

# IMPORTANCIA DEL CICLO LUTEÍNA EPOXIDO EN LAS ESPECIES LEÑOSAS DE LOS BOSQUES ESPAÑOLES.

Koldobika Hormaetxe<sup>1,3</sup>, María Soledad Jiménez<sup>2</sup>, Domingo Morales<sup>2</sup>, Raquel Esteban<sup>1</sup>, Antonio Hernández<sup>1</sup>, José María Becerril<sup>1</sup> y José Ignacio García-Plazaola<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Universidad del País Vasco UPV/EHU. Apartado 644. E-48080 Bilbao. España.

<sup>2</sup>Departamento de Biología Vegetal. Universidad de La Laguna. E-38207 La Laguna, Tenerife. España.

<sup>3</sup>Autor; e-mail: gvbhomok@lgdx04.lg.ehu.es

Mesa temática: 1. Caracterización, dinámica y biodiversidad de los ecosistemas forestales.

## Resumen

Los tejidos fotosintéticos necesitan un eficiente sistema fotoprotector que sea capaz de disipar el exceso de energía, ya que la sobreexcitación del aparato fotosintético causa la destrucción de los tejidos vegetales durante situaciones ambientales adversas (sequía, frío, luz, contaminación...) a través de la producción de especies activas de oxígeno. Este sistema está modulado por la actividad del denominado ciclo de las xantofilas o ciclo VAZ que está presente en todas las plantas vasculares. Recientemente se ha encontrado otro ciclo que actúa en paralelo al ciclo VAZ y que también está implicado en la disipación energética, denominado ciclo luteína epóxido (ciclo Lx). A diferencia del anterior este ciclo no está presente en todas las especies vegetales. En este trabajo se muestra, analizando la composición pigmentaria de 47 especies leñosas características de los bosques españoles, que la luteína epóxido alcanza concentraciones fisiológicamente relevantes tan solo en las familias de las lauráceas y fagáceas. En especies de la familia Lauraceae, el ciclo Lx sustituye en parte al ciclo VAZ, tanto en concentración como en función, y así la fotoconversión de Lx y de V se correlacionaron con la máxima eficiencia fotoquímica del PSII (Fv/Fm) contribuyendo al nivel de fotoprotección. Este hallazgo puede llegar a tener una cierta relevancia en el funcionamiento de los ecosistemas forestales españoles ya que las fagáceas son las especies dominantes en la mayor parte de la superficie forestal española. Pero además este mecanismo puede ser especialmente relevante en el caso de la laurisilva macaronésica, ecosistema forestal dominado por las lauráceas.

Palabras clave: fotoinhibición, fotoprotección, luteína, VAZ.

## INTRODUCCIÓN

Las especies forestales tienen que adaptar su aparato fotosintético a las condiciones ambientales en las que se desarrollan. No solo los estreses ambientales como el frío, la sequía o los contaminantes son perjudiciales para el sistema fotoquímico, el exceso de luz tanto por alta irradiancia continuada como por destellos luminosos (*sunflecks*) también puede causar la destrucción del aparato fotosintético. Cuando las hojas absorben más luz de la que pueden usar en fotosíntesis deben disipar el exceso de energía en forma de calor. Este sistema, presente en todas las plantas, está modulado por la conversión de violaxantina (V) primero en anteraxantina (A) y después en zeaxantina (Z), proceso llamado ciclo VAZ o ciclo de las xantofilas (DEMMING-ADAMS et al., 1999; ADAMS et al., 2002).

Además del ciclo VAZ, en plantas superiores, existe otro ciclo no universal denominado ciclo luteína epóxido (Lx), que fue descubierto en la planta parásita *Cuscuta reflexa* Roxb. (BUNGARD et al., 1999). Aunque la presencia de Lx está bastante extendida entre las especies, su distribución es desigual entre los diferentes taxones (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2004). Recientemente se ha demostrado que este ciclo es operativo en hojas de muérdagos de la familia Loranthaceae (MATSUBARA et al., 2001, 2002, 2003) en especies del género *Quercus* (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2002, 2003; LLORENS et al., 2002) y en Leguminosas como *Acacia melanoxylon* (WATSON et al., 2004) y en *Inga sapindoides* (MATSUBARA et al., 2005).

El ciclo Lx realiza la interconversión entre Lx y luteína (L) de una forma análoga a A y Z por las enzimas violaxantina de-epoxidasa (VDE) y zeaxantina epoxidasa (ZE). La cinética de la de-epoxidación a la luz es similar en ambos ciclos, pero su recuperación en oscuridad es mucho más lenta, lo que sugiere que este ciclo pudiera operar de modo unidireccional. No obstante recientes estudios (MATSUBARA et al., 2005; HORMAETXE et al., 2005) han encontrado dos especies (*Inga sapindoides* y *Laurus nobilis*) en las que el ciclo Lx es reversible. La diferente distribución de ambos ciclos sugiere que el ciclo Lx puede servir como un ciclo adicional en ambientes de sombra, manteniendo el nivel de disipación después de un cambio en el ambiente luminoso (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2003). Además se ha sugerido que la luteína es el primer mecanismo de fotoprotección durante la fotoaclimatación en *I. sapindoides*, convirtiendo los centros de absorción de luz o pigmentos antena de las hojas de sombra en centros potenciales de disipación de energía (MATSUBARA et al., 2005).

Debido a que las condiciones lumínicas limitan en muchos casos el desarrollo de las especies forestales, en este trabajo hemos estudiado la importancia que tiene el ciclo Lx como ciclo adicional al VAZ por su papel en el sistema fotoprotector en las especies forestales ante cambios súbitos del ambiente luminoso.

## METODOLOGÍA

El material vegetal para el estudio de la relación entre la Lx con la V, así como para la relación entre el ciclo Lx y ciclo VAZ, se recolectó en diversas localidades próximas al campus de la Universidad del País Vasco en Leioa (España), en Real Jardín Botánico (Madrid, España), en la Península de Anaga y los alrededores del campus de la Universidad de La Laguna en La Laguna (Tenerife, España). Se utilizaron hojas de sombra de 47 especies: *Acer campestre* (Sapindaceae), *Acer pseudoplatanus* (Sapindaceae), *Alnus glutinosa* (Betulaceae), *Apollonias barbujana* (Lauraceae), *Arbutus unedo* (Ericaceae), *Alnus glutinosa* (Betulaceae), *Betula celtiberica* (Betulaceae), *Buxus sempervirens* (Buxaceae), *Castanea sativa* (Fagaceae), *Cedrus atlantica* (Pinaceae), *Cistus salvifolius* (Cistaceae), *Cornus sanguinea* (Cornaceae), *Corylus avellana* (Betulaceae), *Crataegus monogyna* (Rosaceae), *Fagus sylvatica* (Fagaceae), *Ficus carica* (Moraceae), *Ilex perado* (Aquifoliaceae), *Laurus azorica* (Lauraceae), *Laurus nobilis* (Lauraceae), *Liriodendron tulipifera* (Magnoliaceae), *Malus domestica* (Rosaceae), *Myrica faya* (Myricaceae), *Ocotea foetens* (Lauraceae), *Persea indica* (Lauraceae), *Pinus nigra* (Pinaceae), *Pinus sylvestris* (Pinaceae), *Populus tremula* (Salicaceae), *Prunus dulcis* (Rosaceae), *Prunus lusitanica* (Rosaceae), *Quercus canariensis* (Fagaceae), *Quercus faginea* (Fagaceae), *Quercus ilex* (Fagaceae), *Quercus petraea* (Fagaceae), *Quercus pyrenaica* (Fagaceae), *Quercus rubra* (Fagaceae), *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae), *Rhamnus glandulosa* (Rhamnaceae), *Salix atrocinerea* (Salicaceae), *Salix babilonica* (Salicaceae), *Taxus baccata* (Taxaceae), *Tilia cordata* (Tiliaceae), *Ulmus minor* (Ulmaceae), *Viburnum lantana* (Caprifoliaceae), *Viburnum opulus* (Caprifoliaceae), *Viburnum rigidum* (Caprifoliaceae), *Viburnum tinus* (Caprifoliaceae) y *Visnea mocanera* (Theaceae).

Las hojas se recolectaron y se mantuvieron en oscuridad durante 12 h a temperatura ambiente (20-22 °C) para reducir los efectos de las variaciones diurnas en antioxidantes y pigmentos y conseguir condiciones comparables. Las hojas se muestrearon mediante discos (5 mm de diámetro),

que se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Para el estudio de la relación entre la máxima eficiencia fotoquímica del PSII y la de-epoxidación de los ciclos Lx y VAZ, se expusieron hojas de *Laurus nobilis* a un tratamiento fotoinhibitorio consistente en 5, 15, 30 y 60 minutos de irradiancia a 250 y 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PPFD), y fueron recolectadas después de 1 y 3 h de recibir el choque lumínico.

Los pigmentos fotosintéticos fueron extraídos y determinados mediante HPLC siguiendo el protocolo de GARCÍA-PLAZAOLA & BECERRIL (1999) con las modificaciones descritas en GARCÍA-PLAZAOLA & BECERRIL (2001). Los tiempos de retención y los factores de conversión fueron los mismos que se describen en GARCÍA-PLAZAOLA & BECERRIL (1999, 2001).

La fluorescencia de la clorofila a se realizó en el laboratorio usando un fluorímetro modulado portátil (OS 5-FL, Optisciences, Tyngsboro, MA). La máxima eficiencia fotoquímica del PSII fue estimada por el ratio  $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ . La fluorescencia inicial ( $F_o$ ) y máxima ( $F_m$ ) fue medida en hojas adaptadas a la oscuridad con un pulso saturante de 0,8s.

Los índices de de-epoxidación se calcularon después de un choque fotoinhibitorio en función de la cantidad de xantofila epoxidada relativizada por la cantidad inicial o máxima,  $LxDE = (Lx_o - Lx_i/Lx_o)$  y  $VDE = (V_o - V_i/V_o)$  siendo “o” las concentraciones al amanecer o máxima e “i” las concentraciones después de 1 o 3 h de exposición lumínica. La significación estadística de las regresiones lineales se realizó mediante el programa estadístico Stat View 5.0 (Abacus Concepts INC., Berkeley, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de Lx en tejidos fotosintéticos aumenta en condiciones de sombra (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2002, 2004; MATSUBARA et al., 2002, 2005; HORMAETXE et al., 2005), por lo que este estudio se ha realizado exclusivamente en hojas de sombra de 47 especies de árboles y arbustos. En estas especies el contenido de Lx se correlacionó negativamente con la concentración de V indicando que la Lx sustituye a la V. No obstante los valores de Lx no llegan a superar en ninguna especie los valores de V, siendo el valor máximo de Lx de 23,7  $\text{mmol mol}^{-1}$  clorofila y el valor mínimo de V de 24,8  $\text{mmol mol}^{-1}$  clorofila (Fig. 1). GARCÍA-PLAZAOLA et al. (2002, 2003) indicó que el ciclo Lx es un ciclo adicional y complementario al ciclo VAZ, y con estos nuevos resultados, el ciclo Lx se muestra como un sistema fotoprotector que puede llegar a reemplazar en parte al ciclo VAZ. Sin embargo, este pigmento solo está presente en concentraciones significativas (superiores a 5  $\text{mmol mol}^{-1}$  clorofila) en plantas de las familias de las fagáceas y de las lauráceas. Por lo tanto es importante determinar el papel ecofisiológico de este ciclo en las especies de estas familias.

Para ello se correlacionó el contenido total de Lx + L con el de V+A+Z en hojas de sombra de las especies analizadas de lauráceas y fagáceas. Se observó una correlación inversa solo en las lauráceas indicando que en estas especies que el ciclo Lx puede llegar a sustituir al ciclo VAZ (Fig. 2). En este grupo la actividad de este ciclo podría ser especialmente relevante en su adaptación a las condiciones ambientales sombrías. En este sentido se ha hipotetizado que la luteína ocupa los sitios L2 y V1 de los complejos antena facilitando la relajación a las clorofilas en estado singlete y/o triplete por su capacidad disipadora de energía, y así se ha propuesto que este es un mecanismo fotoprotector que actúa de modo precoz durante la fotoaclimatación, convirtiendo a los complejos antena de las plantas de sombra en centros de disipación de energía (MATSUBARA et al., 2005).

Experimentos previos llevados por nuestro grupo (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2003) han demostrado que en *Quercus* existe una relación directa entre la concentración de V y Lx que se fotoconvierte y la tasa de formación del *quenching* no fotoquímico (NPQ), así como una relación

inversa con la Fv/Fm, lo que sugiere su potencial papel fotoprotector. Para corroborar la función fotoprotectora del ciclo Lx se realizó un experimento fotoinhibitorio a diferentes tiempos de exposición lumínica y a diferentes intensidades con hojas de una Laurácea (*Laurus nobilis*) como se describe en la metodología. Como se muestra en la Fig.3, tanto la de-epoxidación de Lx como la de V se correlacionan negativamente con la Fv/Fm, indicando que la de-epoxidación de Lx en L tiene una función fotoprotectora adicional y puede jugar un papel importante en la fotoaclimatación de esta especie.

## CONCLUSIÓN

El contenido de luteína epóxido se correlaciona negativamente con los niveles de violaxantina presentes en hojas de sombra de 47 especies leñosas. Entre todas las especies tan solo en fagáceas y lauráceas, los componentes de este ciclo alcanzan concentraciones fisiológicamente relevantes. Aparte de un posible papel fotoprotector adicional del ciclo VAZ en las lauráceas, el ciclo Lx puede llegar a sustituir parcialmente el ciclo VAZ.

La activación del ciclo Lx por la luz en las lauráceas se correlaciona negativamente con la máxima eficiencia fotoquímica del PSII (Fv/Fm) en diferentes estadios fotoinhibitorios de forma similar a la V, indicando que este ciclo tiene una función importante en fotoprotección y que juega un papel importante en la fotoaclimatación.

## Agradecimientos

Esta investigación ha sido realizada gracias al proyecto BFU 2004-02876/BFI del MEC de España y al proyecto 9/UPV 0018.310-135331/2001. Koldobika Hormaetxe recibió una beca predoctoral del Ministerio de Ciencia y Tecnología de España. Agradecemos a Beatriz Fernández Marín por su colaboración y asistencia técnica, así como al equipo técnico del Jardín Botánico de Madrid.

## BIBLIOGRAFIA

ADAMS, W.W., DEMMING-ADAMS, B., ROSENTIEL, T. N., BRIGHTWELL, A.K. & EBBERT, V.; 2002. Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants. *Plant Biol.* 4: 545-557.

BUNGARD, R.A., RUBAN, A.V., HIBBERD, J.M., PRESS, M.C., HORTON, P. & SCHOLLES, J.D.; 1999. Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 96: 1135-1139.

DEMMING-ADAMS, B., ADAMS, W.W., EBBERT, V. & LOGAN, B.A.; 1999. Ecophysiology of the xanthophyll cycle. In: FRANK, H.A., YOUNG, A.J., BRITTON, G. & R.J. COGDELL (eds), *The Photochemistry of Carotenoids*: 245-269. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

GARCÍA-PLAZAOLA, J.I. & BECERRIL, J.M.; 1999. A rapid HPLC method to measure lipophylic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem. Analysis.* 10: 1-7.

GARCÍA-PLAZAOLA, J.I. & BECERRIL, J.M.; 2001. Seasonal changes in photosynthetic pigments and antioxidants in beech (*Fagus sylvatica*) in a Mediterranean climate: implications for tree decline diagnosis. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 225-232.

GARCÍA-PLAZAOLA, J.I., ERRASTI, E., HERNÁNDEZ, A. & BECERRIL, J.M.; 2002. Occurrence and operation of the lutein epoxide cycle in *Quercus* species. *Func. Plant Biol.* 29: 1075-1080.

GARCÍA-PLAZAOLA, J.I., HERNÁNDEZ, A., OLANO, J.M. & BECERRIL, J.M.; 2003. The operation of the lutein epoxide cycle correlates with energy dissipation. *Funct. Plant Biol.* 30:

319-324.

GARCÍA-PLAZAOLA, J.I., HORMAETXE, K., HERNÁNDEZ, A., OLANO, J.M. & BECERRIL, J.M.; 2004. The lutein cycle in vegetative buds of woody plants. *Funct. Plant Biol.* 31: 815-823.

HORMAETXE, K., ESTEBAN, R., HERNÁNDEZ, A., BECERRIL, J.M. & GARCÍA-PLAZAOLA, J.I.; 2005. Relevancia del ciclo luteína epóxido (Lx) en las respuestas fotoprotectoras de las especies leñosas de los bosques ibéricos. En: Actas de la I Reunión del Grupo de Trabajo de Ecología, Ecofisiología y Suelos Forestales. S.E.C.F. Pontevedra 20 y 21 Octubre 2004. En prensa.

LLORENS, L., ARANDA, X., ABADÍA, A. & FLECK, I.; 2002. Variations in *Quercus ilex* chloroplast pigment content during summer stress: involvement in photoprotection according to principal component analysis. *Funct. Plant Biol.* 29: 81-88.

MATSUBARA, S., GILMORE, A.M. & OSMOND, C.B.; 2001. Diurnal and acclimatory responses of violaxanthin and lutein epoxide in the Australian mistletoe *Amyema miquelii*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 793-800.

MATSUBARA, S., GILMORE, A.M., BALL, M.C., ANDERSON, J.M. & OSMOND, C.B.; 2002. Sustained downregulation of photosystem II in mistletoes during winter depression of photosynthesis. *Funct. Plant Biol.* 29: 1157-1169.

MATSUBARA, S., MOROSINOTTO, Y., BASSI, R., CHRISTIAN, A.L., FISCHER-SCHLIEBS, E., LÜTTGE, U., ORTHEN, B., FRANCO, A.C., SCARANO, F.R., FÖRSTER, B., POGSON, B.J. & OSMOND, C.B.; 2003. Occurrence of the lutein-epoxide cycle in mistletoes of the Loranthaceae and Viscaceae. *Planta.* 217: 868-879.

MATSUBARA, S., NAUMANN, M., MARTIN, R., NICHOL, C., RASCHER, U., MOROSINOTTO, Y., BASSI, R. & OSMOND, B.; 2005. Slowly reversible de-epoxidation of lutein-epoxide in deep shade leaves of a tropical tree legume may “lock-in” lutein-based photoprotection during acclimation to strong light. *J. Exp. Bot.* 56(411): 461-468.

WATSON, T.L., CLOSE, D.C., DAVIDSON, N.J. & DAVIES, N.W.; 2004. Pigment dynamics during cold-induced photoinhibition of *Acacia melanoxylon*. *Funct. Plant Biol.* 31: 481-489.

## Leyendas de las figuras

Fig.1 Correlación entre el contenido de Lx y V ( $\text{mmol mol}^{-1}$ clorofila) en hojas de sombra de 47 especies forestales. Los círculos corresponden a las lauráceas, los cuadrados negros corresponden a las fagáceas y los triángulos al resto de especies. Las regresiones fueron estadísticamente significativas.

Fig.2 Relación entre la concentración de Lx+L y VAZ ( $\text{mmol mol}^{-1}$ clorofila) en hojas de sombra de lauráceas (círculos y línea de regresión continua) y fagáceas (cuadrados y línea de regresión discontinua).

Fig.3 Correlación entre la máxima eficiencia fotoquímica del PSII ( $F_v/F_m$ ) y los índices de de-epoxidación (LxDE y VDE) en hojas de sombra de *Laurus nobilis*.

## Figuras

Fig.1

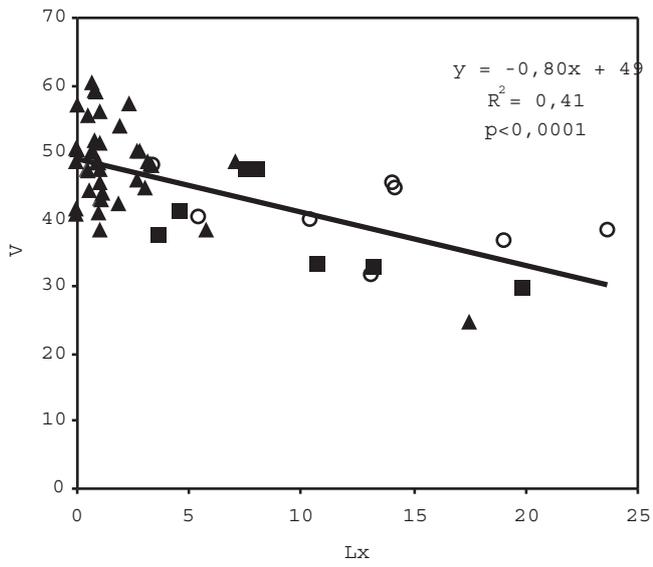


Fig.2

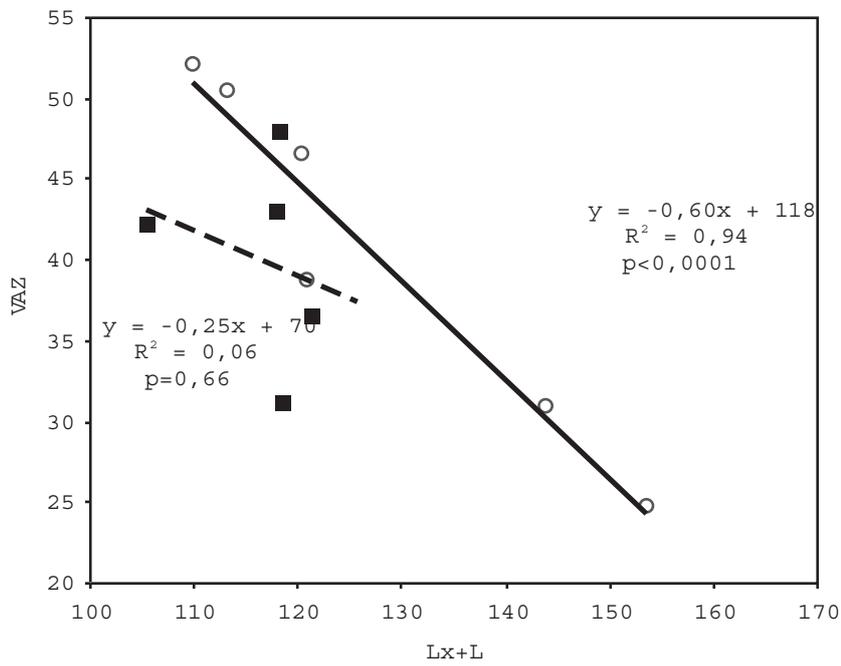


Fig. 3

