

TRABAJOS DE REVISION

ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN C. S. I. C. GRANADA
SECCION DE FISILOGIA VEGETAL

FUNCION DEL HIERRO EN LAS PLANTAS SUPERIORES

por

SANCHEZ-RAYA, ANICETO JUAN y LEAL LOPEZ

INTRODUCCION

El hierro, cuyo carácter de elemento esencial para la vida de los vegetales quedó demostrado hace más de un siglo, ocupa una posición especial entre aquéllos, ya que la cantidad que las plantas necesitan de este catión, es intermedia entre las correspondientes a los macro y micronutrientes. De ahí que haya sido incluido indistintamente en ambos grupos.

La absorción radicular del hierro depende de las circunstancias del medio. Condiciones de pH elevado y aireación suficiente, facilitan el paso de Fe^{++} a Fe^{+++} y posterior insolubilización. Puesto que la forma ferrosa es la más fácilmente absorbible por la planta, es fácil comprender que una alcalinidad elevada pueda dar lugar a una deficiencia en hierro, aunque la cantidad disponible de este elemento sea, aparentemente, suficiente.

De los dos procesos, oxidación e insolubilización, es este último el verdadero responsable de la deficiencia, ya que si el Fe^{+++} permaneciese en solución —caso de los quelatos de hierro— la planta sintetiza sustancias capaces

los suelos alcalinos las plantas sean incapaces de obtener el hierro necesario, a menos que el contenido en materia orgánica y su evolución, proporcionen ácidos húmicos en cantidad suficiente para complejar y, por tanto, solubilizar el hierro imprescindible para la planta (138).

Por otra parte, un exceso en el medio de otros muchos iones metálicos, puede dar lugar a deficiencias de hierro (70, 108).

*REVISION SOBRE EL PAPEL DEL HIERRO EN LA FISIOLOGIA VEGETAL**Distribución del hierro en las plantas.**Efectos de la deficiencia de hierro.*

Síntomas visuales.

Alteraciones citológicas e histológicas.

*Efectos tóxicos del hierro.**Función del hierro en las plantas superiores.*

Anomalías en la formación de cloroplastos.

Interrupción en la síntesis de clorofila.

Aumento en la actividad clorofilasa.

Descenso en el ritmo de asimilación de nitratos.

Excreción de riboflavinas.

Acumulación de aminoácidos y amidas.

Descenso en el contenido de DNA por unidad de proteína.

Detención de la división celular.

Disminución de la intensidad respiratoria.

El hierro en los sistemas enzimáticos.

— El hierro porfirínico.

Citocromos.

Hemoglobina.

Peroxidasas.

Catalasas.

— El hierro no porfirínico.

Flavoproteínas.

Ferredoxinas.

Ferropoteínas no hemínicas ni flavínicas de la cadena respiratoria.

Estabilidad de los componentes de hierro que intervienen en el metabolismo vegetal.

*Ferritinas.**Absorción y transporte del hierro.**Interacción del hierro con los macro y micronutrientes.*

DISTRIBUCION DEL HIERRO EN LAS PLANTAS

El contenido normal de hierro en los tejidos vegetales fluctúa entre las 25 y algo más de 500 p. p. m. (referido al peso seco del tejido), según la parte de la planta que se considere y la especie a que la misma pertenezca (146).

El contenido relativo de hierro en las diferentes partes de la planta depende, no sólo del aporte de este elemento, sino de las condiciones que modifican su absorción. Así, de Kock (49) y Biddulph (15) encuentran plantas cloróticas con una concentración de hierro en sus raíces mayor que la encontrada en plantas normales, atribuyendo el fenómeno a una inmovilización de este catión por los iones fosfato.

En el brote de la planta, Glenister (61), comprobó que las hojas más viejas contienen una cantidad aproximadamente diez veces mayor de hierro que las hojas superiores más jóvenes. De aquí concluye que el hierro no es transferido de unas a otras, por lo que es imprescindible un aporte continuo de este elemento para el desarrollo normal de la planta.

Dentro de una misma hoja, De Kock (49) observó, utilizando Fe^{59} , que los nervios foliares contienen más hierro que las zonas internerviales.

La heterogeneidad en la distribución del hierro, alcanza también a la estructura subcelular del vegetal. Numerosos trabajos sobre la localización del hierro (3, 34, 126, 128, 131, 143, 193, 198), aun llegando a conclusiones muy dispares, están de acuerdo en que la mayor parte del metal que contiene la célula, está localizado en los cloroplastos y plastidios, y, posiblemente, en forma de lipoproteínas (18).

Por otra parte, Possingham y Brown (144), utilizando una técnica autorradiográfica, obtienen pruebas de la acumulación de hierro en el núcleo de las células radicales.

Aunque Liebich (107) había asegurado que la pared celular no contenía hierro en absoluto, Maier y Cattani (115), fraccionando las partículas celulares, demuestran que gran parte del hierro de la planta desempeña funciones estructurales y puede situarse en la pared celular.

EFFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO

La deficiencia de hierro trae como consecuencia una profunda alteración del metabolismo vegetal, que se traduce en modificaciones del aspecto general de la planta y da lugar a síntomas visuales que permiten diagnosticar los estados de carencia. También la estructura íntima resulta afectada, produciéndose una serie de anomalías histológicas y citológicas como consecuencia de

Síntomas visuales.

La sintomatología de la deficiencia en hierro, localizada principalmente en las hojas, se reduce a dos manifestaciones bien delimitadas: clorosis y necrosis.

La clorosis es la falta de formación de clorofila o su destrucción una vez formada. La clorosis debida a la falta de hierro se manifiesta en las áreas internerviales, quedando los tejidos adyacentes a las nerviaciones relativamente verdes, lo que origina un típico reticulado en el que las nerviaciones de cualquier orden conservan su color verde, mientras que el mesofilo va pasando —a medida que se agudiza la clorosis— por tonos verde pálido, verde amarillento, amarillo y —finalmente— blanco. En un estadio posterior, la clorosis afecta también a las nerviaciones, comenzando por las más finas y progresando hasta que todo el limbo foliar pierde el color. Las regiones basales de las nerviaciones laterales y los tejidos adyacentes al nervio principal de la hoja son, con frecuencia, los últimos en manifestar la clorosis, quedando finamente contorneados por estrechos márgenes verdes, hasta resultar totalmente cloróticos.

La clorosis no sólo evoluciona al paso del tiempo, dentro de una misma hoja, sino que también lo hace de forma característica en la planta entera. La aparición de este síntoma tiene lugar sólo en la porción de la planta que se ha desarrollado en condiciones deficientes, es decir, va afectando a las hojas que surgen

medida que la cantidad disponible de este elemento se va haciendo menor, la intensidad del fenómeno va progresando, por lo que las hojas más jóvenes aparecen

en una misma planta todas las fases de la deficiencia, desde hojas completamente normales hasta totalmente cloróticas.

que el reticulado de las nerviaciones, a la distribución del hierro y a su inmovilidad o escasa movilidad, según han demostrado las autorradiografías obtenidas por De Kock (49).

En algunas especies, la clorosis va seguida de la aparición de coloraciones púrpuras en los nervios y pecíolos de las hojas jóvenes y en la epidermis de los tallos, debido a la formación de antocianinas.

En general, no aparece la necrosis en las áreas internerviales, en tanto que la clorosis progresa; sin embargo, en algún caso, puede aparecer este síntoma prematuramente, aunque casi siempre lo hace cuando la clorosis se halla en su última fase. Es éste un punto importante que permite distinguir las deficiencias de hierro y manganeso.

Aparte de la sintomatología general que acabamos de describir, la defi-

ciencia de hierro en el tomate produce algunos síntomas especiales como son, la aparición de áreas internerviales necróticas en cualquier etapa de la deficiencia, aunque con mayor

de la clorofila, la antocianosis que tiñe de púrpura el pecíolo y las nerviaciones de las hojas jóvenes cloróticas, la clorosis es más pronunciada en la región central y basal de las foliolas y, por último, la formación de frutos con colores anaranjados y verdosos al alcanzar la madurez (69).

Alteraciones citológicas e histológicas.

Varios investigadores (144,30) han observado que la deficiencia de hierro determina el cese de las divisiones celulares en los meristemos, continuando aún la expansión celular durante algún tiempo. Parece ser que la concentración

cesaria para la expansión. Estos síntomas desaparecen cuando la planta recibe un suministro suficiente de hierro, reanudando los meristemos su actividad normal. De igual forma, la deficiencia de hierro determina también el cese en la producción de primordios foliares.

La falta de hierro disminuye el tamaño de los cloroplastos (74) y, por ello, las hojas cloróticas adultas no recobran su primitivo color aunque se les suministren sales de hierro, consecuencia del carácter irreversible de los cambios que han sufrido sus cloroplastos, a diferencia de lo que sucede en las hojas jóvenes que se recuperan al cabo de poco tiempo. La destrucción de la clorofila ocurre al mismo tiempo que la desintegración de los cloroplastos.

FUNCION DEL HIERRO EN LAS PLANTAS SUPERIORES

Tanto los síntomas visuales como las alteraciones citológicas e histológicas características de la deficiencia en hierro, son consecuencia de lesiones fisiológicas a que dan lugar los desequilibrios del metabolismo vegetal provocados por la insuficiencia de este elemento.

Los conocimientos actuales sitúan al hierro en el grupo de elementos denominados "cofactores o activadores de sistemas enzimáticos", en los que desempeñan un papel fundamental como grupo activo (129).

En la clasificación propuesta por Thatcher (178), basada en el papel que los elementos esenciales juegan en el metabolismo, el hierro aparece situado en el grupo de los denominados "reguladores de óxido-reducción".

Una información más concreta sobre la función del hierro en la vida vegetal nos la suministra el reconocimiento de los procesos metabólicos

en que interviene, que se pueden deducir de las alteraciones fisiológicas originadas cuando la planta no dispone de este elemento en cantidad suficiente.

Una somera relación de estas lesiones figura en el siguiente esquema:

Anomalías en la formación de cloroplastos.

Aumento de la actividad clorofilasa.

Interrupción en la síntesis de clorofila.

Descenso en el ritmo de asimilación de nitratos.

Excreción de riboflavina.

Acumulación de aminoácidos y amidas.

Descenso en

Detención de la división celular.

Disminución de la intensidad respiratoria.

Anomalías

La deficiencia de hierro conduce, invariablemente, a una reducción del contenido proteico en las hojas (2, 141, 195).

Welkie y Miller (197) han demostrado que las proteínas más afectadas son las del cloroplasto, hecho anteriormente sugerido por Weinstein y Robbins (195) que incluso llegan a afirmar que la clorosis, más que un factor que contribuye al descenso del contenido proteico, es una consecuencia del mismo. Las proteínas del cloroplasto principalmente afectadas por la deficiencia de este elemento, son las estructurales de los grana. Shetty y Miller (159) llegan a la conclusión de que el descenso en el contenido proteico se debe a una disminución en el ritmo de síntesis de proteínas y no a una exaltación de su degradación. En consecuencia, es presumible que la formación de cloroplastos resulte profundamente afectada por la deficiencia de hierro, a través de la síntesis de estas proteínas estructurales.

Interrupción en la síntesis de clorofila.

Otra vía por la que el hierro afecta a la formación de cloroplastos es a través de la síntesis de clorofila. Evans (154) y, posteriormente, De Kock (52), comprueban que tanto la actividad de los hemoenzimas del tejido foliar así como su contenido clorofilico, resultan profundamente afectados por la deficiencia de hierro. Indudablemente, una reducción en la actividad de aquellos enzimas podría afectar a la síntesis de clorofila a través del metabolismo general de la planta; sin embargo, la estrecha correlación existente entre el contenido de clorofila y el de enzimas porfirínicos, sugiere

que la clorosis férrica es consecuencia de la influencia de este elemento en la síntesis de porfirinas.

Marsh y col. (119, 120) pusieron de manifiesto que la porción de la cadena biosintetizante de las porfirinas, que va desde el ALA (ácido-delta-amino levulínico) a la protoporfirina, no resulta afectada en absoluto por la deficiencia de hierro en las plantas superiores, y obtuvieron datos que apoyan la teoría anteriormente establecida (22, 23, 102, 186), según la cual el papel del hierro está localizado en la síntesis del ALA. Una limitación en el ritmo de formación de este precursor de las porfirinas (17), sería la responsable de la estrecha correlación entre el contenido de compuestos hemínicos y el de la clorofila.

Aumento de la actividad clorofilasa.

Bogorad y col. (4), señalan una exaltación de la actividad clorofilasa en el tejido medianamente clorótico, mientras que los de plantas normales y los de plantas padeciendo deficiencia aguda poseen una actividad más débil que aquéllos y muy similar entre sí. A la vista de estos resultados parece lógico pensar que el hierro no influye en la actividad del enzima. Sin embargo, es un hecho comprobado que no sólo la síntesis de clorofila resulta afectada por la deficiencia de hierro, sino también la destrucción de este pigmento.

La clorofila activa por la acción de la luz, es extraordinariamente lábil y necesita ceder un electrón para retornar a su forma estable. Según algunos autores (4, 174), son los carotenoides los que confieren estabilidad a la clorofila y la protegen contra la destrucción fotodinámica. Sin embargo, para otros autores (63) es un compuesto férrico (la ferredoxina) el que, reduciendo la clorofila activa, transforma a ésta en clorofila estable; así se explican los hechos comprobados por Rodríguez y Díez (155), Linschitz (109) y Linschitz y Rennert (110), según los cuales la clorosis férrica puede ser parcialmente aliviada, y por tanto, se produciría un enverdecimiento de las hojas cloróticas, por sombreado, aunque no se modifique el aporte de hierro.

Descenso del ritmo de asimilación de nitratos.

En algunas etapas de la asimilación de los nitratos por las plantas, ha sido palpablemente demostrada la presencia de metaloenzimas que contienen hierro. Así, los componentes metabólicos de la nitrito reductasa, fueron identificados como hierro y cobre (122, 132, 133). Posteriormente, en una etapa discutida de este ciclo, se logra aislar una reductasa del óxido

en que interviene, que se pueden deducir de las alteraciones fisiológicas originadas cuando la planta no dispone de este elemento en cantidad suficiente.

Una somera relación de estas lesiones figura en el siguiente esquema:
Anomalías en la formación de cloroplastos.

Aumento de la actividad clorofilasa.

Interrupción en la síntesis de clorofila.

Descenso en el ritmo de asimilación de nitratos.

Excreción de riboflavina.

Acumulación de aminoácidos y amidas.

Descenso en el contenido de DNA por unidad de proteína.

Detención de la división celular.

Disminución de la intensidad respiratoria.

Anomalías en la formación de cloroplastos.

La deficiencia de hierro conduce, invariablemente, a una reducción del contenido proteico en las hojas (2, 141, 195).

Welkie y Miller (197) han demostrado que las proteínas más afectadas son las del cloroplasto, hecho anteriormente sugerido por Weinstein y Robbins (195) que incluso llegan a afirmar que la clorosis, más que un factor que contribuye al descenso del contenido proteico, es una consecuencia del mismo. Las proteínas del cloroplasto principalmente afectadas por la deficiencia de este elemento, son las estructurales de los grana. Shetty y Miller (159) llegan a la conclusión de que el descenso en el contenido proteico se debe a una disminución en el ritmo de síntesis de proteínas y no a una exaltación de su degradación. En consecuencia, es presumible que la formación de cloroplastos resulte profundamente afectada por la deficiencia de hierro, a través de la síntesis de estas proteínas estructurales.

Interrupción en la síntesis de clorofila.

Otra vía por la que el hierro afecta a la formación de cloroplastos es a través de la síntesis de clorofila. Evans (154) y, posteriormente, De Kock (52) comprueban que tanto la actividad de los hemoenzimas del tejido foliar así como su contenido clorofilico, resultan profundamente afectados por la deficiencia de hierro. Indudablemente, una reducción en la actividad de aquellos enzimas podría afectar a la síntesis de clorofila a través del metabolismo general de la planta; sin embargo, la estrecha correlación existente entre el contenido de clorofila y el de enzimas porfirínicos, sugiere

que la clorosis férrica es consecuencia de la influencia de este elemento en la síntesis de porfirinas.

Marsh y col. (119, 120) pusieron de manifiesto que la porción de la cadena biosintetizante de las porfirinas, que va desde el ALA (ácido-delta-amino levulínico) a la protoporfirina, no resulta afectada en absoluto por la deficiencia de hierro en las plantas superiores, y obtuvieron datos que apoyan la teoría anteriormente establecida (22, 23, 102, 186), según la cual el papel del hierro está localizado en la síntesis del ALA. Una limitación en el ritmo de formación de este precursor de las porfirinas (17), sería la responsable de la estrecha correlación entre el contenido de compuestos hemínicos y el de la clorofila.

Aumento de la actividad clorofilasa.

Bogorad y col. (4), señalan una exaltación de la actividad clorofilasa en el tejido medianamente clorótico, mientras que los de plantas normales y los de plantas padeciendo deficiencia aguda poseen una actividad más débil que aquéllos y muy similar entre sí. A la vista de estos resultados parece lógico pensar que el hierro no influye en la actividad del enzima. Sin embargo, es un hecho comprobado que no sólo la síntesis de clorofila resulta afectada por la deficiencia de hierro, sino también la destrucción de este pigmento.

La clorofila activa por la acción de la luz, es extraordinariamente lábil y necesita ceder un electrón para retornar a su forma estable. Según algunos autores (4, 174), son los carotenoides los que confieren estabilidad a la clorofila y la protegen contra la destrucción fotodinámica. Sin embargo, para otros autores (63) es un compuesto férrico (la ferredoxina) el que, reduciendo la clorofila activa, transforma a ésta en clorofila estable; así se explican los hechos comprobados por Rodríguez y Díez (155), Linschitz (109) y Linschitz y Rennert (110), según los cuales la clorosis férrica puede ser parcialmente aliviada, y por tanto, se produciría un enverdecimiento de las hojas cloróticas, por sombreado, aunque no se modifique el aporte de hierro.

Descenso del ritmo de asimilación de nitratos.

En algunas etapas de la asimilación de los nitratos por las plantas, ha sido palpablemente demostrada la presencia de metaloenzimas que contienen hierro. Así, los componentes metabólicos de la nitrito reductasa, fueron identificados como hierro y cobre (122, 132, 133). Posteriormente, en una etapa discutida de este ciclo, se logra aislar una reductasa del óxido

nítrico, que se identifica como una metaflavoproteína cuyo componente metálico es el hierro (57).

Huzisige y Satoh (82), aislaron de los cloroplastos de espinaca, un sistema enzimático llamado nitrito reductasa fotosintetizante, extraordinariamente similar a la ferredoxina. Posteriormente Losada y col. (111, 139) ponen de manifiesto cómo la ferredoxina juega un papel importante en la etapa de reducción de nitritos dependiente de la luz.

Excreción de riboflavina.

En condiciones normales, todas las plantas superiores sintetizan riboflavina, que es utilizada como grupo prostético en los enzimas flavoproteicos. En las soluciones nutritivas de plantas deficientes en hierro, aparece una coloración amarilla que, Pound y Welkie (145), identificaron como debida a riboflavina. Según estos autores, la deficiencia de hierro interfiere con la utilización de la riboflavina como grupo prostético de las flavoproteínas, de lo que resulta una acumulación del compuesto y su posterior excreción a través del sistema radicular.

Posteriormente Welkie y Miller (197), comprueban que la adición de hierro a la solución nutritiva de plantas deficientes, tiene como consecuencia la desaparición del pigmento, lo que atribuyen a una reabsorción a través de la raíz. De las experiencias realizadas por estos investigadores se deduce, que el hierro juega un papel importante no sólo en la utilización de la riboflavina, sino también en su degradación.

Acumulación de aminoácidos y amidas.

Numerosos investigadores (141, 12, 50, 86), no encuentran diferencias en el contenido total de nitrógeno de hojas normales y deficientes en hierro: sin embargo, la fracción proteica es un 25% menor en las segundas, de donde se deduce que el contenido en compuestos nitrogenados solubles aumenta como consecuencia de un descenso en proteínas. Algunos de estos investigadores (12, 50) precisan que la fracción nitrogenada soluble, es especialmente rica en aminoácidos que, como consecuencia de la deficiencia en hierro no pueden integrarse en la proteinogénesis. Este criterio ha sido posteriormente confirmado (195, 159), al comprobarse que la incorporación de glicina exógena a las proteínas celulares es prácticamente nula en plantas deficientes en hierro.

Descenso en el contenido de DNA por unidad de proteína.

Kessler (86), encontró una estrecha correlación entre el contenido de DNA y el de hierro soluble en las hojas de varias especies frutales. Según este autor, la falta de hierro era consecuencia de una anomalía en la síntesis de DNA, lo cual explicaría la diferente susceptibilidad de las distintas especies a la clorosis en suelos calizos.

Possingham y Brown (144) comprueban que el hierro se acumula en el núcleo y sugieren que este elemento ejerce alguna influencia en la síntesis de ácido nucleico o en la combinación del mismo con otros componentes del núcleo. Aunque esta interpretación está de acuerdo con la hipótesis de Kirby (99), según la cual, los metales pesados promueven, de alguna forma, la unión del ácido desoxiribonucleico con las proteínas, los resultados de Kessler (86) demuestran claramente que la estrecha correlación entre el contenido de DNA y el de hierro soluble, está condicionada por la primera de las variables.

Detención de

Ya hemos indicado que la detención del crecimiento de plantas cultivadas en condiciones de deficiencia de hierro, es consecuencia de un descenso en el ritmo de la división celular (144, 30). Este fenómeno tiene lugar de una forma brusca y coincide con el descenso en el contenido de hierro soluble en el tejido, así como con una restricción en la síntesis del sistema citocromooxidasa. Se atribuye precisamente al desequilibrio de este sistema enzimático, la detención de la división celular, aunque no se excluye la posibilidad de que el fenómeno tenga lugar en el sentido opuesto (144, 30).

En opinión de algunos autores, el hierro actúa sobre la división celular modificando el metabolismo del AIA. Según Shibaoka y Yamaki (160), el hierro estimula el transporte de auxina al mismo tiempo que atenúa su destrucción. En la misma idea participan Tomaszewski y Thimann (183) que ponen de manifiesto el papel del hierro como inhibidor del sistema AIA-oxidasa.

Por último, se ha de tener en cuenta el antagonismo hierro-manganeso y el papel que el segundo desempeña como activador del sistema AIA-oxidasa (183, 142).

Disminución de la intensidad respiratoria.

La falta de hierro está directamente ligada a una disminución de la actividad respiratoria de la planta, que se manifiesta, como era de esperar,

en las hojas jóvenes ya que éstas son las más afectadas por los estados carenciales. La deficiencia de hierro no ocasiona diferencias en el valor de la respiración de las hojas viejas, que permanecen verdes (61).

Estudios comparativos efectuados en hojas jóvenes de plantas normales y de plantas deficientes en hierro, muestran que la intensidad respiratoria en las hojas de estas últimas puede ser incluso menor de la mitad de la correspondiente a las hojas normales. En una planta que crece en condiciones de deficiencia de hierro, las hojas que alcanzaron su total desarrollo antes de que aparecieran los síntomas de clorosis, tienen una intensidad de respiración alta, que contrasta con la de las hojas jóvenes que son las que padecen la deficiencia. El máximo valor de respiración se encuentra en las hojas jóvenes de plantas normales, y en las hojas de la mitad del tallo de las plantas cloróticas.

El efecto del hierro sobre la respiración se atribuye al hecho de ser un componente fundamental de ferroproteína citocromo-oxidasa, que es la oxidasa terminal en la cadena de transportadores de electrones, desde el NADH_2 hasta el oxígeno molecular, transporte que constituye la denominada oxidación terminal. Como consecuencia de la falta de hierro, se inhibe la síntesis de la citocromo-oxidasa, bloqueándose la reoxidación del NADH_2 vía oxidación terminal, con lo que el proceso respiratorio resulta vitalmente afectado. Todo esto demuestra que el sistema citocrómico, que finaliza en la citocromooxidasa, es el camino respiratorio normal de la planta.

EL HIERRO EN LOS SISTEMAS ENZIMATICOS

De lo expuesto

el hierro en la fisiología vegetal es consecuencia de su intervención como grupo activo de varios sistemas enzimáticos importantes, que pueden ser reunidos en dos grandes grupos:

1.º Aquéllos en que este elemento es un constituyente integral, y 2.º Sistemas que son activados por este metal. En nuestro estudio, nos limitaremos a considerar el primer grupo ya que en el segundo el significado fisiológico de la activación por parte del metal es, en muchos casos, discutible.

Las propiedades catalíticas de los ferroenzimas son, en realidad, las mismas que posee el ión cuando forma parte de compuestos inorgánicos más sencillos. La combinación directa o indirecta del metal con la proteína específica tiene como consecuencia una exaltación de las propiedades catalíticas de aquél y una elevada especificidad.

El metal puede ir ligado directamente a la proteína o bien a través del núcleo prostético, como en los enzimas que contienen hierro porfirínico.

El hierro porfirínico.

La entrada del hierro en el anillo de la porfirina da lugar al grupo Hemo que, cuando se combina con ciertas proteínas, puede actuar como transportador de oxígeno molecular (hemoglobina), transportador de electrones (citocromos), activador del oxígeno (citocromo-oxidasa), activador del peróxido de hidrógeno (peroxidasa), o bien, descomponiendo el peróxido de hidrógeno (catalasa).

Citocromos.

Son hemoproteínas caracterizadas porque en ellas el hierro experimenta libremente oxidaciones y reducciones reversibles, mediante el cambio de un simple electrón. Las diferencias funcionales entre los diversos citocromos se deben a sus distintos potenciales de óxido-reducción, cuyo origen está en la diferente energía de coordinación del hierro dentro de la molécula (129).

Participan de manera indispensable en la cadena respiratoria y en la fotosíntesis, y su función consiste en una simple transferencia de electrones, con oxidación o reducción simultánea del átomo de hierro, mediante un cambio reversible de valencia.

Hasta el presente, se han aislado de las mitocondrias de las plantas superiores tres tipos de citocromos: *a*, *b* y *c*. De los cloroplastos, se han aislado dos tipos: *b* y *f*.

Keilin fue el primero en señalar la presencia del citocromo *a*, en tejidos vegetales (92). Los citocromos de este tipo, *a* y *a₁*, constituyen la denominada citocromo-oxidasa cuya actividad en plantas fue descrita por primera vez por Bhagvat y Hill (13). En las plantas, esta citocromo-oxidasa no ha sido todavía purificada ni aislada, a pesar de los esfuerzos de Kasinsky (91). Ambos citocromos *a* y *a₁* existen, como entidades funcionalmente distintas en el complejo IV (93), pero una vez degradado este complejo, ambos citocromos no son distinguibles entre sí (188, 137). En el complejo, los dos citocromos están asociados con cobre en

Sin embargo, aún no se ha llegado a un acuerdo sobre si el cobre desempeña, o no, una función en la actividad citocromo-oxidásica (63, 8, 5, 201, 202, 53).

El peso molecular mínimo de la muestra más purificada del citocromo *a* es de 80×10^3 (43). El grupo Hemo del citocromo *a* es un derivado de la citodeutero protoporfirina (106).

La citocromo-oxidasa, además de una simple mediadora en la reacción

entre el oxígeno y la mitocondria, desempeña un papel en la conservación de la energía en la cadena respiratoria (21).

En los tejidos de las plantas superiores se han descrito nueve citocromos *b* diferentes, que incluyen: tres citocromos *b* de las mitocondrias, dos de los cloroplastos y cuatro que han sido solubilizados y purificados, y cuya función se supone similar a la del citocromo *b* en las mitocondrias de los tejidos animales (41). Su grupo Hemo, es un derivado de la protoporfirina IX y no está ligado por un enlace covalente a la apoproteína (6). Forma parte del complejo III de la cadena respiratoria, en la proporción de dos moléculas de citocromo por molécula de complejo, y del complejo II en la proporción 1: 1 (152, 203). Su papel en la cadena respiratoria es aún discutido (37, 104, 105, 39), y se supone que participa principalmente en la conservación de la energía más que en las reacciones de transferencia de electrones (40).

Los citocromos en las hojas fueron descritos por primera vez por Yakushiji (200), que logró aislar los componentes *b* y *c* de las hojas de espinaca y algunas crucíferas. Posteriormente, Hill y Scarisbrick (77) realizan un estudio más detenido, y comprueban que aunque el citocromo *c* de los cloroplastos reúne características similares a los de ese grupo, tiene un potencial 100 m vol. mayor. Este nuevo citocromo aparece en la bibliografía con la denominación de citocromoc₂, ó más frecuentemente, citocromo *f*. El citocromo *f* aparece ligado muy firmemente a la estructura de los tilacoides (147, 56), y en las plantas verdes interviene como transportador de electrones en el fotosistema I (11), mientras que el citocromo *b* está asociado con la conexión entre los fotosistemas I y II.

El grupo Hemo de los citocromos *c*, deriva de la protoporfirina IX (76) y está ligado por un enlace covalente tío-éter a dos radicales cisteína (179). Los citocromos *c*, de cualquier especie que se considere, son proteínas básicas de un peso molecular que oscila alrededor de 13×10^3 (117). El citocromo *c* es capaz de combinarse con los fosfolípidos para formar complejos, pudiendo ser de esta forma como intervienen en la cadena respiratoria, incluidos en una matriz de naturaleza lipóide, la membrana de la mitocondria (44).

En principio, se consideró que los sistemas citocrómicos y citocromooxidásicos sólo existían en tejidos embrionarios, de donde desaparecería su actividad al desarrollarse estos tejidos (194). Posteriormente, se ha demostrado que los sistemas citocrómicos pueden estar presentes en etapas más avanzadas del desarrollo, incluyendo tejidos maduros.

Hemoglobina.

Kubo (101), llegó a la conclusión de que en los módulos bacterianos de las raíces de leguminosas, se encontraba una hemoglobina que contenía hierro al estado ferroso. Posteriormente, se ha confirmado esta idea y se han obtenido pruebas concluyentes de su identidad, demostrando que se produce sólo en los nódulos que contienen una raza activa de *Rhizobium* y son fijadores del nitrógeno atmosférico (94, 185).

Smith (170), descubrió que la hemoglobina estaba confinada en los núcleos y citoplasmas de las células de la planta.

Virtanen (185) sugirió que la reducción de la metahemoglobina a hemoglobina podría ser el mecanismo inicial de fijación del nitrógeno; con posterioridad se ha demostrado que en esta reducción, efectuada por la hidroxilamina, se produce nitrógeno molecular (42).

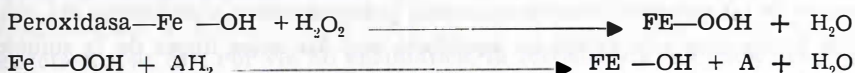
Peroxidasas.

Son enzimas con hierro porfirínico al estado férrico. Están ampliamente distribuidas en las plantas.

Las peroxidasas catalizan la reacción entre el peróxido de hidrógeno y cierto número de sustratos oxidables, por lo que presentan cierta especificidad. Aparentemente, algunos son o no, de valencia, pues su acción no es inhibida por el CO. George (60) llegó a la conclusión de que la peroxidación lleva implícito el paso de dos escalones electrónicos sencillos, en los que las peroxidasas I y II contienen hierro en los estados pentavalente y tetravalente que son sucesivamente reducidos por el sustrato.

En casos especiales —cuando el sustrato es el ácido dihidroximaleico— las peroxidasas actúan como oxidasas, existiendo entonces un cambio reversible de valencia del hierro, lo que se comprueba por la inhibición producida por el CO.

Hill y Hartree (78) dilucidaron el mecanismo probable de reacción, para el que se dio el siguiente esquema (175):

*Catalasas.*

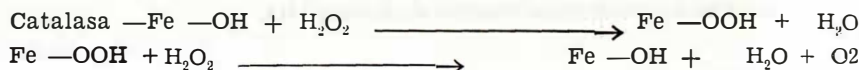
Son también enzimas en cuya composición entra un grupo porfirínico que contiene hierro al estado férrico.

Están casi universalmente distribuidas en los tejidos vivos.

Estos enzimas catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno de manera que tiene lugar una bismutación esencial, en la que una molécula de peróxido de hidrógeno reduce a otra que a su vez actúa como oxidante, resultando así, como productos de la reacción, oxígeno molecular y agua. Existen pruebas de que el hierro permanece bajo la forma férrica durante la acción de las catalasas.

Como función peroxidante de la catalasa puede considerarse su capacidad para catalizar la oxidación de sustratos por el peróxido de hidrógeno, en especial, teniendo en cuenta la semejanza que presentan los complejos de peroxidasa y catalasa con el peróxido de hidrógeno (129).

Se ha explicado el mecanismo probable de reacción de la catalasa (78) para el que se dió el esquema siguiente (175):



La función de peroxidasas y catalasas es, probablemente de protección frente a los efectos nocivos de la acumulación del peróxido de hidrógeno, según demostró Chance (36).

Las diferentes hemoproteínas resultan afectadas en grado diferente por la deficiencia de hierro. Así, mientras la catalasa y el citocromo c experimentan una considerable pérdida de actividad (1, 2, 24, 52, 67, 130, 195), los citocromos a y a₁ pierden tan sólo un 30 % de su actividad en el caso de una deficiencia extrema (67, 195), y la peroxidasa, prácticamente, no acusa variación alguna (52, 67, 120).

El hierro no porfirínico.

El hierro entra a formar parte de otro grupo de compuestos, que participan en el metabolismo de la planta, en forma de metaloproteínas. En este caso, el enlace se establece directamente entre el metal y la proteína por interacciones con los grupos polares de esta última. Aunque la naturaleza detallada de este tipo de enlace no ha sido bien definida en estos casos, se ha comprobado que no existe, prácticamente, disociación del ión y, por tanto, tampoco existe un equilibrio con los iones libres de la solución.

Flavoproteínas.

El hierro participa bajo esta forma en una serie de enzimas de la cadena respiratoria, formados por flavoproteínas a las que se enlaza el hierro constituyendo las denominadas metaloflavoproteínas. Estas, actúan

de intermediarias en la cadena respiratoria, pero no pueden ceder directamente su electrón al oxígeno molecular. Su existencia es, sin embargo, imprescindible en la cadena respiratoria. La mayor parte de ellas actúan como deshidrogenasas (153, 169, 121, 165) y aunque el lugar de unión del hierro es, por el momento, un enigma (166, 167), las técnicas de resonancia electrónica demuestran que el átomo de hierro, en estas metaloflavoproteínas, experimenta una óxido-reducción reversible durante la actuación enzimática. La señal paramagnética es distinta de la que producen otras ferroproteínas, lo que demuestra que el hierro está ligado de forma diferente (168, 147, 58). Mahler y Glenn (114), sugirieron que la presencia de un constituyente metálico en la flavoproteína, salva las dificultades teóricas de las reacciones de simple transferencia de electrones, proporcionando estabilidad al complejo como consecuencia de la estructura resonante que se establece entre el metal y la flavina.

Ferredoxinas.

Esta interesante familia de compuestos fue señalada por primera vez por Davenport, Hill y Whatley (45), que la describen como "factor reductor de la hemoglobina" en los microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico. San Pietro y Lang (156), purifican el mismo compuesto y lo describen como una "piridín nucleótido reductasa fotosintetizante". El nombre de ferredoxina fue propuesto por Mortenson y col. (127), para aquellas proteínas óxido-reductoras que contienen hierro no hemínico, aisladas del *Clostridium pasteurianum*. Posteriormente, Tagawa y Arnon (176) generalizan el nombre a todas las ferroproteínas no hemínicas óxido-reductoras.

Las ferredoxinas actúan como los transportadores de electrones más reductores del metabolismo celular en procesos muy dispares, tanto en organismos aerobios como anaerobios. Estos electrones pueden proceder, bien del hidrógeno gaseoso, o bien de la clorofila excitada por la luz.

En las plantas superiores, la ferredoxina se considera como el primer compuesto reductor estable y químicamente aislable, que se forma a expensas de la energía radiante (157). La ferredoxina reducida puede ser oxidada por el NADP y la NADP reductasa (175, 162, 95, 47), por el nitrito y nitrito reductasa (140, 83). Por vía no enzimática, la ferredoxina reducida puede ser oxidada por el oxígeno (176, 38, 81), diversas hemoproteínas (45, 46, 96) y, posiblemente, por algunos componentes de la cadena transportadora de electrones de los fotosistemas I y II (95, 177).

En lo que a estructura se refiere, las ferredoxinas son divisibles en dos grupos, según su espectro de absorción: las de plantas superiores y algas,

de color rojo, y las procedentes de las bacterias, de color marrón. Estas diferencias

miento del hierro en la molécula. En la ferredoxina de espinaca, el hierro puede estar ligado a través del grupo hidroxilo de la tirosina (59).

Respecto a su composición, hasta el momento, sólo se conoce de entre las de las plantas superiores, la de la ferredoxina procedente de los cloroplastos de espinaca (59, 184), que contiene gran cantidad de aminoácidos ácidos y es muy pobre en amoniácidos básicos; posee dos átomos de hierro por molécula, y, como todas las ferredoxinas, igual cantidad de grupos sulfuro lábiles.

La ferredoxina actúa como transportadora de un simple electrón, ya que, cuando está totalmente reducida, la mitad del hierro total se encuentra en forma ferrosa (58).

La ferredoxina es uno de los compuestos férricos en que este metal está más débilmente ligado, por lo que se intercambia con mucha facilidad (199) y es uno de los primeros afectados por la deficiencia de hierro.

Muchos de los síntomas de la clorosis férrica están asociados a la disminución de la actividad de este enzima. Ya hemos visto cómo la destrucción de la clorofila es una consecuencia de su inactivación. Por otra parte, como resulta afectada la producción de ATP y TPNH, todos aquellos procesos que requieren un aporte de energía aparecen igualmente deprimidos (119).

Ferroproteínas no hemínicas ni flavínicas de la cadena respiratoria.

Los complejos I, II y III de la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias, contienen hierro en forma que produce señales características de ESR (65, 152, 7, 150). Uno de ellos, el del complejo III, ha sido aislado por Coleman y col. (151), y contiene dos átomos de hierro por molécula. La del complejo I, contiene unos treinta átomos —mg. de hierro— por mg. de proteína (66).

También se ha demostrado la participación de una ferroproteína no hemínica en el proceso de fosforilación oxidativa que tiene lugar en las mitocondrias (33).

FERRITINAS

Las ferritinas de las plantas —fitoferritinas— son complejos ferrop^{ro}teicos similares a las ferritinas de otras fuentes. Estas ferroproteínas están

localizadas en los plastidios y cloroplastos, en regiones no ocupadas por los tilacoides.

Hasta el presente no se conoce nada sobre la bioquímica de las fitoferritinas. Con respecto a su estructura se ha comprobado que su componente inorgánico consiste en un óxido de hierro ligado de alguna forma a iones fosfato (62), y rodeado a su vez de la apoproteína. La mayor parte de la información obtenida sobre esta estructura, procede de estudios realizados mediante técnicas de microscopia electrónica (35, 118, 154, 173).

Las ferritinas parecen jugar un papel importante en la bioquímica del hierro de las plantas, regulando las reacciones en que participa este elemento. Numerosos trabajos señalan como función primaria de la ferritina, el almacenamiento del hierro que han de utilizar los enzimas que participan en el proceso fotosintetizante (35, 118, 84), como son, las ferredoxinas, numerosos hemoenzimas y los que intervienen en la síntesis de la clorofila. En apoyo de esta teoría está el hecho de que exista una correlación negativa entre el desarrollo de los cloroplastos y su contenido en ferritinas (158).

ABSORCION Y TRANSPORTE DEL HIERRO

A partir de las experiencias de Kliman (100) ha sido universalmente admitido que el hierro es incorporado por el sistema radical de las plantas en forma ferrosa. El hecho de que las plantas sean capaces de asimilar hierro cuando se les suministra en forma férrica, se debe a la actividad de sistemas óxido-reductores sintetizados en el metabolismo de la propia planta.

La capacidad reductora de las raíces va asociada al genotipo en las distintas variedades de una especie vegetal, como lo demuestra el hecho de que todas respondan de igual manera frente a la presencia de Fe^{++} en la solución nutritiva, pero no frente a la de Fe^{+++} . Esta capacidad reductora varía con el estado de nutrición de la planta en lo que a hierro se refiere. Así, las plantas cloróticas presentan esta propiedad muy aumentada, lo que se traduce en un gran incremento del valor de transporte y acumulación de hierro en sus hojas, y parece estar relacionada con la susceptibilidad a la clorosis férrica (31, 28). La acción reductora aumenta también con la iluminación y parece ir acompañada de una liberación de hidrogeniones y compuestos fluorescentes. Cabe en lo posible que ciertos productos fotosintetizados contribuyan a esta acción (28).

Existe, pues, una relación manifiesta entre el poder reductor de las raíces, su capacidad para absorber hierro y la susceptibilidad de las plantas a la clorosis férrica (28).

Bitcover y Sieling (16) fueron los primeros en sugerir que el hierro sería absorbido por la planta en forma de complejo orgánico, más que como ión ferroso o férrico. Después de comprobar la utilidad del uso de quelatos de hierro en la corrección de síntomas de clorosis, se ha verificado la necesidad absoluta del quelante (19). Aunque los primeros investigadores sugirieron que la planta sólo tomaba el hierro, trabajos posteriores han confirmado que se absorbe la molécula entera (188, 190). Existe, sin embargo, una diferencia en la velocidad de absorción de los componentes del quelato, pues así como las plantas normales absorben el hierro y el agente quelante en cantidades equimoleculares (79), las plantas deficientes absorben en proporción bastante mayor el hierro que el quelante, demostrándose que estas variaciones dependen del estado de nutrición de hierro de las plantas (134).

De acuerdo con Wallace (191), en la superficie de la raíz, se dispondrían unos quelantes naturales de la planta, que, compitiendo con los aniones y quelantes del medio nutritivo, tomarían el hierro, facilitando su introducción en la planta. De este modo, variedades con distinta susceptibilidad a la clorosis férrica, diferirían en la cantidad y calidad de sus quelantes naturales (19). Se ha comprobado que el hierro de una solución se absorbe en orden inverso a las estabilidades de los complejos de los que forma parte (79). El hecho de encontrarse cierta cantidad de hierro en el exudado de las plantas cultivadas sin quelante alguno, confirma la presencia de quelantes naturales en las plantas (180).

El producto inicial en la absorción del hierro es el mismo cualquiera que sea la cantidad de hierro de que dispone la planta en el medio nutritivo, y consiste en un complejo orgánico de hierro que presenta fluorescencia a la luz ultravioleta. Su misión parece ser la de un simple transportador y cuando alcanza un cierto nivel, el hierro es transferido a productos secundarios (161).

Mediante electroforesis, se observa que el hierro transportado en el exudado del brote se desplaza hacia el ánodo (181). Este movimiento, análogo al de un anión, sugiere que el hierro va combinado con otros compuestos (32). Por electrodiálisis se pone de manifiesto que casi todo el hierro en las hojas cloróticas se encuentra en forma de anión, mientras que las hojas normales contienen cantidades aproximadas de hierro bajo la forma de anión y de catión (103). Quizá se pueda explicar el hecho de que las hojas cloróticas tengan tanto o más hierro que las normales, teniendo en cuenta la capacidad quelante de las grandes cantidades de ácidos orgánicos y compuestos solubles de nitrógeno, que se acumulan en las primeras (189).

Se ha demostrado que las plantas cloróticas poseen generalmente, un contenido mayor de ácidos cítrico y málico que las plantas verdes (86, 87, 51, 149). Tiffin (182) sugirió que los ácidos orgánicos pueden actuar directamente en el transporte de hierro en las plantas y, en efecto, encontró en el exudado del brote ácidos cítrico, málico y otros no identificados, combinados con el hierro. Se ha demostrado que al aumentar el contenido de hierro en el exudado lo hace de igual manera el de citratos, siendo también paralela la disminución de ambos (32).

El grado de deficiencia de hierro determina, en razón directa, la absorción y transporte de hierro y el correspondiente transporte de citrato. La inhibición del primer proceso trae consigo la del segundo. De esta manera, el propio contenido de hierro controlaría la absorción de hierro y el transporte del citrato (32).

La capacidad de utilización del hierro está íntimamente ligada al genotipo. Numerosos autores han comprobado cómo variedades diferentes de una misma especie presentan susceptibilidades muy diversas a la clorosis férrica (9, 10, 27, 196). En general, los datos obtenidos sugieren que esta susceptibilidad a la clorosis se debe, más bien, a una disminución en la capacidad de transporte, que a la inmovilización o inactivación de este elemento en el brote (54). Aunque el origen del fenómeno es todavía desconocido, algunos investigadores se inclinan, a la luz de los hechos experimentales, a atribuir esta anomalía a la secreción de sustancias que interfieren en la acumulación del hierro (192). Esta secreción dependería, tanto cualitativa como cuantitativamente, de los caracteres genéticos de la planta.

INTERACCION DEL HIERRO CON LOS MACRO Y MICRONUTRIENTES.

En el caso del nitrógeno no parece existir una interacción propiamente dicha. Las plantas deficientes en hierro presentan un contenido mayor de nitrógeno soluble que las verdes, quizá como resultado de una desintegración de las proteínas (85). Se ha demostrado, en efecto, que las plantas cloróticas acumulan más arginina que las normales (80).

La presencia en el cultivo de un exceso de calcio provoca la aparición de síntomas de clorosis férrica. Aunque se ha interpretado como un efecto de competencia por compuestos de coordinación específicos (26), parece ser debido, más bien, a un efecto de elevación del pH de la solución (108).

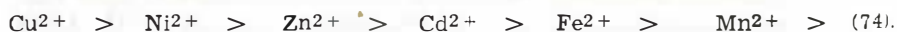
Se ha demostrado que la existencia en el cultivo de cantidades elevadas de fósforo, unido a un pH neutro o alcalino, provoca la precipitación del hierro en forma de fosfato férrico en el sistema vascular de la hoja (14,

148), e incluso en la raíz (74). La presencia adicional de cobre en la solución, aumenta estos efectos del fósforo (25).

En plantas cloróticas se aprecia una disminución de la relación Ca/K (113). Sin embargo, la elevación del nivel de potasio en la solución, hace desaparecer los síntomas de clorosis (20). Se debe, probablemente, a que el potasio disminuye la absorción de fósforo (74), la concentración de fósforo inorgánico —por estimular la fosforilación en los sistemas fosfoquinásicos (75, 112, 125)— y aumenta el transporte de hierro desde las raíces hacia las hojas, cuando está inmovilizado, posiblemente, por el fosfato (20, 138).

El exceso de manganeso provoca en la planta síntomas de deficiencia de hierro. Shive y col. (163, 171, 172) sugirieron que el alto potencial redox del sistema $Mn^{2+} \rightleftharpoons Mn^{3+}$ provocaría el paso de Fe^{2+} a Fe^{3+} en la célula, y éste sería precipitado por el fosfato (135). La oxidación natural del Mn^{2+} se ha demostrado in vivo (97). Paradójicamente, zinc y cadmio pueden provocar también clorosis férrica (71, 72), sin que ninguno de ellos pueda sufrir cambios de valencia.

En estudios comparativos de los efectos de diversos metales (71, 72, 73) se deduce que su actividad relativa para inducir clorosis, está directamente relacionada con la estabilidad de los quelatos que forman (83, 116, 123, 124). Esta estabilidad es independiente del ligando y respecto a ella se da el siguiente orden:



La formación de estos complejos se sugirió como explicación probable a la deficiencia de hierro producida por metales (72). Esta hipótesis implica que los metales compitan con el hierro en algunas etapas de la formación de la clorofila, en un lugar ocupado normalmente por aquél (74).

Aunque se pensó que manganeso, cobre, zinc y calcio podrían sustituir al hierro en los complejos con los ácidos málico o malónico, se ha comprobado que en realidad esto no ocurre (108).

El zinc es el elemento que interfiere más fuertemente la acción del hierro. No sólo reduce su absorción, sino también, y en alto grado, su transporte hacia el ápice del tallo (108).

La deficiencia de sílice provoca la aparición de síntomas de toxicidad de hierro. La adición de sílice disminuye la absorción de hierro y manganeso, e incluso la del fósforo si el nivel de éste en el medio es muy elevado (136).

BIBLIOGRAFIA

- 1.—AGARWALA, S. C., SHARMA, C. P., KUMAR, A.—*Plant Physiol.* 39, 603-9. (1964).
- 2.—AGARWALA, S. C., SHARMA, C. P., FAROOQ, S.—*Plant Physiol.* 40,—439-99. (1965).
- 3.—ANDERSON, J. M., BOARDMAN, N. K., DAVID, D. J.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 985-89. (1964).
- 4.—ANDERSON, I. C., ROBERTSON, D. S.—*Plant Physiol.* 35, 531-34. (1960).
- 5.—ATHERTON, N. M., GIBSON, Q. H., GREENWOOD, C.—*Biochem. J.* 86, 554-55. (1963).
- 6.—BASFORD, R. E., TISDALE, H. D., GLENN, J. L., GREEN, D. E.—*Biochim. Biophys. Acta.* 24, 107. (1957).
- 7.—BEINERT, H., SANDS, R. H.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 41. (1960).
- 8.—BEINERT, H., GRIFFITHS, D. E., WHARTON, D. C., SANDS, R. H.—*J. Biol. Chem.* 237, 2337-46. (1962).
- 9.—BELL, W. O., BOGORAD, L.—*Botan. Gaz.* 120, 36-39. (1958).
- 10.—BELL, W. D.—*Maize Genetics Cooperation News Letter.* 36, 72-73. (1962).
- 11.—BENDALL, D. S., HILL, R.—*Ann. Rev. Plant Physiol.* 19, 167-186. (1968).
- 12.—BENNETT, J. P.—*Soil Sci.* 60, 91-105. (1945).
- 13.—BHAGVAT, K., HILL, R.—*New Phytologist.* 50, 112-120. (1951).
- 14.—BIDDULPH, O.—*Am. J. Botany.* 28, 348-54. (1941).
- 15.—BIDDULPH, O.—In "Analyse des plantes et problème des engrais minéraux", p. 7-17. Paris: Inst. Rech. Huiles et Oléagineux. (1954).
- 16.—BITCOVER, E. H., and SIELING, D. H.—*Plant Physiol.* 26, 290-303. (1951).
- 17.—BOGORAD, L.—In: "Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems", Mary Belle Allen, ed., Academic Press, New York, pp. 227-56. (1960).
- 18.—BOICHENKO, E. A., UDELNOVA, T. M.—*Dokl. Akad. Nauk SSSR.* 158, 464-66. (1964).
- 19.—BOLLARD, E. G.—*Ann. Review of Plant Physiology.* 11, 151. (1960).
- 20.—BOLLE-JONES, E. W.—*Plant and Soil.* 6, 129-173. (1955).
- 21.—BONNER, W. D., PLESNICAR, M.—*Nature.* 214, 616. (1967).
- 22.—BROWN, E. G.—*Nature.* 182, 313-15. (1958).
- 23.—BROWN, E. G.—*Nature.* 182, 1091-92. (1958).
- 24.—BROWN, J. C., HENDRICKS, S. B.—*Plant Physiol.* 27, 651-60. (1952).
- 25.—BROWN, J. C., HOLMES, R. S., and SPECHT, A. W.—*Plant Physiol.* 30, 457-62. (1955).
- 26.—BROWN, J. C.—*Ann. Rev. Plant Physiol.* 7, 171-190. (1956).
- 27.—BROWN, J. C., HOLMES, R. S. and TIFFIN, L. O.—*Soil Sci.* 86, 75-82. (1958).
- 28.—BROWN, J. C., R. S. HOLMES. and L. O. TIFFIN.—*Soil Sci.* 91, 127-132. (1961).
- 29.—BROWN, J. C., JONES, W. E.—*Soil Sci.* 94, 173-79. (1962).
- 30.—BROWN, R., POSSINGHAM, J. V.—*Proc. Roy. Soc. B-147,* 145-166. (1957).
- 31.—BROWN, J. C., and L. O. TIFFIN.—*Soil Sci.* 89, 8-15. (1960).
- 32.—BROWN, J. C., and TIFFIN, L. O.—*Plant Physiol.* 40, 395-400. (1965).

- 33.—BUTOW, R. and RACKER, E.—In: "Non Heme Proteins", Role in Energy Conversion, Edited by Anthony San Pietro. 383-392. (1965).
- 34.—CARELL, E. F., KAHN, J. S.—Arch. Biochem. Biophys. 108, 1-6. (1964).
- 35.—CATESSON, A. M.—C. R. Acad. Sci. 262. 1070-73. (1966).
- 36.—CHANCE, B.—Science (Lancaster, Pa). 116, 202-203. (1952).
- 37.—CHANCE, B.—J. Biol. Chem. 233, 1223. (1958).
- 38.—CHANCE, B., SAN PIETRO, A.—Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 49, 633-38. (1963).
- 39.—CHANCE, B.—J. Biol. Chem. 240, 2729. (1965).
- 40.—CHANCE, B., SCHOENER, B.—J. Biol. Chem. 241, 4567. (1966).
- 41.—CHANCE, B., BONNER, W. D., J. R. STOREY, B. T.—Ann. Rev. Plant Physiol. 19, 295-316 (1968).
- 42.—COLTER, J. S., QUASTEL, J. H.—Arch. of Biochem. 27, 368-389. (1950).
- 43.—CRIDDLE, R. S., and BOCK, R. M.—Biochem. Biophys. Res. Commun. 1, 138. (1959).
- 44.—DAS, L., CRANE, F. L.—Biochemistry. 3, 696-700. (1964).
- 45.—DAVENPORT, H. E., HILL, R., WHATLEY, F. R.—Proc. Roy. Soc. (London). Ser. B. 139, 346-58. (1952).
- 46.—DAVENPORT, H. E., HILL, R.—Biochem. J. 74, 493-501. (1960).
- 47.—DAVENPORT, H. E.—Nature. 199, 151-53. (1963).
- 48.—DAVIES, D. D.—Biochem. J. 98, 37. (1966).
- 49.—DE KOCK, P. C.—Soil Sci. 79, 167-175. (1955).
- 50.—DE KOCK, P. C., MORRISON, R. I.—Biochem. J. 70, 266-272. (1958).
- 51.—DE KOCK, P. C., and MORRISON, R. J.—Biochem. J. 70, 272-77. (1958).
- 52.—DE KOCK, P. C., COMMISSIONG, K., FARMER, V. C., INK SON, R. H. E.—Plant Physiol. 35, 599-604. (1960).
- 53.—EHREMBERG, A., YONETANI, T.—Acta Scand. 15, 1071-82. (1961).
- 54.—ELMSTROM, G. E., and HOWARD, F. D.—Plant Physiol. 44, 1108-1114. (1969).
- 55.—EVANS, H. J.—School of Forestry Bull. 15, Duke University, Durham, North Carolina. (1959).
- 56.—FASELLA, P., BOSSA, R., TURANO, C., ROSSI-FANELLI, H.—Enzymologia, 30, 198-205. (1966).
- 57.—FEWSON, C. A., NICHOLAS, D. J. D.—Nature. 188, 794-96. (1960).
- 58.—FRY, K. T., LAZZARINI, R. A., SAN PIETRO, A.—Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 50, 652-57. (1963).
- 59.—FRY, K. T., SAN PIETRO, A.—In: "Photosynthetic Mechanisms of Green Plants" (Kock, B., and Jagendorf, A. T., Eds., Natl. Acad. Sci.—Natl. Res. Council, Publ. 1.145. Washington, D. C., 1963). pp. 252-61.
- 60.—GEORGE, P.—Biochemic. J. 54, 267-276. (1953).
- 61.—GLENISTER, P. R.—Botan. Gaz. 106, 33-40. (1944).
- 62.—GRANICK, S., HAHN, P. F.—J. Biol. Chem. 155, 661-669. (1944).
- 63.—GRIFFITHS, D. E., WHARTON, D. C.—Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 151-55. (1961).
- 64.—GRIFFITHS, D. E., WHARTON, D. C.—J. Biol. Chem. 236, 1850. (1961).
- 65.—HATEFI, Y., HAAVIK, A. G., GRIFFITHS, D. E.—J. Biol. Chem. 237, 1676. (1962).
- 66.—HATEFI, Y., STEMPEL, K. E.—Biochem. Biophys. Res. Commun. 26 (3), 301-8. (1967).

- 67.—HEALY, W. B., CHENG, S., McLEROY, W. D.—Arch. Biochem. Biophys. 54, 206-214. (1955).
- 68.—HERAS, L.—E. E. de Aula Dei. 6(3-4), 136-165. (1961).
- 69.—HEWITT, E. J.—Long Ashton Research Sta. Ann. Rept. 1944, 50-60. (1945).
- 70.—HEWITT, E. J.—Nature. (Lond.). 161, 489-490. (1948).
- 71.—HEWITT, E. J.—Long Ashton Research Sta. Ann. Rept. 1948, 66-80. (1948).
- 72.—HEWITT, E. J.—J. of Exper. Bot. 4, 59-64. (1954).
- 73.—HEWITT, E. J.—J. of Exper. Bot. 5, 110-118. (1955).
- 74.—HEWITT, E. J.—Plant Physiology, III, 137-160 (Steward, F. C., Ed., Academic Press, New York, (1963).
- 75.—HIATT, A. J., y EVANS, H. J.—Plant Physiol. 35, 673-77. (1960).
- 76.—HILL, R., KEILIN, D.—Proc. Roy. Soc. (London). B-107, 286. (1930).
- 77.—HILL, R., SCARISBRICK, R.—New Phytologist. 50, 98-111. (1951).
- 78.—HILL, R., HARTREE, E. F.—Ann. Rev. Plant Physiol. 4, 115-150. (1953).
- 79.—HILL-COTTINGHAM, D. G. and LLOYD-JONES, C. P.—Exptl. Botany. 16 233-242. (1965).
- 80.—HOLLEY, R. W., and CAIN, J. C.—Science. 121, 172-73. (1955).
- 81.—HORIO, T., YAMASHITA, T.—Biochem. Z. 338, 526-36. (1963).
- 82.—HUZISIGE, H., SATOH, K.—Botan. Mag. (Tokyo). 74, 178-85. (1961).
- 83.—HUZISIGE, H., SATOH, K., TANAKA, K., HAYASIDA, T.—Plant Cell Physiol. (Tokyo). 4, 307-22. (1963).
- 84.—HYDE, B. B., HODGE, A. J., KAHN, A. and BIRNSTIEL, M. L.—J. Ultrastruct. Res. 9, 248-58. (1963).
- 85.—ILJIN, W. S.—Ber. Deut. Botan. Ges. 61, 138-48. (1943).
- 86.—ILJIN, W. S.—Plant and Soil. 3, 239-56. (1951).
- 87.—ILJIN, W. S.—Plant and Soil. 4, 11-28. (1952).
- 88.—IRVING, H. M., and WILLIAMS, R. J. P.—The Analyst. 77, 813-829. (1952).
- 89.—JACOBSEN, L., OERTLI, J. J.—Plant Physiol. 31, 199-204. (1957).
- 90.—JAMES, W. O.—Proc. Roy. Soc. Ser. B. 141, 289-299. (1953).
- 91.—KASINSKY, H. E., SHICHI, H., HACKETT, D. P.—Plant Physiol. U. S. A. 41, 739-748. (1966).
- 92.—KEILIN, D.—Proc. Roy. Soc. B 98, 312-339. (1925).
- 93.—KEILIN, D., HARTREE, E. F.—Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B 127, 167-191. (1939).
- 94.—KEILIN, D., WANG, Y. L.—Nature. (Lond.). 155, 227-229. (1945).
- 95.—KEISTER, D. L., SAN PIETRO, A., STOLZENBACH, F. E.—Arch. Biochem. Biophys. 98, 235-44. (1962).
- 96.—KEISTER, D. L., SAN PIETRO, A.—Arch. Biochem. Biophys. 103, 45-53. (1963).
- 97.—KENTEN, R. H., and MANN, P. J. G.—Biochem. J. 65, 179-185. (1956).
- 98.—KESSLER, B.—Nature, 179, 1015-16. (1957).
- 99.—KIRBY, K. S.—Biochem. J. 62, 31 p. (1956).
- 100.—KLIMAN, S.—Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 2, 385-392. (1937).
- 101.—KUBO, H.—Acta Phytochim. (Tokyo). 11, 195-200. (1939).

- 102.—LASCELLES, J.—In: "The Bacteria", vol. III, I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier, ed. Academic Press, New York. Pp. 335-72. (1962).
- 103.—LATIES, G.—Ann. Rev. Plant. Physiol. 10, 87-113. (1959).
- 104.—LEE, C. P., ERNSTER, L.—In: "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria" (Tager, I. M., Papa, S., Quagliariello, E., and Slater, Eds., BBA Library vol. 7, Elsevier Press, Amsterdam, (1966). 218-34.
- 105.—LEE, C. P., ERNSTER, L.—Federations Proc. 26, 610. (1967).
- 106.—LEMBERG, R., CLEZY, P., BARRET, J.—In: "Haematin Enzymes" (Falk J. E., LEMBERG, R., and MORTON, R. K., Eds. Pergamon Press, New York, 1961). 344.
- 107.—LIEBICH, H.—Z. Botan. 37, 129-57. (1941).
- 108.—LINGLE, J. C., TIFFIN, L. O. and BROWN, J. C.—Plant Physiol. 38, 71-76. (1963).
- 109.—LINSCHITZ, H.—Según Ann. Rev. Plant Physiol. 5, 271-340. (1952).
- 110.—LINSCHITZ, H., RENNERT, J.—Nature. 169, 193-194. (1952).
- 111.—LOSADA, M., PANEQUE, A., RAMIREZ, J. M., DEL CAMPO, F. F.—Biochem. Biophys. Res. Commun. 10, 298-303. (1963).
- 112.—MCCOLLUM, R. E., HAGEMAN, R. H., and TYNER, E. H.—Soil Sci. 86, 324-331. (1958).
- 113.—McGEORGE, W. T.—Soil. Sci. Soc. Amer. Proc. 13, 200-4. (1948).
- 114.—MAHLER, H. R. and GLENN, J. L.—In Symposium on "Inorganic nitrogen nutrition", ed. by W. D. McElroy and B. Glass. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press. (1956).
- 115.—MAIER, R. H., and CATTANI, R. A.—Life Sciences. 4, 391. (1965).
- 116.—MALEY, L. and MELLOR, D. P.—Nature. 165, 453. (1956).
- 117.—MARGOLIASH, E., SCHEJTER, A.—Advances in Protein Chem. 21, 113. (1966).
- 118.—MARINOS, N. G.—J. Ultrastruct. Res. 17, 91-113. (1967).
- 119.—MARSH, H. V., EVANS, H. J. and MATRONE, G.—Plant Physiol. 38, 632-38. (1963).
- 120.—MARSH, H. V., EVANS, H. J., and MATRONE, G.—Plant Physiol. 38, 638-42. (1963).
- 121.—MASSEY, V.—Biochem. Biophys. Acta. 30, 500. (1958).
- 122.—MEDINA, A., and NICHOLAS, D. J. D.—Biochem. Biophys. Acta. 25, 138-41. (1957).
- 123.—MELLOR, D. P. and MALEY, L.—Nature. 159, 370. (1947).
- 124.—MELLOR, D. P., and MALEY, L.—Nature. 161, 436-437. (1948).
- 125.—MILLER, G. W. and EVANS, H. J.—Plant Physiol. 32, 346-354. (1957).
- 126.—MORI, S.—Bull. Inst. Chem. Res. (Kyoto Univ.), 20, 16-20. (1950).
- 127.—MORTENSON, L. E., VALENTINE, R. C. and CARNAHAN, J. E.—Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 448. (1962).
- 128.—MURPHY, J. J., MAIER, R. H.—J. Agr. Food Chem. 15, 113-17. (1967).
- 129.—NASON, A., and McELROY, W. D.—Plant Physiology III, 451-522. (Steward, F. C., Ed., Academic Press, New York, 1963).
- 130.—NEILANDS, J. B.—Bacteriol. Rev. 21, 101-11. (1957).
- 131.—NEISH, A. C.—Biochem. J. 33, 300-08. (1939).
- 132.—NICHOLAS, D. J. D.—Nature. 179, 800-4. (1957).
- 133.—NICHOLAS, D. J. D., MEDINA, A., and JONES, O. T. G.—Biochem. Biophys. Acta. 37, 468-76. (1960).

- 134.—NICHOLAS, D. J. D.—Ann. Review of Plant. Physiol. 12, 63. (1961).
- 135.—NOACK, K. and LIEBICH, H.—Naturwissenschaften. 29, 302. (1941).
- 136.—OKUDA, A., and TAKAHASHI, E.—In "Mineral Nutrition of the Rice Plant", Chap. 10, 123-46. (Proc. Intern. Conf. Rice Res. Inst., Los Baños, Philippines, Feb., 1964. Johns Hopkins Press, Baltimore, Md. 494 pp. 1965).
- 137.—OKUNUKI, K.—O. Hayaishi, ed., Acad. Press, New York, London. 409-467. (1962).
- 138.—OLSEN, C.—Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. Chim. 21, 15-32. (1935).
- 139.—PANEQUE, A., DEL CAMPO, F. F. y LOSADA, M.—Nature. 198, 90-91. (1963).
- 140.—PANEQUE, A., RAMIREZ, J. M., DEL CAMPO, F. F., LOSADA, M.—J. Biol. Chem. 239, 1737-41. (1964).
- 141.—PERUR, N. G., SMITH, R. H., WIEBE, H. H.—Plant Physiol. 36, 736-39. (1961).
- 142.—PILET, P. E., GASPAR, Th.—Masson and CIE, ed. (1968).
- 143.—PORUTSKII, G. V., GOLOVCHENKO, V. P., CHEREDNICHENKO, S. V.—Dokl. Acad. Nauk. SSSR. 146, 1223-26. (1962).
- 144.—POSSINGHAM, J. V. and BROWN, R.—Nature. 180, 653-654. (1957).
- 145.—POUND, G. S. and WELKIE, G. W.—Virology. 5, 371-381. (1958).
- 146.—PURVIS, E. R. and CAROLS, R. I.—"Hunger Sings in Crops". III Ed. (Ed. by Howard B. Spragues), (1964).
- 147.—RAJAGOPALAN, K. V., HANDLER, P.—J. Biol. Chem. 239, 1509-14. (1964).
- 148.—REDISKE, J. H. and BIDDULPH, O.—Plant Physiol. 28, 576-93. (1953).
- 149.—RHOADES, W. A. and WALLACE, A.—Soil Sci. 89, 248-56. (1960).
- 150.—RIESKE, J. S., HANSEN, R. E., ZAUGG, W. S.—J. Biol. Chem. 239, 3017. (1964).
- 151.—RIESKE, J. S., MacLENNAN, D. H., COLEMAN, R.—Biochem Biophys. Res. Commun. 15, 338. (1964).
- 152.—RIESKE, J. S., ZAUGG, W. S., HANSEN, R. E.—J. Biol. Chem. 239, 3023. (1964).
- 153.—RINGLER, R. L.—J. Biol. Chem. 236, 1192. (1961).
- 154.—ROBARDS, A. W. and ROBINSON, C. L.—Planta. 82, 179-88. (1968).
- 155.—RODRIGUEZ, C., DIEZ, M. C.—Ecologie Vegetale, Actes du colloque de Montpellier, UNESCO, pp. 89-91. (1955).
- 156.—SAN PIETRO, A., LANG, H. M.—J. Biol. Chem. 231, 211-29. (1958).
- 157.—SAN PIETRO, A. and BLACK, C. C.—Ann. Rev. Plant Physiol. 16, 155-174. (1965).
- 158.—SECKBACH, J.—Plant Physiol. 44, 816-20. (1969).
- 159.—SHETTY, A. S. and MILLER, G. W.—Plant Physiol. 41, 415-21. (1966).
- 160.—SHIBAOKA, H. and YAMAKI, T.—Botan. Mag. (Tokyo). 72, 203-214. (1959).
- 161.—SHIM, S. C. and VOSE, P. B.—J. Exptl. Botany. 16, 216-232. (1965).
- 162.—SHIN, M., TAGAWA, K., ARNON, D. I.—Biochem. Z. 338, 84-96. (1963).
- 163.—SHIVE, J. W.—Plant Physiol. 16, 435-445. (1941).
- 164.—SINGER, T. P., and KEARNEY, E. B.—J. of Biol. Chem. 183, 409-429. (1950).

- 165.—SINGER, L. P., MASSEY, V.—Record Chem. Progr. 18, 201. (1957).
- 166.—SINGER, T. P.—In "The Enzymes", 2nd, ed. 1 (Boyer, P. D., Lardy, H., and Myrbäck, K., Eds., Academic Press, New York, 1963).
- 167.—SINGER, T. P., KEARNEY, E. B.—In "The Enzymes", 2nd ed., 1 (Boyer, P. D., Lardy, H., and Myrbäck, K., Eds., Academic Press, New York, 1963).
- 168.—SINGER, T. P.—"The Enzymes". 7, 345-81 (Academic, New York, 1963).
- 169.—SINGER, T. P., RINGLER, R. L., MINAKAMI, S.—In "Molecular Basis of Enzyme Action and Inhibition" (Desnuelle, P. A. E., Ed. Proc. Intern. Congr. Biochem., 5th, IV, Pergamon, Oxford, 1963).
- 170.—SMITH, J. D.—Biochemic. J. 44, 585-591. (1949).
- 171.—SOMERS, I. I., GILBERT, S. G. and SHIV, J. W.—Plant Physiol. 17, 317-320. (1942).
- 172.—SOMERS, I. I. and SHIVE, J. W.—Plant Physiol. 17, 582-602. (1942).
- 173.—SPREY, B.—I. Z. Pflanzenphysiol. 53, 255-61. (1965).
- 174.—STANIER, R.—In: "The Harvey Lectures". Academic Press Inc. New York, p. 219-55. (1960).
- 175.—SUMNER, J. B. and SOMERS, G. F.—"Chemistry and methods of enzymes", 3rd ed., New York: Academic Press. (1953).
- 176.—TAGAWA, K. and ARNON, D. I.—Nature. 195, 537-543. (1962).
- 177.—TAGAWA, K., TSUJIMOTO, H. Y., ARNON, D. I.—Nature. 199, 1247-52. (1963).
- 178.—THATCHER, R. N.—Science. 79, 463-466. (1934).
- 179.—THEORELL, H.—Biochem. Z. 298, 242. (1938).
- 180.—TIFFIN, L. O., BROWN, J. C. and KRAUSS, R. W.—Plant Physiol. 35, 362-67. (1960).
- 181.—TIFFIN, L. O. and BROWN, J. C.—Science. 135, 311-13. (1962).
- 182.—TIFFIN, L. O.—Plant Physiol. 38, ix. (1963).
- 183.—TOMASZEWSKI, M. and THIMANN, K. V.—Plant Physiol. 41, 1443-1454. (1966).
- 184.—TSUGITA, A., TAGAWA, K., ARNON, D. I.—Abstr. Pacific Slope Biochem. Conf., Honolulu, 1963. (Symp. on Ferredoxins, Sponsored by Natl. Sci. Found).
- 185.—VIRTANEN, A.—Biologic. Rev. 22, 239-269. (1947).
- 186.—VOGEL, W., RICHERT, D. A., PIXLEY, B. Q., SCHULMAN, M. P.—J. Biol. Chem. 235, 1769-75. (1960).
- 187.—WAINIO, W. W.—In "Haematin Enzymes", J. E. Falk, R. Lemberg and R. K. Morton, Ed., Pergamon Press, New York, Part. 2, 281-300. (1961).
- 188.—WALLACE, A.—Symposium on Use Metal Chelates Plant Nutrition Seattle. (1956).
- 189.—WALLACE, A., L. M. SHANNON, O. R. LUNT and R. L. IMPEY.—Soil Sci. 84, 27-41. (1957).
- 190.—WALLACE, A.—In "Chelation Phenomena", Ann. N. Y. Acad. Sci., 88, (1960).
- 191.—WALLACE, A.—Publ. by Arthur Wallace, Los Angeles 64, California. U. S. A. pp. ix. 195. (1962).
- 192.—WALLACE, A., JEFREYS, R. A. and HALE, V. Q.—Soil Sci. 94, 111. (1962).

- 193.—WARBURG, O., LÜTTGENS, W.—*Biochimica*. 11, 303-22. (1946).
- 194.—WAYGOOD, E. R.—*Canad. J. Res.* 28, 7-62. (1950).
- 195.—WEINSTEIN, L. H., ROBBINS, W. R.—*Plant Physiol.* 30, 27-32. (1955).
- 196.—WEISS, M. G.—*Genetics.* 28, 253-68. (1943).
- 197.—WELKIE, G. W. and MILLER, G. W.—*Plant Physiol.* 35, 516-520. (1960).
- 198.—WHATLEY, F. R., ORDIN, L., ARNON, D. I.—*Plant Physiol.* 26, 414-18. (1951).
- 199.—WILLIAMS, R. J. P.—In "The Enzymes", 2nd Ed, vol. I, 391-441. (Boyer, P. D., Lardy, H., Myrbäck, K., Eds., Academic Press, New York, 785 pp. 1959).
- 200.—YAKUSHIJI, E.—*Acta Phytochim. (Tokyo)*. 8, 325-329. (1935).
- 201.—YONETANI, T.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3, 549-53. (1960).
- 202.—YONETANI, T.—*Federation Proc.* 21, 46. (1962).
- 203.—ZAUGG, W. S., RIESKE, J. S.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9, 213. (1962).