación la realizamos con mucho cuidado, para que la muestra problema quede a un centímetro de los bordes del papel, y poder lograr una uniformidad en los desplazamientos de las sustancias a emigrar.

La cantidad de muestra que utilizamos en cada determinación es aproximadamente de unos 0,02 mililitros.

Las tiras de papel así preparadas, las colocamos en los soportes de la cubeta electroforética, introduciendo los extremos en el tampón contenido en los compartimentos exteriores.

Finalizada la electroforesis, las bandas de papel las retiramos del aparato y las desecamos en posición horizontal, para desnaturalizar y fijar las distintas fracciones proteicas.

Las bandas, una vez desecadas, las teñimos con azul de bromofenol al 0,1 %, en alcohol metílico saturado con cloruro mercuríco, según técnica de Kunkel y Tiselius (50), ligeramente modificada. Las tiras las introducimos en el baño del colorante mencionado, durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo, las sacamos de la disolución para someterlas a lavados con una disolución de ácido acético al 1 % durante 5-6 minutos seguidos; finalmente con agua destilada hasta obtener las fracciones proteicas perfectamente teñidas de azul y una perfecta blancura del resto del papel.

En el caso de lipoproteínas, hemos utilizado indistintamente el sudán negro B, preparado según Swahn (51), en disolución saturada de alcohol etílico al 60 %, y el sudán III, según Fasoli (52) y Kunkel y Slater (53), en disolución saturada de alcohol etílico al 50 %.

Los lavados para la extracción del exceso de colorante, los efectuamos con una disolución de alcohol etílico al 50 %.

Las tiras de papel teñidas, las secamos perfectamente entre papel de filtro, con la ayuda de un secador eléctrico.

Las lecturas de los distintos electroforegramas, las hemos realizado por fotometría directa, haciendo transparente el papel con salicilato de metilo para las proteínas, o glicerina en el caso de lípidos.

Es interesante hacer resaltar, según pudimos comprobar en ensayos previos, la gran influencia que ejerce la posición del material de prueba sobre el papel electroforético. En experiencias sucesivas, el material lo colocamos a 1,5, 3, 4,5 y 6 centímetros de distancia respecto del centro

del papel, y hacia cada uno de los electrodos. En todos los casos obtuvimos desplazamientos, pero las separaciones de las fracciones proteicas y pigmentarias fueron más perfectas cuando la muestra la colocamos a 6 centímetros del centro del papel, y en dirección al electrodo negativo (figura 5).

Idénticamente, pudimos comprobar con ensayos previos que el voltaje más conveniente era de 400-500 voltios, durante 60-90 minutos (figura 6).

En lo que respecta a la temperatura, no hemos observado efectos caloríficos elevados a temperaturas medias de 20° C.

2.—*Resultados*

En las figuras 7 y 8 exponemos la parte experimental correspondiente al desdoblamiento electroforético del homogeneizado celular filtrado de hojas de acelgas.

En la figura 7 (2), observamos la presencia de tres pigmentos amarillos que han emigrado perfectamente desde la zona de puesta, donde se han estabilizado los granos cloroplastidiales portadores del complejo clorofilolipoproteico o cloroplastina.

Nos parece lógico aceptar que los granos no sean transportados durante la electroforesis, por ser precisamente elementos figurados cloroplastidiales sin carga eléctrica. Únicamente podemos observar un pequeño desplazamiento desde la zona de puesta hacia el ánodo, posiblemente debido a un arrastre producido por los pigmentos amarillos y proteínas protoplásmicas, no reveladas en este proteinograma sin teñir.

El electroforegrama (1) semejante al anterior, se diferencia únicamente en que lo hemos teñido con azul de bromofenol, colorante típico de proteínas. En él observamos una zona azul intensa, perfectamente definida, que nos indica el punto preciso donde han emigrado las proteínas protoplásmicas del homogeneizado de hojas de acelgas. En la zona de puesta, observamos una segunda zona teñida, donde se hallan situados los granos cloroplastidiales con el pequeño desplazamiento, ya indicado en el electroforegrama (2).

Nos parece interesante poner de manifiesto que el no presentar esta segunda zona un color azul típico de las proteínas teñidas con azul de bromofenol, sino un color azul oscuro, es debido a la mezcla del verde de la clorofila de los granos, con el azul del reactivo. Entre ambas zonas, apreciamos un ligero "trailing" o cola de las proteínas protoplásmicas durante su desplazamiento y la ausencia de los pigmentos amarillos, que han sido disueltos y separados durante las manipulaciones de la tinción.

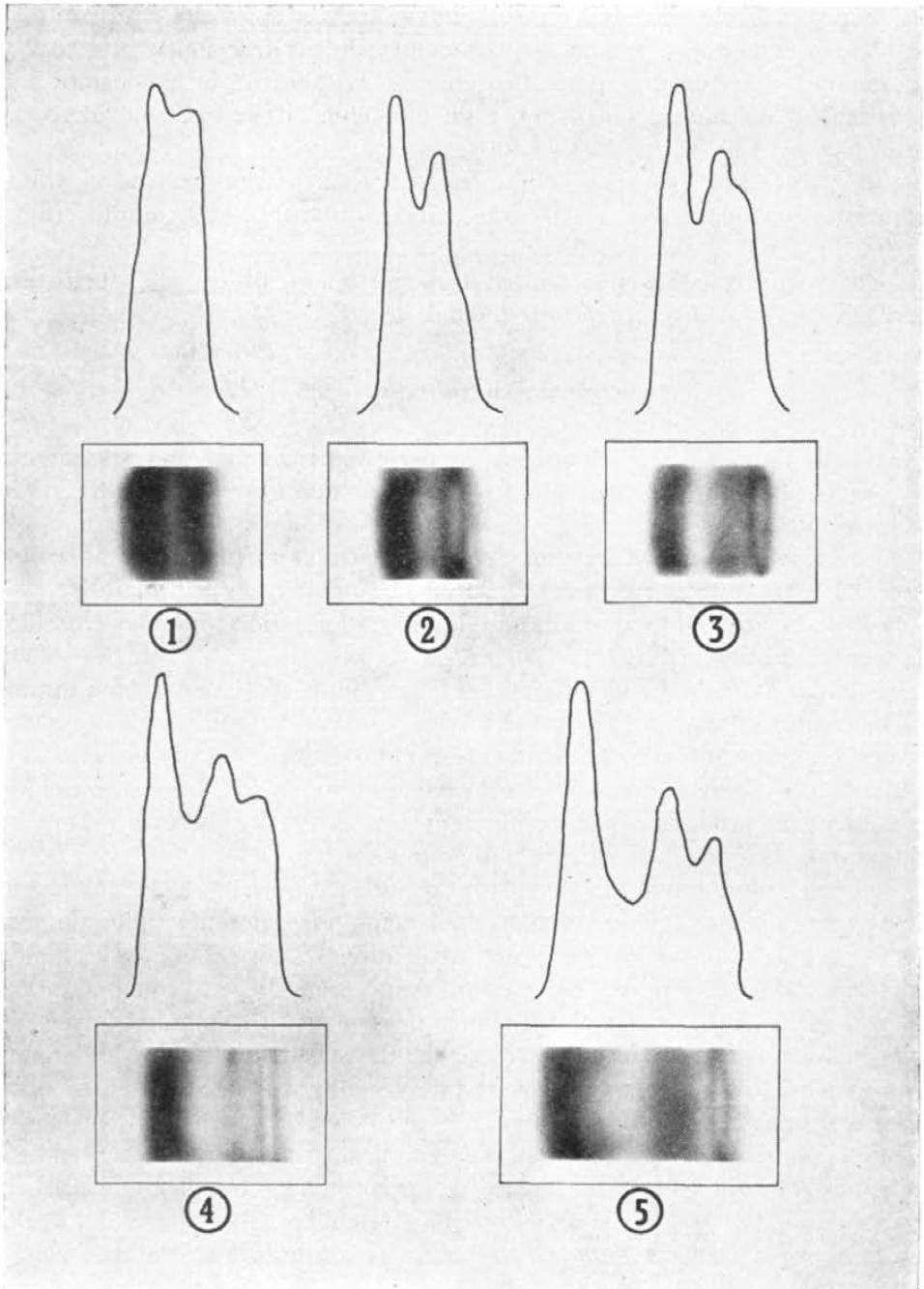


Figura 5

Gráficas y electroforegramas del desdoblamiento electroforético de homogeneizado celular filtrado de hojas de acelga, según la colocación de la muestra en el papel, respectivamente desde el centro hacia el polo negativo (cátodo) : 0 cm. (1), 1,5 cm. (2), 3 cm. (3), 4,5 cm. (4) y 6 cm. (5).

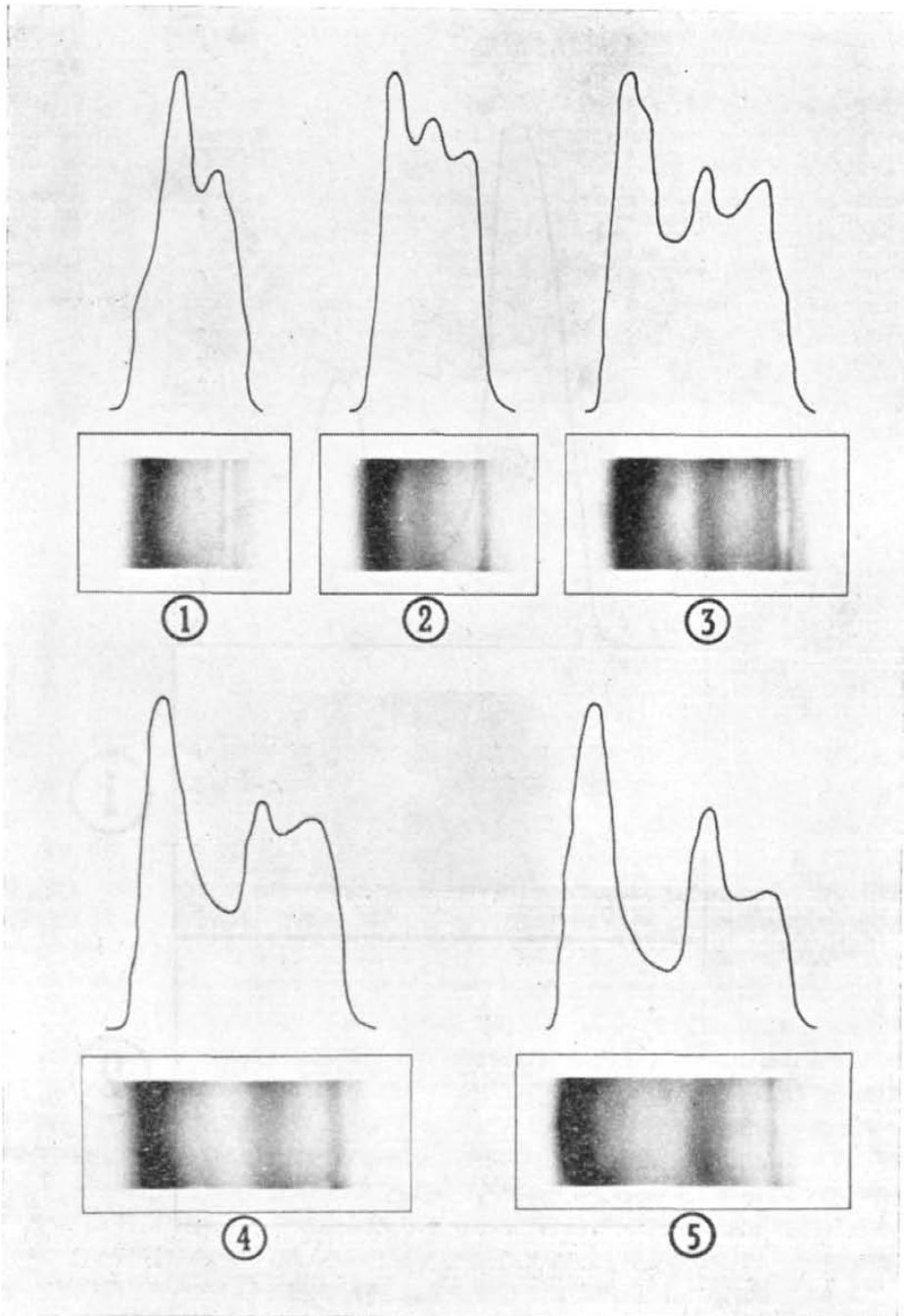


Figura 6

Gráficas y electroforegramas del desdoblamiento electroforético de homogeneizado celular filtrado de hojas de acelga, en función del tiempo empleado: 15 min. (1), 30 min. (2), 45 min. (3), 60 min. (4) y 90 min. (5).

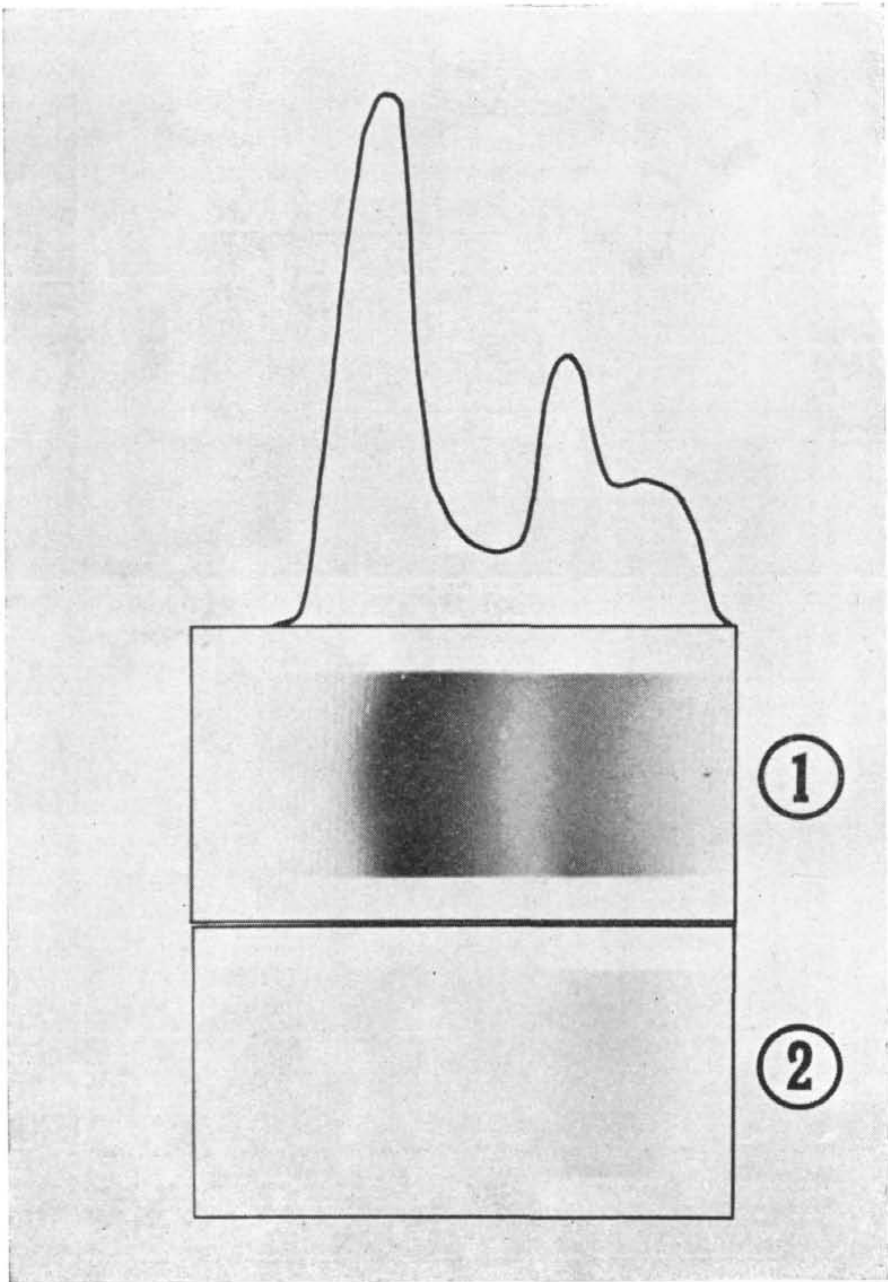


Figura 7

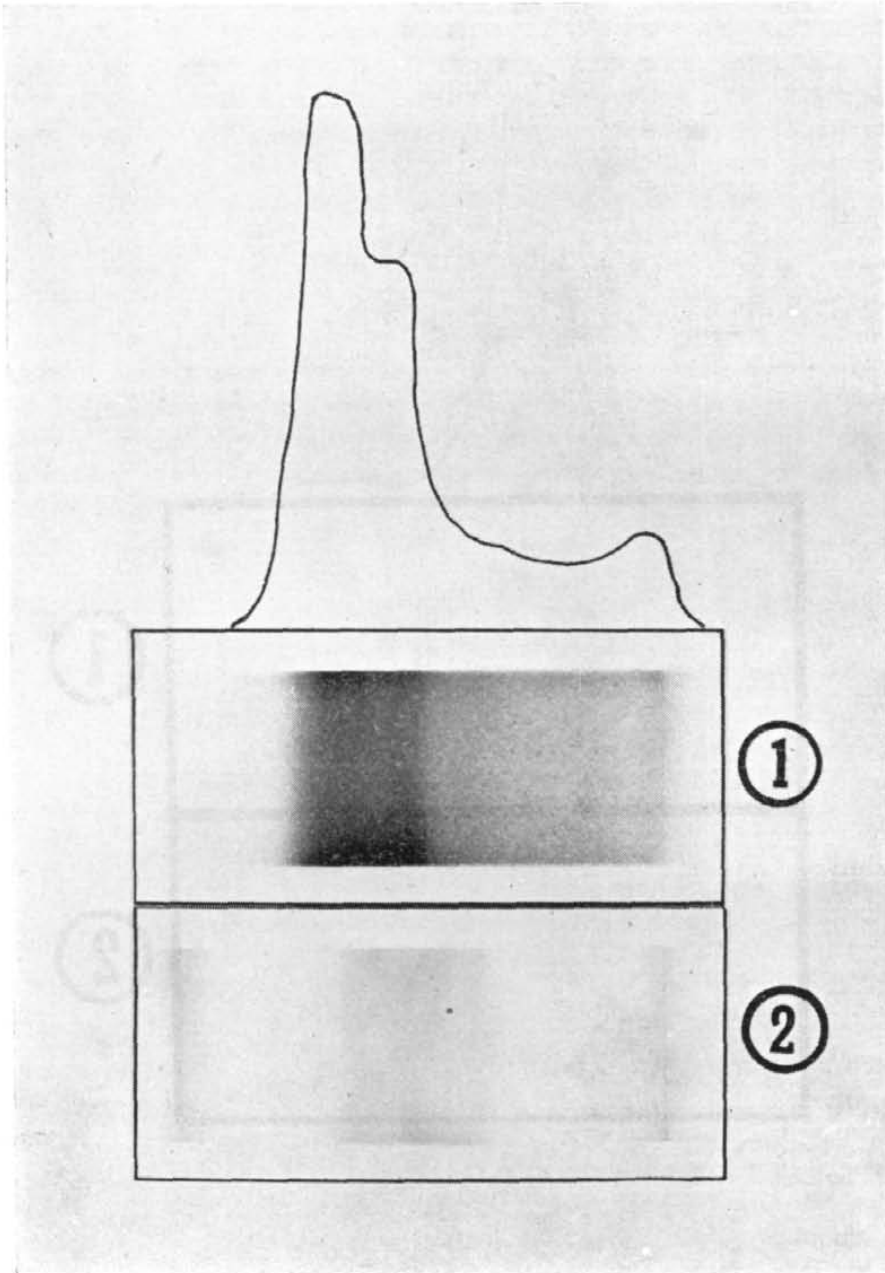


Figura 8

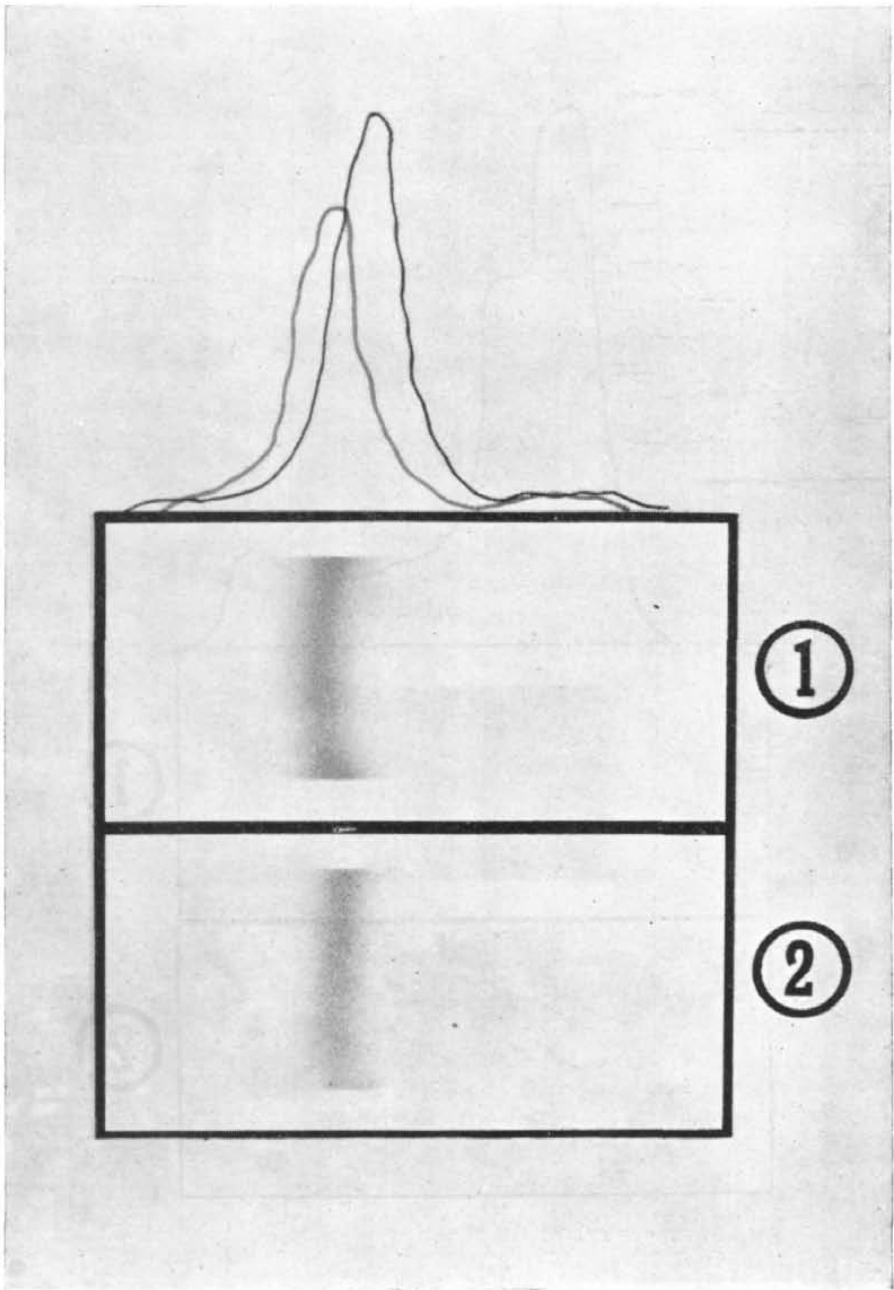


Figura 9

Del estudio de los electroforegramas (1) y (2), deducimos la existencia, en el homogeneizado filtrado de hojas de acelgas, de dos grupos principales de proteínas: las relacionadas con los pigmentos fotosintéticos en la estructura submicroscópica de los cloroplastos, de estructura compleja, y las restantes de los protoplasmas celulares de los parénquimas foliares, de constitución más sencilla.

Los resultados electroforéticos de la figura 8, complementan los anteriormente expuestos.

En el electroforegrama (2), observamos la presencia de los pigmentos amarillos en las mismas posiciones que ya indicamos en la figura 7 (2), junto con una banda verde que emigra desde la puesta. Como previamente hemos observado mediante preparaciones micrográficas la ausencia de formas granulares figuradas en el material de prueba, dicha zona verde nos detecta la situación electroforética de la cloroplastina.

El electroforegrama (1), idéntico al anterior, pero teñido con azul de bromofenol, nos revela la presencia de las proteínas protoplásmicas, seguida de la cloroplastina. Desde aquéllas, y hacia el punto de partida, también apreciamos el "trailing" o cola proteica, tal como nos ocurre en el electroforegrama (1) de la figura 7.

En la figura 9 (1), ponemos de manifiesto el desplazamiento efectuado por la cloroplastina cristalizada, disuelta en una disolución acuosa de piridina al 50 %.

En el electroforegrama (2) de esta misma figura, exponemos el desplazamiento de la cloroplastina, posteñida con sudán III.

Finalmente, en la figura 10 detallamos el estudio electroforético realizado respectivamente con homogeneizados de hojas de limonero fisiológicamente normal y deficiente en hierro : (1), migración electroforética, con los correspondientes proteinogramas que nos demuestran la presencia de granos cloroplastidiales en hojas de limonero fisiológicamente normal, y la ausencia de los mismos en los cloróticos por deficiencia aguda de hierro.

(2) y (3) nos identifican electroforéticamente la fracción lipoproteica en la cloroplastina de limonero fisiológicamente normal, y ausencia de esta última en las hojas de limonero clorótico; pero en las migraciones electroforéticas correspondientes a este último, apreciamos las fracciones lipoproteicas cloroplastidiales precursoras a la cloroplastina, teñidas con sudán III.

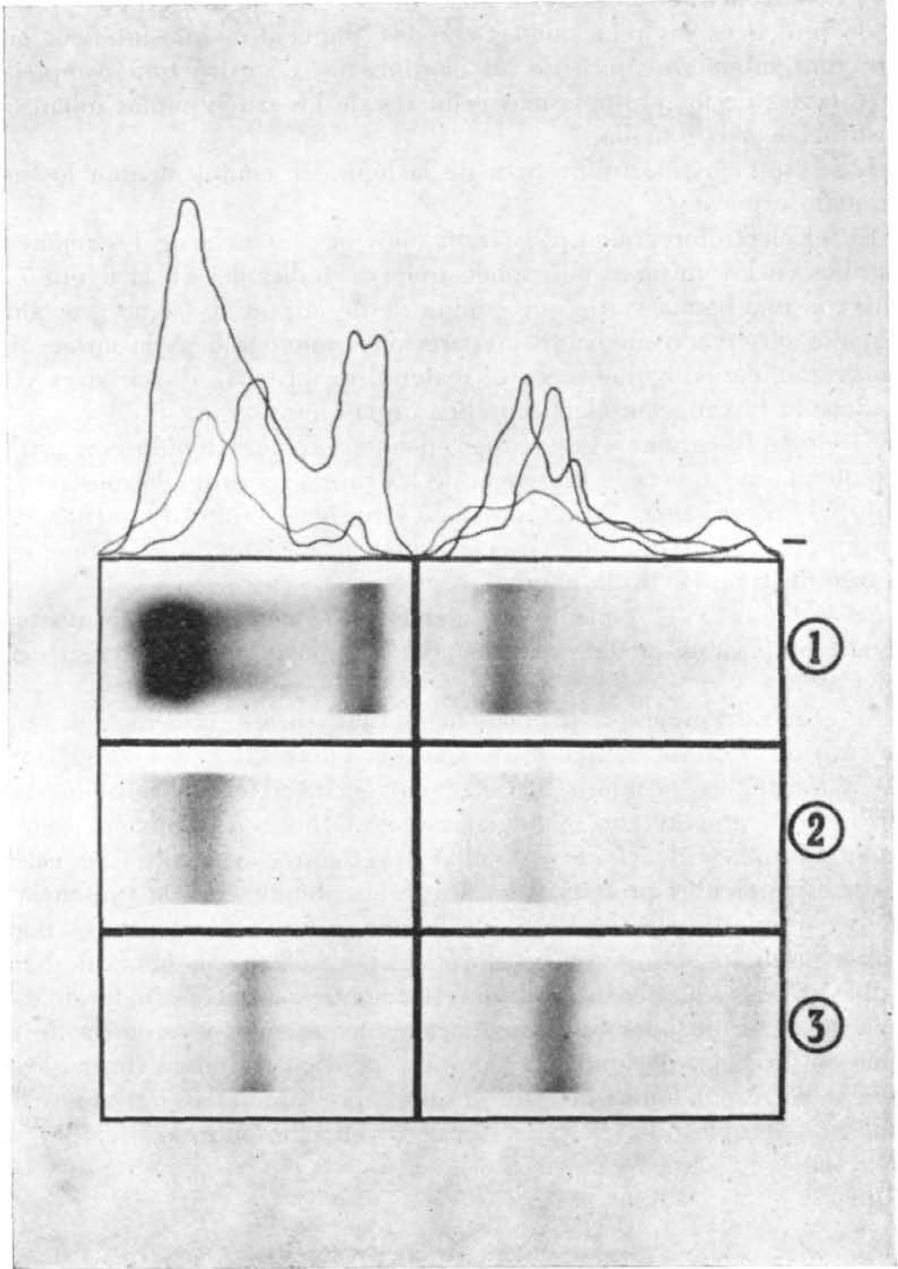


Figura 10

V

ESTUDIO CROMATOGRÁFICO DE LA CLOROPLASTINA

La cromatografía en capa fina puede considerarse como la última novedad dentro de las técnicas cromatográficas. Fue descubierta por Izmailov y Sharaiber (54), y aplicada por Stahl (55), (56), a quien se debe su verdadero desarrollo.

Por su gran precisión, selectividad y rapidez de ejecución, tiende a reemplazar a la cromatografía sobre papel.

Por nuestra parte, pretendemos aplicar la cromatografía en capa fina al estudio de la cloroplastina.

PARTE EXPERIMENTAL

1.—*Material y métodos*

A) *Equipo cromatográfico*

El equipo cromatográfico que hemos utilizado, construido por "Desaga", Heidelberg (Alemania), consta de los elementos siguientes: tanque cromatográfico, placas de vidrio, distribuidor de absorbente, soporte metálico almacenador, desecador, depositador de muestras, pipetas cromatográficas y aparato pulverizador (fotografía 12).



Fotografía 12

Equipo "Desaga" para cromatografía en capa fina

B) *Material biológico*

Como material biológico para la identificación de los pigmentos clorofilicos, hemos utilizado extractos etéreos de hojas de acelga, rábano y limonero fisiológicamente normal y clorótico por deficiencia de hierro, así como de cloroplastina de acelga en distinto estado de purificación.

En la identificación de aminoácidos, hemos empleado hidrolizados de granos cloroplastidiales, aislados y purificados de hojas de acelga y de su correspondiente cloroplastina.

Para preparar los hidrolizados respectivos, hemos utilizado ácido clorhídrico 6 N, en la proporción de diez veces el peso de material biológico a investigar; calentamos la mezcla a 100-110° C durante 24 horas, en ampollas de vidrio cerradas a la llama. Después de este tratamiento, eliminamos el exceso de ácido por evaporación en desecador. Finalmente, el residuo obtenido lo disolvimos en un pequeño volumen de ácido clorhídrico N/10.

C) *Experiencias preliminares*

En esta parte experimental, hemos realizado una serie de ensayos previos con distintos adsorbentes, para seleccionar el más idóneo.

De todos ellos, hemos elegido por sus cualidades específicas el Silicagel G Merck. Este adsorbente posee un grado granulométrico comprendido entre 5 y 25 μ , que nos ha permitido la obtención de capas regulares, de apariencia fina, de 0,2 a 0,3 milímetros de espesor.

La notable selectividad que nos ha demostrado frente a los compuestos orgánicos oxigenados, puede explicarse, según McDonald (56), por un mecanismo de adsorción que lleva implicado la formación de enlaces, con puente de hidrógeno entre el ácido silícico y el compuesto adsorbido.

Por otra parte, hemos ensayado también distintos disolventes para determinar cuáles nos daban los mejores resultados.

Estos ensayos previos los hemos efectuado con arreglo a la microtécnica circular de Stahl (57).

Para el desdoblamiento de los pigmentos fotosintéticos procedentes de homogeneizados celulares y cloroplastina pura, hemos fijado la mezcla tolueno/etanol (8 : 1). En la identificación de aminoácidos, previa hidrólisis del producto correspondiente, hemos obtenido resultados muy satisfactorios con las mezclas: fenol/agua (75 : 25), n-butanol/ácido acético/agua (60 : 20 : 20), y etanol/agua (63 : 37).

D) *Técnica operatoria*

Las placas de vidrio las recubrimos con una papilla semifluida de Silicagel G Merck, de 0,2 a 0,3 milímetros de espesor. Las dejamos reposar unos minutos a la temperatura ordinaria en posición horizontal, y las colocamos para su desecación y activación en estufa a 120-140° C, durante 30 minutos cuando estudiamos pigmentos fotosintéticos, y a 100-110° C, durante 15 minutos, en la identificación de aminoácidos.

Sobre las placas así preparadas, situamos a 2 centímetros de su base, las muestras problemas a 1,5 centímetros (ó a 2 centímetros según conviene) una de otra, y dejamos en blanco un espacio de 2 centímetros en los bordes laterales de la misma. El depósito lo efectuamos con micropipetas graduadas de 1 mm³.

Las placas cargadas con las muestras a investigar, las colocamos en el tanque cromatográfico, con una inclinación de 30°, en cuyo fondo depositamos previamente 100 mililitros de disolvente. La ascensión capilar de éste nos separa los constituyentes de la mezcla, habiéndonos sido suficiente una emigración de 10 centímetros en un espacio de tiempo de 45 minu-

tos, para los pigmentos fotosintéticos, y unas 3 horas en el caso de aminoácidos.

Para revelar los cromatogramas, desecamos las placas a 110° C, durante 10 minutos, y seguidamente las pulverizamos con los reactivos específicos, por el procedimiento de nebulización. En el caso concreto de aminoácidos, hemos utilizado disolución de ninhidrina, y una vez aplicada, desecamos las placas de nuevo a 100° C, durante 5 minutos, para activar la acción reveladora de aquel reactivo.

2.—Resultados

Los desdoblamientos pigmentarios, efectuados directamente sobre el material foliar de las distintas especies vegetales ensayadas, muestran la presencia de diversos pigmentos amarillos, verdes y anaranjados. Sin embargo, creemos de interés destacar que los desdoblamientos efectuados con extractos etéreos de cloroplastina de acelga, en distintos estados de purificación, según el método propuesto por nosotros, demuestran perfectamente el grado de pureza de aquélla, por la disminución y ausencia final de pigmentos carotenoides.

En lo que respecta a los pigmentos clorofílicos, también podemos observar que en todos los ensayos aparecen dos pigmentos: uno verde azulado, y otro verde amarillento en menor proporción, que corresponden respectivamente a las clorofilas *a* y *b*, como comprobamos espectrofotométricamente, previa elución con éter.

Los valores R_f , determinados por nosotros para las clorofilas, han sido: 0,30 y 0,34 para la *a* y *b*, respectivamente.

Una visión de conjunto de todos estos resultados, nos indica que en la composición de la cloroplastina intervienen las clorofilas *a* y *b*, de forma similar a como se encuentran en las estructuras granulares de los cloroplastos.

En las tablas XIV, XV y XVI especificamos los resultados obtenidos en nuestras investigaciones sobre identificación cromatográfica de aminoácidos en granos cloroplastidiales y cloroplastina.

TABLA XIV

Disolvente: fenol/agua (75 : 25)

| Aminoácidos ensayados | Valores Rf | Aminoácidos hallados en el hidrolizado de granos cloroplastidiales y cloroplastina de acelgas |
|-------------------------------|------------|---|
| 1.—Mezcla. | | |
| 2.—Leucina | 0,53 | Posibles { Leucina Metionina Isoleucina |
| 3.—Metionina | 0,51 | |
| 4.—Isoleucina | 0,50 | |
| 5.—Tirosina | 0,45 | Tisorina |
| 6.—Histidina | 0,32 | |
| 7.—Alanina | 0,30 | Alanina |
| 8.—Arginina | 0,24 | Arginina |
| 9.—Glicocola | 0,25 | Glicocola |
| 10.—Acido aspártico | 0,17 | |
| 11.—Acido glutámico | 0,15 | Acido glutámico |

TABLA XV

Disolvente: butano/ácido acético/agua (60 : 20 : 20)

| Aminoácidos ensayados | Valores Rf | Aminoácidos hallados en el hidrolizado de granos cloroplastidiales y cloroplastina de acelgas |
|------------------------------|------------|---|
| 1.—Mezcla. | | |
| 2.—Leucina | 0,54 | Posibles { Leucina Isoleucina Tirosina |
| 3.—Isoleucina | 0,50 | |
| 4.—Tirosina | 0,50 | |
| 5.—Metionina | 0,47 | Metionina |
| 6.—Acido glutámico | 0,40 | Acido glutámico |
| 7.—Alanina | 0,33 | Alanina |
| 8.—Glicocola | 0,29 | Glicocola |
| 9.—Acido aspártico | 0,29 | |
| 10.—Arginina | 0,19 | Arginina |
| 11.—Histidina | 0,15 | Histidina |



TABLA XVI

Disolvente: etanol/agua (63 : 37)

| Aminoácidos ensayados | Valores Rf | Aminoácidos hallados en el hidrolizado de granos cloroplastidiales y cloroplastina de acelgas |
|------------------------------|------------|---|
| 1.—Mezcla. | | |
| 2.—Tirosina | 0,80 | Tirosina |
| 3.—Leucina | 0,75 | Posibles { |
| 4.—Metionina | 0,73 | |
| 5.—Isoleucina | 0,73 | Metionina |
| 6.—Alanina | 0,65 | |
| 7.—Acido glutámico | 0,65 | Posibles { |
| 8.—Acido aspártico | 0,64 | |
| 9.—Glicocola | 0,63 | A. glutámico |
| 10.—Arginina | 0,20 | Glicocola |
| 11.—Histidina | 0,47 | Arginina |
| | | Histidina |

Hemos logrado demostrar la naturaleza proteica de estos constituyentes cloroplastidiales al identificar en los correspondientes hidrolizados la presencia de tirosina, metionina, alanina, glicocola, arginina, histidina, ácido glutámico, y como posibles, leucina e isoleucina.

VI

TECNICAS EMPLEADAS PARA EL ANALISIS VEGETAL Y DE SUELOS

I.—Análisis foliar

A) *Toma de muestras*

Las muestras de hojas se tomaron con arreglo a las normas dadas por Carpena, Abrisqueta, Sánchez y Guillén (58).

B) *Preparación de la muestra*

Las muestras recogidas en el campo, se sometieron lo más rápidamente posible a un primer lavado con agua corriente; después se lavaron con una disolución al 0,05 % de un detergente no iónico en agua destilada, y por último recibieron dos lavados más con agua bidestilada. A continuación se sometieron a un desecado previo a 60-70° C durante cuatro horas. Finalmente se pulverizaron en un triturador y se conservaron en pequeñas bolsas de plástico.

C) *Extracto de hojas*

Los extractos foliares se prepararon según técnica descrita por Carpena, Guillén y Costa (59).

D) *Nitrógeno total*

Se utilizó el procedimiento Kjeldhal, pero en escala semimicro, partiendo de 50 miligramos de material pulverizado y seco.

E) *Fósforo*

Se determinó mediante técnica espectrofotométrica de Kitson y Mellón (60).

F) *Potasio*

Se determinó por medio del fotómetro de llama utilizando extractos foliares a una dilución 1 : 100.

G) *Calcio y magnesio*

Ambas determinaciones se realizaron por valoración con complejo-na III 0,05 M. Primeramente se dosificó calcio + magnesio sobre 5 ml de extracto vegetal a pH 10, con negro de eriocromo T como indicador. El calcio se determinó sobre 2 ml de extracto, a pH 12, en presencia de murexida.

La diferencia entre las dos determinaciones nos dio los valores correspondientes al magnesio.

H) *Hierro*

Se empleó la técnica espectrofotométrica de Fortune y Mellon (61).

I) *Manganeso*

Se realizó mediante técnica espectrofotométrica de Boken (62).

J) *Clorofila*

Se determinó a partir de hojas frescas por trituración y extracción acetonica del pigmento y posterior lectura espectrofotométrica de la disolución verde obtenida a 700 m μ , según técnica de Schenk (63) y Petering, Wolman y Hibbard (64).

2.—Análisis de suelos

A) *Toma de muestras*

La muestra representativa de la zona estudiada se obtuvo mediante la reunión de 20 ó 30 submuestras recogidas en zig-zag sobre la superficie total del campo.

Los taladros se verificaron dentro de la zona de goteo del árbol y con orientaciones distintas respecto del tronco, según normas de Fitt y Nelson (65).

B) *Preparación de la muestra*

La muestra de suelo se dejó secar al aire, a la temperatura ambiente. Después, se desmenuzó y tamizó a través de una malla de 2 milímetros, para separar la grava de la tierra. De esta última, mediante el sistema de cuarteo, se obtuvo la muestra media sobre la que se realizaron todas las determinaciones.

C) *Extracto de suelo (percolación)*

a) Para la determinación de fósforo asimilable. Se agitaron durante 40 segundos, 5 gramos de suelo con 50 ml de reactivo de Bray y Kurtz (66), y a continuación se filtró sobre papel de filtro.

b) Para cationes asimilables (sodio, potasio, calcio y magnesio). Se colocaron en un tubo de percolación, 5 gramos de suelo y 100 ml de acetato amónico N pH 7,0. Después de 2 a 3 horas, se completó el volumen del percolado a 100 ml, con matraces aforados.

D) *Capacidad de cambio*

Se determinó mediante la técnica de Cecconi y Polesello (67).

E) *Medidas de pH*

Las medidas de pH en agua destilada y en cloruro potásico N, se realizaron sobre pasta saturada, con electrodo de vidrio en potenciómetro Beckman.

F) *Carbonatos totales*

Se utilizó el calcímetro Bernad. Las determinaciones se efectuaron midiendo el volumen de dióxido de carbono desprendido por acción del ácido clorhídrico sobre los carbonatos de la muestra.

G) *Carbonato cálcico activo*

Se utilizó el método de Galet (68).

H) *Materia orgánica*

Se determinó volumétricamente, según técnica de Walkley (69).

I) *Nitrógeno*

Se utilizó la misma técnica que en hojas pero en escala macro, partiendo de 1 gramo de suelo.

J) *Fósforo asimilable*

Se empleó la técnica espectrofotométrica indicada para hojas a partir de extracto de suelo obtenido por el método de Bray y Kurtz (66).

K) *Potasio, calcio y magnesio asimilables*

Las extracciones de estos tres elementos se realizaron percolando 5 gramos de suelo con 100 ml de acetato amónico a pH 7. El primero se determinó por fometría de llama en el anterior extracto convenientemente diluido y los dos restantes por valoración con complexona III, tal como queda indicado para extracto de hojas.

VII

CONCLUSIONES

1.^a Ponemos de manifiesto, con técnicas micrográficas originales, la estructura granular de los cloroplastos en células autótrofas de los parénquimas foliares de acelga y limonero.

2.^a Demostramos que la estructura molecular de los granos cloroplastidiales y de las membranas submicroscópicas de cada disco, es más lábil en las células de los parénquimas foliares de acelga (*Beta vulgaris* L.) que en los de tomatera (*Solanum lycopersicum* L.), rábano (*Rhaphanus sativus* L.) y limonero (*Citrus limonum* R.).

3.^a Confirmamos filogenéticamente que los cloroplastos granulares de las plantas superiores pasan por una serie de fases evolutivas, en las primeras de las cuales tienen una estructura microscópica similar a la de los cloroplastos de las plantas inferiores.

4.^a Demostramos paralelamente con la corrección de la deficiencia de hierro en limoneros cloróticos sometidos a tratamiento de recuperación, que se restablece la estructura granular de los cloroplastos en los parénquimas fotosintéticos, ya que se traduce en una normal morfología y tamaño cloroplastidial y de la composición química de las hojas, conforme avanza el proceso curativo.

5.^a Exponemos técnicas de disociación y desintegración celular, que permiten estudiar microscópica y electroforéticamente "in vivo" y micrográficamente "in situ", orgánulos protoplásmicos y sus distintas fracciones en homogeneizados vegetales.

6.^a Proponemos un método de obtención del complejo clorofilo-lipoproteico a partir de granos cloroplastidiales y piridina como extractante, que permite lograr cloroplastina cristalizada de alto grado de pureza, con reducción extraordinaria del tiempo de cristalización y economía de reactivos.

7.^a Hemos conseguido la desintegración de los cloroplastos de distintas especies vegetales, que nos ha permitido un corrido electroforético de los pigmentos fotosintéticos y de las lipoproteínas cloroplastidiales simultáneamente.

8.^a Confirmamos electroforéticamente la presencia de granos clorofilo-lipoproteicos en los cloroplastos de hojas de limonero fisiológicamente normales, y la ausencia de los mismos, como tales, en hojas de esta misma especie vegetal con deficiencia aguda de hierro.

9.^a Hemos comprobado electroforéticamente la selectividad disolvente de la piridina por el complejo clorofilo-lipoproteico o cloroplastina.

10.^a Damos cuenta de la separación electroforética de la cloroplastina aislada, mediante técnica original, de parénquimas foliares de distintas especies vegetales.

11.^a Identificamos en la cloroplastina la fracción lipoproteica, por medio de técnica electroforética de postinción.

12.^a Hemos aislado electroforéticamente las fracciones lipoproteicas precursoras a la cloroplastina, en hojas de limonero clorótico por deficiencia aguda de hierro.

13.^a Hemos aplicado la cromatografía en capa fina en el estudio de la cloroplastina, cuyos resultados demuestran que en la composición de aquel complejo clorofilo-lipoproteico, intervienen las clorofilas *a* y *b*, de forma similar a como se encuentran en las estructuras moleculares de los cloroplastos.

14.^a La cromatografía en capa fina nos ha permitido controlar el grado de pureza de la cloroplastina cristalizada, en el método de obtención de la misma propuesto por nosotros.

15.^a Hemos logrado demostrar por la técnica cromatográfica mencionada, la naturaleza proteica de los granos cloroplastidiales y de la cloro-

plastina, al identificar en los correspondientes hidrolizados la presencia de tirosina, metionina, alanina, glicocola, arginina, histidina, ácido glutámico, y como posibles, leucina e isoleucina.

16.^a Hemos estudiado con técnicas micrográficas, electroforéticas y cromatográficas, el desarrollo de cloroplastos en parénquimas foliares de limoneros fisiológicamente normales y deficientes en hierro.

17.^a Hemos confirmado las íntimas uniones complejas existentes entre las lipoproteínas cloroplastidiales y las clorofilas *a* y *b* que forman parte de la estructura molecular de los cloroplastos.

18.^a Demostramos que la naturaleza verdaderamente granular de la estructura microscópica de los cloroplastos superiores, sólo llega a definirse claramente durante el proceso de la formación, en los mismos, del complejo clorofilo-lipoproteína o cloroplastina.

VIII

BIBLIOGRAFIA

- (1) KUSTER, E. 1935 a. Die Pflanzenzelle. Jena.
- (2) GUILLIERMOND, A. 1930. Rev. gen. Bot., 42, 327.
- (3) HOFMEISTER, L. 1940. Z. wiss. Mikr., 57, 259.
- (4) HUBERT, B. 1935. Diss. Leiden.
- (5) HEITZ, E. 1932. Planta, 18, 616.
- (6) HEITZ, E. 1936. Ber. deut. botan. Ges., 54, 362.
- (7) FREY-WYSSLING, A. 1937 c. Protoplasma, 29, 279.
- (8) WEIER, E. 1938. Bot. Rev., 4, 497.
- (9) GEITLER, L. 1937. Planta, 26, 463.
- (10) MENKE, W. 1940. Naturwiss., 28, 158.
- (11) STRUGGER, S. 1951. Ber. deut. botan. Ges., 64, 69.
- (12) FREY-WYSSLING, A. y STEINMANN, E. 1953. Vierte Jahresschrift Naturf. Ges. Zürich, 98, 20.
- (13) WOLKEN, J. y PALADE, G. 1954. J. Gen. Physiol., 37, 111.
- (14) LEYON, H. y VON WETTSTEIN, D. 1954. Z. Naturforsch., 9b, 471.
- (15) VATTER, A. 1955. Thèse. Univ. of Illinois.
- (16) STEINMANN, E. y SJÖSTRAND, 1955. Exper. Cell. Res., 8, 15.
- (17) HODGE, A. J., McLEAN, J. D. y MERCER, F. V. 1955. J. Biophys. Biochem. Cyt., 1, 605.
- (18) LEYON, H. 1953. Exper. Cell. Res., 6, 497.
- (19) WOLKEN, J. J. y PALADE, G. E. 1953. Ann. N. Y. Acad. Sci., 56, 873.
- (20) LOUSTAU, J., ORTUÑO, A. y CARPENA, O. 1958. Anal. Edaf. XVII, 473.
- (21) GUILLIERMOND, A. 1920. C. R. Soc. Biol. 83, 408.
- (22) STRUGGER, S. 1950. Naturwiss., 37, 166.
- (23) MUHLETHALER, K. 1947. Naturwiss., 44, 204.
- (24) WETTSTEIN, D. VON 1957. Hereditas, 43, 303.
- (25) LEYON, H. 1954. Exper. Cell. Res., 7, 606.
- (26) MESTRE, H. 1930. Centr. Marine Biol. Stanford Univ. Press.
- (27) STOLL, A. 1936. Naturwiss., 24, 53.
- (28) WILLSTATTER, R. y ROHDEWALD, M. 1934. Hoppe Seyler's Z. physiol. chem., 225, 112.
- (29) STOLL, A. y WINDEMANN, E. 1941. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Basel, 125.
- (30) SMITH, E. L. y PICKELS, G. E. 1940. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 26, 242.

- (31) SMITH, E. L. 1941. *J. Gen. Physiol.*, 24, 753.
- (32) TAKASHIMA, S. 1952. *Nature*, 169, 182.
- (33) KRASNOVSKY, A. A. y BRIN, C. P. 1954. *Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R.* 95, 611.
- (34) WOLKEN, J. J. y SCWHERTZ, F. A. 1956. *Nature*, 177, 136.
- (35) NIEMAN, R. H. y VENNESLAND, B. 1957. *Science* 125, 353.
- (36) NIEMAN, R. H. y VENNESLAND, B. 1959. *Plant. Physiol.*, 34, 255.
- (37) BISHOP, N. I., NAKAMURA, J., BLAT y VENNESLAND, B. 1959. *Plant Physiol.*, 34, 551.
- (38) NIEMAN, R. H., NAKAMURA, H. y VENNESLAND, B. 1959. *Plant Physiol.* 34, 262.
- (39) ARDAO, C. y VENNESLAND, B. 1960. *Plant Physiol.*, 35, 268.
- (40) SHEWATTAND, H. S. A. y EVANS, W. C. 1954. *Nature*, 173, 540.
- (41) CHIBA, J. y NOGUCHI, I. 1954. *Cytologia*, 19, 41.
- (42) WOLKEN, J. J. y MELLON, A. D. 1957. *Biochim. Biophys. Acta.*, 25, 267.
- (43) KE, B. y CLENDENNING, K. A. 1956. *Biochim. Biophys. Acta*, 19, 74.
- (44) EVERSOLE, R. A. y WOLKEN, J. J. 1958. *Science*, 127, 1.287.
- (45) CALVERY, H. O. 1944. *Chemistry of the Amino Acids and Proteins*, 2.^a ed., cap. IV.
- (46) HERRIOT, R. M. 1947. *Advances in Protein Chem.*, 30, 413.
- (47) KIRK, P. L. 1947. *Advances in Protein Chem.*, 3, 139.
- (48) WAGNER, H., HORHAMMER, L. y WOLFF, P. 1961. *Biochem. Z.*, 334, 175.
- (49) JATZKEWITZ, H. y MEHL, E. 1960. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. chem.* 320, 251.
- (50) KUNKEL, H. y TISELIUS, A. 1951. *J. Gen. Physiol.*, 35, 89.
- (51) SWAHN, B. 1952. *J. Clin. Lab. Invest.*, 4, 98.
- (52) FASOLI, A. 1952. *Lancet*, 262, 106.
- (53) KUNKEL, H. G. y SLATER, J. R. 1952. *J. Clin. Lab. Invest.*, 31, 677.
- (54) IZMAILOV, N. A. y SHARAIBER, M. S. 1938. *Farmatsiya*, 3, 1.
- (55) STAHL, E. 1956. *Pharmazie*, 11, 633.
- (56) STAHL, E. 1961. *Pharmazie*, 73, 646.
- (57) STAHL, E. 1958. *Chemiker-Ztg.*, 82, 323.
- (58) CARPENA, O., ABRISQUETA, C., SANCHEZ, J. A. y GUILLEN, M. G. 1957. *Anal. Edaf.* XVI, 59.
- (59) CARPENA, O., GUILLEN, M. G., y COSTA, F. 1959. *Anal. Edaf.*, XVIII, 765.
- (60) KITSON, R. E. y MELLON, M. G. 1944. *Ind. Eng. Chem. Anal. ed.*, 16, 379.
- (61) FORTUNE, W. E. y MELLON, M. G. 1938. *Ind. Eng. Chem. Anal. ed.*, 10, 60.
- (62) BOKEN, E. 1956. *Plant and Soil* VII, n.º 3.237.
- (63) SCHENK, W. 1952. *Planta*, 41, 290.
- (64) PETERING, H. G., WOLMAN, W. y HIBBARD, R. P. 1940. *Ind. Eng. Chem. Anal. ed.*, 12, 148.
- (65) FITT, J. W. y NELSON, W. L. 1956. *Advances in Agronomy*, VIII, 241.
- (66) BRAY, R. H. y KURTZ, L. T. 1945. *Soil Sci.*, 59, 39.
- (67) CECCONI, S. y POLESSELLO, A. 1956. *Ann. Sper. Agr.*, X, 127.
- (68) GALET, P. 1947. *Progrès Agric. Viticole*, 128.
- (69) WALKLEY, A. 1935. *A. Journ. Agric. Science*, 25, 598.