

RELEVANCIA DEL CICLO DE LA LUTEINA EPOXIDO (LX) EN LAS RESPUESTAS FOTOPROTECTORAS DE LAS ESPECIES LEÑOSAS DE LOS BOSQUES IBÉRICOS

Koldobika Hormaetxe, Raquel Esteban, Antonio Hernández, José María Becerril y José Ignacio García-Plazaola

Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Universidad del País Vasco UPV/EHU. Apartado 644. 48080-BILBAO (España). Correo electrónico: gvbhomok@lgdx04.lg.ehu.es.

Resumen

El uso eficiente de la luz en fotosíntesis debe ser compatible con la habilidad para disipar el exceso de energía, proceso crucial para la supervivencia de las plantas, que es modulado principalmente por el ciclo de las xantofilas (VAZ). El ciclo de la luteína epóxido (Lx) es otro ciclo auxiliar involucrado en la disipación de energía que se encuentra en algunas plantas vasculares. Este ciclo actúa en paralelo con el ciclo VAZ, compartiendo el papel fotoprotector, aunque no se ha demostrado que opere de forma completamente reversible (a corto plazo). En el presente trabajo se demuestra por primera vez que el ciclo es completamente reversible en condiciones naturales en hojas de *Laurus nobilis*, a diferencia de lo que se ha observado en otras especies del género *Quercus*. La diferente regulación y comportamiento del ciclo en estos dos taxones sugiere que puede jugar papeles ecológicos diferentes, pero también es coherente con su posible origen polifilético. En este caso más que de un ciclo, habría que hablar de varios ciclos. Además el mayor contenido de Lx que de VAZ en hojas de sombra de laurel indica que incluso podría tener una mayor importancia cuantitativa en los sistemas de fotoprotección. Su amplia distribución taxonómica entre las especies leñosas sugiere una especial relevancia, ya que está presente en familias como las Pináceas y las Fagáceas, que son las especies dominantes en más del 90% de la superficie forestal española

Palabras clave: Irradiancia, *Laurus nobilis*, Luteína, Plántulas, VAZ

INTRODUCCIÓN

La luz es a la vez la fuente de energía que emplea la fotosíntesis y la causa de la destrucción de los tejidos vegetales por la sobreexcitación del aparato fotosintético. El ambiente luminoso, lejos de ser estable, varía enormemente tanto en la escala temporal como en la espacial, por lo que los tejidos fotosintéticos deben de ser capaces de tener un ajuste óptimo entre la ener-

gía que emplean en la fotosíntesis y la que no utilizan. Este balance entre energía empleada y disipada, lo obtienen a través del mecanismo de “disipación térmica”, proceso que consiste en la reemisión en forma de calor de la energía captada por la clorofila y no empleada en la fotosíntesis. Este mecanismo está modulado por la conversión a la luz de violaxantina (V) primero a anteraxantina y después a zeaxantina, y su reconversión en oscuridad a V, ciclo denomina-

do VAZ o de las xantofilas (GILMORE, 1997; ADAMS et al., 2002).

Hace algunos años (BUNGARD et al., 1999) se descubrió en la planta parásita llamada *Cuscuta reflexa* Roxb., un nuevo ciclo de las xantofilas, en el que se produce la de-epoxidación de la luteína-5,6-epóxido (Lx) en luteína (Lut) a la luz paralelamente al ciclo VAZ. El mismo ciclo se ha descrito con posterioridad en otras especies de plantas como en muérdagos de la familia Loranthaceae (MATSUBARA et al., 2001, 2002, 2003), en las especies del género *Quercus* (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2002, 2003; LLORENS et al., 2002) y en *Acacia melanoxylon* (WATSON et al., 2004). El origen evolutivo del ciclo de la Lx no está completamente entendido, ya que recientes estudios de GARCÍA-PLAZAOLA et al., (2004) indican que se encuentra en numerosas especies leñosas mostrando una distribución taxonómica desigual entre los diferentes taxa.

A nivel funcional el ciclo VAZ y Lx comparan características comunes, así tanto V como Lx muestran cinéticas similares de de-epoxidación y están probablemente catalizadas por el mismo enzima, violaxantina de-epoxidasa (VDE) (MATSUBARA et al., 2001; GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2003). De hecho la enzima VDE es capaz de de-epoxidar tanto Lx como V a la misma velocidad (GOSS, 2003). La principal diferencia entre los dos ciclos se basa en que las reacciones de epoxidación en oscuridad son mucho más bajas en el ciclo de la Lx que en el ciclo VAZ (MATSUBARA et al., 2001; GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2003). De hecho hasta la fecha no se ha podido determinar que el ciclo Lx opere a corto plazo en los dos sentidos, y algunos autores han propuesto que se trate más bien de una conversión unidireccional e irreversible de Lx a L (MATSUBARA et al., 2003). La lenta re-epoxidación de Lx a L sugiere que zeaxantina epoxidasa (ZE) es el enzima clave para completar el ciclo Lx. Se ha propuesto que una mutación en ZE, podía originar una alteración de la afinidad por el sustrato y/o la existencia de dos ZE diferentes (MATSUBARA et al., 2003). Consecuentemente, los dos ciclos de las xantofilas operarían simultáneamente, compartiendo una VDE común y una o dos enzimas epoxidadas diferentes, apareciendo el ciclo de la Lx en diferentes familias a lo largo de la evolución (GARCÍA-PLAZAOLA et al.,

2004). Aunque no está clara la función del ciclo Lx, se ha observado que la máxima eficiencia fotoquímica (Fv/Fm) y el quenching no fotoquímico correlaciona con el nivel de de-epoxidación de la Lx y se ha propuesto un papel en la fotoprotección de los tejidos fotosintéticos que crecen en ambientes sombríos (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2003). Por otro lado, la forma de funcionamiento y regulación del ciclo Lx, inducen a pensar que podría tratarse de un mecanismo complementario o “de emergencia”, que permitiría a las plantas adaptarse a cambios súbitos en el ambiente luminoso, como es por ejemplo la generación de claros en el bosque.

En este trabajo se analiza el funcionamiento del ciclo en laurel (*Laurus nobilis* L.) comparándose con resultados obtenidos en diferentes especies del género *Quercus*. Se estudia igualmente su implicación e importancia en estructuras juveniles (plántulas) y su posible papel en fotoprotección.

METODOLOGÍA

Para estudiar el ciclo de la Lx dentro del dosel arbóreo se recolectaron hojas jóvenes y viejas de plántulas de *Laurus nobilis* el 27 de junio de 2004 en el municipio de Arteaga (lat. 43° 21' N; long. 2° 40' O; alt. 10 m del nivel del mar) dentro de la Reserva de la Biosfera de Urdaibai (País Vasco, España). El material vegetal se muestreó mediante discos (5 mm de diámetro). Se congeló directamente en campo mediante nitrógeno líquido al mediodía para conocer el estado de los pigmentos “*in situ*” y otra parte se congeló después de estar en oscuridad durante 20 horas a 20°C para reducir los efectos de las variaciones diurnas en los pigmentos, consiguiendo así las condiciones adecuadas para un “*artificial predawn*” (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2000). El material vegetal se almacenó a -80°C hasta su análisis en el HPLC.

La irradiancia relativa (porcentaje de irradiancia frente a la total que se recibe a cielo abierto) fue determinada mediante una cámara digital (Nikon Coolpix 4500) con un ojo de pez acoplado (Nikon Fisheye Converted FC-E8). Las imágenes hemisféricas fueron analizadas usando el programa Gap light analyzer (GLA)

versión 2.0 para transformar los píxeles entre cobertura arbórea y cielo, calculando la apertura del dosel arbóreo.

La determinación de los pigmentos se llevó a cabo mediante HPLC de fase reversa, siguiendo el método de GARCÍA-PLAZAOLA & BECERRIL (1999) con las modificaciones descritas por 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).

Los índices de de-epoxidación se calcularon en función de la cantidad de xantofila epoxidada en condiciones de campo, $Lx_{DE} = (Lx_o - Lx_i/Lx_o)$ y $VDE = (V_o - V_i/V_o)$ siendo "o" las concentraciones en oscuridad e "i" las concentraciones al mediodía. La significación estadística de las regresiones lineales se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 11.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plántulas de *Laurus nobilis* se encontraron creciendo en ambientes sombríos, comprendidos entre 5-25 % de irradiancia relativa (Figura 1). La concentración de Lx se correlacionó negativamente con la irradiancia, con lo que las concentraciones más altas de Lx se observaron en condi-

ciones de sombra. Las hojas adultas de las plántulas acumularon mayores concentraciones de Lx ($19,3 \pm 1,7$ mmol.mol⁻¹ Chl) que las hojas jóvenes ($2,7 \pm 0,2$ mmol.mol⁻¹ Chl). Por el contrario la concentración de V fue mayor en hojas jóvenes ($78,7 \pm 5,8$ mmol.mol⁻¹ Chl) que en hojas viejas ($48,8 \pm 4,6$ mmol.mol⁻¹ Chl). Una tendencia similar con una mayor presencia relativa de Lx con respecto a V también se ha descrito cuando se comparan yemas con hojas completamente expandidas (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2004).

Para estudiar si la luteína resultante del ciclo se re-epoxida en oscuridad (conversión de Lut a Lx), se midió la concentración de Lx en hojas adultas de plántulas de laurel en condiciones de campo y después de permanecer en oscuridad durante 20 horas. En la figura 1, se observa como en oscuridad existe recuperación del contenido de Lx así como de V. Hasta el momento solo en unas pocas publicaciones se han demostrado la presencia y fotoconversión de Lx a Lut (BUNGARD et al., 1999; MATSUBARA et al., 2001, 2002, 2003; LLORENS et al., 2002; GOSS, 2003; GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2002, 2003, 2004), y esta es la primera vez que se demuestra que la Lx se puede re-epoxidar en condiciones naturales. En cambio en hojas del género *Quercus*, no se observa re-epoxidación a Lx a escala diaria (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2002), esto indicaría

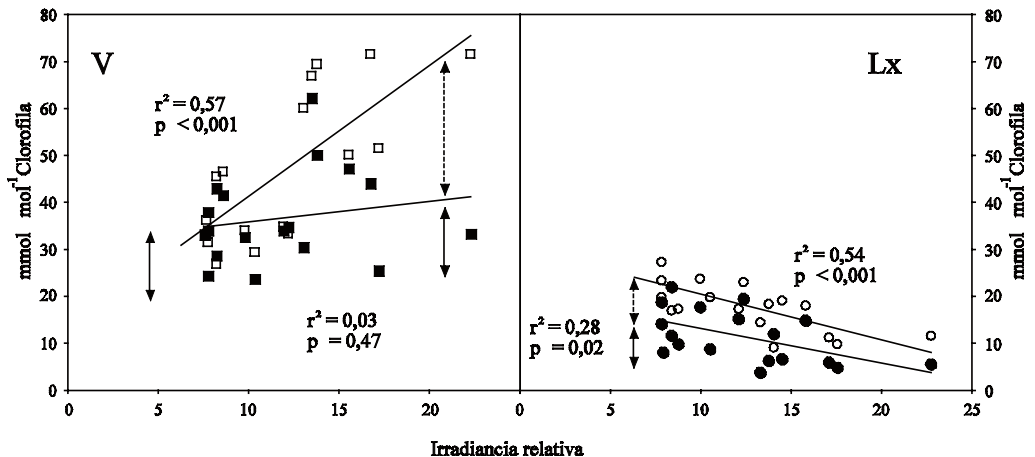


Figura 1. Correlación entre la irradiancia relativa (PPFD) y la concentración de V (cuadrados) y la de Lx (círculos) en hojas adultas de plántulas de *Laurus nobilis*. Los puntos en negro pertenecen a concentraciones al mediodía en condiciones de campo y los puntos de blancos corresponden a concentraciones tras 20 h en oscuridad. Las flechas bidireccionales continuas corresponden a la relación de xantofila estable o no fotoconvertible y las flechas bidireccionales discontinuas corresponden a la relación de xantofila dinámica o fotoconvertible (n=18)

la existencia de varios ciclos de Lx, uno en el que únicamente cambia de Lx a Lut a corto plazo y otro que se recupera a Lx en oscuridad en el intervalo de una noche, apoyando la hipótesis de mutaciones recurrentes en ZE (MATSUBARA et al., 2003).

Tanto en laurel como en especies del género *Quercus* (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2002) o en *Inga* sp. (MATSUBARA et al., 2004) y en muérdagos de la familia Loranthaceae, la de-epoxidación de la Lx no es completa, siempre hay una fracción no fotoconvertible que podemos llamarlo *pool* estático o no dinámico y el que se de-epoxida, *pool* dinámico (Figura 1), como ocurre con una parte de la V que no puede ser de-epoxidada al jugar un importante papel estructural dentro del complejo antena (PFÜNDEL & BILGER, 1994).

La Lx puede jugar un papel importante en la fotoprotección en los cloroplastos (MATSUBARA et al., 2003) así como mantener la disipación de energía después de un destello luminoso en una hoja de sombra dentro del dosel arbóreo o como tener una importante función en estructuras juveniles de la planta como ocurre en las yemas (GARCÍA-PLAZAOLA et al., 2003). En la Figura 2, el cociente entre los índices de de-epoxidación indica que se epoxida una mayor cantidad de Lx que de V en los ambientes más sombríos, mostrando que la fotoconversión de este pigmento tiene un mayor peso que el de V en condiciones de baja irradiancia, siendo su función de especial importancia para la supervivencia de las

plántulas que crecen bajo el dosel vegetal. Por lo que este ciclo, podría tener especial relevancia en la supervivencia y aclimatación de las plántulas de laurel y en los taxones donde esta distribuida la Lx e incluso podría jugar un mayor papel que el ciclo VAZ en ambientes de baja iluminación.

CONCLUSIONES

La concentración de Lx en plántulas de *Laurus nobilis* L. se incrementa con el nivel de sombra en el que se desarrolla. Además las hojas adultas tienen un mayor contenido de este pigmento.

Es la primera vez que se demuestra que este pigmento puede re-epoxidarse bajo condiciones naturales, por lo que se puede hablar de un verdadero ciclo de Lx. Por el contrario esta reversión no se observa en el género *Quercus*, de esta forma se puede considerar que existen dos ciclos: uno unidireccional (a corto plazo) y no completo (de Lx a Lut) y uno verdadero (reversible a Lx). Además existen dos tipos de Lx, un *pool* estático o no fotoconvertible y otro *pool* dinámico o fotoconvertible.

El nivel de fotoconversión de Lx es superior al de VAZ en condiciones de baja iluminación por lo que su papel puede ser especialmente relevante en la supervivencia de las plántulas en condiciones de sombra, así como en estructuras expuestas a baja irradiancia como en las yemas.

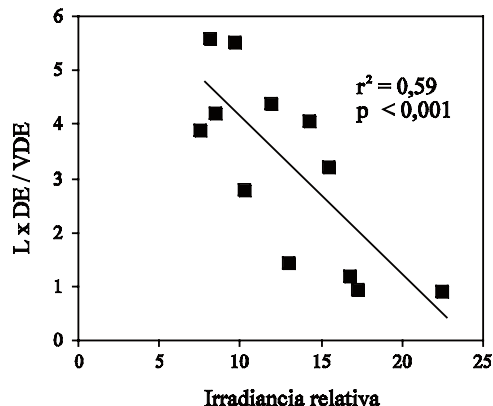


Figura 2. Relación entre la irradiancia relativa y el cociente de los índices de de-epoxidación (Lx DE / VDE) en hojas adultas de plántulas de *Laurus nobilis* (n=12)

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.

BIBLIOGRAFÍA

- 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. & SCHOLE, J.D.; 1999. Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle and plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96: 1135-1139.
- GARCÍA-PLAZAOLA, J.I. & BECERRIL, J.M.; 1999. A rapid HPLC method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochem. Anal.* 10: 1-7.
- GARCÍA-PLAZAOLA, J.I., HERNÁNDEZ, A. & BECERRIL, J.M.; 2000. Photoprotective responses to winter stress in evergreen mediterranean ecosystems. *Plant Biol.* 2: 530-535.
- 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. *Func. 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. *Func. Plant Biol.* 31: 815-823.
- GILMORE, A.M.; 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum* 99: 197-209.
- GOSS, R. 2003. Substrate specificity of the violaxanthin de-epoxidase of the primitive green alga *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae). *Planta* 217: 801-812.
- 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. *Func. 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. *Func. 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.; 2004. 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. *Journal Exp. Bot.* In press.
- PFÜNDEL, E. & BILGER, W.; 1994. Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth. Res.* 42: 89-109.
- WATSON, T.L., CLOSE, D.C., DAVIDSON, N.J. & DAVIES, N.W.; 2004. Pigment dynamics during cold-induced photoinhibition of *Acacia melanoxylon*. *Func. Plant Biol.* 31: 481-489.