

Estequiometría de Pigmentos fotosintéticos en plantas superiores en relación con la deficiencia de hierro *

Por E. MONGE, J. VAL y L. HERAS

Estación Experimental de Aula Dei (C.S.I.C.)

Recibido el 30-X-85

ABSTRACT

MONGE, E.; VAL, J. and HERAS, L. 1985. — Photosynthetic pigments stoichiometry in higher plants in relation to iron deficiency. *An Aula Dei*. 17 (3-4): 239-251.

Iron deficiency affects the composition and function of the photosynthetic apparatus. The photosynthetic pigments located in the chloroplasts are also affected by iron deficiency. In this paper, we have studied the pigmentary relations versus the degree of iron deficiency of higher plants; discrepancies in the chlorophyll a/chlorophyll. b/ relationship are explained; and we prove that the lutein is the main pigment in extreme situations of deficiency. In order to explain these results several hypothesis, are proposed.

INTRODUCCION

La deficiencia de hierro en plantas superiores afecta, de forma casi exclusiva, al cloroplasto, mientras que el resto de orgánulos celulares que contienen hierro, como los peroxisomas, retículo endoplasmático, mitocondrias, etc, parece que no se ven alterados (Platt-Aloia et al. 1983). Las plantas deficientes en hierro tienen menos clorofila por unidad de cloroplasto, pero el número de estos no disminuye por unidad de hoja. Sin embargo, la reducción en la cantidad de clorofila va acompañada de una alteración, tanto en el número, como en el grado de apilamiento de las membranas tilacoidales del cloroplasto, lo que produce una disminución de la capacidad fotosintética por unidad de área (Terry, 1980).

Shetty y Miller (1966) y Terry (1980), entre otros, afirman que en condiciones de deficiencia de hierro, se observa una disminución en la relación clorofila/carotenoides debido a un incremento relativo de la concentración de xantofilas frente a la de clorofilas y β -caroteno. Por otra parte, mientras

* Trabajo financiado por el C.S.I.C.

para algunos autores (Spencer y Possingham, 1960; Botrill, Possingham y Kriedemann, 1970) la deficiencia de hierro no altera la relación clorofila *a*/clorofila *b*, otros observan modificaciones de esta relación (Stoking, 1975; Bindra, 1980).

Las clorofilas, así como el resto de pigmentos fotosintéticos, forman parte de las antenas y de los centros de reacción de los dos fotosistemas. Las antenas son ricas en clorofila *a*, clorofila *b*, xantofilas y β -caroteno, mientras que los centros de reacción contienen principalmente clorofila *a* y β -caroteno (Genge, Pilger y Hiller, 1974; Brown, Alberto y Thornber, 1975; Thornber, 1975).

Las alteraciones en la estequiometría del aparato fotosintético deben implicar modificaciones en las relaciones pigmentarias. Es preciso, por lo tanto, comprobar si el mayor o menor grado de la deficiencia de hierro altera o no las relaciones clorofila *a/b* y xantofilas/clorofilas, en plantas superiores. Si se mantuviese constante la relación *a/b*, en todo el rango de deficiencia, indicaría que no se producen cambios cualitativos en la estequiometría del aparato fotosintético y que la disminución de la relación clorofila/xantofilas se debería, únicamente, a una alteración de la composición pigmentaria de las estructuras de la antena. Por el contrario, si se apreciaran cambios en la relación *a/b*, podría pensarse que se modifica la relación entre los centros de reacción y las antenas, lo que explicaría las alteraciones en la estequiometría de los pigmentos fotosintéticos, en plantas afectadas por deficiencia de hierro.

La finalidad de este trabajo es estudiar, en plantas superiores, los cambios que produce la deficiencia de hierro en la estequiometría de pigmentos fotosintéticos, como consecuencia de las alteraciones que sufren las antenas y centros de reacción.

MATERIAL Y METODOS

Se tomaron muestras de dos especies vegetales; albaricoquero (*Prunus armeniaca*, L. cv. Paviot) cultivado en condiciones naturales y girasol (*Helianthus annuus*, L. cv. SH-25) desarrollado en cámara de cultivo. Las condiciones de la cámara de cultivo fueron 350 μmol quanta $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, el rango de radiación fotosintéticamente activa estaba comprendido entre 400-700 nm, la temperatura era de 25 $^{\circ}$ C con 16 h de fotoperiodo. La solución nutritiva fue la de Hoagland (1959).

Dependiendo del grado de amarillez se tomaron de las hojas entre 10 (verdes) y 40 (amarillas) discos de 0.358 cm^2 , los cuales se trituraron en mortero con 5 ml de acetona y una pequeña cantidad de ascorbato sódico como antioxidante. El extracto se almacenó a -30 $^{\circ}$ C hasta el momento del análisis. La identificación y cuantificación, de los pigmentos fotosintéticos se realizó por HPLC en fase reversa, tal como se describe en artículos previos (Monge, Val y Heras, 1984a y b).

RESULTADOS

Los valores de la relación clorofila *a*/clorofila *b*, que figuran en la bibliografía, para plantas superiores, en condiciones normales, oscilan entre 2.5 y 3.5 (Monge, Val y Heras, 1984a). Como se ha mencionado anteriormente, esta relación es una de las más estudiadas y en material vegetal deficiente en hierro, hay discrepancias acerca de si esta relación queda o no alterada.

En la Figura 1, se representa la relación entre ambas clorofilas, frente a la concentración de clorofila total, en material con distintos grados de deficiencia de hierro. Como puede observarse, tanto en el material de campo (Figura 1-A), como en el cultivado en condiciones controladas (Figura 1-B), la relación *a/b*, se mantiene constante en un amplio rango. Sin embargo, en casos extremos de deficiencia (concentración de clorofila total $< 10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) se observa un marcado aumento de esta relación.

Si tenemos en cuenta la composición pigmentaria de las distintas partes del aparato fotosintético, las gráficas anteriores indican que la relación entre antenas y centros de reacción, permanece inalterada excepto en los casos extremos de deficiencia de hierro.

En los siguientes gráficos se estudian las variaciones de los distintos pigmentos en función del grado de deficiencia de hierro, expresado por su contenido en clorofila total. Así, en la Figura 2, está representada la cantidad de pigmentos totales (carotenoides + clorofilas) frente a la clorofila total.

Los gráficos 2-A y 2-B, muestran la variación del total de pigmentos fotosintéticos en función de la concentración de clorofila. En ambos tipos de plantas, la recta que representa la totalidad de pigmentos tiene una pequeña desviación en el origen de ordenadas ($\approx 0.6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ en girasol y $0.7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ en albaricoquero). Esta desviación en el origen puede estar motivada por las xantofilas o por los carotenos. Con el fin de estudiar este extremo, en la Figura 3 se representa la evolución de carotenoides (xantofilas + carotenos) frente a la concentración de clorofila total.

Como se puede observar, en ambas gráficas (3-A y 3-B), la línea que representa a los carotenoides no tiende totalmente al origen ($0.7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ en albaricoquero y $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ en girasol), cuando disminuye la concentración de clorofila.

En la Figura 4 se representa la incidencia que tiene la deficiencia de hierro en las xantofilas, al representar éstas en función de su contenido en clorofila, especificándose la gráfica de la luteína, xantofila mayoritaria en plantas superiores.

Como puede observarse en la Figura 4, tanto en material cultivado en condiciones naturales, como en el obtenido en cámara de cultivo, las xantofilas tienen una ordenada en el origen distinta de cero ($\approx 0.6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), que coincide prácticamente con la de la luteína (0.54 en albaricoquero y 0.6 en girasol).

Los resultados mostrados hasta ahora demuestran que, en plantas deficientes en hierro, el valor de la ordenada de las rectas, cuando la concentración de clorofila es muy baja, se debe a que la luteína queda afectada en menor proporción que el resto de pigmentos. Para contrastar esta tesis, se agruparon los valores de carotenoides exceptuando los de la luteína, representando en la Figura 5 su variación en función de la concentración, con el fin de comprobar si la desaparición del resto de pigmentos es concomitante con la disminución de la concentración de clorofila.

Las Figuras 5-A y 5-B muestran como las rectas que representan a los carotenoides excepto la luteína, a bajas concentraciones de clorofila, presentan una mayor tendencia al origen (0.16 en albaricoquero y 0.058 en girasol) que en el resto de las gráficas (≈ 0.6 en ambas especies) por lo que podría decirse que la deficiencia de hierro parece afectar por igual a todos los pigmentos fotosintéticos, excepto a la luteína donde parece que sus niveles iniciales son independientes del grado de deficiencia de hierro.

En los cuadros 1 y 2 se han agrupado los resultados obtenidos, con arreglo a los grados de deficiencia (severa, media y normal) expresados por su contenido en clorofila total. Asimismo se precisan los rangos que, con arreglo a nuestros resultados, pueden fluctuar las relaciones entre los distintos pigmentos y las clorofilas.

CUADRO 1. — *Resumen de resultados obtenidos en girasol desarrollado en cámara de cultivo.*

	Pigmentos totales	Carotenoides	Xantofilas	Luteína
Clorofila total				
0-10 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	0.6-12	0.6-2	0.6-2	0.6-1
10-30 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	12-35	2-5	2-4	1-2
30-50 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	35-59	5-9	4-6	2-3
Pigmento/Cl				
Cl <10 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	> 1.2	> 0.2	> 0.2	> 0.1
Cl >50 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	< 1.2	< 0.18	< 0.12	< 0.06

CUADRO 2. — Resumen de resultados obtenidos en albaricoquero cultivado en condiciones de campo.

	Pigmentos totales	Carotenoides	Xantofilas	Luteína
Clorofila total				
0-10 $\mu\text{g.cm}^{-2}$	0.7-13	0.7-2.3	0.65-1.9	0.54-1.2
10-30 $\mu\text{g.cm}^{-2}$	13-37	2.3-6.2	1.9-4.4	1.2-2.6
30-50 $\mu\text{g.cm}^{-2}$	37-60	6.2-10	4.4-6.0	2.6-3.8
Pigmento/Cl				
Cl <10 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ > 1.3		> 0.23	> 0.2	> 0.12
Cl >50 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ < 1.2		< 0.2	< 0.2	< 0.07

DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo evidencian que la deficiencia de hierro afecta a todos los pigmentos fotosintéticos, pero en situaciones extremas de deficiencia, disminuyen en mayor grado las clorofilas que los carotenoides. En este sentido, en la Figura 1, se demuestra que la relación entre clorofilas, a concentraciones muy bajas se sitúa por encima de 2.8 en albaricoquero y de 3.2 en girasol. Esta figura también nos indica que la deficiencia de hierro afecta, en mayor grado a la clorofila *b* que a la clorofila *a*. Resultados similares se obtuvieron al estudiar otras especies (datos no presentados) en campo (melocotonero y peral) y en cámara de cultivo (cacahuete y guisante).

La clorofila *a* está localizada en los centros de reacción y la clorofila *b*, junto con la clorofila *a*, en los complejos de antena. El gráfico de la Figura 1 demuestra que la deficiencia de hierro mantiene la estequiometría entre los complejos de los centros de reacción y de antena, en un amplio rango de deficiencia. No obstante, por debajo de 10 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ de clorofila total en hoja, están más afectadas las estructuras responsables de la captación de luz.

Estos resultados sirven para explicar la discrepancia entre los autores que mantienen que la relación clorofila *a*/clorofila *b* es constante (Spencer y Possingham, 1960; Botrill, Possingham y Kriedemann, 1970) y los que dicen que aumenta (Stoking, 1975; Bindra, 1980). Por lo tanto, se puede afirmar que,

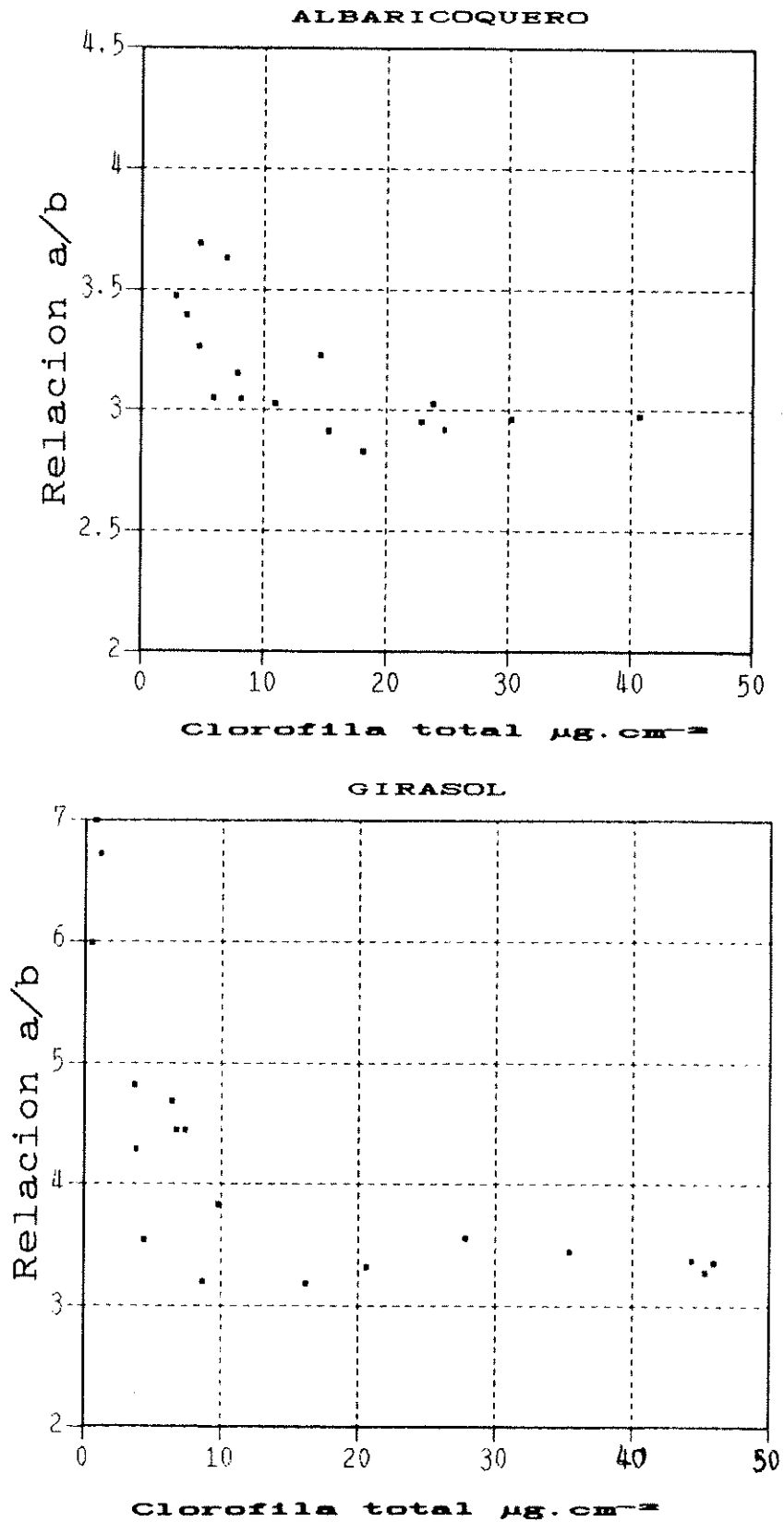
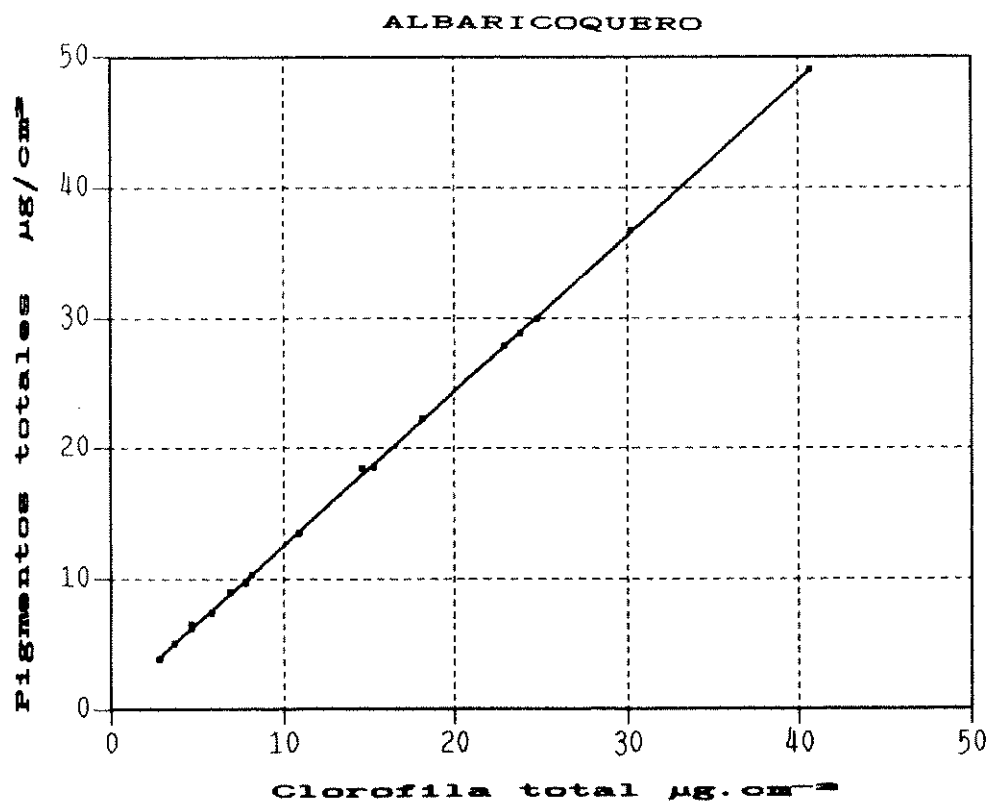
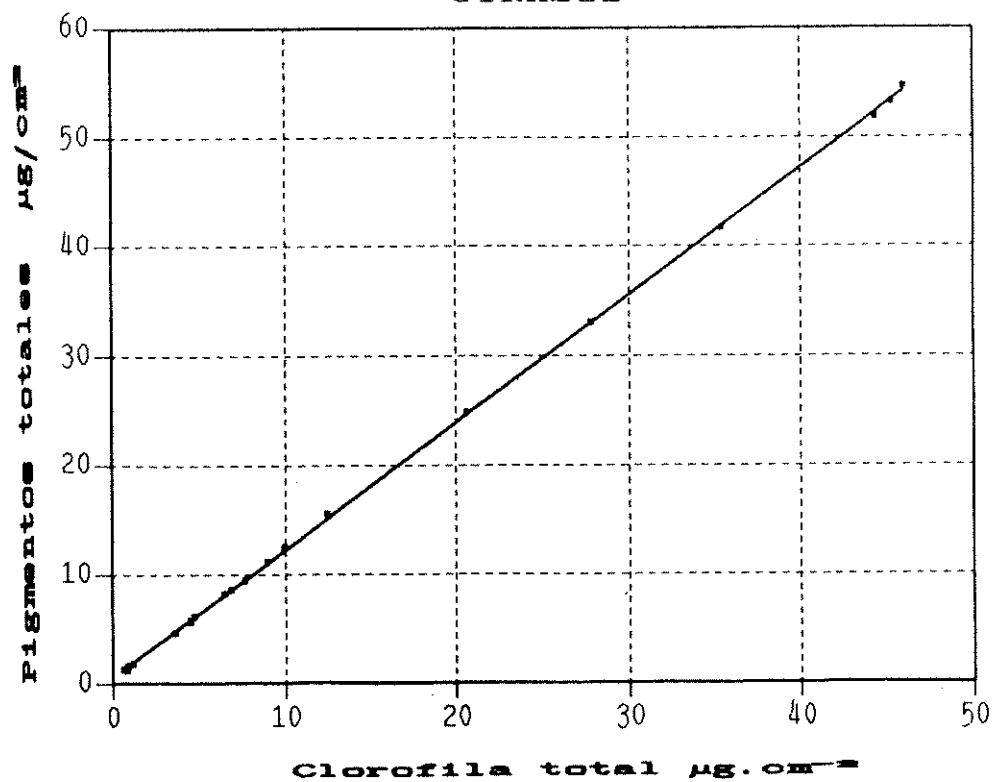


FIG. 1 — Relación clorofila a/b frente a clorofila total: (A) en condiciones de campo (albaricoquero) y (B) en cámara de cultivo (girasol).



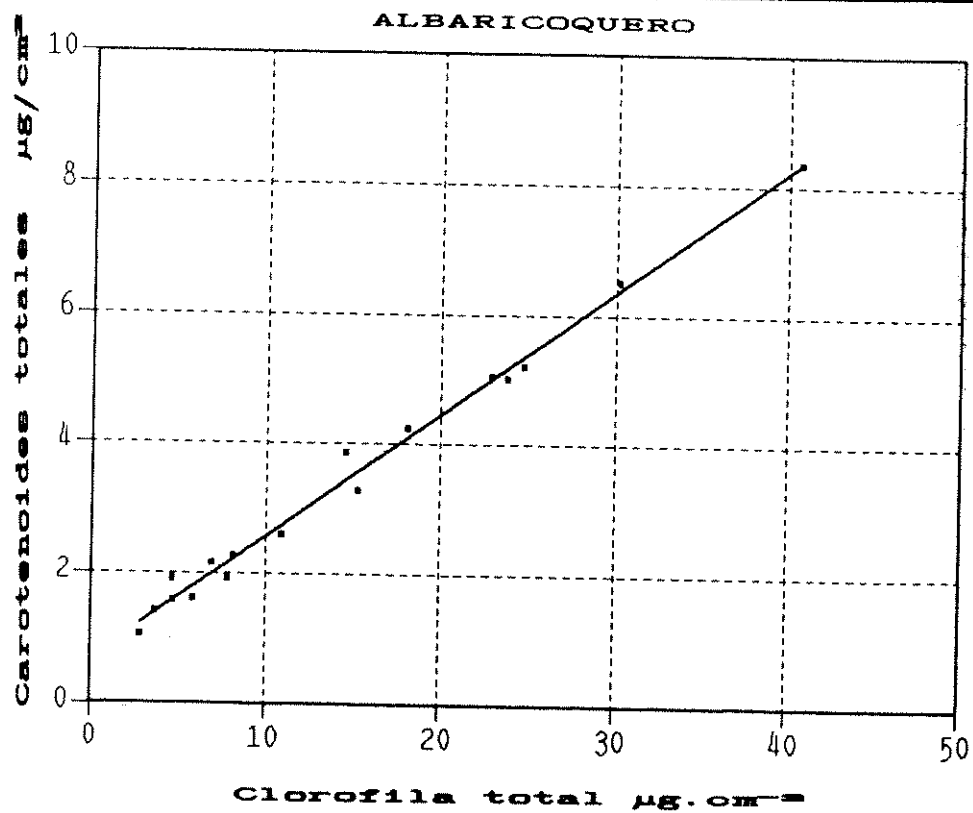
$$Y = 0.794 + 1.188.X$$

GIRASOL

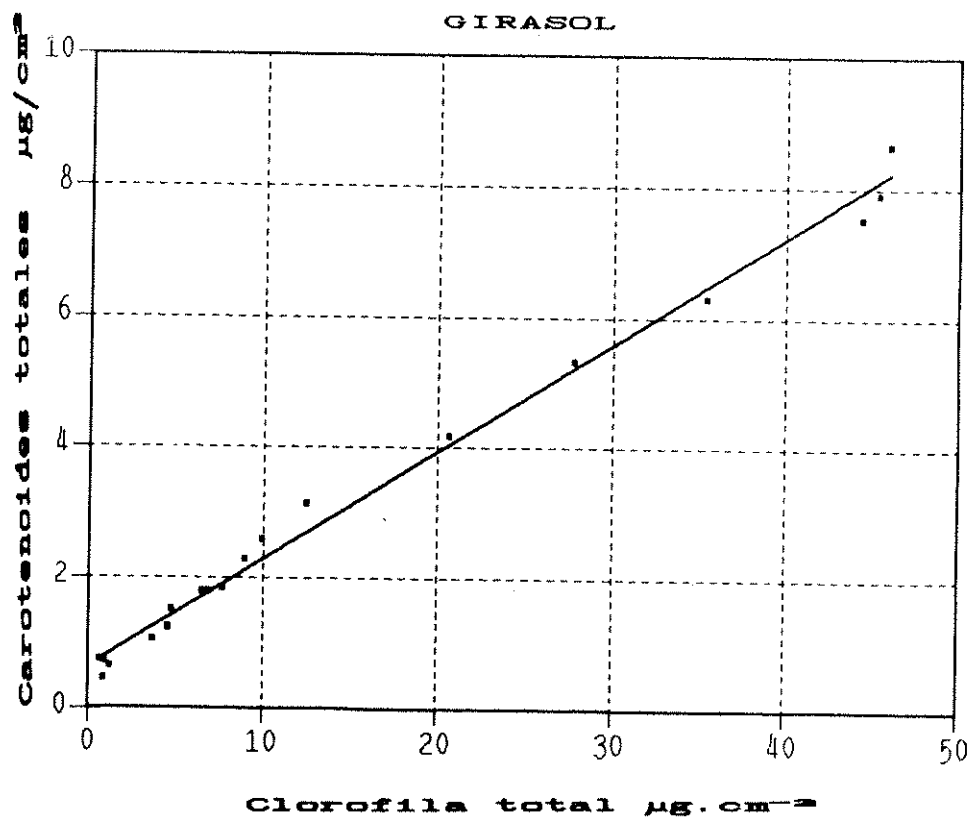


$$Y = 0.654 + 1.165.X$$

FIG. 2 — Evolución de los pigmentos fotosintéticos de plantas deficientes en hierro, cultivadas (A) en condiciones de campo (albaricoquero) y (B) en cámara de cultivo (girasol), en relación con la cantidad de clorofila total.



$$Y = 0.703 + 0.188.X$$



$$Y = 0.654 + 0.166.X$$

FIG. 3 — Evolución de carotenoides en relación a la concentración de clorofila total en condiciones de campo (A) y cámara de cultivo (B).

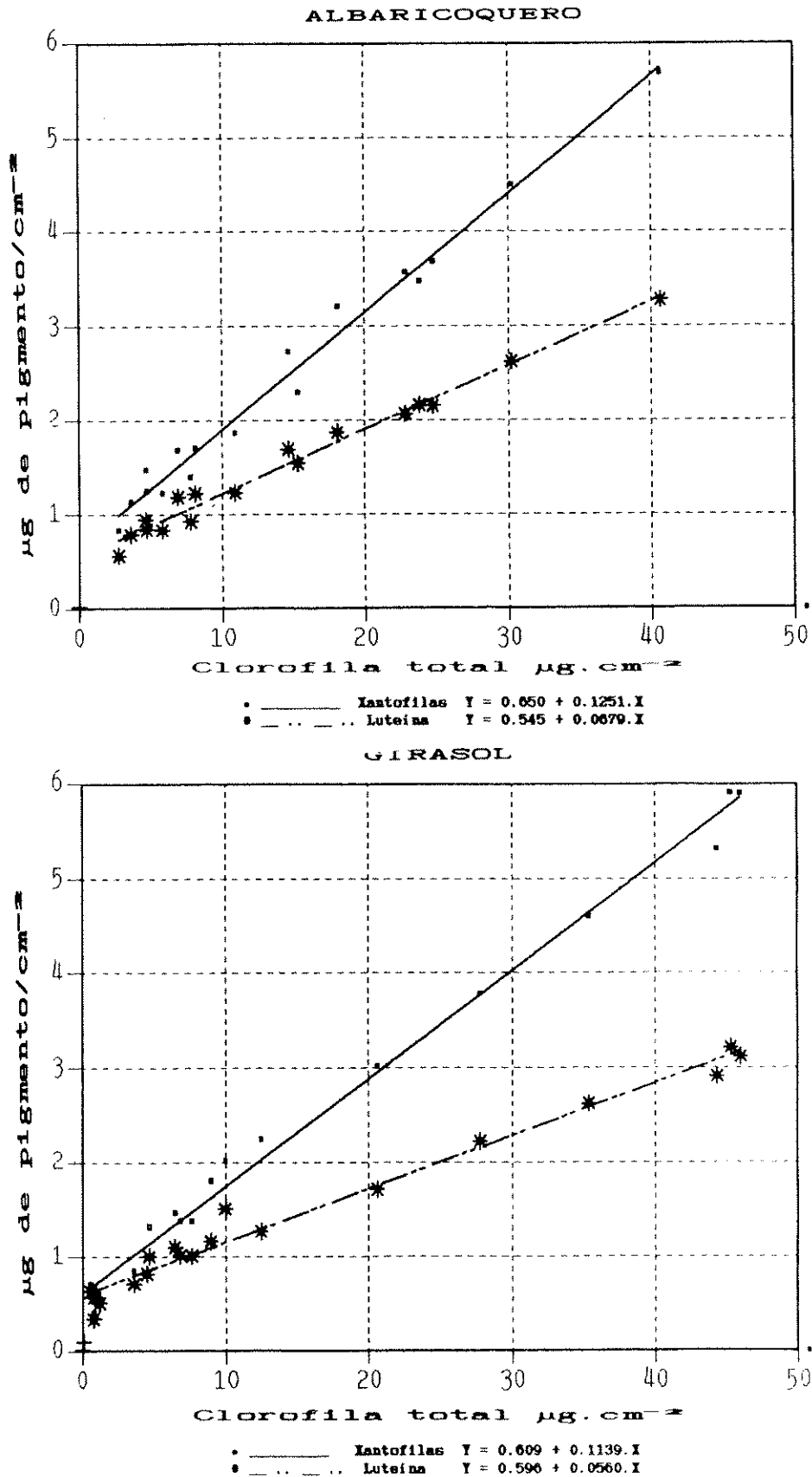


FIG. 4 — Cambios en la concentración de xantofilas (línea continua) y la luteína (línea de puntos) en función de la concentración de clorofila total en plantas deficientes en hierro cultivadas en condiciones naturales (A) y en cámara de cultivo (B).

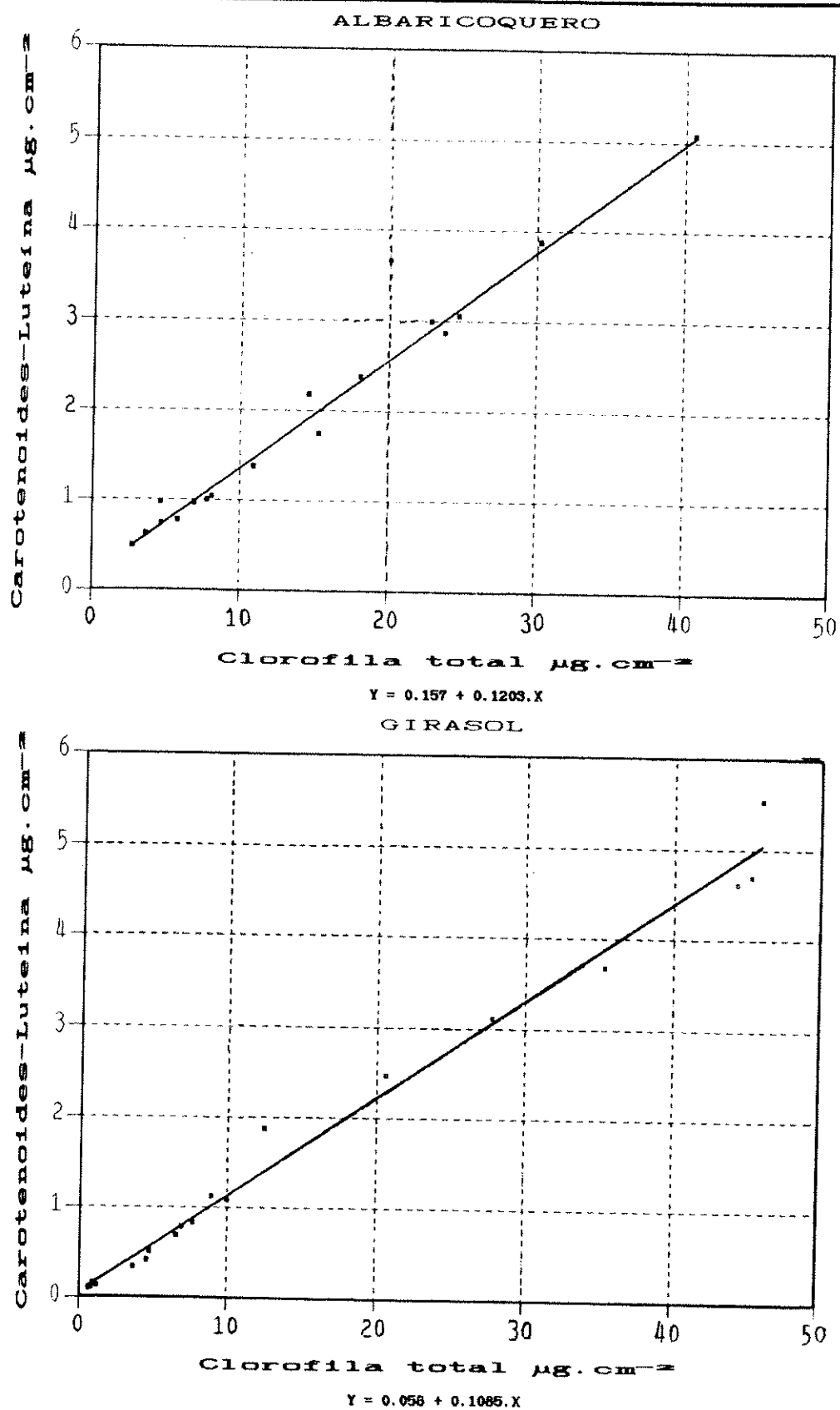


FIG. 5 — Evolución de los carotenoides, excepto la luteína en función de la concentración de clorofila condiciones de campo (A) y cámara de cultivo (B).

en plantas superiores, la relación entre clorofilas, es constante o variable, dependiendo del grado de deficiencia.

En hojas de remolacha, la relación carotenos/clorofilas y xantofilas/clorofilas aumenta, con el grado de deficiencia de hierro en 1.6 y 4 veces respectivamente (Terry, 1980). Estas relaciones demuestran que, aunque hay una disminución de todos los pigmentos fotosintéticos, por unidad de área, las xantofilas disminuyen en menor proporción que el resto de pigmentos, lo que se confirma con los resultados mostrados en los Cuadros 1 y 2, aunque los valores encontrados por nosotros son distintos, debido, probablemente, a que se trabajó con otras especies vegetales.

En los gráficos de las Figuras 2 y 3, tanto los pigmentos totales, como los carotenoides tienden a un valor aproximado de 0.6, cuando la clorofila total desaparece. Esto probablemente se deba a la presencia de luteína, cuya ordenada en el origen alcanza (Figura 4) este mismo valor (0.6).

La menor disminución de las xantofilas, en material vegetal deficiente en hierro, se debe exclusivamente a la luteína, como se demuestra en la Figura 4 y no afecta a ningún otro pigmento, ya que cuando se representan los carotenoides exceptuando la luteína (Figura 5), puede observarse que la ordenada en el origen alcanza un valor próximo a cero (0.053 en girasol y 0.157 en albaricoquero).

Los pigmentos fotosintéticos, en plantas superiores, se encuentran, de forma exclusiva, en los cloroplastos. Este orgánulo celular está separado del resto de la célula por una doble membrana externa que contiene cantidades muy pequeñas de pigmentos captadores de luz. El 90% aproximadamente, de los pigmentos de las membranas externas son xantofilas, principalmente violaxantina, y no se ha detectado la presencia de clorofilas (Block et al, 1983). Si tenemos en cuenta que la deficiencia de hierro repercute por igual en todos los pigmentos, a excepción de la luteína (Figuras 4 y 5), pero que no afecta al número de células, ni de cloroplastos por unidad de área (Terry, 1980), podría pensarse que esta deficiencia no afecta la composición pigmentaria de las membranas externas del cloroplasto.

La práctica totalidad de pigmentos fotosintéticos se encuentra en los tilacoides, formando parte, tanto de los complejos de antena, como de los centros de reacción de los dos fotosistemas. La deficiencia de hierro disminuye la tasa de fotosíntesis linealmente con la disminución de clorofila debido a una reducción de la capacidad fotoquímica por unidad de área (Terry, 1980) decreciendo asimismo, el número de moléculas de P₇₀₀; y de citocromo por unidad de área (Spiller y Terry, 1980). Todo esto parece indicar que la deficiencia de hierro afecta principalmente a las membranas tilacoidales y que la menor disminución de la luteína podría estar motivada:

- a) Porque este pigmento no está distribuido por igual en las membranas del tilacoide y la deficiencia afectaría a las regiones con menor concentración de luteína.
- b) Por una mayor proliferación de glóbulos osmiofílicos, en cloroplastos

afectados por deficiencia de hierro, lo que podría explicar la desviación en el comportamiento de la luteína, ya que éstos glóbulos podrían contener este pigmento.

Las hipótesis que se exponen, necesitan lógicamente, un estudio posterior que proporcionará un mayor conocimiento sobre: a) otros lugares del cloroplasto que podrían contener pigmentos fotosintéticos (glóbulos osmiofílicos); b) si hay regiones en las membranas tilacoidales con mayor riqueza en luteína; c) la posibilidad de que las membranas de envoltura del cloroplasto, además de en violaxantina, sean ricas en luteína.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren hacer patente su reconocimiento a M.^a Angeles Gracia por su excelente labor técnica.

RESUMEN

La deficiencia de hierro afecta la composición y funcionalidad de las distintas partes del aparato fotosintético. Los pigmentos fotosintéticos, localizados en el cloroplasto también se ven afectados por esta deficiencia. En este trabajo, se estudian las relaciones pigmentarias, en plantas superiores, en función del grado de deficiencia de hierro; se explican las discrepancias, acerca de la relación clorofila *a*/clorofila *b*; y se demuestra que la luteína es el pigmento mayoritario en situaciones extremas de deficiencia. Finalmente se proponen varias hipótesis que justificarían los resultados obtenidos.

REFERENCIAS

- Bindra, A. S. (1980) Iron chlorosis in horticultural and field crops. *Annu. Rev. Plant Sciences* II: 221-312.
- Block, M.A., Dorne, A. J., Joyard, J. y Douce, R. (1983) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner membranes from spinach chloroplasts. II, Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 258: 13281-13286.
- Botrill, D. E. Possingham, J. V. y Kriedemann, P.E. (1970) The effect of nutrient deficiencies on photosynthesis and respiration in spinach. *Plant Soil* 32: 424-438.
- Brown, I.S., Alberto, R. S. y Thornber, J. P. (1975) Comparative studies on the occurrence and spectral composition of chlorophyll protein complexes in a wide variety of plant material. *Proc. 3rd. Int. Cong. Photosynthesis 1974.* pp 19
- of plant material. *Proc. 3rd. Int. Cong. Photosynthesis 1974.* pp 1951-1962. Rehovot Israel (N. Avron ed.). Elsevier. Amsterdam.
- Genge, S., Pilger, D. y Hiller, R.G. (1974) The relationship between chlorophyll b and pigment-protein complex II. *Biochim. Biophys. Acta* 347: 22-30.
- Monge, E., Val, J. y Heras, L. (1984) a) Identificación de pigmentos en plantas superiores por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa. *An Aula Dei* 17 (1-2): 33-43.

- b) Análisis cuantitativo de pigmentos en plantas superiores. *An. Aula Dei* 17 (1-2): 60-66.
- Platt-aloia, K. A., Thompson W.W. y Terry, N. (1983). Changes in plastid ultrastructure during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Protoplasma* 114: 85-92.
- Shetty, A.S., y Miller G. W. (1966) Influence of iron chlorosis on pigment and protein metabolism in leaves of *Nicotiana tabacum L.* *Plant Physiol.* 41: 415-421.
- Spencer, D. y Possingham, J. V. (1960) The effect of nutrient deficiencies on the Hill reaction of isolated chloroplast from tomato. *Amer. J. Biol. Sci.* 13: 441-445.
- Spiller, S. y Terrey (1980) Limiting factors in photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiol.* 65: 121-125.
- Stoking, C.R. (1975) Iron deficiency and the structure and physiology of maize chloroplasts. *Plant Physiol.* 55: 626-631.
- Terry, N. (1980) Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. *Plant Physiol.* 65: 114-120.
- Thornber, J. P. (1975) Chlorophyll-protein light harvesting and reaction center components of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 65: 110-120.