

LA FORMACION DE CLOROFILA EN CASOS DE DEFICIENCIA INDUCIDA DE HIERRO

Por A. ABADIA

Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza

I. INTRODUCCION

EL problema de la distribución del hierro en el metabolismo vegetal viene estudiándose desde 1843 (GRISS, 1843 b), sin que hasta la fecha haya logrado resolverse ni aun parcialmente (STEWART y LEONARD, 1952).

Las plantas para su desarrollo normal necesitan hierro en su alimentación (GILE y CARRERO, 1916; MARSH y SHIVE, 1925). WOLFF (1913) considera que el hierro, debido a las pequeñas cantidades en que interviene en el metabolismo, actúa como catalizador; WARBURG (1925) propone la teoría de que es el componente de los fermentos respiratorios encargado del transporte de oxígeno; HOPKINS (1930) supone que la concentración de hierro iónico juega un papel importante en los procesos celulares de la oxidación biológica; KIRCHHOF (1944) ha clasificado este elemento dentro del grupo de los biocatalizadores. MACALLUM (1895) localiza al hierro en los núcleos; puede, también, estar asociado con los plástidos (REED y DUFRENOY, 1935), la mayor parte en los cloroplastos (NOACK y LIEBICH, 1941). SAYRE (1930) estudiando los depósitos en los tallos del maíz, admite la existencia de complejos formados por proteínas y óxidos de hierro hidratados. BOUSSINGAULT (1874) diferencia dos clases de hierro en la planta, extractable y no extractable con alcohol; MOLISCH (1923) diferencia el «hierro enmascarado u orgánico» del «hierro débilmente unido o inorgánico», y HORST (1947) clasifica el hierro en tres porciones: a) hierro cloroplástico soluble en agua; b) extractable con ácido clorhídrico 0,01 N, y c) hierro residual.

Cuando a una planta le falta hierro en su alimentación, la producción de clorofila no es normal, siendo el primer trastorno que aparece, una pérdida de color verde de las hojas jóvenes, con lo cual adquieren un color amarillo característico (clorosis) (AMBRIDGE, 1949; KITCHEN, 1949; WALLACE, 1951), lo que prueba la participación del hierro en la síntesis de la molécula de clorofila.

La síntesis de clorofila puede estar influenciada por numerosos factores, tales como la intensidad luminosa y las condiciones genéticas, patológicas y nutritivas. Entre estas últimas la deficiencia de hierro confiere unas características propias y especiales al problema, teniendo en cuenta que el hierro no es componente de la molécula de clorofila.

La relación existente entre hierro y clorofila es complicada. Los trabajos de GRISS (1843 *a* y *b*), demostraron la necesidad de un suministro de hierro para que las hojas cloróticas, por falta de aquel elemento, pudiesen normalizar su contenido en clorofila. WALLACE (1928), OSERKOWSKY (1932), BENNET (1945) y JACOBSON (1945), entre otros, relacionan la clorofila con el hierro total, encontrando que el contenido en este elemento es menor en las hojas cloróticas. Pero GILE y CARRERO (1920), MILAND (1924), WALLACE y MANN (1926) y OSERKOWSKY (1933) deducen que la relación existente no es con el hierro total, sino con una porción de él, denominada «hierro activo» por OSERKOWSKY, o, según otros autores, soluble, inorgánico, libre, etc.

Estos hechos conceden interés al problema del hierro en relación con la perturbación de la síntesis de clorofila, ya que se comprende la necesidad de considerar una serie de causas que lo inmovilicen o inactiven en el interior de la planta; causas que parecen estar relacionadas con el contenido de los suelos en carbonatos que, directa o indirectamente, son los que originan las condiciones que conducen a la deficiencia inducida de hierro (clorosis). Entre los factores del suelo determinantes de la inmovilización del hierro en la planta se han estudiado preferentemente: el pH (HEWIT, 1948), el alto contenido en potasio (HEWIT y BOLLE-JONES, 1953), en fósforo (BIDDULPH, 1948), en algunos metales pesados (SMITH y SPECHT, 1953), especialmente manganeso (RIPPEL, 1923), humedad (HUBERTY y HAAS, 1940), el tamaño del grano del carbonato cálcico (BUCHER y WILLIAMS, 1936) y el contenido en materia orgánica (WILLIS, 1936).

La perturbación de la síntesis de clorofila por la deficiencia inducida de hierro, va acompañada de profundas variaciones en diversos componentes de la planta; y así, por ejemplo, ILJIN, en un amplio trabajo y empleando material muy diverso, llega a esta conclusión después de estudiar la diferente composición de la savia de plantas verdes y cloróticas en componentes inorgánicos (ILJIN, 1952) y orgánicos (ILJIN, 1951, *a* y *b*). Al mismo resultado llega McGEORGE (1948 *a* y *b*, 1949), estudiando la distinta composición de hojas normales y cloróticas; y así otros autores, como puede verse en la recopilación bibliográfica hecha por la Chilean Nitrate Educational Bureau (1946 y 1951).

Por otra parte, el hierro interviene en la formación de las Fe-porfirinas (SUMMER, 1941), que dan origen a diversas encimas, entre ellas a la catalasa.

VON EULER y sus colaboradores demostraron la existencia de una relación entre clorofila y catalasa; la actividad catalásica es menor en plantas total o parcialmente desprovistas de clorofila que en plantas normales. Este mismo resultado obtienen otros investigadores (EULER, GARD y RISLUND, 1931; YAMAKUJI, 1943) trabajando con plantas desprovistas de clorofila por infección con virus mosaico. DROINEAU y COUNGY (1946), por primera vez, indican que las

hojas de plantas cloróticas, por falta de hierro, poseen también una actividad catalásica menor que las hojas verdes. BROWN y HENDRICKS (1952) admiten la posibilidad de realizar un diagnóstico de deficiencias minerales de microelementos, por los datos obtenidos en el estudio de algunas de las encimas existentes en las plantas, incluyendo en su estudio la deficiencia de hierro en relación con la catalasa.

Se han puesto en práctica las técnicas más variadas para seguir el curso y las funciones del hierro en los organismos vegetales. Recientemente, REDISKE y BIDDULPH (1950), utilizando hierro radioactivo, han corroborado las conclusiones a que se había llegado por otros autores; estudiando el efecto de distintas sales de hierro en la absorción, traslocación, acumulación e inmovilización en la planta, coincidiendo, en lo general, con nuestro enfoque del problema.

En este trabajo estudiamos el problema de la deficiencia inducida de hierro aportando este elemento al sistema en forma de sulfato ferroso y analizando las repercusiones que ello produce en:

- a) El balance de hierro total y «soluble».
- b) El contenido en clorofila.
- c) El sistema encimático «catalasa».
- d) La relación «catalasa/clorofila».
- e) El contenido en varios nutrientes (fósforo, potasio y magnesio).

Como primera etapa hemos realizado un estudio comparativo del contenido en nutrientes, solubles y totales de las hojas cloróticas por un lado y de las hojas normales por otro, y esto a lo largo de todo el ciclo vegetativo de la planta.

Para aportar hierro al sistema, hemos adoptado las técnicas de inyección de ROACH (1939), ROACH y ROBERTS (1945) y THOMPSON (1943), con las que se facilita la investigación de las relaciones existentes con los elementos que están influenciados por la deficiencia inducida de hierro, ya que se orillan las causas que pueden motivar su inmovilización cuando se adiciona a medios tan complejos como son el suelo o las soluciones nutritivas.

Conocidas las repercusiones que el tratamiento con sulfato de hierro produce en el contenido en nutrientes y en el balance de hierro total y soluble, restablecimos, por aporte directo de hierro a la planta, las condiciones normales de nutrición y síntesis de clorofila, controlando la variación en el contenido de nutrientes, de catalasa y de clorofila mediante análisis periódicos, realizados cada día, y con una duración total de 192 horas; tratando de establecer si la formación de catalasa precede o sigue a la de clorofila.

II. MATERIAL Y METODOS

La referencia concreta del material utilizado se da en el capítulo de resultados, acompañando a la exposición de la respectiva experiencia.

Los resultados preliminares realizados indicaron que de todo el material de que podíamos disponer, los frutales eran los más afectados por la deficiencia inducida de hierro; diagnosticándose que la clorosis, hecho fundamental para la elección, era debida principalmente a una deficiencia de aquel elemento.

Los síntomas que aparecían, coincidían, en la mayoría de los casos, con los indicados en la bibliografía para una deficiencia de hierro (WALLACE, 1951; KITCHEN, 1949; AMBRIDGE, 1949; ABADÍA, 1952). Realizado el diagnóstico visual, se procedió a su corroboración por el método de inyección o fisiológico (ROACH, 1939; ROACH y ROBERTS, 1945). En las primeras experiencias se realizaron cuatro series de inyecciones de cada uno de los elementos nutritivos inorgánicos, que mostraron que la deficiencia de hierro era factor limitante, siendo accesorios los efectos de otros macro o micronutrientes. En los casos en los que la deficiencia de hierro aparecía emparejada con otra perturbación, se desechaba el material.

Para evitar posibles complicaciones de la deficiencia de hierro en trastornos producidos por virus, que en el melocotonero dan síntomas muy parecidos, verificamos la reacción de LINDNER *et al* (1950), que diagnostica un trastorno de esta índole basándose en el contenido de polifenoles en las hojas, con resultados negativos para la existencia de virus.

TOMA DE MUESTRAS

En el estudio de la clorosis no hay un método «standard» para la toma de muestras (BENNET, 1945). La única manifestación visual de la deficiencia inducida de hierro se presenta en las hojas, y por ello su composición nos ha parecido la base mejor para estudiar las modificaciones producidas por los distintos tratamientos (BRADFORD, 1949).

Para la determinación de clorofila y de la actividad catalásica, tampoco hay método «standard» de toma de muestras, y por ello hemos realizado unas experiencias (pág. 229) encaminadas a comprobar si las muestras tomadas para la determinación de nutrientes servían para aquellos fines. Los resultados nos indican que esto es posible.

El proceso seguido para la toma de muestras ha sido doble: uno para determinar la variación de nutrientes, actividad catalásica y contenido en clorofila con el tiempo de acción del sulfato ferroso, y otro para estudiar la variación de nutrientes durante el ciclo vegeta-

tivo. Para el primer caso se eligieron, en el mismo ejemplar, dos ramas visualmente análogas: una de ellas fué inyectada con solución de sulfato ferroso, quedando la otra como testigo. Para poder disponer de material suficiente para todas las determinaciones, fué necesario inyectar cinco ramas para la toma de las hojas correspondientes a un mismo tiempo de acción. Unas veces las cinco ramas inyectadas estaban en el mismo ejemplar y otras en distinto, pero siempre a una rama inyectada le correspondía otra testigo en el mismo ejemplar. En todas las experiencias se tomaron las hojas que quedaban por encima del punto de inyección y sus homólogas de los testigos.

Para el segundo caso, en árboles tratados y sin tratar, se tomaron la segunda, tercera y cuarta hoja desplegada a partir del ápice. El total de la muestra fué de 100 gramos. Se procuró que no hubiera ningún fruto en las proximidades para eliminar las posibles variaciones que ello pudiera ocasionar en los componentes estudiados (HUBERTY y HAAS, 1940).

Todas las muestras se tomaron a la misma hora del día, para evitar la variación en el contenido en nutrientes (GOODALL y GREGORY, 1947) y clorofila (SIRONVAL, 1935).

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las hojas se limpian, para evitar los resultados anormales, sobre todo en la determinación del hierro (SMITH *et al.*, 1950), con una solución de CIH 0,01 N, que contenga 0,001 % de un humectante libre de hierro (Shell Stool); posteriormente se separaron los peciolo de las láminas de las hojas utilizando sólo éstas para los análisis.

Las láminas de las hojas se parten en cuatro trozos, mezclándolos antes de tomar dos gramos de muestra para la determinación de la actividad catalásica y otros dos gramos para la determinación del contenido en clorofila (determinaciones realizadas por duplicado). El resto del material se seca para su almacenamiento y posteriores determinaciones.

Las muestras que se emplearon para la determinación de nutrientes totales y hierro «soluble» se secaron durante cuarenta y ocho horas a 75° en estufa eléctrica, pulverizándolas, en mortero de porcelana, hasta polvo fino.

EXTRACCIONES

La extracción de nutrientes solubles (fósforo, potasio y magnesio) se realizó con reactivo MORGAN, según el método indicado por HUNTER (1950), decolorando los extractos con carbón activo al que hubo que purificar, por repetidos lavados con ácido clorhídrico, hasta eliminación completa de fosfatos. La extracción de nutrientes totales se hizo por digestión ácida, según PIPER (1950).

Para la preparación de la suspensión encimática se ha seguido el método indicado por DROINEAU y COUNGY (1946).

La estabilización de la clorofila se realiza introduciendo las hojas frescas, durante un minuto, en agua hirviendo (SCHENK, 1952), secánolas luego entre papel de filtro. Un gramo de hojas así tratadas, mezcladas con medio gramo de arena y unas gotas de alcohol etílico, se reducen a pulpa fina en un mortero, pasándola a un filtro de placa y lavando con 10 c. c. de alcohol etílico de 96"; los lavados se repiten cuatro veces con 5 c. c. de alcohol cada una, repitiéndose los lavados y triturados hasta que los líquidos pasen sin coloración; los filtrados se recogen en matraces de 100 c. c.

Para la extracción del hierro «soluble» empleamos CIH 1 N (OSERKOWSKY, 1933). Los extractos obtenidos por maceración del polvo de hojas secas con el citado reactivo durante veinticuatro horas están fuertemente coloreados, lo que impide su utilización en la determinación directa del hierro, por lo que el extracto clorhídrico, después de añadirle unas gotas de ácido nítrico concentrado se evapora a sequedad; a continuación se procede a la destrucción de la materia orgánica y a la preparación de la solución de manera análoga a la mencionada para la determinación de nutrientes totales.

Todas las extracciones se realizaron por duplicado, acompañando las correspondientes muestras en blanco.

DETERMINACIONES ANALITICAS

Las determinaciones analíticas, excepto la de catalasa, se efectuaron por métodos absorciométricos, empleando un absorciómetro SPEKKER, tipo H-760, e interpolando las lecturas de las soluciones problemas en las correspondientes curvas patrones.

Para la determinación de fósforo, se midió la intensidad del color azul que los fosfatos forman con molibdato amónico (HUNTER, 1950); el magnesio, formando el complejo con amarillo de titanio y midiendo la intensidad del color rosa que se desarrolla (NICHOLAS, 1947), y el potasio, por turbidimetría, empleando cobaltinitrito sódico (LUNT *et al.*, 1950). Para la determinación de hierro, medimos la intensidad del color rojo que se produce con α - α' dipiridilo (MASON, 1950).

La clorofila se determinó, inmediatamente después de haber sido obtenida la solución, midiendo la intensidad del color verde, empleando cubeta de 4 c. c. y filtro rojo (Ilford, 608). Las lecturas de los problemas se interpolaron en una curva patrón, obtenida asignando el valor 100 % de contenido en clorofila, a una solución extraída de hojas visualmente normales; diluyendo con alcohol etílico se obtuvieron soluciones menos concentradas, y de ellas se realizaron las medidas colorimétricas (BEHRENS, 1952). Las lecturas obtenidas para las soluciones problemas se interpolaron en la curva de la figura 1 (curva patrón para la determinación de clorofila en el melocotonero) obtenida con aquellos valores; por lo tanto, los conte-

nidos en clorofila *no son absolutos*. Para peral y membrillero se obtuvieron curvas análogas.

La actividad catalásica se determinó midiendo el volumen de oxígeno desprendido en la descomposición de una cantidad determi-

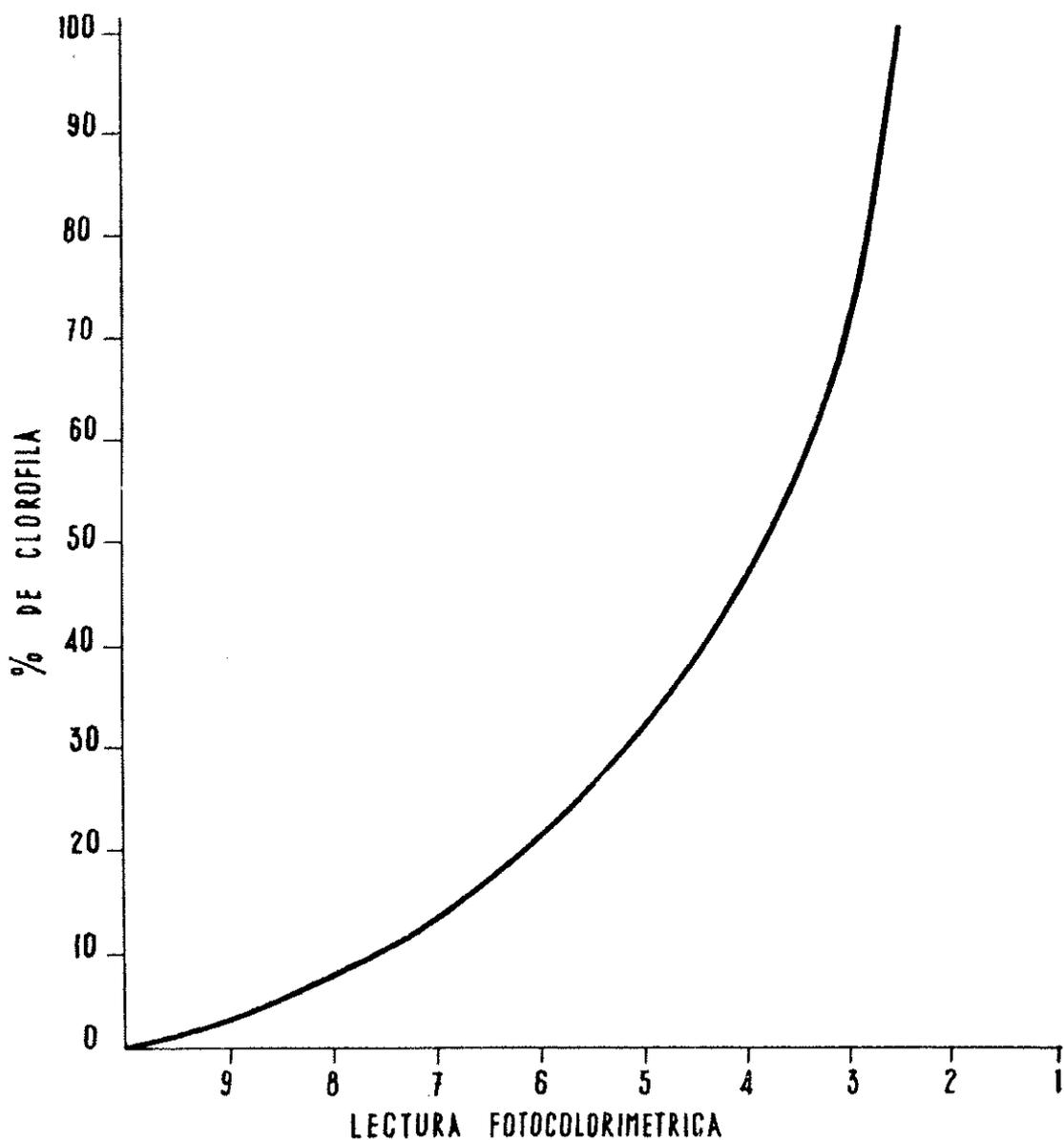


Fig. 1.—Curva patrón para la determinación de clorofila en hojas de melocotonero.

nada de agua oxigenada (DROINEAU y COUNGY, 1946). Para «standardizar» el método se estudió la modificación de la actividad catalásica con el tiempo que transcurre desde la toma de muestra en el campo hasta el comienzo de la determinación (tiempo de «almacenamiento» de la muestra).

A la vista de los resultados obtenidos (pág. 230) la determinación de la actividad catalásica queda establecida en las siguientes

etapas: desde la toma de muestras hasta el comienzo de la determinación transcurren treinta minutos; del comienzo de la determinación al de la reacción, veinte minutos; del comienzo de la reacción a la lectura gasométrica, veinte minutos.

APORTE DE HIERRO

En las experiencias en que se estudiaron las variaciones que acompañan a la formación de clorofila, el hierro se introdujo en forma de inyección líquida, según el método de ROACH (1939). La solución inyectada fué sulfato ferroso al 0.025 % acidulada con sulfúrico (0,025 % en volumen). La distribución uniforme del líquido inyectado y la rapidez de esta distribución se logró inyectando tres peciolos consecutivos, con lo que todas las hojas superiores al punto de inyección quedan completamente tratadas y asegurada la uniformidad de la muestra.

Las inyecciones se realizaron en ramas del mismo año, muy jóvenes, para que la distribución fuese completa al cabo de las veinticuatro horas, por lo que hubo necesidad de inyectar cinco ramas para cada una de las muestras que habían de tomarse.

En el estudio de la variación de nutrientes durante el ciclo vegetativo, la aportación de hierro se realizó mediante inyección sólida. La técnica seguida y las cantidades de hierro introducidas fueron las indicadas por THOMPSON (1943).

III. ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las determinaciones realizadas sobre los extractos con reactivo MORGAN se expresan en tanto por ciento del elemento referido a material fresco. Los nutrientes totales, en tanto por ciento del elemento referido a material seco.

La clorofila se expresa en tanto por ciento sobre material fresco. La actividad catalásica, en c. c. de oxígeno desprendidos por descomposición de una cantidad determinada de agua oxigenada; todas estas medidas gasométricas se hallan referidas a condiciones normales de presión y temperatura.

VARIACION DE NUTRIENTES A LO LARGO DEL CICLO VEGETATIVO

Para este estudio se montaron cinco experiencias, todas ellas sobre variedades comerciales de melocotonero. El material empleado

y la fecha del tratamiento se indican en el cuadro 1. En el cuadro 2 se indican las características de los suelos en los que crecía el citado material.

CUADRO 1.—*Material empleado en el estudio de la variación de nutrientes a lo largo del ciclo vegetativo.*

Experiencia	Fecha del tratamiento	Número de árboles	Edad de los árboles
A ₁	21-6-51	14	8 años
A ₂	3-2-52	3	5 »
A ₃	25-6-51	2	5 »
A ₄	8-11-52	4	4 »
A ₅	11-2-52	4	? »

CUADRO 2.—*Características del suelo.*

Experiencia	pH	Materia orgánica	Carbonatos totales	Poder clorosante
A ₁	8,0	1,56	341,0	109,7
A ₂	8,0	1,64	334,7	96,3
A ₃	8,3	1,30	335,0	114,5
A ₄	7,4	1,90	312,0	99,0
A ₅	»	»	»	»

En todas estas experiencias se inyectaron (inyección sólida) la mitad de los ejemplares existentes, quedando el resto como testigo. En la experiencia A₂ se inyectaron dos ramas de cada uno de los ejemplares.

NUTRIENTES EXTRACTABLES CON REACTIVO MORGAN

FÓSFORO

Los valores medios del contenido en fósforo de las cinco experiencias se indican en el cuadro 3.

CUADRO 3.—Variación del contenido en fósforo soluble con la época de la toma de muestra.

Mes de la determinación	Hojas tratadas	Hojas sin tratar
Marzo	0.044	0,034
Abril	0.047	0,038
Mayo	0.050	0,041
Junio	0.040	0,036
Julio	0.054	0,053
Agosto	0.044	0,042

El contenido en fósforo extractable con reactivo MORGAN (fig. 2) es mayor en las hojas procedentes de árboles tratados. La diferencia en contenido en fósforo entre las hojas tratadas y las no trata-

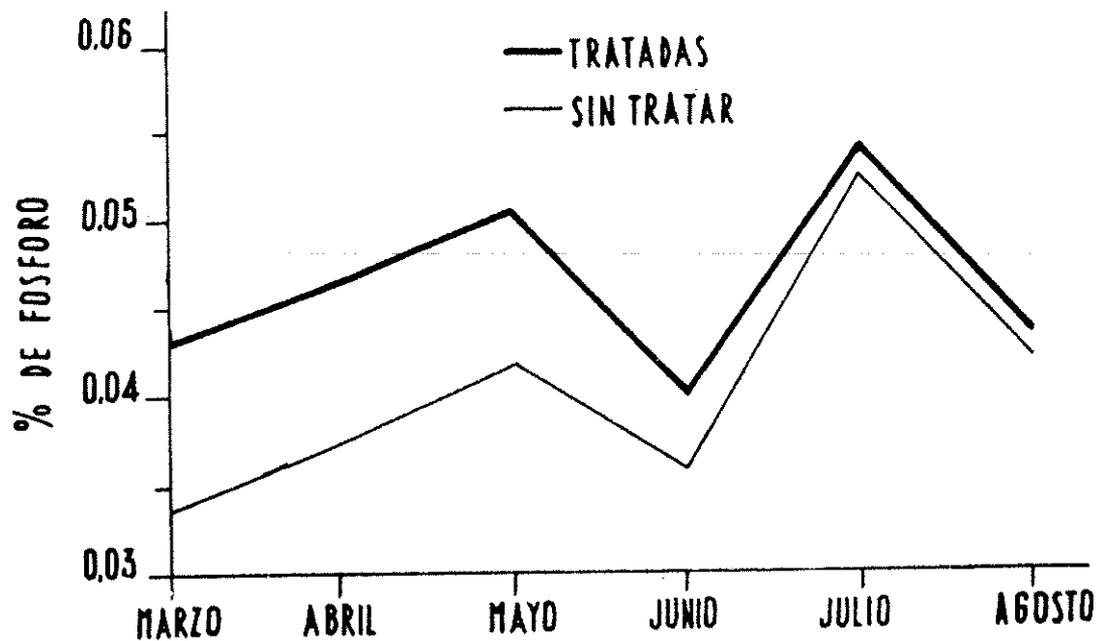


Fig. 2.—Variación del contenido en fósforo «soluble» con la época de la toma de muestra.

das es máxima en primavera y comienzos de verano; hacia finales de éste, el contenido aumenta en las hojas de los árboles testigo, tendiendo a igualarse con el de las hojas inyectadas.

POTASIO

En el cuadro 4 se indican los valores medios de los contenidos en potasio de las cinco experiencias realizadas.

CUADRO 4.—Variación del contenido en potasio soluble con la época de la toma de muestra.

Mes de la determinación	Hojas tratadas	Hojas sin tratar
Marzo	0,29	0,36
Abril	0,24	0,34
Mayo	0,21	0,34
Junio	0,26	0,36
Julio	0,31	0,37
Agosto	0,34	0,34

El contenido de las hojas cloróticas en potasio «soluble» varía dentro de límites muy estrechos a lo largo de todo el ciclo vegetativo estudiado (fig. 3). En hojas verdes procedentes de árboles inyec-

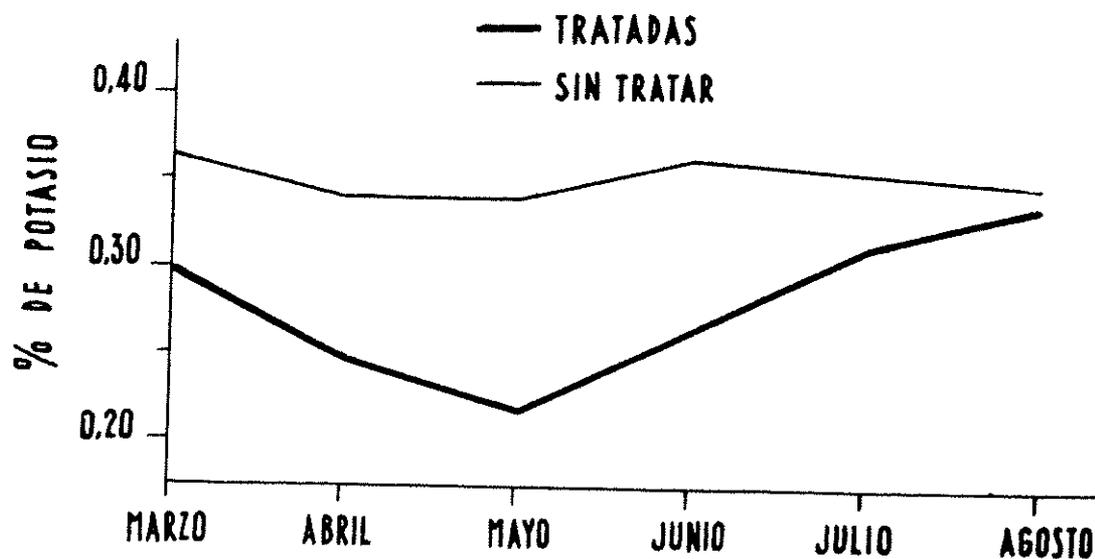


Fig. 3.—Variación del contenido en potasio «soluble» con la época de la toma de muestra.

tados hay variaciones bruscas en relación con la época de la toma de muestra. El contenido en potasio «soluble» es siempre más bajo en las hojas verdes que en las cloróticas.

MAGNESIO

La fig. 4 construída con los valores dados en el cuadro 5, correspondientes a las medias de las cinco experiencias, representa el contenido en magnesio de las hojas verdes (inyectadas) y cloróticas (sin inyectar). El máximo contenido corresponde al mes de abril, a partir del cual va disminuyendo tanto en hojas tratadas como en hojas

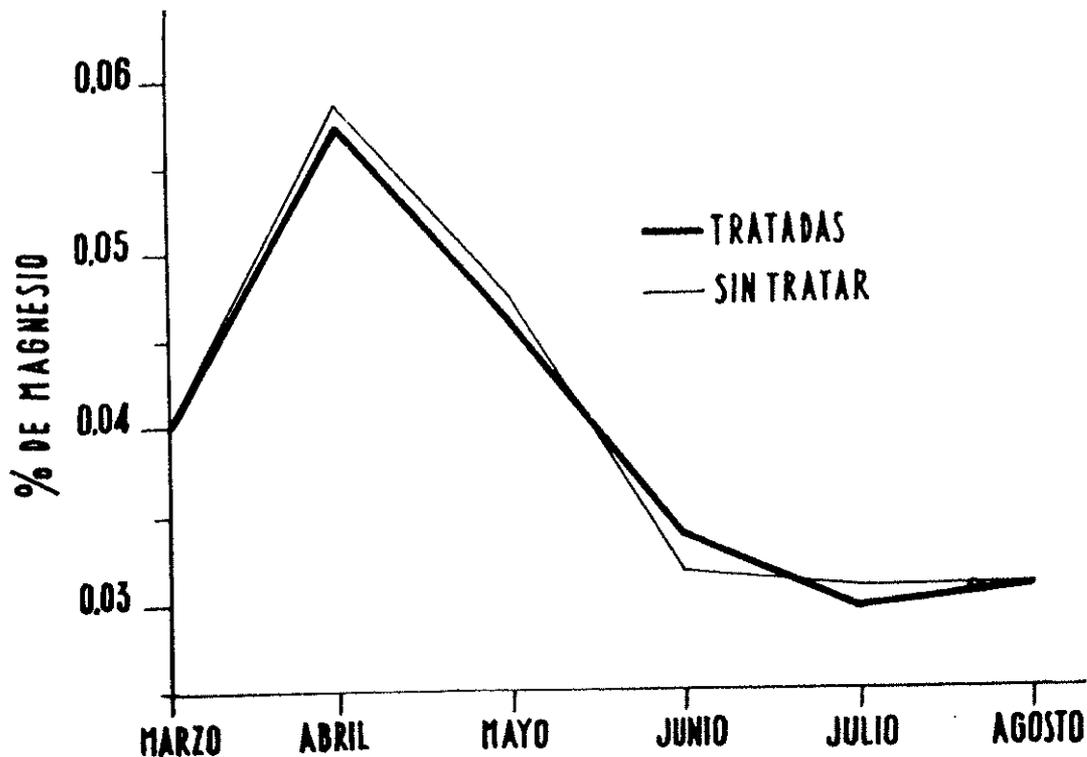


Fig. 4.—Variación del contenido en magnesio «soluble» con la época de la toma de muestra.

CUADRO 5.—Variación en el contenido en magnesio soluble con la época de la toma de muestra.

Mes de la determinación	Hojas tratadas	Hojas sin tratar
Marzo	0,040	0,040
Abril	0,058	0,059
Mayo	0,047	0,043
Junio	0,034	0,032
Julio	0,030	0,031
Agosto	0,031	0,031

sin tratar. Prácticamente no existe diferencia en el contenido en magnesio de las hojas tratadas y sin tratar, como se deduce de la observación de la gráfica.

NUTRIENTES TOTALES

Las cifras indicadas en los cuadros corresponden al valor medio de las cinco experiencias realizadas.

FÓSFORO

El contenido en fósforo total (fig. 5 y cuadro 6), tanto en hojas tratadas como en las testigos, disminuye a medida que avanza la estación.

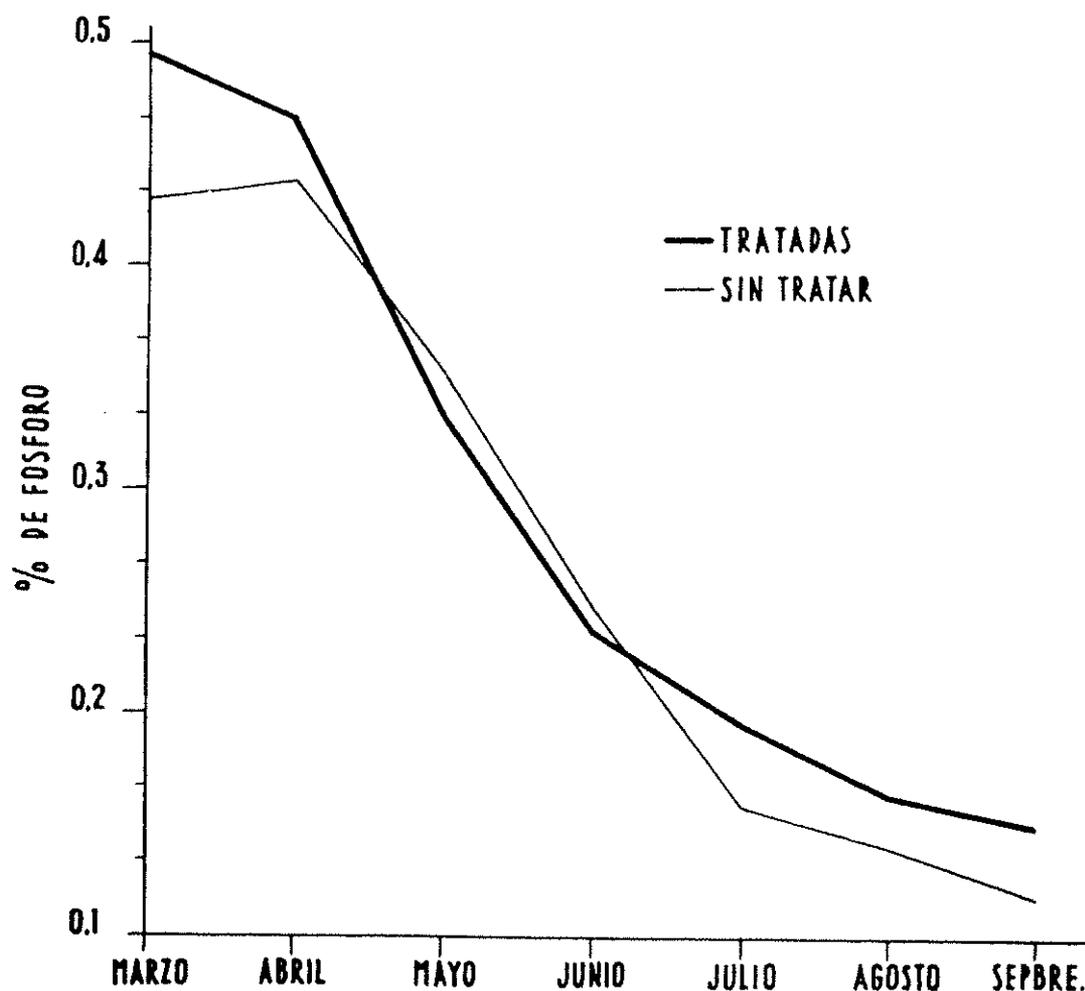


Fig. 5.—Variación del contenido en fósforo total con la época de la toma de muestra.

CUADRO 6.—Variación en el contenido en fósforo total con la época de la toma de muestra.

Mes de la determinación	Hojas tratadas	Hojas sin tratar
Marzo	0,496	0,430
Abril	0,467	0,439
Mayo	0,333	0,349
Junio	0,227	0,243
Julio	0,194	0,158
Agosto	0,162	0,136
Septiembre	0,147	0,120

POTASIO

En las muestras correspondientes a marzo (cuadro 7 y fig. 6), el contenido en potasio total es análogo para las dos clases de material; entre marzo y abril aumenta en las hojas testigo y disminuye

CUADRO 7.—Variación en el contenido en potasio total con la época de la toma de muestra.

Mes de la determinación	Hojas tratadas	Hojas sin tratar
Marzo	1,30	1,27
Abril	1,19	1,61
Mayo	1,27	1,63
Junio	1,51	1,85
Julio	1,34	1,68
Agosto	1,31	1,54
Septiembre	1,08	1,14

en las tratadas, y, por lo tanto, estas últimas contienen menos potasio total. El potasio total tiende a igualarse en otoño para las dos clases de material, lo mismo que ocurre con el potasio «soluble».

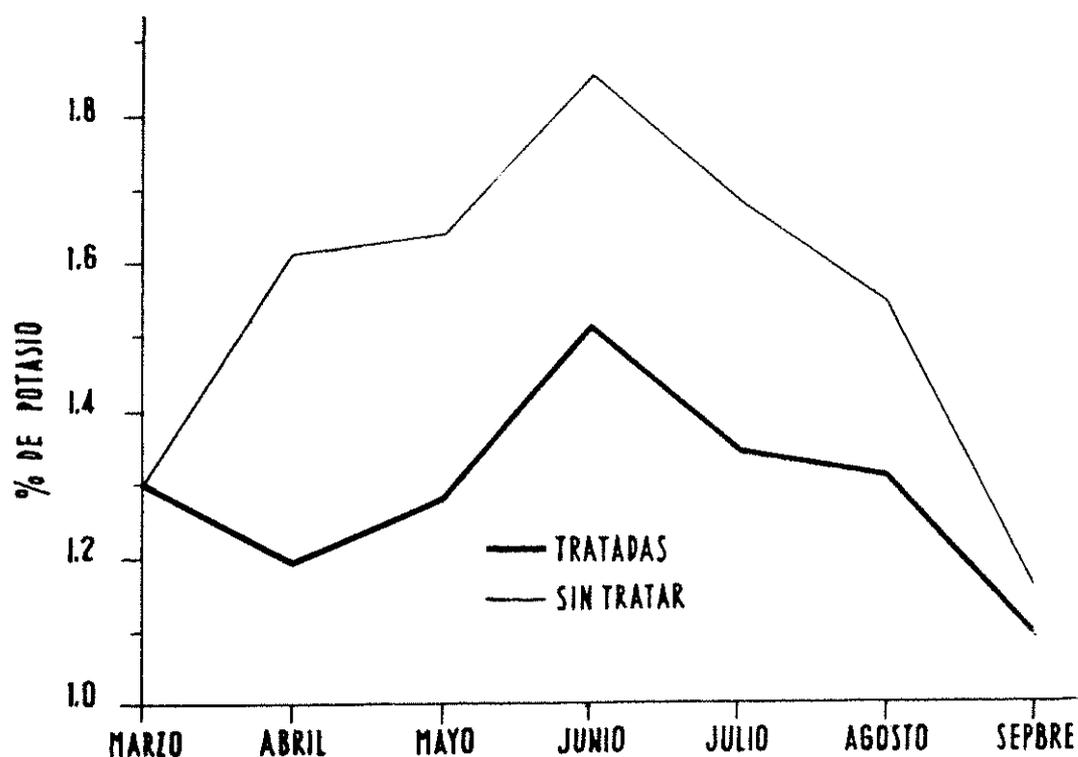


Fig. 6.—Variación del contenido en potasio total con la época de la toma de muestra.

MAGNESIO

El contenido en magnesio (cuadro 8 y fig. 7), presenta grandes fluctuaciones a lo largo de todo el ciclo vegetativo; las variaciones son análogas para los dos materiales, no existiendo diferencia entre el contenido de las hojas verdes (tratadas) y las cloróticas (sin tratar).

CUADRO 8.—Variación en el contenido en magnesio total con la época de la toma de muestra.

Mes de la determinación	Hojas inyectadas	Hojas sin inyectar
Marzo	0,193	0,189
Abril	0,227	0,219
Mayo	0,528	0,569
Junio	0,358	0,328
Julio	0,476	0,487
Agosto	0,399	0,398
Septiembre	0,559	0,575

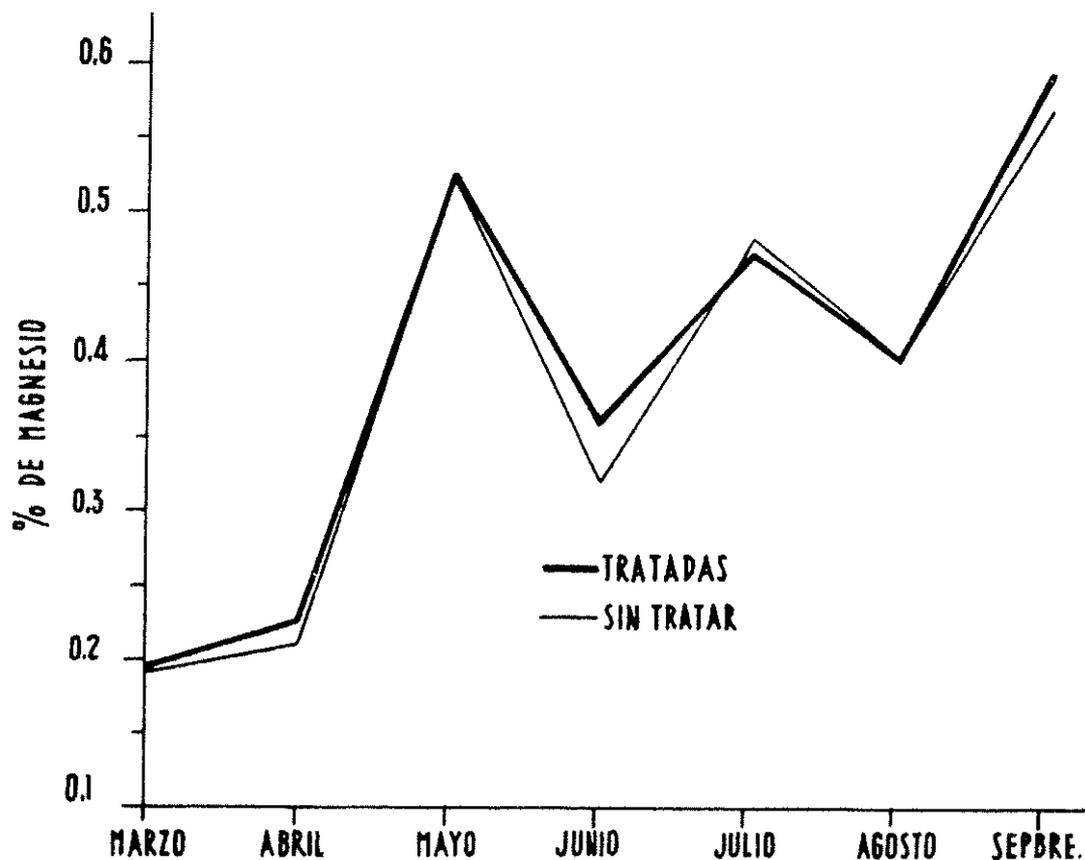


Fig. 7.—Variación del contenido en magnesio total con la época de la toma de muestra.

HIERRO TOTAL

Las cifras correspondientes al contenido en hierro total (cuadro 9 y fig. 8) varían poco con la época de la toma de muestras, con la excepción de un aumento brusco observado entre marzo y abril.

CUADRO 9.—Variación en el contenido en hierro total con la época de la toma de muestra.

Mes de la determinación	Hojas tratadas	Hojas sin tratar
Marzo	0,0171	0,0176
Abril	0,0319	0,0307
Mayo	0,0265	0,0271
Junio	0,0291	0,0298
Julio	0,0303	0,0294
Agosto	0,0277	0,0273
Septiembre	0,0286	0,0289

La diferencia existente entre la cantidad de hierro total de las hojas tratadas y las hojas sin tratar es muy pequeña y no presenta regularidad.

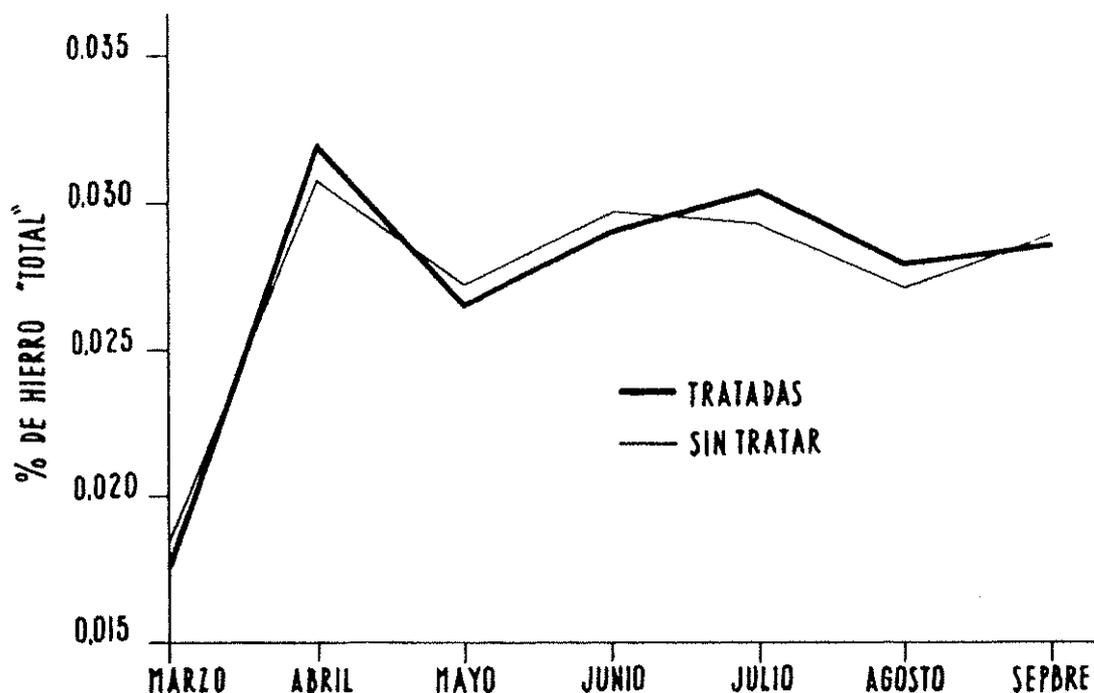


Fig. 8.—Variación del contenido en hierro total con la época de la toma de muestra.

HIERRO «SOLUBLE»

La fig. 9, construída con los valores dados en el cuadro 10, representa los contenidos en hierro extractable con CIH 1 N (hierro «soluble»). En hojas procedentes de árboles tratados, el hierro «soluble» disminuye a medida que avanza la estación; en hojas de árboles tes-

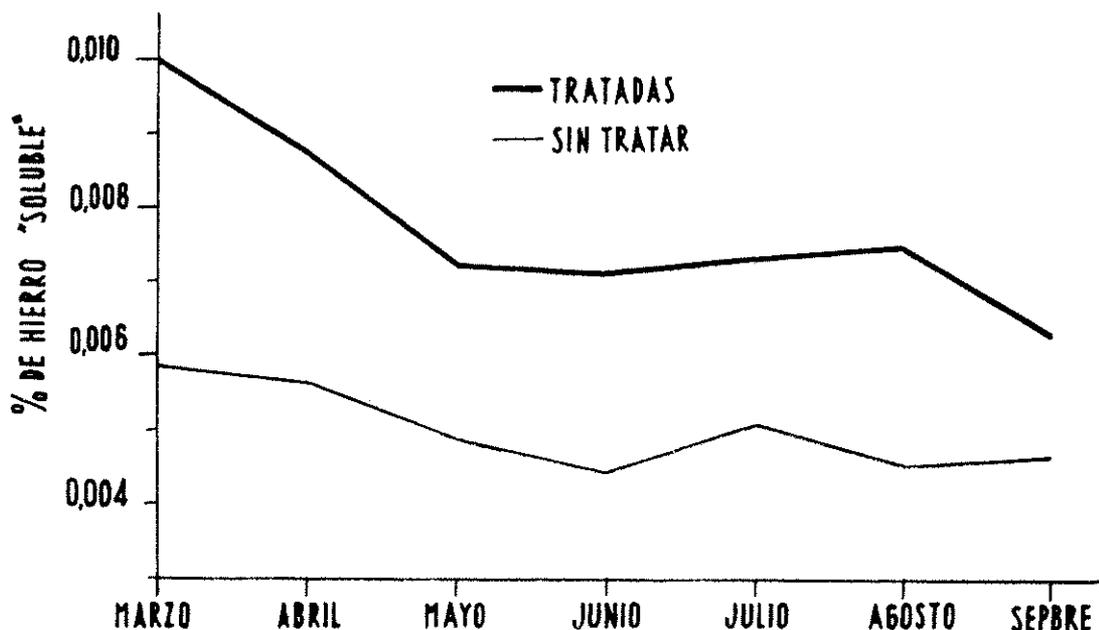


Fig. 9. Variación del contenido en hierro «soluble» con la época de la toma de muestra.

tigo la disminución es menos brusca y las fluctuaciones existentes muy parecidas a las de las hojas verdes. En todos los casos el contenido en hierro «soluble» de las hojas verdes es mayor que el de las cloróticas.

CUADRO 10.—Variación en el contenido en hierro «soluble» con la época de la toma de muestra.

Mes de la determinación	Hojas tratadas	Hojas sin tratar
Marzo	0,0101	0,0059
Abril	0,0088	0,0057
Mayo	0,0073	0,0049
Junio	0,0071	0,0044
Julio	0,0073	0,0051
Agosto	0,0075	0,0045
Septiembre	0,0063	0,0046

ACTIVIDAD CATALASICA

VARIACIÓN CON EL TIEMPO DE «ALMACENAMIENTO» DE LA MUESTRA

El estudio de esta variación fué necesario para disponer de un método «standard» de estimación de la actividad catalásica, y se realizó sobre tres clases de material (cuadro 11): peral, membrillero y melocotonero.

CUADRO 11.—Variación de la actividad catalásica con el tiempo de almacenamiento de la muestra.

FRUTAL	Tiempo de almacenamiento (horas)	C. C. DE OXIGENO DESPRENDIDO A LOS				
		5 ^m	10 ^m	15 ^m	20 ^m	25 ^m
Peral	0	6.2	9,0	10.7	11.8	12,8
	2	7,0	10,2	11,6	12,2	12,3
	4	8,4	11,0	12,0	12,6	12,4
Membrillero	0	7,9	9,0	11,9	13,6	14,3
	2	9,0	11,9	13,4	14,2	14,7
	4	10,0	12,9	13,9	14,3	14,7
Melocotonero	0	4,8	7,0	8,0	8,6	9,0
	2	5,4	7,5	8,2	8,6	8,8
	4	5,1	7,2	8,2	8,7	9,0

Para realizar las determinaciones de actividad catalásica y su variación con el tiempo transcurrido desde la toma de la muestra hasta el comienzo de la determinación, esto es, el «tiempo de almacenamiento», se tomó una muestra única, que, llevada al laboratorio, se dividió en tres lotes: en el primero se determinó inmediatamente la actividad catalásica, valor correspondiente al tiempo 0 de los cuadros; la actividad catalásica en los otros dos lotes se comenzó a determinar con intervalos de dos horas.

En la fig. 10 se representan los valores correspondientes a la experiencia con peral; los resultados de las otras dos fueron análogos.

Los resultados obtenidos indican que existe un aumento de la actividad catalásica con el tiempo de almacenamiento, pero la variación puede considerarse prácticamente nula al cabo de los veinte minutos de reacción, tiempo elegido para la lectura de los c. c. de oxígeno desprendidos en todas las determinaciones posteriores.

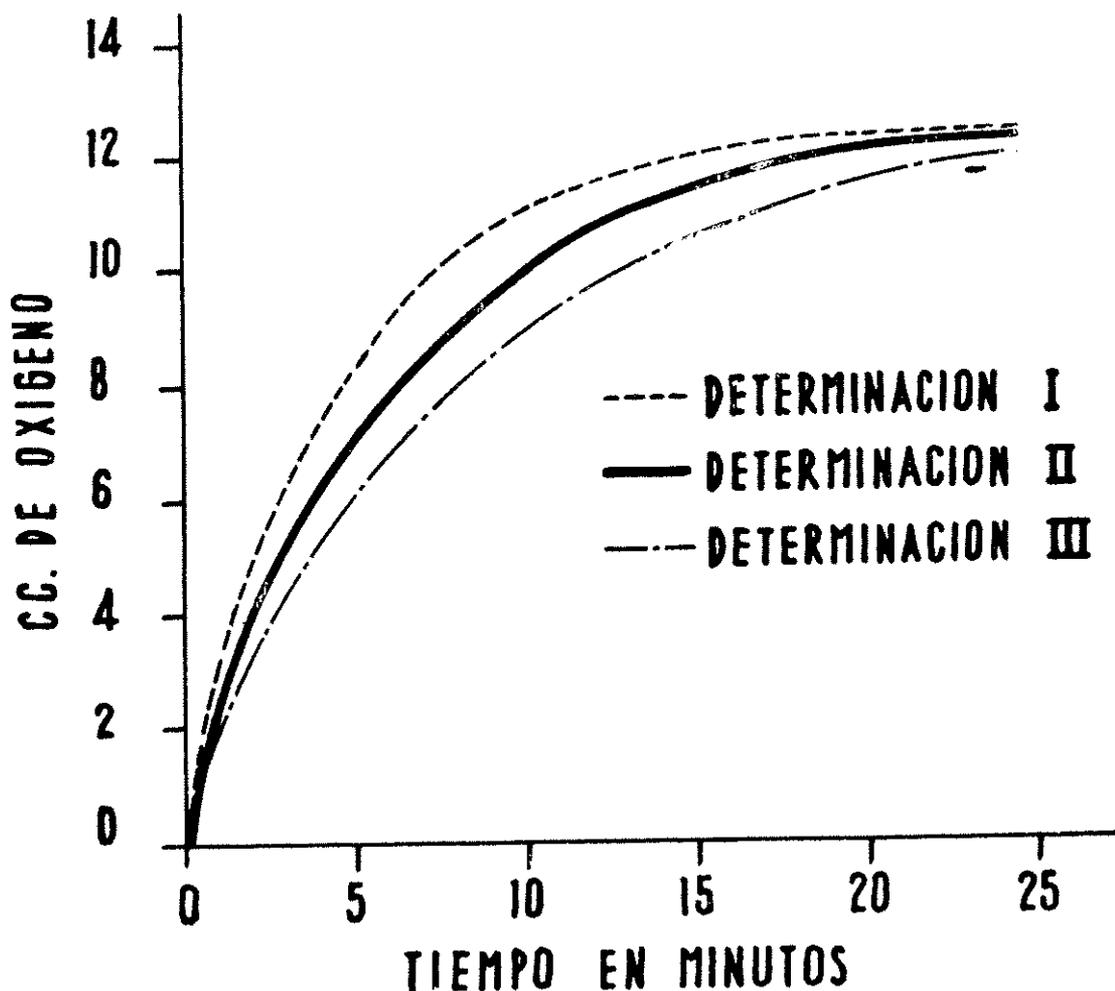


Fig. 10.—Variación de la actividad catalásica con el tiempo de almacenamiento de la muestra. La determinación I corresponde a la muestra analizada después de cuatro horas de almacenamiento; la II, después de dos horas, y la III, analizada inmediatamente de llegar al laboratorio.

VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÁSICA Y CONTENIDO EN CLOROFILA CON LA EDAD Y ESTADO DE LA HOJA.

El material empleado en cada una de las experiencias se indica en el cuadro 12. Las características del suelo en el que crecía este material se muestran en el cuadro 13.

CUADRO 12.—Material empleado en la determinación de la variación de la actividad catalásica y contenido en clorofila con la edad y estado de la hoja.

Experiencia	Frutal	Variiedad	Parcela
B ₁	Membrillero	Comercial	H
B ₂	Membrillero	Q-C	H-2
B ₃	Membrillero	Q-A	J-20
B ₄	Membrillero	Comercial	LP-5b
B ₅	Peral	Condessa P.	LP-6a
B ₆	Peral	Manteca gris	LP-6a
B ₈	Melocotonero	Comercial	LP-6d
B ₉	Melocotonero	»	LP-5f
B ₁₀	Melocotonero	»	LP-2
B ₁₁	Peral	»	LP-6a

CUADRO 13.—Características del suelo.

Experiencia	pH	Materia orgánica	Carbonatos totales	Poder clorosante
B ₁	8,0	1,70	336,3	98,7
B ₂	8,0	1,94	364,0	86,9
B ₃	8,0	—	313,3	92,2
B ₄	7,9	1,88	320,6	110,1
B ₅	7,8	2,36	301,2	108,2
B ₆	7,8	2,36	301,2	108,2
B ₈	8,0	1,32	332,5	113,1
B ₉	8,1	1,36	346,3	109,4
B ₁₀	7,9	1,88	327,6	102,6
B ₁₁	7,8	2,36	301,2	108,2

CUADRO 14.—Variación de la actividad catalásica y contenido en clorofila con la edad de la hoja.

Experiencia	c. c. de oxígeno desprendido en la hoja					% de clorofila en la hoja				
	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª
B ₁	9,1	8,3	6,8	6,6	6,3	67,0	85,5	99,0	92,0	100,0
B ₂	8,0	7,9	6,8	6,7	6,6	62,0	64,5	81,0	92,5	98,5
B ₃	8,8	7,8	6,1	5,4	4,7	50,0	60,0	73,5	88,0	95,0
B ₄	3,4	5,5	6,1	6,2	—	35,5	33,5	38,0	35,0	—
B ₅	5,4	6,2	4,9	4,3	—	37,0	34,5	27,0	30,0	—
B ₆	—	—	—	—	—	72,0	76,0	76,0	82,0	—
B ₈	6,0	8,0	7,9	6,6	—	47,5	52,5	62,5	70,0	—
B ₉	4,9	4,0	2,5	3,8	—	11,0	18,0	9,5	14,0	—
B ₁₀	7,3	8,2	8,4	8,2	—	31,5	47,0	58,0	60,0	—
B ₁₁	5,0	4,8	5,8	5,5	—	21,0	20,8	20,0	19,0	—

Los resultados obtenidos en las experiencias realizadas (cuadro 14) indican que en plantas normales la actividad catalásica (fig. 11) experimenta una disminución al aumentar la edad de la hoja. El contenido en clorofila (fig. 12), aumenta con la edad de la hoja. Las hojas cloróticas no muestran ninguna regularidad en la variación de la actividad catalásica (fig. 13) ni en el contenido en clorofila (figura 14) con la edad de la hoja.

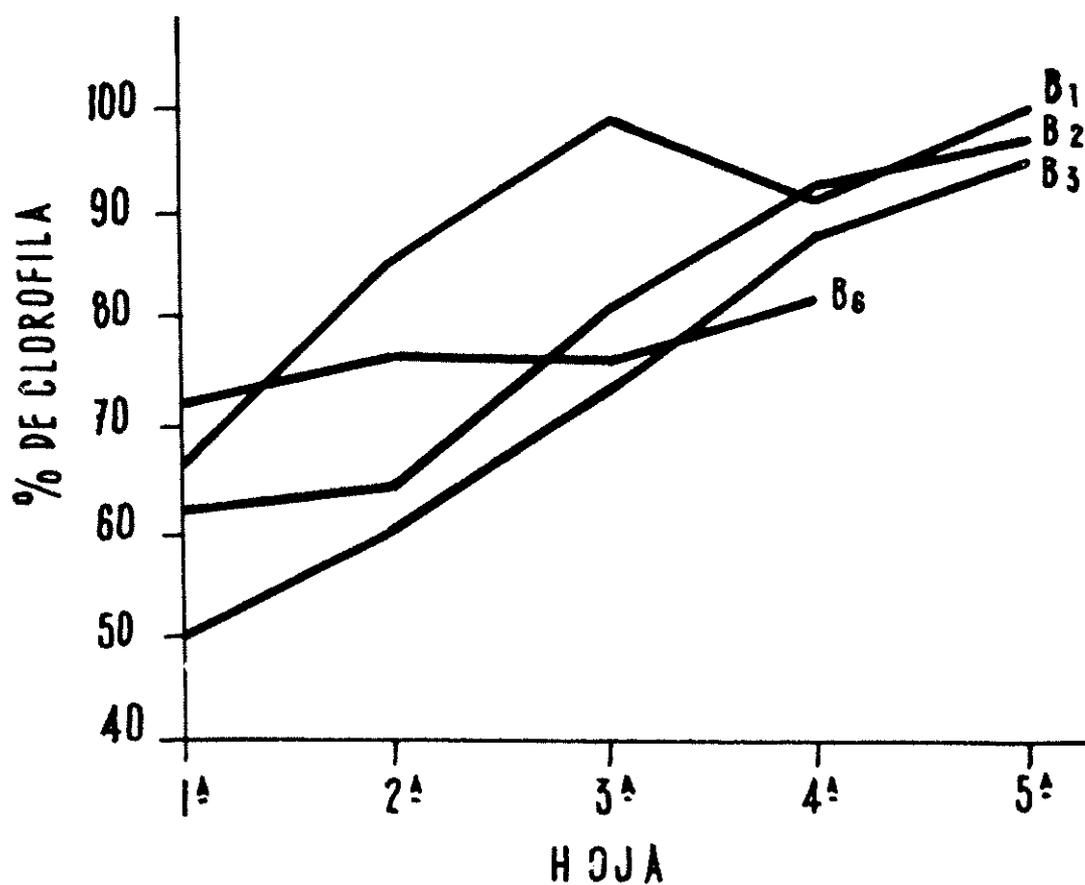


Fig. 11.--Variación de la actividad catalásica con la edad de la hoja en plantas normales.

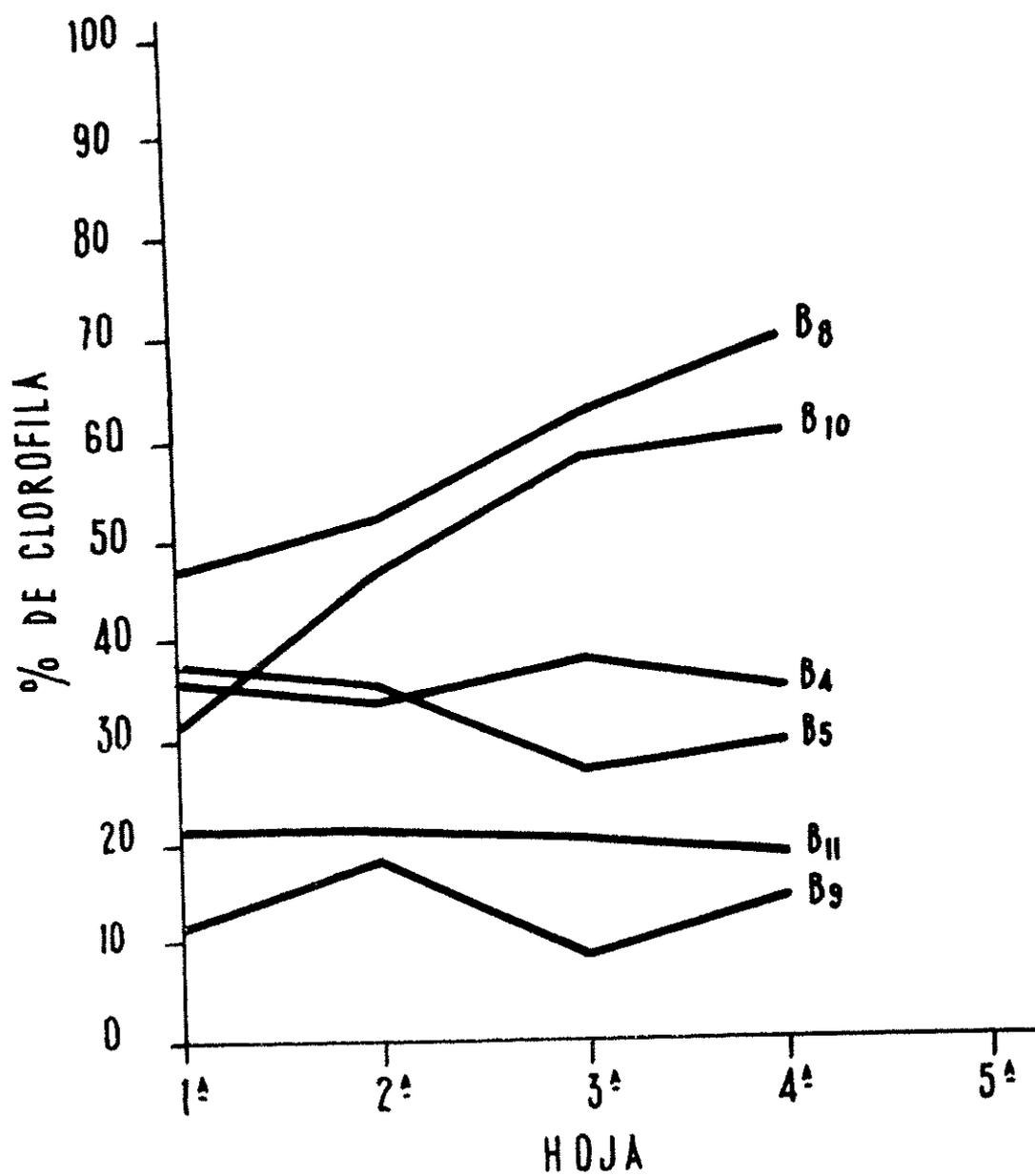


Fig. 12.—Variación del contenido en clorofila con la edad de la hoja en plantas normales.

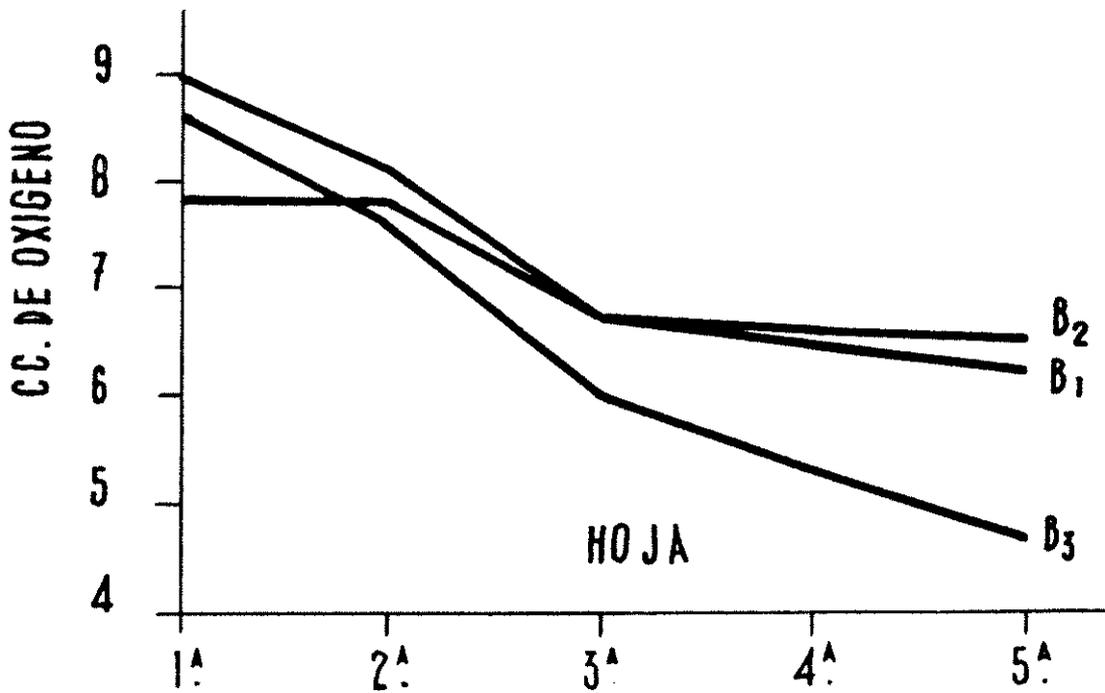


Fig. 13.—Variación de la actividad catalásica con la edad de la hoja en plantas deficientes en hierro.

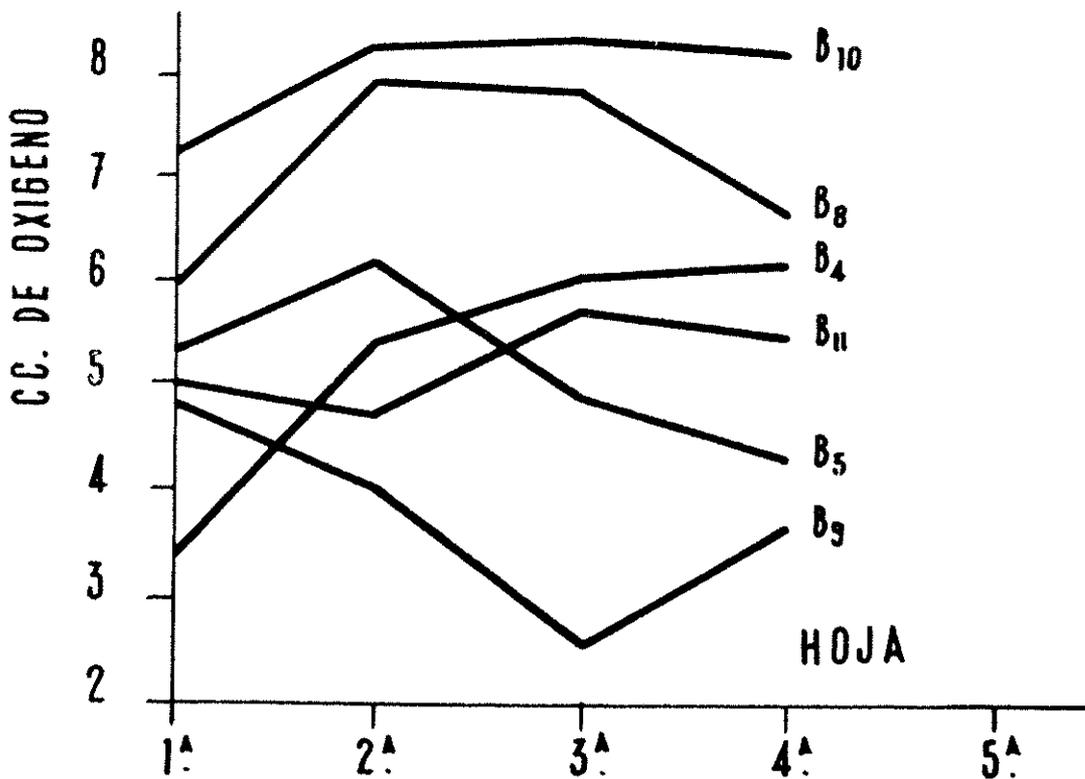


Fig. 14.—Variación del contenido en clorofila con la edad de la hoja en plantas deficientes en hierro.

VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÁSICA CON EL TIEMPO DE LA DETERMINACIÓN Y CONTENIDO EN CLOROFILA.

Se tomó para cada determinación una muestra media de todas las variedades de peral existentes en un vivero. Cada lote estaba compuesto de hojas que contenían aproximadamente la misma cantidad de clorofila. Los resultados obtenidos (cuadro 15 y fig. 15) nos indican que en todos los casos existe un desprendimiento brusco de oxígeno en los primeros minutos de la reacción; posteriormente el desprendimiento es más lento, haciéndose menor a medida que aumenta el tiempo transcurrido desde el comienzo de la descomposición del agua oxigenada.

CUADRO 15.—Variación de la actividad catalásica con el tiempo de la determinación y contenido en clorofila.

Curva Núm.	% de clorofila	C. C. DE OXIGENO DESPRENDIDOS A LOS					
		5 ^m	10 ^m	15 ^m	20 ^m	25 ^m	30 ^m
1	73,0	9,6	11,5	12,1	12,4	12,5	12,4
2	72,5	8,8	10,7	11,8	12,1	12,3	12,3
3	60,0	8,5	10,5	11,6	11,9	12,1	12,2
4	58,0	5,9	7,7	8,5	9,0	9,4	9,7
5	47,0	5,6	7,4	8,3	8,8	9,2	9,4
6	31,5	5,0	6,6	7,4	8,0	8,4	8,5
7	20,0	4,1	5,3	5,8	6,0	6,2	6,5
8	19,0	3,0	4,4	5,0	5,4	5,6	5,7
9	20,8	2,7	4,0	4,7	5,1	5,3	5,4
10	10,0	2,3	3,4	4,0	4,1	4,4	4,6

En el cuadro 15 se observa también que la actividad catalásica es menor en las hojas que presentan un grado más avanzado de clorosis, o sea con un contenido menor en clorofila.

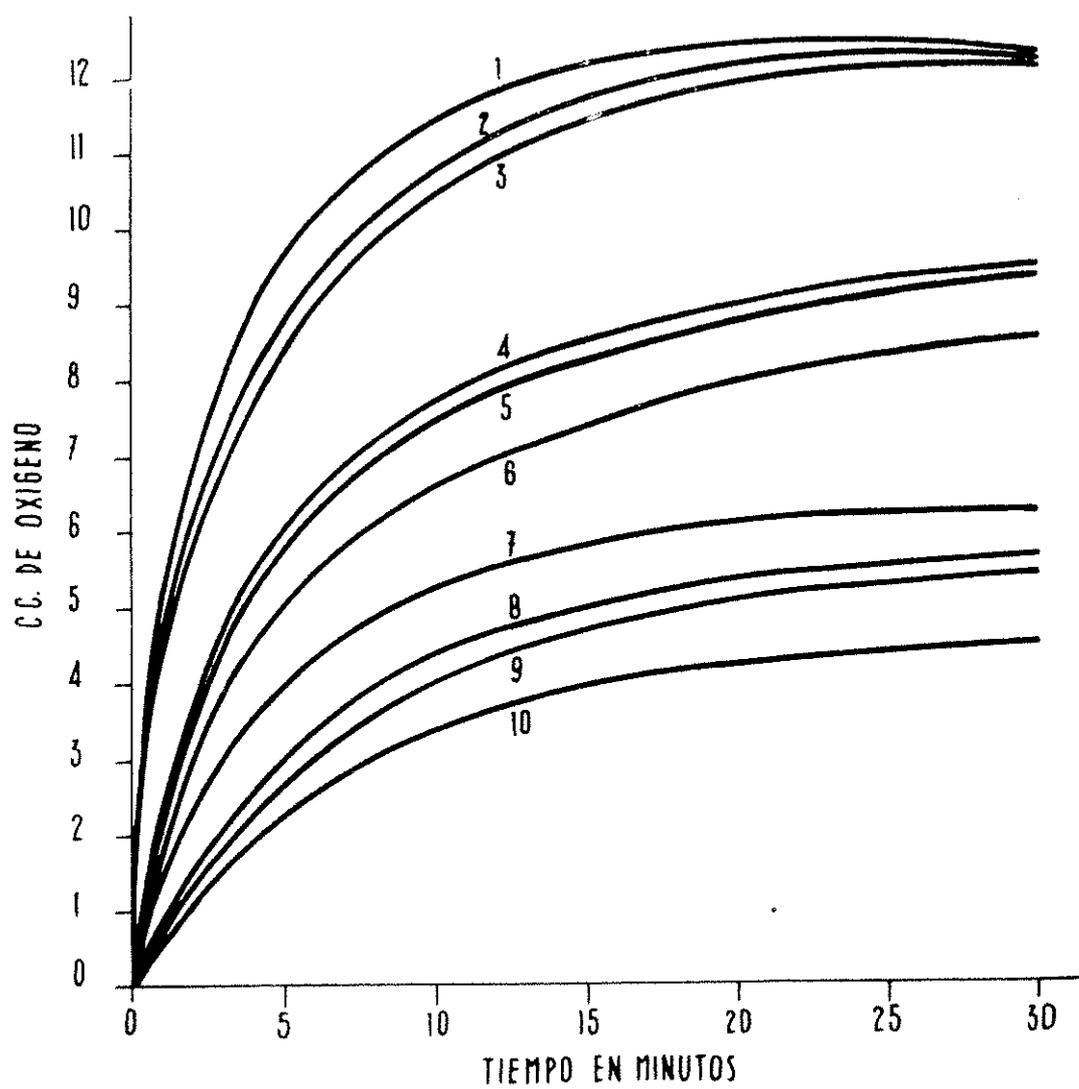


Fig. 15.- Variación de la actividad catalásica con el tiempo de la determinación y contenido en clorofila.

yección. En tiempos menores de acción del sulfato ferroso hay una diferencia en el contenido en clorofila entre las hojas inyectadas y sin inyectar, no comprobable por observación visual.

En el membrillero (cuadro 19) el aumento brusco se presenta a las 120 horas, e igualmente en el peral (cuadro 20).

CUADRO 19.—*Variación del contenido en clorofila en hojas de membrillero con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.*

Horas transcurridas desde el tratamiento	Respuesta visual	H O J A S	
		Tratadas	Sin tratar
24	—	32,8	34,5
48	—	35,2	35,0
72	—	37,8	34,7
96	?	42,6	38,2
120	+	52,6	35,8
144	+	60,0	33,0
168	+	66,8	32,5
192	+	59,0	30,0

CUADRO 20.—*Variación del contenido en clorofila en hojas de peral con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.*

Horas transcurridas desde el tratamiento	Respuesta visual	H O J A S	
		Tratadas	Sin tratar
24	—	18,8	17,4
48	?	20,7	16,1
72	—	27,0	26,0
96	—	20,2	18,0
120	+	32,8	23,8
144	+	32,0	20,2
168	+	25,8	20,4
192	+	32,0	24,0

Los contenidos en clorofila y demás componentes estudiados no son iguales en todas las muestras testigo analizadas, puesto que el material empleado en cada una de las determinaciones no procedía de una misma planta.

ACTIVIDAD CATALÁSICA

Los valores absolutos de la actividad catalásica de las hojas de melocotonero (cuadro 21 y fig. 17) y membrillero inyectadas, son ya mayores que las de las testigo a las veinticuatro horas de realizado el tratamiento; la diferencia en el peral aparece a las cuarenta y ocho

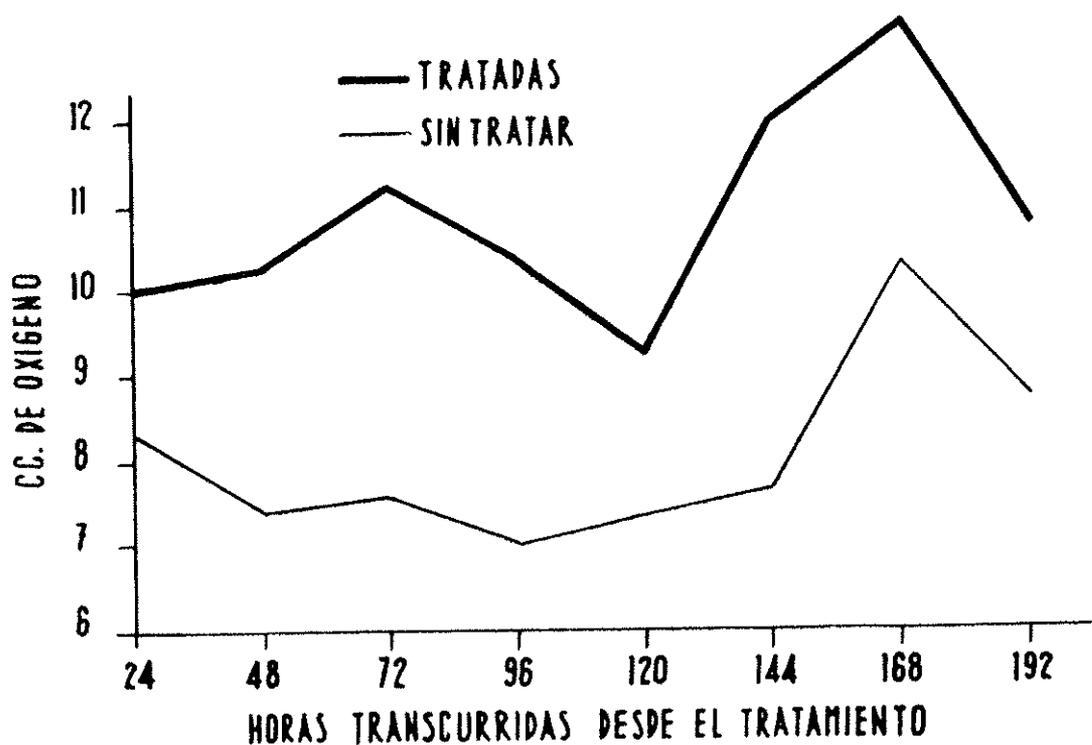


Fig. 17. Variación de la actividad catalásica en hojas de melocotonero con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

horas de la inyección y se mantiene en todos los casos, con fluctuaciones mayores o menores durante el tiempo que ha durado la experiencia.

En la gráfica correspondiente al melocotonero (fig. 17) se observa una disminución brusca de la actividad catalásica en las muestras correspondientes a las hojas que llevan inyectadas 120 horas.

CUADRO 21.—Variación de la actividad catalásica con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

Horas transcurridas desde el tratamiento	MELOCOTONERO		PERAL		MEMBRILLERO	
	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar
24	10,0	8,3	4,9	4,5	7,8	5,8
48	10,3	7,4	6,2	4,0	8,8	6,7
72	11,3	7,6	8,4	6,8	9,1	6,2
96	10,4	6,9	6,5	4,7	9,8	6,5
120	9,3	7,4	7,5	6,2	8,9	6,4
144	12,0	7,6	7,4	5,1	10,8	5,9
168	13,2	10,4	6,9	5,1	11,4	6,2
192	10,8	8,7	9,3	6,7	9,8	5,4

Las cifras indicadas en este cuadro corresponden a c. c. de oxígeno desprendido.

CUADRO 22.—Variación del valor «R» con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

Horas transcurridas desde el tratamiento	MELOCOTONERO		PERAL		MEMBRILLERO	
	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar
24	0,25	0,20	0,26	0,26	0,24	0,17
48	0,24	0,18	0,30	0,25	0,25	0,19
72	0,24	0,19	0,31	0,26	0,24	0,18
96	0,21	0,18	0,32	0,26	0,23	0,17
120	0,15	0,16	0,23	0,26	0,17	0,18
144	0,20	0,20	0,23	0,25	0,18	0,18
168	0,19	0,20	0,27	0,25	0,17	0,19
192	0,16	0,19	0,29	0,28	0,16	0,18

La figura 18 da idea más clara del fenómeno; en ella se han representado los valores de R dados en el cuadro 22. R representa el valor de la actividad catalásica relacionado con la unidad % de clorofila; esto es:

$$R = \frac{\text{c. c. de O}_2 \text{ desprendidos}}{\% \text{ de clorofila}}$$

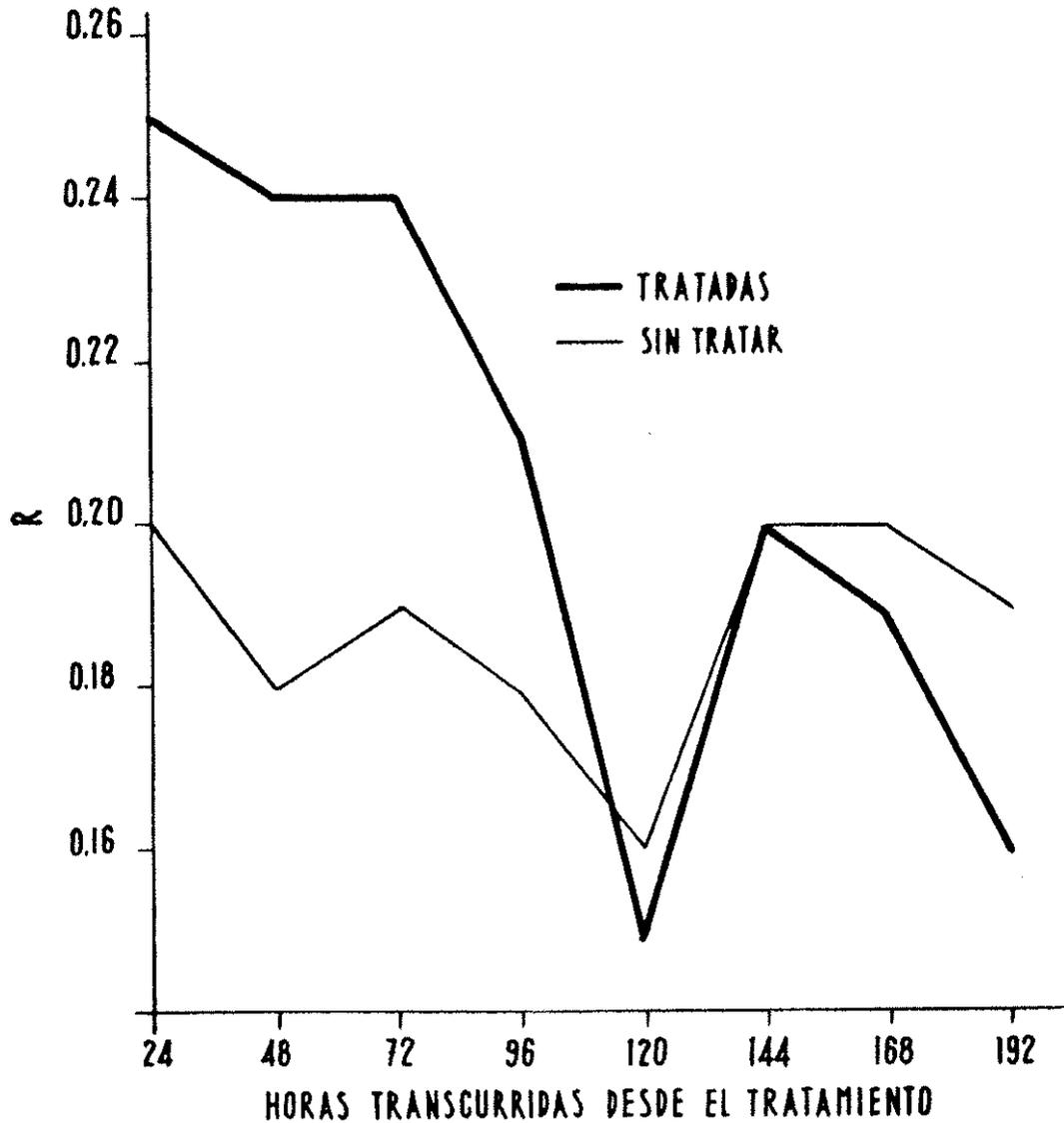


Fig. 18.—Variación de R, en hojas de melocotonero, con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

El valor de R es mayor en las hojas inyectadas a las 24 horas de realizada la inyección, excepto para el peral; en el melocotonero, hasta las 72 horas, las hojas tratadas presentan valores de R más elevados; entre las 72 y 96 horas se observa un descenso, que es más brusco entre las 96 y 120 horas; a partir de las 120 horas, los valores de R son prácticamente iguales para el material tratado y sin tratar. En el peral y membrillero el descenso brusco del valor de R corresponde al período 96-120 horas.

Las variaciones observadas de la actividad catalásica y del valor de R, podrían atribuirse directamente al sulfato ferroso inyectado, ya que las sales ferrosas y férricas poseen la facultad de funcionar como catalasas en ciertas condiciones del medio, pH especialmente. Pero sólo cuando el hierro inorgánico se introduce en un anillo porfirínico es cuando aumenta sus propiedades catalásicas. La porfirina de hierro es 10^3 veces más activa que las sales de hierro, y la catalasa, 10^6 veces más activa que aquéllas (STERN, 1942).

La actividad catalásica del sulfato de hierro inyectado es despreciable; en efecto: a distintas porciones, de 4 c. c. cada una, de una misma suspensión encimática, cuya actividad catalásica se determinó, le añadimos cantidades crecientes de la solución de sulfato ferroso empleada para las inyecciones. Los resultados obtenidos (media de tres determinaciones) se indican en el cuadro 23.

CUADRO 23.—*Variación de la actividad catalásica con la cantidad de sulfato ferroso.*

c. c. de solución 0,01 N de FeSO_4 añadidos	c. c. de oxígeno desprendidos
0,00	4,9
0,05	4,8
0,10	5,0
0,15	4,8
0,20	5,1
0,50	5,6

Solamente para una adicción de 0,50 c. c. de solución de sulfato ferroso a 4 c. c. de la suspensión encimática, se observa una variación en la actividad catalásica.

Para preparar la suspensión encimática se empleó un gramo de hojas, diluyendo a 200 c. c., después de formar con ellas una pulpa; por lo tanto, en esta experiencia se tomó una cantidad, 4 c. c. de la suspensión, que corresponde a 0,02 gramos de hojas; y estos 0,02 gramos de hojas inyectadas, suponiendo que todo el líquido colocado en los tres tubos de inyección se hubiese absorbido a las veinticuatro horas y que todo el líquido absorbido se hubiese trasladado a las hojas sin quedar nada en ramas ni peciolo, contendrían aproximadamente 0,0125 c. c. de la solución de sulfato ferroso, cantidad que no modifica la actividad catalásica según los datos indicados en el cuadro 23.

HIERRO TOTAL

Los valores más altos correspondientes al hierro total de las hojas tratadas reflejan el influjo de la inyección en todos los casos (cuadro 24 y fig. 19). La diferencia existente en el contenido en hierro entre el material inyectado y sin inyectar, representa la cantidad de hierro introducida por la inyección.

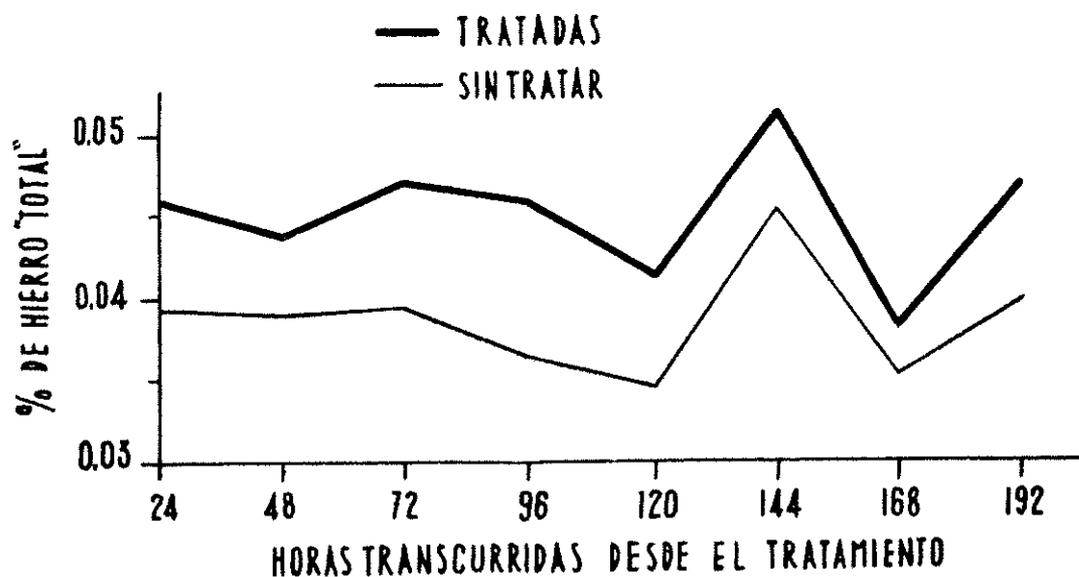


Fig. 19.—Variación del contenido en hierro total, en hojas de melocotonero, con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

CUADRO 24.—Variación en el contenido en hierro total con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

Horas transcurridas desde el tratamiento	MELOCOTONERO		PERAL		MEMBRILLERO	
	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar
24	0,0456	0,0392	0,0455	0,0348	0,0370	0,0300
48	0,0436	0,0378	0,0434	0,0368	0,0504	0,0438
72	0,0470	0,0397	0,0438	0,0336	0,0551	0,0484
96	0,0463	0,0362	0,0473	0,0366	0,0436	0,0345
120	0,0416	0,0347	0,0378	0,0312	0,0490	0,0438
144	0,0515	0,0452	0,0481	0,0406	0,0621	0,0556
168	0,0384	0,0355	0,0484	0,0401	0,0561	0,0475
192	0,0471	0,0401	0,0432	0,0371	0,0351	0,0465

Las cifras indicadas en este cuadro están referidas a tanto por ciento de material seco.

CUADRO 25.—Variación en el contenido en hierro «soluble» con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

Horas transcurridas desde el tratamiento	MELOCOTONERO		PERAL		MEMBRILLERO	
	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar
24	0,0100	0,0059	0,0125	0,0070	0,0120	0,0078
48	0,0102	0,0070	0,0085	0,0044	0,0119	0,0070
72	0,0123	0,0081	0,0109	0,0040	0,0113	0,0075
96	0,0123	0,0075	0,0103	0,0046	0,0108	0,0056
120	0,0121	0,0080	0,0101	0,0047	0,0107	0,0062
144	0,0100	0,0050	0,0076	0,0036	0,0113	0,0074
168	0,0096	0,0075	0,0097	0,0045	0,0104	0,0050
192	0,0100	0,0068	0,0124	0,0053	0,0109	0,0064

Estos valores se refieren a % de material seco.

HIERRO «SOLUBLE»

La figura 20, construída con los valores dados en el cuadro 25, representa los contenidos de hierro, extraído con ClH 1N, de las hojas tratadas y sin tratar; los valores correspondientes a las primeras son mayores en todo momento y en todas las muestras.

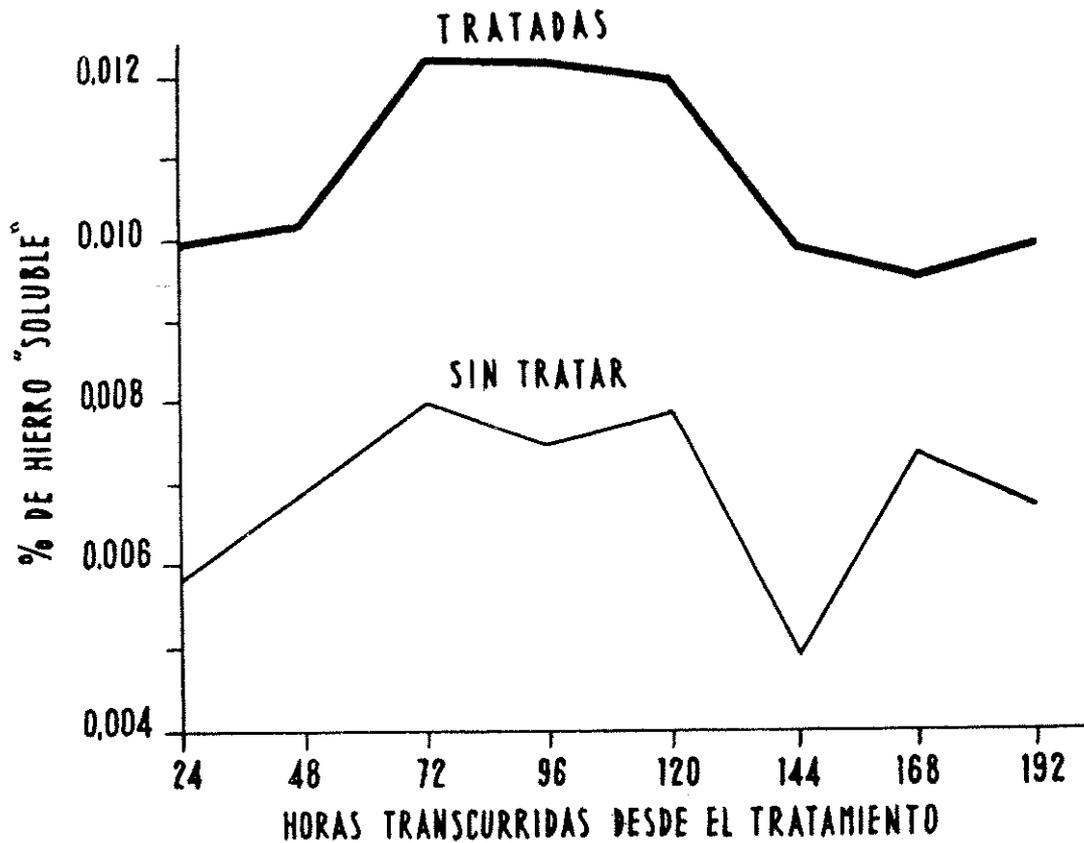


Fig. 20.—Variación del contenido en hierro «soluble», en hojas de melocotonero, con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

RELACIÓN «HIERRO SOLUBLE/TOTAL»

El clorhídrico 1N extrae solamente una parte del hierro introducido en la planta por la inyección, parte representada por la diferencia entre el contenido de hojas tratadas y sin tratar.

En el cuadro 26 se observa un valor máximo de esta relación a las 120 horas en peral y membrillero, y a las 144 horas en el melocotonero.

CUADRO 26.—Variación de la relación «hierro total/hierro soluble» con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

Horas transcurridas desde el tratamiento	Melocotonero	Peral	Membrillero
24	0,64	0 52	0.60
48	0,55	0,62	0,74
72	0,57	0 67	0,57
96	0,47	0,53	0 47
120	0,59	0,81	0 86
144	0,87	0,53	0,60
168	0,63	0,63	0 62
192	0,45	—	0,68

FÓSFORO

Los contenidos en fósforo de las hojas inyectadas y de sus homólogas sin inyectar (cuadro 27 y fig. 21) muestran diferencias despreciables en general. Únicamente en las determinaciones correspondientes a las 144 horas en el melocotonero, y 72 y 96 en el peral, existe una diferencia entre las dos clases de material.

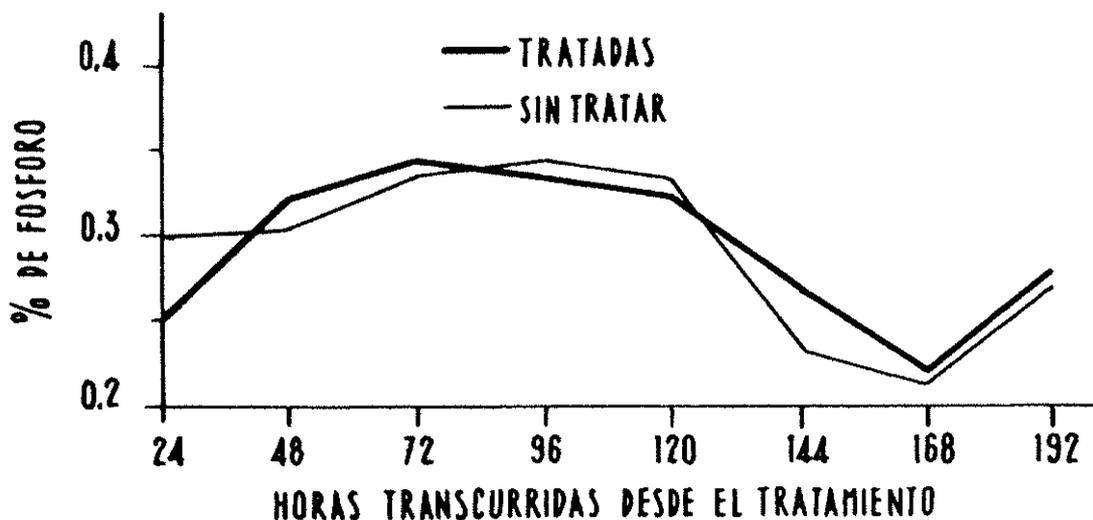


Fig. 21.—Variación del contenido en fósforo, en hojas de melocotonero, con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

POTASIO

En peral y membrillero el contenido en potasio de las hojas inyectadas es aproximadamente el mismo hasta las 96 horas; en el melocotonero (cuadro 28 y fig. 22) la constancia se mantiene hasta las 72 horas. A partir de este momento el contenido en potasio de las hojas tratadas disminuye, tendiendo, por lo tanto, a normalizarse, ya que las hojas cloróticas (testigos) contienen un exceso de potasio (pág. 222 y 225).

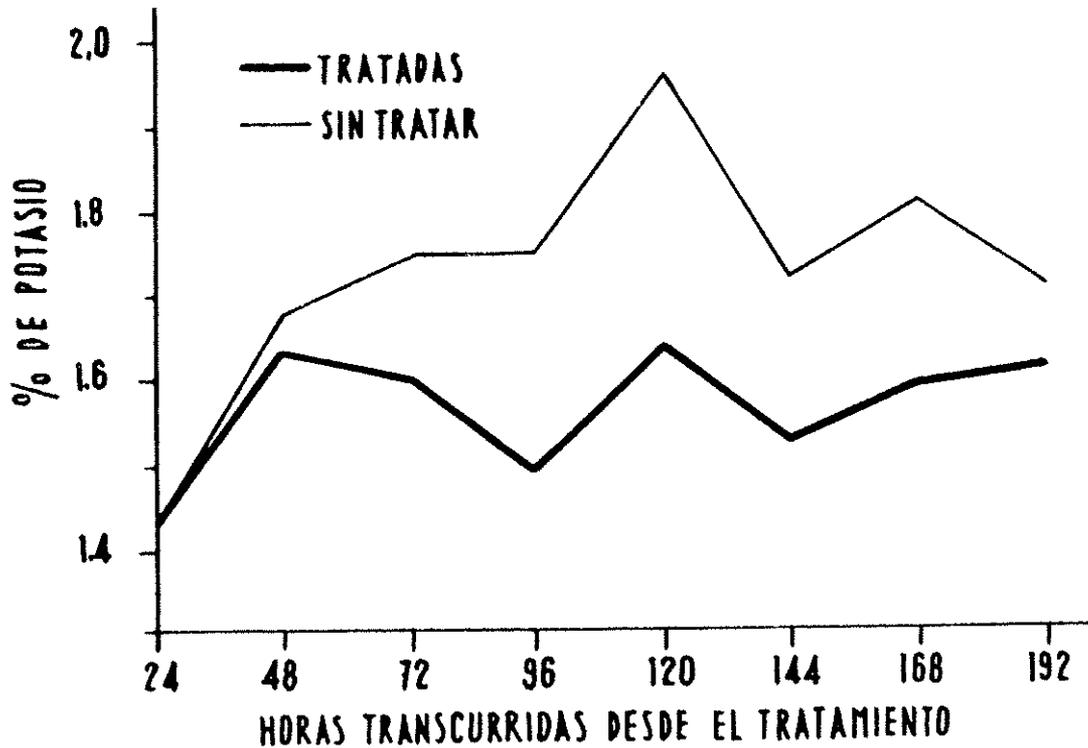


Fig. 22.—Variación del contenido en potasio, en hojas de melocotonero, con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

CUADRO 27.—Variación en el contenido en fósforo con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

Horas transcurridas desde el tratamiento	MELOCOTONERO		PERAL		MEMBRILLERO	
	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar
	24	0,262	0,300	0,245	0,227	0,227
48	0,330	0,303	0,262	0,284	0,195	0,223
72	0,347	0,347	0,175	0,176	0,219	0,191
96	0,344	0,345	0,276	0,268	0,311	0,241
120	0,328	0,334	0,282	0,269	0,221	0,218
144	0,273	0,232	0,245	0,261	0,179	0,200
168	0,222	0,217	0,146	0,135	0,221	0,223
192	0,284	0,280	0,185	0,174	0,143	0,134

Las cifras indicadas en este cuadro están expresadas en % de materia seca.

CUADRO 28.—Variación en el contenido en potasio con el tiempo transcurrido desde el tratamiento.

Horas transcurridas desde el tratamiento	MELOCOTONERO		PERAL		MEMBRILLERO	
	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar	Tratadas	Sin tratar
	24	1,43	1,43	1,39	1,43	1,33
48	1,63	1,67	1,48	1,44	1,16	1,18
72	1,61	1,74	1,29	1,34	1,39	1,41
96	1,49	1,74	1,11	1,38	1,14	1,30
120	1,63	1,96	1,27	1,40	1,28	1,40
144	1,53	1,71	1,17	1,49	1,16	1,28
168	1,78	1,80	1,15	1,26	1,34	1,38
196	1,60	1,70	1,21	1,36	1,22	1,40

Los valores indicados en este cuadro están referidos a % de materia seca.

IV. DISCUSION

En plantas cloróticas el efecto del sulfato ferroso en la formación de clorofila está plenamente establecido y los resultados obtenidos en este trabajo (pág. 239) corroboran, en primer lugar, los aumentos del contenido en clorofila como consecuencia de aquella influencia. La respuesta clara visual al aporte de sulfato ferroso corresponde a un aumento brusco de clorofila que se produce a las 120 horas de realizar el tratamiento en el peral y membrillero, y a las 96 horas en el melocotonero.

La influencia del sulfato ferroso inyectado repercute, sin embargo, antes en el aumento de la actividad catalásica. En efecto: los valores absolutos de la actividad catalásica de las hojas inyectadas son mayores que los de las testigo, a las veinticuatro horas de efectuada la inyección (pág. 241). La gráfica correspondiente a estos valores (pág. 241) nos indica que antes de haber comenzado la síntesis de clorofila, a las 120 ó 96 horas, según el frutal, se ha producido un aumento de la actividad catalásica de las hojas inyectadas; a partir de las 120 horas estas hojas contienen más clorofila, y según la relación existente entre pigmento y encima (pág. 231) contienen más catalasa.

Una idea del curso de la actividad de la encima, independiente del de la clorofila, en las 196 horas que han durado nuestras experiencias, podemos obtenerla con la gráfica de la actividad catalásica relacionada con la unidad por ciento de clorofila; esto es, con el valor que hemos llamado R (pág. 243).

Si se estudian comparativamente las variaciones de R y las del contenido en clorofila, se llega a la conclusión de que las disminuciones de R se producen al mismo tiempo que los aumentos en clorofila; esto nos conduce a admitir una estrecha relación entre la síntesis del pigmento y de la encima.

Esta consecuencia a la que nos han llevado nuestras experiencias puede explicarse según la idea de GRANICK (GRANICK, 1948, *a* y *b*, 1951, GRANICK y GILDER, 1946), que supone que la síntesis de la encima tiene un curso común con la del pigmento hasta llegar a la formación de la protoporfirina de hierro 9, bifurcándose posteriormente en dos caminos distintos: formación de clorofila y de catalasa.

La deficiencia inducida de hierro acompañada de baja actividad catalásica puede explicarse por la falta de grupos protoporfirínicos, lo que repercutiría tanto en la síntesis de clorofila como en la de catalasa; al inyectar sulfato ferroso se aporta al sistema el elemento que faltaba para una producción normal de aquéllos, y con el aumento se normaliza la síntesis de los dos productos finales.

Se ha sugerido la hipótesis de la inactivación del sistema enzimático responsable de la formación de la molécula de clorofila (LINDNER y HARLEY, 1944), por desplazamiento del hierro por el potasio;

pero, según nuestros resultados, no creemos que esto pueda explicar la baja actividad catalásica que presentan las hojas cloróticas. En efecto: si la cantidad de hierro introducida por la inyección es suficiente para desplazar el potasio del compuesto que hubiese formado con alguno de los precursores de la catalasa, el aumento brusco de la actividad catalásica observado en nuestro trabajo iría acompañado por una movilización del potasio inmediata a la inyección, tan inmediata como lo era el aumento de la actividad catalásica; esto es, a las veinticuatro horas de efectuado el tratamiento, y, sin embargo, la movilización sólo se produce veinticuatro horas antes de que tenga lugar la síntesis rápida de clorofila, en cualquiera de las plantas estudiadas. Por tanto, es de suponer que si el exceso de potasio actúa bloqueando alguna de las reacciones que conducen a la molécula de clorofila, impida no la formación de la catalasa, sino alguna de las reacciones posteriores y antes de la formación de clorofila.

El hecho de que el aporte de hierro produzca un aumento de la actividad catalásica, parece indicar que en la hoja clorótica *existen los grupos proteicos* característicos, necesarios para la síntesis de la molécula de catalasa; *pero faltan los grupos prostéticos*, que no pueden sintetizarse hasta que no se ha aportado el hierro necesario.

El descenso brusco de la actividad catalásica, o del valor de R, en el momento en que tiene lugar la síntesis rápida de clorofila producida por la inyección de sulfato ferroso, es análogo al observado por APPLEMAN (1952) en plántulas de trigo, correlativo al aumento rápido en el contenido en clorofila producido por iluminación. Los hechos observados por APPLEMAN y los investigados por nosotros pueden explicarse si admitimos un precursor común a la catalasa y a la clorofila (GRANICK, 1951; APPLEMAN, 1952; BERNARD *et al.*, 1953). En sus líneas generales el proceso se verificaría de la manera siguiente: en el período anterior a la síntesis rápida de clorofila, efecto de la inyección de sulfato ferroso, la concentración de los grupos precursores de la molécula del pigmento y de la encima es mayor que la necesaria para una síntesis rápida de catalasa, y suministra los grupos requeridos para la síntesis de clorofila; ésta se va realizando lentamente, equilibrada con la de catalasa, pero cuando se forma de un modo rápido hay un consumo, también rápido, de los grupos precursores tomando los que necesita, después de agotar los libres, de las propias moléculas de catalasa, con lo que disminuye la actividad de ésta.

Ahora bien, no se conoce la relación existente entre actividad catalásica y concentración de catalasa. No es imprescindible admitir que el aumento de la actividad catalásica, observado a las veinticuatro horas, sea debido a un correspondiente incremento en el número de moléculas de catalasa ni tampoco que la disminución de la actividad catalásica que acompaña a la formación rápida de clorofila, sea debida a una disminución de las moléculas de catalasa.

Otra hipótesis para explicar estos hechos observados sería que el hierro, inyectado en forma de sulfato ferroso, aumentase la actividad sin llegar a sintetizar completamente la molécula de catalasa, sino simplemente por acrecentamiento de precursores comunes, que si admitimos como tales a las porfirinas de hierro (GRANICK, 1951) tienen una actividad catalásica apreciable. (La actividad de la catalasa es del orden de 10^6 veces mayor que la de las porfirinas.) Admitiendo esto, el aumento de la actividad catalásica sería producido por la cantidad de porfirinas formadas y su disminución por la desaparición de los grupos porfirínicos necesarios para la síntesis de clorofila. Nuestros datos consignados en los cuadros se refieren a actividad catalásica y no a concentración en catalasa.

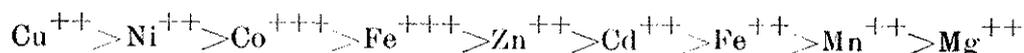
Nos inclinamos a considerar, como APPLEMAN, que hay un equilibrio dinámico entre todas las sustancias que contienen grupos porfirínicos en los cloroplastos. Bajo condiciones normales existirá una relación cuantitativa definida entre clorofila, catalasa y, tal vez, otros eslabones porfirínicos desconocidos en la síntesis de clorofila. En condiciones anormales, falta de luz o de hierro, puede variar aquella relación. Al inyectar hierro, el sistema complejo tiende a restablecer todos los equilibrios que le corresponden al estado de normalidad.

En los casos estudiados por nosotros el hierro es el factor limitante en la formación de la molécula de clorofila. Este hecho se deduce de que el tratamiento con sulfato ferroso daba lugar a la síntesis de clorofila, detenida en las hojas cloróticas. Las consideraciones hechas hasta aquí nos llevan a la conclusión de que si bien el hierro es el factor limitante, parece serlo por intermedio de la catalasa o de algún precursor de la molécula de clorofila.

En los tratamientos con solución de sulfato ferroso la diferencia en el contenido en hierro de hojas inyectadas y de hojas sin inyectar, aun variando dentro de límites muy estrechos, no es la misma en las distintas determinaciones realizadas para un mismo frutal. La falta de regularidad en estas variaciones se debió a que la cantidad de solución introducida en la planta por la inyección no fué la misma en todos los casos: la capacidad de los tubos de inyección y la cantidad de solución colocada en cada uno de ellos fué aproximadamente la misma, pero los factores ambientales que pueden influir en la absorción de la solución no se controlaron.

Por tanto, no todo el hierro que llamamos «total» es activo en la formación de clorofila, sino que para ello necesita estar en una forma que no puede precisarse con los datos obtenidos ni con los existentes en la literatura. Esta forma puede identificarse, sin embargo, con la ferrosa, dada la menor estabilidad de los complejos ferrosos que la de los férricos (GRANICK y GILDER, 1947; HILL, 1949), con lo que es más fácil admitir el desplazamiento del ión ferroso de las protoporfirinas por el magnesio. Otro hecho que parece confirmar esta hipótesis es la influencia de algunos metales pesados en la apa-

rición de la deficiencia inducida de hierro (HEWIT, 1948): el Cd, Cu y Co son muy activos en aquella acción y Ni, Zn, Cr y Mo menos activos y precisamente en este orden; teniendo en cuenta la serie de estabilidad de los complejos organometálicos (IRVING y WILLIAMS, 1948):



estos resultados se explican mejor si se admite que el hierro ferroso es el activo en la síntesis de la molécula de clorofila.

El que todo el hierro contenido en la planta no sea activo en la formación de la molécula de clorofila presupone una inactivación de parte de aquel elemento. Dado lo expuesto anteriormente, esta inactivación puede ser debida a dos causas: un desplazamiento del hierro de las moléculas precursoras de la clorofila, o bien un paso de hierro ferroso a hierro férrico.

Posiblemente la causa principal de la inactivación está asociada con el contenido en carbonato cálcico de los suelos; este compuesto actúa como amortiguador, y sus propiedades como tal, dependen del tamaño de la partícula, de la cantidad de materia coloidal y de la humedad presente, factores que se han estudiado ya en relación con la inmovilización del hierro (HUBERTY y HAAS, 1940; BUCHER y WILLIAMS, 1936).

Las características del suelo debidas al carbonato cálcico, modifican las condiciones en el interior de la planta, produciendo la inmovilización o inactivación del hierro. En relación con esto, REDISKE y BIDDULPH (1950), empleando hierro radioactivo, han estudiado la movilidad del hierro en el interior de la planta con diferentes condiciones de medio de cultivo; cuando éste tiene un pH inferior a 7, la distribución del hierro es rápida y por igual en todas las hojas, pero si el pH es más alto, las condiciones en el interior de la planta se modifican produciéndose una rápida inmovilización.

Las características de los suelos en los que crecía el material clorótico empleado en nuestras experiencias son muy adecuadas para la inmovilización del hierro: pH elevados, contenidos altos en carbonato cálcico total y activo (relacionado éste con el tamaño de la partícula) y pobreza en materia orgánica.

En la nutrición de la planta existe un equilibrio dinámico en los tejidos entre las varias formas de hierro: hierro iónico y complejos orgánicos e inorgánicos; además, se puede suponer un equilibrio entre los dos estados de oxidación del hierro. Cuando la planta está en condiciones inadecuadas de nutrición, por falta de hierro, se rompen los equilibrios existentes. Al restablecer las condiciones de normalidad, por tratamiento con sulfato ferroso, se inicia el restablecimiento de los equilibrios, pero hasta que éstos se consigan es posible que las cantidades de los distintos componentes sufran amplias variaciones, siendo ésta la causa de la disparidad de los datos existen-

tes en la bibliografía y de algunos resultados aparentemente contradictorios encontrados en nuestras experiencias.

Los contenidos en magnesio soluble y total de las hojas inyectadas (verdes) son prácticamente análogos a los de las hojas sin inyectar (cloróticas) (pág. 223). Los resultados obtenidos sitúan este elemento al margen de las perturbaciones en los fenómenos que acompañan a la síntesis de la molécula de clorofila en la deficiencia inducida de hierro; por ello no incluimos este elemento en el estudio de la variación de los componentes de la planta con el tiempo transcurrido desde el tratamiento con sulfato ferroso.

El metabolismo del fósforo soluble está influido por la deficiencia inducida de hierro, como lo muestran los resultados obtenidos (página 221), de los que se deduce que las hojas inyectadas (verdes) contienen una cantidad mayor que las cloróticas (sin inyectar); la diferencia es grande en los primeros meses del ciclo vegetativo, disminuyendo en los últimos en los que se realizaron las experiencias. Para los meses de julio y agosto el contenido en fósforo soluble se iguala prácticamente para ambos materiales; es interesante que precisamente en esta época se observa visualmente una recuperación en el contenido en clorofila de los árboles cloróticos, contenido que tiende a igualarse con el de los árboles verdes.

Las relaciones del fósforo total con el fenómeno de la clorosis son más complejas: sólo en determinadas épocas (meses de marzo, abril, julio, agosto y septiembre) existe una diferencia en el contenido entre el material procedente de árboles tratados y de testigos, siendo mayor en los tratados; en el resto de las determinaciones los contenidos en fósforo total son casi análogos en las dos clases de material. Los resultados obtenidos para las variaciones del contenido en fósforo total con el tiempo transcurrido desde la inyección de sulfato ferroso no aportan mucha luz sobre estas relaciones; las cifras correspondientes a estas determinaciones (página 248) dan valores muy parecidos para hojas inyectadas y sin inyectar. Estos resultados nos indican, sin embargo, que al no existir diferencia, no es admisible que el contenido en fósforo sea causa de la deficiencia inducida de hierro; más bien parece que las variaciones en el metabolismo de este elemento sean un efecto de ella.

El contenido en potasio, soluble y total, es siempre mayor en las hojas sin inyectar, cloróticas (páginas 222 y 225); estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores (ILJIN, 1952; LINDNER y HARLEY, 1944). Esto significa que las hojas cloróticas presentan un exceso de potasio, exceso que ya hemos indicado era difícil de relacionar con la síntesis de clorofila y con el sistema encimático.

En las gráficas correspondientes a los contenidos en potasio total (pág. 225) y soluble (pág. 222) se observa una tendencia a igualarse los contenidos de las hojas inyectadas y sin inyectar hacia finales del ciclo vegetativo. Esto podría relacionarse, como en el caso del

fósforo, con la observación visual de una recuperación en clorofila de los árboles deficientes, que, en esta época, tiende a igualarse con el contenido de los inyectados. Las máximas diferencias de potasio total, entre el contenido de hojas inyectadas y cloróticas, corresponden a las épocas en que la síntesis de clorofila se encuentra más restringida por causa de la deficiencia de hierro; también las diferencias en el contenido en potasio soluble entre los dos materiales son máximas en las épocas de máxima clorosis.

Por estos datos se deduce que el metabolismo del potasio está íntimamente relacionado con la deficiencia de hierro y, por lo tanto, con la síntesis de la molécula de clorofila. La clase de relación y su posible explicación se han dado en la página .

La clorosis producida por deficiencia inducida de hierro es un complicado proceso que será preciso investigar profundamente para explicar la mayoría de los puntos relacionados con su fisiología.

V. CONCLUSIONES

1.^a En la deficiencia inducida de hierro en frutales, el balance del hierro «soluble» (extractable con ClH 1 N) indica la influencia preferente de éste en la formación de clorofila.

2.^a Los valores de la actividad catalásica y de la relación «cc. de oxígeno desprendidos/% de clorofila» son menores en las hojas cloróticas que en las que se ha regulado la síntesis de clorofila por tratamiento con sulfato ferroso (solución al 0,025%).

3.^a El tratamiento con sulfato ferroso produce incremento de la actividad catalásica.

4.^a El aumento de la actividad catalásica en el material clorótico tratado con sulfato ferroso precede al aumento del contenido en clorofila.

5.^a El aumento del contenido en clorofila coincide con una disminución del valor de la relación «cc. de oxígeno desprendidos/% de clorofila».

6.^a Las hojas cloróticas contienen más potasio que las tratadas con sulfato ferroso. Antes de que aumente el contenido en clorofila, hay una disminución del contenido en potasio de las hojas tratadas con solución de sulfato ferroso.

7.^a El contenido en fósforo soluble es más alto en las hojas tratadas con sulfato ferroso. El aumento del contenido en clorofila no va acompañado de una variación en el contenido de fósforo de las hojas tratadas con solución de sulfato ferroso.

8.^a El contenido en magnesio no presenta diferencia apreciable entre las hojas cloróticas y las tratadas con sulfato ferroso.

RESUMEN

Se estudia el problema de la deficiencia de hierro en algunos frutales, inyectando hierro al sistema, en forma de sulfato ferroso y analizando, en las hojas, las repercusiones sufridas en el balance en hierro total, hierro «soluble», contenido en clorofila, actividad catalásica y contenido en varios nutrientes minerales (K, Mg y P).

Se discute la influencia destacada del hierro «soluble». Relacionando la actividad catalásica con el contenido en clorofila, se encuentra una estrecha relación entre la síntesis del pigmento y la de la catalasa. Parece ser que el metabolismo del potasio esté relacionado con la síntesis de la molécula de clorofila, y que las anomalías encontradas en el contenido en fósforo de las hojas cloróticas sean consecuencia y no causa de la clorosis.

SUMMARY

(CHLOROPHYLL SYNTHESIS IN INDUCED IRON DEFICIENCY)

A study is carried out on induced Fe-deficiency in fruit-trees. Fe as ferrous sulphate was injected into the trees and its effects were studied in the leaf system. Modifications in contents of total Fe, soluble Fe, chlorophyll, catalase activity and various mineral nutrients (K, Mg, P) are described.

The striking influence of soluble Fe in the formation of chlorophyll is discussed. A close correlation between the synthesis of the catalase and that of the chlorophyll was found.

K-metabolism is presumably connected with the synthesis of the chlorophyll molecule. The abnormalities in P-contents observed in chlorotic leaves, are probably a consequence, and not a cause, of the chlorosis itself.

REFERENCIAS

- ABADIA, A.
1952 Deficiencia inducida de hierro en frutales.—*An. Inst. Edaf. y Fis. Veg.*, **11**: 641-651.
- AMBRIDGE, G.
1949 Hunger signs in crops. The National Fertilizers Association. Washington.
- APPLEMAN, D.
1952 Catalase-chlorophyll relationship in barley seedling.—*Plant. Physiol.*, **27**: 613-622.
- BEHRENS, W. U.
1952 Der Einfluss der Phosphorsäure auf den Stoffumsatz junger Haferpflanzen.—*Ztschr. Pflanzenern.*, **56**: 80-90.
- BENNET, J. P.
1945 Iron in leaves.—*Soil. Sci.*, **60**: 91-105.

- BERNARD, J., FINKLE, H., and APPLEMAN, D.
 1953 The effect of magnesium concentration on chlorophyll and catalase development in *Chlorella*.—*Plant. Physiol.*, **28**: 652-664.
- BIDDULPH, Q.
 1948 Interrelations between iron and phosphorus in plant nutrition.—*Ore. St. Coll. Corralis Collochim. Nutrition*, 24-27.
- BOUSSINGAULT, D.
 1874 *Agronomie*. Vol. 5, 2.^e ed.
- BRADFORD, H. V., et al.
 1949 The problem of selecting uniform sample of leaves.—*Plant. Physiol.*, **24**: 335-344.
- BROWN, J. C., and ENDRICKS, S. B.
 1952 Enzymatic activities as indications of copper and iron deficiencies in plants.—*Plant Physiol.*, **27**: 651-660.
- BUCHER, T. F., and WILLIAMS, J. A.
 1936 The hydrolysis calcium carbonate and its relation to the alkalinity of calcareous soils.—*Arizona Agr. Exp. St. Techn. Bull.*, 64.
- CHILEAN NITRATE EDUCATIONAL BUREAU
 1946 y 1951 Bibliography of the literature on the minor elements and their relation to plant and animal nutrition. Vol. I y II. New York.
- DROINEAU, G., et COUNGY, P.
 1946 Contribution a l'étude de la catalase des tissus foliaires.—*Ann. Agr.*, **16**: 34-50.
- EULER, H. V.; GARD, M., und RISLUND, G.
 1931 Katalase und Zuckerbestimmungen in chlorophylldefekten Pflanzen.—*Zschr., für Physiol. Chemie*, **203**: 165.
- GILE, P. L., and CARRERO, J. O.
 1916 Assimilation of iron by rice from certain nutrient solutions.—*J. Agr. Research*, **7**: 503-528.
 1920 Causes of lime induced chlorosis and availability of iron in soil.—*J. Agr. Research*, **20**: 33-62.
- GRANICK, S.
 1948 a Protoporphyrin-9 as a precursor of chlorophyll. *J. Biol. Chem.*, **172**: 717-27.
 1948 b Magnesium protoporphyrin as a precursor of chlorophyll in *Chlorella*. *J. Biol. Chem.*, **175**: 333-342.
 1951 Biosynthesis of chlorophyll and related pigments.—*Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **2**: 115-145.
- GRANICK, S., and GILDER, H.
 1946 The porphyrin requirements of *Haemophylius influenzae* and some functions of the vinyl and propionic acid side chains of heme.—*J. Gen. Physiol.*, **2**: 115-145.
 1947 Distribution, structure and properties of the tetrapyrroles.—*Advances in enzymology*, **7**: 305-364.
- GRISS, E.
 1843 a De l'action des composés ferrugineux solubles appliqués a la vegetation et specialment en traitement de la chlorose et de la debilité des plantes.—*Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)*, **17**: 679.
 1843 b De l'action des compositions ferrugineuses sur la vegetation.—*Ann. Chim. Phys. Sc.*, **4**, **7**: 21.
- GOODALL, D. W., and GREGORY, F. G.
 1947 Chemical composition of plants as an index of their nutritional status.—*Imp. B. Hort. and Plant Crops. London. Tech. Comm.*, 17.
- HEWIT, E. J.
 1948 Relation to manganese and some other metals to the iron status of plants.—*Nature*, **161**: 489-490.
- HEWIT, E. J., and BOLLE-JONES, E. W.
 1953 Studies in iron deficiency of crops. II: The interrelationships of iron and potassium in the potato plant.—*Jour. Pomol. and Hort. Sci.*, **28**: 185-196.

- HILL, H.
1949 Trace elements in relation to enzymes.—*Brit. Comm. Sci. Plant Nutrition, Australia*.
- HOPKINS, E. F.
1930 Iron-ion concentration in relation to growth and other biological processes.—*Bot. Gaz.*, **89**: 209-240.
- HORST, L.
1947 A quantitative chemical investigation of the iron in the chloroplasts and other cell components of *Spinacia oleracea*.—*Z. Botan.*, **37**: 129-157.
- HUBERTY, M. R., and HAAS, A. R.
1940 The pH of soils as affected by soil moisture and other factors.—*Soil Sci.*, **49**: 455-78.
- HUNTER, J.
1950 Analytical technique for assensing the nutrient status of plants.—*The Macaulay Inst. for Soil Research*. Comunicación personal.
- ILJIN, W. S.
1951 a Metabolism of plant affected with lime-induced chlorosis. I: Nitrogen metabolism.—*Plant and Soil*, **3**: 239-256.
1951 b Metabolism of plants affected with lime-induced chlorosis. II: Organic acids and carbohydrates.—*Plant and Soil*, **3**: 339-351.
1952 Metabolism of plants affected with lime-induced chlorosis (calciose). III: Mineral elements.—*Plant and Soil*, **4**: 11-28.
- IRVING, H., and WILLIAMS, R.
1948 Order of stability of metal complexes.—*Nature*, **162**: 746-747.
- JACOBSON, L.
1945 Iron in the leaves and chloroplasts of some plants in relation to their chlorophyll content.—*Plant Physiol.*, **20**: 233-245.
- KIRCHHOF, F. F.
1944 The role of chemical elements concerned in life processes.—*Chem. Ztg.*, **68**: 10-11.
- KITCHEN, H. B.
1949 Diagnostic techniques for soils and crops. The American Potash Institute. Washington.
- LINDNER, R. C., and HARLEY, C. P.
1944 Nutrient interrelations in lime induced chlorosis.—*Plant Physiol.*, **19**: 420-440.
- LINDNER, R. C., KIRKPATRICK, H., and WEECKES, T. E.
1950 A simple staining technique for detecting virus disease in some woody plants.—*Science*, **112**: 119.
- LUNT, A. H., et al.
1950 The Morgan Soil testing system.—*Connecticut Agr. Exp. Stat. Bull.*, 541.
- MACALLUM, A. B.
1895 On the distribution of assimilated iron compounds other than hemoglobin and hematis in animal and vegetable cells.—*Proc. Roy. Soc. London*, **57**: 261-262.
- Mc GEORGE, W. T.
1948 a Nutrient interrelations in lime induced chlorosis as revealed by seedling test and field experiments.—*Arizona Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.*, **116**: 297-338.
1948 b Micro and macro-nutrient interrelations in lime-induced chlorosis.—*Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **13**: 200-204.
1949 Lime induced chlorosis. Relation between active iron and citric and oxalic acids.—*Soil Sci.*, **68**: 381-390.
- MARSH, R. P., and SHIVE, J. W.
1925 Adjustment of iron supply to requirements of soy bean in solution culture.—*Bot. Gaz.*, **79**: 1-28.
- MASON, A. C.
1950 The estimation of iron in plant material.—*Ann. Rep. E. Malling Rs. St.*, 124-127.

- MILAND, Y.
1924 The distribution of iron in chlorotic pear trees. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **21**: 93-98.
- MOLISCH, H.
1923 *Mikrochemie der Pflanze*, 3. Aufl. Gustav Fischer, Jena.
- NICHOLAS, D. J.
1947 Use of chemical tissue tests in diagnostic of the mineral status of plants.—*Intern Congr. Pur. Appl. Chem.*, II B. B. B. III. 127.
- NOACK, K., and LIEBICH, H.
1941 The iron content of the chloroplasts of spinach.—*Naturwiss.*, **29**: 302.
- OSERKOWSKY, J.
1932 Hydrogen-ion concentration and iron content of tracheal sap from green and chlorotic pear trees.—*Plant Physiol.*, **7**: 253-258.
1933 Quantitative relation between chlorophyll and iron in green and chlorotic pear leaves.—*Plant Physiol.*, **8**: 449-468.
- PIPER, C. S.
1950 *Soil and Plant Analysis*. The Waite Agric. Res. Inst. Adelaide.
- REDISKE, J. H., y BIDDULPH, O.
1950 The absorption and traslocation of iron.—*Plant Physiol.*, **28**: 594-606.
- REED, H. S., and DUFRENOY, J.
1935 The effects of zinc and iron salts on the cell structure of mottled orange leaves.—*Hilgardia*, **9**: 113-141.
- RIPPEL, A.
1923 The iron chlorosis in green plants caused by manganese.—*Biochem. Zeitschr.*, **140**: 315-323.
- ROACH, W. A.
1939 Plant injection as a physiological method.—*Ann of Bot.*, **3**: 155-226.
- ROACH, W. A., and ROBERTS, W. O.
1945 Further work on plant injection for diagnostic and curative purposes. *Imp. B. of Hort. and Plant. Crops. Thech. Comm.*, 16.
- SAYRE, J. D.
1930 Accumulated iron in the nodes of corn plants.—*Plant Physiol.*, **5**: 393-396.
- SCHENK, W.
1952 Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Lichtfeld und chlorophyllgehalt an Sprossrinden und Blättern von Holzgewächsen.—*Planta*, **41**: 290-310.
- SHIVE, J. W.
1941 Significant roles of trace elements in the nutrition of plants.—*Plant Physiol.*, **16**: 435-445.
- SIRONVAL, C.
1935 A propos du metabolisme de la chlorophylle dans la feuille.—*Bull. de la Soc. Roy. de Bot. Belge*, **85**: 285.
- SMITH, P. F. *et al.*
1950 Mineral composition of chlorotic orange leaves and some observations on the relation of sample preparation technique to the interpretation of results.—*Plant. Physiol.*, **25**: 496-505.
- SMITH, P. F., and SPECHT, A. W.
1953 Heavy-metal nutrition and iron chlorosis of citrus seedling.—*Plant Physiol.*, **28**: 371-383.
- STERN, K. G.
1942 *A symposium on respiratory enzymes*. Univ. Wisconsin Press.
- STEWART, I., and LEONARD, C. D.
1952 Chelates as a source of iron for plants growing in the field.—*Science*, **116**: 564-566.
- SUMMER, J. B.
1941 The chemical nature of catalase.—*Advances in enzymology*, 163-177.
- THOMPSON, S. G.
1943 The cure of deficiencies of iron or manganese.—*Ann. Rep. E. Malling Research, St.*

- WALLACE, T., and MANN, C.
 1926 Investigations on chlorosis of fruit trees.—*J. Pomology and Hort. Sci.*,
 2: 115-123.
 1928 Investigations on chlorosis of fruit trees. II: The composition of leaves,
 bark and wood of current season's shoots in cases of lime-induced chlo-
 rosis.—*J. Pomology and Hort. Sci.*, 7: 172-183.
 1951 The diagnosis of mineral deficiencies in plant. London.
 WARBURG, O.
 1925 Iron, the oxygen-carrier of respiration-ferment.—*Science*, 61: 575-582.
 WILLIS, L. G.
 1936 Evidences of the significance of oxidation-reduction equilibrium in soil
 fertility.—*Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 1: 291-297.
 WOLF, J.
 1913 De l'action catalitique du fer dans le developpement de l'orge.—*C. R.*
Acad. Sci. (Paris), 157: 1476-1478.
 YAMAKUJI, K. et al-
 1943 Über Atmung und Katalasewirkung beim Viruskranken Zuckerrohr.—
Biochemische Zeit., 315: 405.

CONTENIDO

I. Introducción	212
II. Material y métodos	215
Toma de muestras	215
Preparación de las muestras	216
Extracciones	216
Determinaciones analíticas	217
Aporte de hierro	219
III. Análisis de resultados	219
Variación de los nutrientes a lo largo del ciclo vegetativo	219
Nutrientes extractables con reactivo Morgan	220
Fósforo	220
Potasio	221
Magnesio	222
Nutrientes totales	223
Fósforo	224
Potasio	225
Magnesio	226
Hierro total	227
Hierro «soluble»	228
Actividad catalásica	229
Variación con el tiempo de almacenamiento de la muestra	229
Variación de la actividad catalásica y contenido en clorofila con la edad y estado de la hoja	231
Variación de la actividad catalásica con el tiempo de la deter- minación y contenido en clorofila	236
Variación de los componentes con el tiempo de acción del sulfato ferroso	238
Contenido en clorofila	239
Actividad catalásica	241
Hierro total	245
Hierro «soluble»	247
Relación «hierro soluble/total»	247
Fósforo	248
Potasio	249
IV. Discusión	251
V. Conclusiones	256
Resumen	257
Summary	257
Referencias	257