

Síntesis de proteínas por cloroplastos *in vitro*. Factores que afectan el medio de incubación

J. A. Lozano * y D. E. Griffiths

School of Molecular Sciences. University of Warwick, Coventry (England), y Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Murcia (España)

(Recibido el 22 de septiembre de 1969)

J. A. LOZANO and D. E. GRIFFITHS, *Protein Synthesis by Chloroplasts in vitro. Factors Affecting the Incubation Medium*. R. esp. Fisiol., 26, 61-70, 1970.

Protein synthesis effected by isolated chloroplasts of young pea leaves has been studied in relation with variable concentrations of mercaptoethanol, magnesium and potassium ions, ATP generating system, GTP, CTP, UTP, mixture of added amino acids and ammonium ions. The amino acid mixture stimulated the synthesis if the chloroplasts used were isolated from young leaves, whilst the activator effect of the ammonium ions was made patent upon mature chloroplasts. Possible diverse contaminations had a minimum participation in the protein synthesis.

Desde hace algún tiempo se conoce que la fracción de cloroplastos de plantas superiores y de algas fotosintéticas incorporan *in vitro* aminoácidos en forma de proteínas, al igual que sucede con los ribosomas aislados de cloroplastos (1, 5-9, 11-21, 23, 25-33, 36-43, 46).

En un principio, los primeros resultados pudieron estar muy influidos por el problema de las contaminaciones, especialmente la bacteriana, tal como señalaron APP y JAGENDORF (2), lo cual podría invalidar algunas deducciones.

Aun cuando ciertas características de la mayoría de los sistemas cloroplásticos hasta ahora estudiados son similares, sin embargo existen otras en las que los datos son muy dispares. Así sucede respecto a requerimientos de ATP,** GTP, iones amonio, aminoácidos añadidos, etc.

En este trabajo hemos intentado realizar el estudio de algunas de las condiciones relacionadas con los medios de incu-

bación y que tienen influencia en la incorporación de aminoácidos, pues algunas de las diferencias existentes en la bibliografía podrían explicarse por las diferentes condiciones de experimentación utilizadas por los diversos investigadores en este campo.

Como material de trabajo se toman cloroplastos procedentes de hojas de guisantes. La bibliografía sobre este sistema es corta y confusa. SISSAKYAN *et al.* (39) y PARTHIER y WOLLGIEHN (31) no necesitaron la adición de cofactores para la incorporación, en contraste con lo que cabría esperar teniendo en cuenta los resul-

* Beneficiario de una Beca de la Fundación Juan March durante el desarrollo de parte de este trabajo.

** Abreviaturas: ATP = ácido adenosintrifosfórico. GTP = ácido guanosintrifosfórico. CTP = ácido citidintrifosfórico. UTP = ácido uridintrifosfórico.

tados con otros sistemas similares. Por otra parte, mientras los primeros autores señalaron que los fragmentos de cloroplastos incorporaban C^{14} -glicina mucho más activamente que los cloroplastos enteros, los autores del segundo trabajo obtuvieron síntesis proteicas comparables en magnitud.

Material y métodos

MATERIAL VEGETAL. Hojas de guisantes (*Pea sativum*, variedad *Feltham First*) recolectadas de la habitación de cultivo normalmente a los cuatro o cinco días tras el nacimiento de las plantas. La solución nutritiva, cuando se usó, fue la de ARNON y HOAGLAND (4) diluida dos veces.

PREPARACIÓN DE CLOROPLASTOS. 10 g de hojas se lavaron tres veces con agua bidestilada y se colocaron en 200 ml de solución filtrada de hipoclorito cálcico del 2 % durante cinco minutos, tras lo cual las hojas se volvieron a lavar cinco veces con agua bidestilada y estéril.

Los homogenados se prepararon con 20 ml de medio de Honda, según describieron SPENCER y WILDMAN (43), con las modificaciones sugeridas por PARENTI y MARGULIES (29). Otra modificación fue la inclusión de una centrifugación previa a $200 \times g$ durante dos minutos. El sobrenadante se centrifugó a $2.750 \times g$ durante dos minutos y el centrifugado, suspendido en 5 ml de nuevo medio de Honda, constituyó la preparación de cloroplastos no lavados. Esta preparación se centrifugó nuevamente a $2.750 \times g$ durante dos minutos y el residuo sólido se resuspendió en 5 ml de medio de Honda, obteniendo la preparación de cloroplastos lavados usada normalmente en los ensayos de síntesis de proteínas. La concentración en clorofila varió alrededor de 0,050 mg/ml de suspensión. Todas las operaciones se realizaron a $0-4^\circ C$.

INCORPORACIÓN DE C^{14} -LEUCINA EN PROTEÍNAS. El ensayo de incorporación fue

basado en el de SPENCER y WILDMAN (43), pero la mezcla final de reacción medía 0,3 ml y consistió en 0,2 ml de preparación de cloroplastos junto con: cloruro magnésico, 12 mM; cloruro potásico, 100 mM; mercaptoetanol, 16 mM; ATP, 2,75 mM; fosfoenolpiruvato (sal trisódica), 8,3 mM; 10 μg de piruvato quinasa, GTP, CTP y UTP, 0,13 mM en cada uno de ellos y una mezcla de 2 μg de cada uno de los 20 aminoácidos, excepto leucina. Para comenzar la reacción, se añadieron 10 μl de C^{14} -leucina de una disolución conteniendo 10 μC y 0,066 $\mu M/ml$. La incorporación continuó usualmente durante 60 minutos a $25^\circ C$.

La preparación de las muestras para el conteo fue la descrita por MANS y NOVELLI (24), colocando duplicados de 0,1 ml de muestras tras el período de incubación en los discos de papel Whatman 3MM.

La composición del líquido de centelleo fue 5 g de 2,5-difenil oxazol y 0,2 g de 1,3-bis-2 (5-feniloxazolil) benceno en 1.000 ml de tolueno, y el conteo se realizó en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb.

Las muestras llegaron a tener unas 1.500 c.p.m., lo cual, teniendo en cuenta la eficacia de medida del 56 %, supuso una incorporación específica de unos 3.000 $\mu \mu M$ de C^{14} -leucina por miligramo de clorofila. El valor para el tiempo cero de incubación fue de unas 10 c.p.m.

Se usaron dos tipos de control, consistentes en la adición de la C^{14} -leucina o de la suspensión de cloroplastos, al final del período de incubación, justamente antes de colocar las muestras sobre los discos de papel.

Los duplicados de la misma suspensión de cloroplastos incubados en las mismas condiciones, pero separadamente, dieron valores con variaciones que generalmente fueron menores del $\pm 7 \%$.

CONTAMINACIÓN BACTERIANA Y OTRAS CONTAMINACIONES. Al finalizar las reacciones de incubación se tomaron alícuo-

tas, que se pusieron en tubos de cultivo de un modo similar al reseñado por SALLE (35), con diluciones sucesivas de la muestra examinada. Para minimizar la contaminación bacteriana se usó en lo posible material y reactivos estériles, bien por tratamiento térmico o por filtración a través de filtros Millipore. En otros casos, las diluciones recién preparadas se dispusieron en pequeñas alícuotas y se congelaron, para ser usadas posteriormente individualmente tras la descongelación. Sin tales precauciones la contaminación era del orden de 10^6 poblaciones de bacterias por mililitro, mientras que en el trabajo normal realizado con esos cuidados la cifra osciló usualmente entre 10^2 y 10^4 .

El tratamiento con Triton X-100, para distinguir la incorporación debida a núcleos, bacterias, células enteras o trozos de tejido, fue realizado según PARENTI y MARGULIES (29), pero usando 0,5 % de Triton X-100 en lugar del 0,1 %, pues los cloroplastos procedentes de hojas muy jóvenes tras la centrifugación a $6.000 \times g$ durante 20 minutos, depositaban parte de la clorofila en el centrifugado, si la concentración del detergente era sólo del 0,1 %. Por otra parte, concentraciones de hasta 3-4 % de Triton han sido usados por otros autores para romper los cloroplastos (16) sin que se alteren otros orgánulos (42).

CLOROFILA. Se determinó según el método de ARNON (3), con las precauciones indicadas por PARENTI y MARGULIES (29).

PRODUCTOS. La mayoría de los productos bioquímicos usados procedían de Sigma. El ficoll y el dextrano 40 de Pharmacia. El resto de reactivos generales de Fisons y B.D.H.

Resultados

En las figuras 1 y 2 se señalan los efectos del mercaptoetanol y de los iones magnesio y potasio sobre la incorporación de

C^{14} -leucina en proteínas. La dependencia fue notable y la máxima actividad se obtuvo con concentraciones entre 10 y 20 mM en magnesio, 100 mM en potasio y 16 mM en mercaptoetanol. Como se puede comprobar en la tabla I, las concentraciones necesarias, relativamente altas, de iones Mg^{2+} y K^+ no se debieron a la utilización en el medio de incubación de cloroplastos lavados, en lugar de los no lavados, que podrían tener su propio contenido en estos iones. En otros ensayos realizados con cloroplastos aislados de hojas de guisantes con tres semanas de edad, en lugar de cuatro días, también fueron necesarias concentraciones de ese tipo para obtener una síntesis óptima de proteínas, lo cual

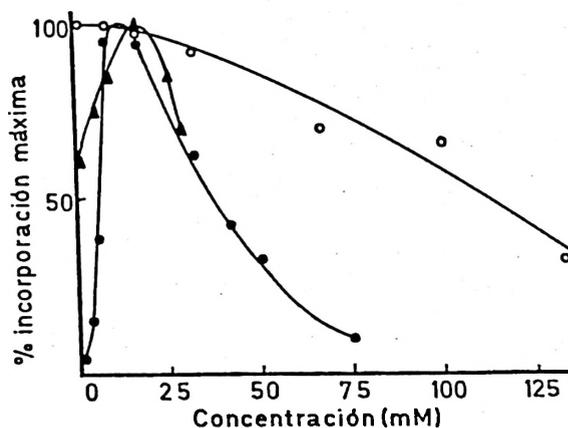


Fig. 1. Efecto de los iones magnesio (●), iones amonio (○) y del mercaptoetanol (▲) sobre la síntesis de proteínas.

Tabla I. Requerimientos de iones Mg^{2+} y K^+ en cloroplastos no lavados.

Mg^{2+} (mM)	K^+ (mM)	Radioactividad en proteínas c.p.m.
12	100	956
-	-	128
12	-	630
12	25	650
12	50	662
6	100	565

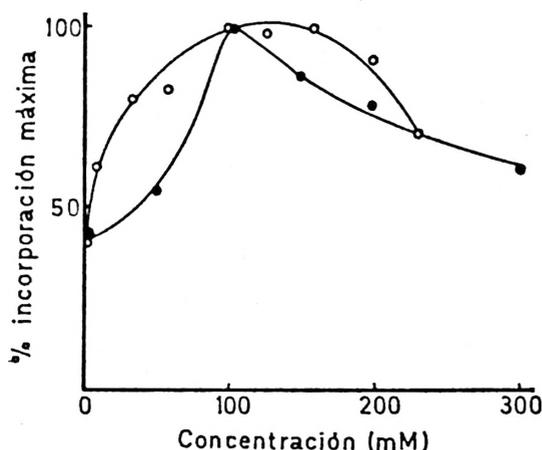


Fig. 2. Efecto de la mezcla GTP+CTP+UTP (○) y de los iones potasio (●) sobre la síntesis de proteínas.

indica que tales requerimientos son independientes del estado de madurez de los cloroplastos.

En ausencia del sistema generador de ATP (ATP, fosfoenolpiruvato y piruvato quinasa), la síntesis de proteínas cayó hasta el 7% del control con el sistema generador. La concentración óptima de ATP añadido fue entre 2 y 3 mM (fig. 3). En realidad, el efecto del ATP sobre el sistema pareció depender de la concentración de iones magnesio. Si ésta era mayor, entonces la concentración óptima de ATP también era mayor, pero la incorporación total era menor debido al efecto inhibitorio sobre el sistema de un exceso de iones magnesio. En la tabla II se comprueba que las concentraciones usadas de fosfoenolpiruvato y piruvato quinasa fueron las óptimas para conseguir la mayor síntesis proteica.

La adición de los nucleótidos GTP, CTP y UTP, incrementó la síntesis de proteínas realizada por los cloroplastos aislados, tanto si éstos procedían de hojas de tres días de edad, como los obtenidos de hojas de tres semanas de edad. La dependencia se muestra en la figura 2.

El sistema de síntesis de proteínas tam-

bién dependió de la adición al medio de incubación de una mezcla de los 19 aminoácidos, además de la C^{14} -leucina (fig. 4). La concentración óptima de la mezcla fue entre 6 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de cada uno de los aminoácidos. La dependencia de la adición de la mezcla de C^{12} -aminoácidos al medio de incubación, varió con la edad de las hojas de guisantes, siendo mucho más significativa al usar cloroplastos procedentes de hojas muy jóvenes, tal como se puede observar en la tabla III, donde se resumen los datos obtenidos en diversas determinaciones realizadas a lo largo de varios meses.

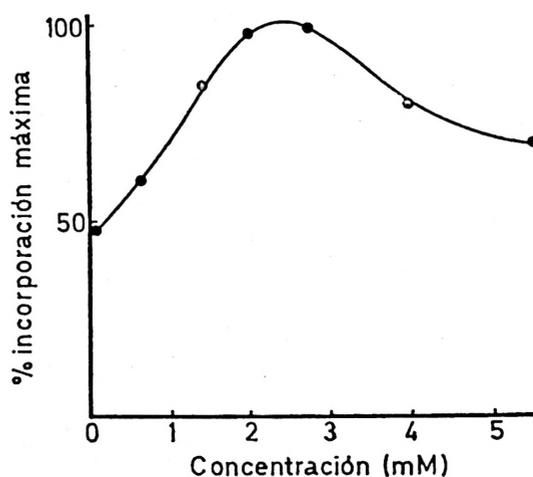


Fig. 3. Efecto del ATP añadido sobre la síntesis de proteínas.

Tabla II. Efectos de diversas adiciones de fosfoenolpiruvato (PEP) y piruvato quinasa (PK) al medio de incubación.

PEP (mM)	PK ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Radioactividad (c.p.m./muestra)
8,30	33	610
2,07	33	290
4,15	33	508
6,22	33	570
16,60	33	410
8,30	66	580
0	0	90

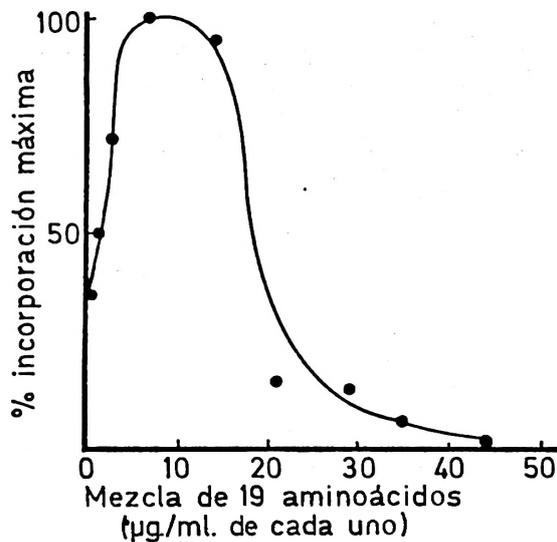


Fig. 4. Efecto de la adición de la mezcla de los 19 C^{12} -aminoácidos sobre la síntesis de proteínas.

Respecto a la acción de inhibidores, uno de los usados fue el cloranfenicol, un potente inhibidor de la síntesis de proteínas en sistemas con ribosomas 70 S, como el de cloroplastos, mitocondrias o bacterias. A partir de 25 $\mu\text{g/ml}$ inhibió la incorporación de aminoácidos en más del 90 % y aun a 6 $\mu\text{g/ml}$ la inhibición obtenida fue del 80 % (fig. 5). El efecto de la cicloheximida, de acción sobre los sistemas 80 S pero no sobre los 70 S, se estudiará en otro trabajo, por la conexión que hemos encontrado entre este antibiótico y la inhibición de un transporte activo de aminoácidos en cloroplastos. En cuanto a la acción de ribonucleasa, su efecto inhibidor aumenta a lo largo del tiempo de incubación y actúa preferentemente sobre cloroplastos rotos, confirmando las conclusiones de MARGULIES *et al.* (25) de que durante la incubación existe una ruptura de los cloroplastos. Los datos concretos sobre la acción de ribonucleasa se encuentran reunidos en las tablas IV y V y se comprobó también que los iones Cu^{2+} no tuvieron efecto inhibidor sobre la acción

de ribonucleasa, en contraste con las afirmaciones de HALL y COCKING (20).

La incorporación de radioactividad producida por bacterias, núcleos, células enteras y pequeños trozos de tejido fue estimada (tabla VI) en menos de un 5 %, por tratamiento con Triton X-100.

Usando cloroplastos previamente hervidos dos minutos, aún con dos horas de incubación, no hubo incorporación de C^{14} -leucina en proteínas, lo cual indica la ausencia de una contaminación bacteriana sensible en los reactivos. Por otra parte, en ensayos realizados con bacterias aisladas de la preparación de cloroplastos, aun concentraciones de 10^6 bacterias por mililitro de medio de incubación incorporaron tan sólo del orden del 4 % de la radioactividad que normalmente incorporaba un volumen igual de preparación de

Tabla III. Efecto de la adición de la mezcla de C^{12} -aminoácidos al sistema de síntesis de proteínas.

Edad de las hojas	Mezcla de C^{12} -aminoácidos	
	añadidos	no añadidos
3-4 días	100 %	20-60 %
3 semanas	100 %	80-98 %

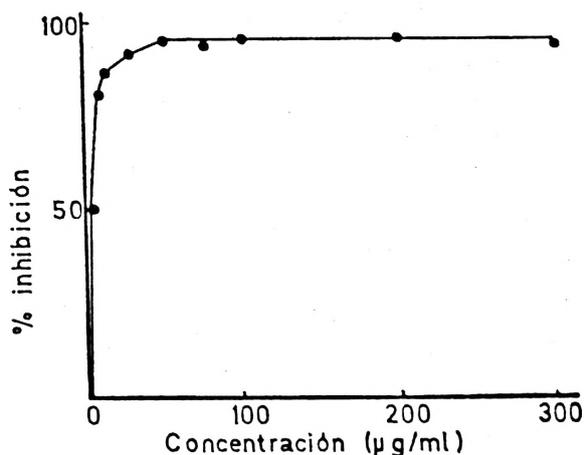


Fig. 5. Efecto inhibitorio del cloranfenicol sobre la síntesis de proteína.

Tabla IV. Efecto de la ribonucleasa (6 $\mu\text{g/ml}$) sobre el sistema de síntesis de proteínas por cloroplastos intactos o por cloroplastos rotos hipotónicamente.

Los cloroplastos rotos se prepararon centrifugando una preparación de cloroplastos sin lavar a 2000 g \times 15 minutos a 0-4° C, suspendiendo el centrifugado en un medio hipotónico de volumen igual al original, dejándolo 1 hora a 0-4° C, con agitaciones ocasionales, antes de ser utilizado como preparación de cloroplastos rotos. El medio hipotónico consistió en cloruro magnésico 1 mM y mercaptoetanol 4 mM en tampón Tris 0,01 M pH 7,8.

Cloroplastos	Proteínas sintetizadas (c.p.m./muestra)
Intactos	1110
Intactos + RNA-asa	522
Inhibición %	47
Rotos	190
Rotos + RNA-asa	44
Inhibición %	77

cloroplastos. Teniendo en cuenta que usualmente nuestros valores de contaminación bacteriana tras la incubación del sistema de síntesis, fueron de alrededor de 10^3 bacterias por mililitro, o sea 3 órdenes menos que 10^6 , ello indica la poca importancia de la posible incorporación bacteriana en nuestro sistema. Otra confirmación de ello se obtuvo preincubando el sistema de incorporación completo, excepto la C^{14} -leucina, durante 90 minutos a 25° C, con lo cual se inactivó el sistema, y es de esperar que tras esa preincubación el número de bacterias viables fuese mayor o igual que antes de la preincubación. En tales condiciones y tras la adición de la C^{14} -leucina e incubación durante una hora, la radioactividad en proteínas de las muestras fue sólo de 4 c.p.m. en un ensayo en que la contaminación era de 10^5 /ml y de 10 c.p.m. en otro ensayo con 10^6 /ml, o sea entre el 0,3 % y el 0,6 % de los valores usuales del sistema de cloroplastos.

Por todo ello, podemos afirmar razonablemente que los resultados de incorpora-

ción no se deben en cuantía apreciable a ninguna de las posibles contaminaciones citadas.

Discusión

La dependencia de la síntesis de proteínas realizada en cloroplastos aislados, en relación con la concentración de iones magnesio, ha sido señalada por diversos investigadores, variando la concentración óptima entre 2-5 mM (5, 16) a 20-200 mM para cloroplastos de *Acetabularia* (19). Menos datos existen respecto a iones potasio y a mercaptoetanol, y sólo FRANCKI *et al.* (16) indicaron, para cloroplastos de tabaco, que el óptimo de concentraciones de mercaptoetanol era entre 0,26 y 7,7 mM, sin que fuese crítica en dicho rango, lo cual muestra un comportamiento algo diferente al que nosotros encontramos en nuestro sistema.

Tabla V. Inhibición producida por ribonucleasa (6 $\mu\text{g/ml}$) a lo largo del tiempo de incubación del sistema.

A lo largo del periodo de incorporación se tomaron muestras a los tiempos indicados.

Sistema	c.p.m./muestra		
	min.: 0-30	30-45	45-60
Normal	892	308	75
Normal + RNA-asa	525	124	28
Inhibición %	41	60	63

Tabla VI. Tratamiento con Triton X-100.

La operación se realizó como se describe en Material y métodos. El centrifugado fue suspendido en un volumen de medio Honda igual al original, para poder tomar las muestras de medida de radioactividad.

Sistema	Incorporación	
	c.p.m.	%
Sistema sin tratar	1380	100
Sobrenadante tras tratamiento y centrifugación	1368	99
Porción sólida resuspendida tras tratamiento y resuspensión	60	4

Nuestra concentración óptima de iones magnesio, 12 mM, está en concordancia con los datos de sedimentación de ribosomas cloroplásticos publicados por SISSAKYAN *et al.* (40), SAGER *et al.* (34) y por FILIPPOVICH *et al.* (15), con distintos materiales y que indican que con esas concentraciones de iones magnesio sedimentan polirribosomas y ribosomas, mientras que con magnesio 1 mM los polirribosomas y aun los ribosomas se disocian. Nuestros resultados también concuerdan con los datos publicados por BOARDMAN *et al.* (7), estudiando ribosomas 70 S y 80 S purificados, procedentes de clorooplastos y citoplasma de hojas de tabaco, respectivamente. La síntesis óptima de proteínas tuvo lugar en el primer caso, ribosomas 70 S, entre concentraciones 11 y 15 mM de magnesio, similares a los requerimientos de magnesio de los ribosomas 70 S de *Escherichia coli* (45), mientras que para los ribosomas 80 S fue entre 4 y 7 mM, semejante a la necesitada para la máxima actividad por los ribosomas de reticulocitos (22). De este modo, con una concentración 4 mM en magnesio, de acuerdo con los datos de BOARDMAN *et al.* (7), el sistema 80 S operaría casi a un 70 % de la actividad máxima, mientras que el 70 S lo haría sólo con algo más del 10 %. A esa concentración de iones magnesio, nuestro sistema cloroplástico de incorporación de aminoácidos opera al 13 % de su actividad máxima, lo cual indica la ausencia de una apreciable participación de los citorribosomas contaminantes que pudieran hallarse en la preparación, en la síntesis de proteínas. Concentraciones óptimas de iones magnesio semejantes a la de nuestro sistema han sido señaladas en sistemas aislados de clorooplastos por SAGER *et al.* (34) y SPENCER y WILDMAN (43).

Respecto a la necesidad de la adición al medio de incubación de un sistema generador de ATP, los datos existentes son ciertamente contradictorios. No aumentó apreciablemente la síntesis de proteínas e incluso a veces se inhibió en los casos es-

tudiados por APP y JAGENDORF (1) y otros (6, 19, 38, 40 y 46). Sin embargo, algunos de estos resultados se han criticado (2), indicando que eran debidos a contaminaciones bacterianas, sobre todo en los casos en que no se han acompañado datos demostrando la ausencia de bacterias o que éstas tuvieran una participación mínima en la incorporación. Ello es particularmente aplicable a los estudios previos al nuestro sobre el sistema de clorooplastos de guisantes. Los resultados que hemos obtenido sobre la necesidad del sistema generador de ATP, están de acuerdo, por otra parte, con lo conocido en otros sistemas (5, 7, 13, 29, 34, 42 y 43). De todos modos y a la vista de nuestros hallazgos sobre la influencia que posee la concentración de ATP añadida sobre la actividad del sistema de clorooplastos de guisantes, quizás algunos de los resultados discrepantes citados anteriormente se pueden deber a no haber tenido en cuenta esa dependencia y, por tanto, haber usado concentraciones inadecuadas de ATP, que en defecto sólo produciría una pequeña activación y en exceso puede llegar a ocasionar la inhibición de la síntesis de proteínas.

Un efecto semejante podría explicar también el distinto grado de dependencia hallado en los distintos sistemas cloroplásticos descritos, respecto a la adición de GTP o de la mezcla de los nucleótidos GTP, CTP y UTP.

Nuevamente nos encontramos con datos contradictorios en relación con el efecto que sobre el sistema de síntesis de proteínas cloroplásticas *in vitro* produce la adición de una mezcla de aminoácidos. HEBER (21), con clorooplastos de espinacas, BOARDMAN *et al.* (7) con ribosomas de clorooplastos de tabaco, y SISSAKYAN *et al.* (40), con ribosomas de clorooplastos de guisantes, no encontraron acción estimulante por la adición de la mezcla de aminoácidos, en contraste con los datos de SPENCER (42), con clorooplastos de espinacas, SPENCER y WILDMAN (43), con cloroplas-

tos de tabaco, y de PARENTI y MARGULIES (29) con cloroplastos de judías. BAMJI y JAGENDORF (5), usando plastidios de trigo, señalaron la importancia que tenía en orden a obtener unos u otros resultados, la relación existente entre las concentraciones de aminoácido radioactivo añadido y la de la mezcla de los otros aminoácidos adicionados, quizás porque a bajas concentraciones de aquél, era el factor limitante de la incorporación.

Por nuestra parte, creemos que hay dos hechos deducibles de nuestras experiencias y que podrían aclarar algo sobre el problema de los resultados discrepantes existentes. En primer lugar resaltar que el grado de dependencia es función de la cantidad añadida de aminoácidos, de modo que si ésta no es óptima, no solamente no se observa el efecto activador, sino que puede inhibir, como ocurre si existe un exceso de aminoácidos presentes. En segundo lugar, que el grado de dependencia es función del estado de desarrollo de los cloroplastos, siendo mayor en las primeras etapas del desarrollo de éstos.

En cuanto al efecto de los iones amonio, desde que SPENCER (42) señaló sus características activadoras de la síntesis proteica de cloroplastos, otros autores lo han confirmado (5, 17). CONWAY (10) y SPYRIDES (44), con *Escherichia coli*, indicaron la necesidad de los iones amonio durante la unión de aminoacil-sRNA a los ribosomas. En otros sistemas cloroplásticos ese efecto activador de los iones amonio no se ha producido y quizás, al menos parcialmente, la causa sea el hecho observado por nosotros de que la dependencia de los iones amonio es variable con el estado de desarrollo de los cloroplastos y sólo produce el efecto activador sobre los cloroplastos ya maduros.

Resumen

Se ha estudiado la síntesis de proteínas realizada por cloroplastos aislados de hojas de guisantes en relación con concentraciones varia-

bles de mercaptoetanol, iones magnesio y potasio, GTP, CTP y UTP, sistema generador de ATP, mezcla de aminoácidos añadidos e iones amonio. La mezcla de aminoácidos estimuló la síntesis si los cloroplastos usados eran jóvenes, mientras que el efecto activador de los iones amonio se hizo patente sobre cloroplastos maduros. Se demuestra el mínimo grado de participación en la síntesis proteica producida por las diversas contaminaciones posibles.

Bibliografía

1. APP, A. A. y JAGENDORF, A. T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 286, 1963.
2. APP, A. A. y JAGENDORF, A. T.: *Plant Physiol.*, **39**, 772, 1964.
3. ARNON, D. I.: *Plant Physiol.*, **24**, 1, 1949.
4. ARNON, D. I. y HOAGLAND, D. R.: *Soil Sci.*, **50**, 463, 1940.
5. BAMJI, M. S. y JAGENDORF, A. T.: *Plant Physiol.*, **41**, 764, 1966.
6. BISWAS, S. y BISWAS, B. B.: *Experientia*, **21**, 251, 1965.
7. BOARDMAN, N. K., FRANCKI, R. I. B. y WILDMAN, S. G.: *J. Mol. Biol.*, **17**, 470, 1966.
8. CHAKRAVORTY, A. K. y BISWAS, B. B.: *Indian J. of Biochem.*, **2**, 275, 1965.
9. CHEN, J. J. y WILMAN, S. G.: *Science*, **155**, 1271, 1967.
10. CONWAY, T. W.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 1216, 1964.
11. EISENSTADT, J.: En *Biochemistry of Chloroplasts*, Ed. Goodwin; Academic Press, pág. 341, 1967.
12. EISENSTADT, J. y BRAWERMAN, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **76**, 319, 1963.
13. EISENSTADT, J. y BRAWERMAN, G.: *J. Mol. Biol.*, **10**, 392, 1964.
14. ELLIS, R. J.: *Biochem. J.*, **110**, 42, 1968.
15. FILIPPOVICH, I. I., SVETAILO, E. N., ALIEV, K. y SISSAKYAN, N. M.: *Doklady Biochem., Proc. Acad. Sci. URSS*, English Transl., **153**, 1457, 1964.
16. FRANCKI, R. I. B., BOARDMAN, N. K. y WILDMAN, S. G.: *Biochemistry*, **4**, 865, 1965.
17. GNAMAN, A. y KAHN, J. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **142**, 486, 1967.
18. GOFFEAU, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **174**, 340, 1969.

19. GOFFEAU, A. y BRACHET, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 302, 1965.
20. HALL, T. C. y COCKING, E. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 163, 1966.
21. HEBER, U.: *Nature*, **195**, 91, 1962.
22. LAMFRON, H. y KNOPF, P. M.: *J. Mol. Biol.*, **9**, 558, 1964.
23. LINNANE, A. W. y STEWART, P. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 511, 1967.
24. MANS, R. J. y NOVELLI, G. K.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 48, 1961.
25. MARGULIES, M. M., GANTT, E., y PARENTI, F.: *Plant Physiol.*, **43**, 495, 1968.
26. MARGULIES, M. M. y PARENTI, F.: *Plant Physiol.*, **43**, 504, 1968.
27. MELIK-SARKISYAN, S. S., GONCHAROV, V. P. y SISSAKYAN, N. M.: *Biokhimiya*, **30**, 183, 1965.
28. NIKOLAEVA, M. K., OSIPOVA, O. P. y KRYLOV, Y. V.: *Doklady Akad. Nauk. URSS*, **175**, 487, 1967.
29. PARENTI, F. y MARGULIES, M. M.: *Plant Physiol.*, **42**, 1179, 1967.
30. PARTHIER, B.: *Z. Naturforsch.*, **19b**, 235, 1964.
31. PARTHIER, B. y WOLLGIEHM, R.: *Naturwissenschaften*, **50**, 598, 1963.
32. RAMÍREZ, J. M., DEL CAMPO, F. y ARNON, D. I.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 606, 1968.
33. RAMÍREZ, J. M., DEL CAMPO, F. y ARNON, D. I.: *Congreso de las FEBS (Madrid)*. Abstract núm. 905, 1969.
34. SAGER, R., WEINSTEIN, I. B., ASHKENAZI, Y.: *Science*, **140**, 304, 1963.
35. SALLE, A. J.: En *Fundamental Principles of Bacteriology*, McGraw-Hill, N. Y., 552, 1948.
36. SCOTT, N. S., SMILLIE, R. M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 598, 1967.
37. SISSAKYAN, N. M., BEZINGER, E. N., MARCHUKAITIS, A. S.: *Doklady Biochem., Proc. Acad. Sci. URSS, English Transl.*, **147**, 1245, 1962.
38. SISSAKYAN, N. M., FILIPPOVICH, I. I.: *Biokhimiya*, **22**, 375, 1957.
39. SISSAKYAN, N. M., FILIPPOVICH, I. I. y SVETAILO, E. N.: *Doklady Akademii Nauk. URSS*, **147**, 488, 1962.
40. SISSAKYAN, N. M., FILIPPOVICH, I. I., SVETAILO, E. N., ALIYEV, K. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 474, 1965.
41. SMILLIE, R. M., GRAHAM, D., DWYER, M., GRIEVE, A., TOBIN, N. F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 604, 1967.
42. SPENCER, D.: *Biochem. and Biophys.*, **111**, 381, 1965.
43. SPENCER, D. y WILDMANN, G. G.: *Biochemistry*, **3**, 954, 1964.
44. SPYRIDES, G. J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 1222, 1964.
45. TISSIÈRES, A., SCHLESSINGER, D. y GROSS, F.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **46**, 1450, 1960.
46. STEPHENSON, M. L., THIMANN, K. V. y ZAMECNIK, P. C.: *Arch. Biochem. and Biophys.*, **65**, 194, 1956.

