

## MECANISMO DE CONCENTRACIÓN DE CARBONO EN CIANOBACTERIAS

*M. Isabel Orús Orús*

Dpto. Biología, Fac. Ciencias, Univ. Autónoma Madrid.

Las cianobacterias son microorganismos fotoautotróficos que, a diferencia de las demás bacterias fotosintéticas, tienen un modelo de fotosíntesis dependiente de la actuación coordinada de dos fotosistemas que les permite utilizar el agua como donador de electrones. Con una antigüedad de más de 3.500 millones de años, se les considera pioneros de la fotosíntesis oxigénica, precursores de los cloroplastos de algas y metafitas y, consecuentemente, responsables de los cambios drásticos en la composición atmosférica que la fotosíntesis a gran escala provocó en el planeta.

Ciertas características particulares de su metabolismo se pueden entender como un reflejo de su antigüedad y su historia evolutiva. La rubisco de cianobacterias tiene una baja afinidad por el  $\text{CO}_2$  ( $K_m$  200-300  $\mu\text{M}$ , alrededor de 10-20 veces más alta que la de plantas) pero su fotosíntesis *in vivo* manifiesta una afinidad aparente por el carbono inorgánico extracelular [ $K_{0,5} (C_i)$  para fotosíntesis,  $K_{0,5} (C_i)$ ] del orden de 10-20  $\mu\text{M}$  (Fig. 1). Por otra parte presentan niveles muy bajos de fotorrespiración.

Este comportamiento fisiológico, que recuerda al de las plantas C4, se puede explicar en base a la posesión de un mecanismo de concentración de carbono, esbozado en los años 80 y recogido en un modelo teórico (Reinhold *et al.*, 1989 y 1991; Fridlyand *et al.*, 1996), que se acepta como

válido a pesar de no haberse conseguido aún evidencias concluyentes. Los principales elementos del mecanismo serían: a) un transporte activo capaz de acumular elevados niveles intracelulares de  $C_i$ , b) desequilibrio químico de las especies de  $C_i$  en el interior de la célula, y c) transcurso de la fijación del  $CO_2$  por la rubisco en un compartimento, el carboxisoma, donde la presencia de una anhidrasa carbónica aceleraría *in situ* el equilibrio químico de las especies de  $C_i$ .

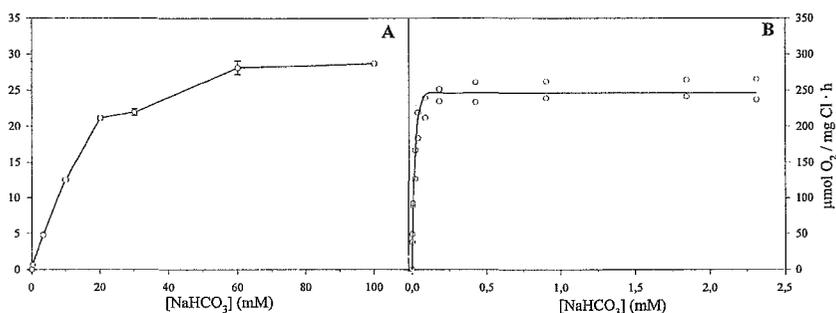


Figura 1. Comparación de la respuesta a la concentración de  $C_i$  de A) actividad fijadora de  $CO_2$  por rubisco aislada (carboxisomas) y B) fotosíntesis *in vivo*, en *Synechococcus* PCC 7942. Nótese que  $K_{0.5}$  ( $C_i$ ) de actividad rubisco es de alrededor de 10 mM (equivalente a pH 8 a 250  $\mu M$  de  $CO_2$ ) y la  $K_{0.5}$  ( $C_i$ ) de la fotosíntesis *in vivo* es de 14  $\mu M$ . Para condiciones de experimentación, ver figuras 2 y 5.

Históricamente se ha aceptado que el mecanismo se induce al pasar de condiciones de suministro de carbono saturante (gaseo con 5% de  $CO_2$  en aire = alto- $CO_2$ ) a condiciones limitantes (gaseo con aire = bajo- $CO_2$ ). Este concepto ha sufrido algunas modificaciones; así, en la actualidad se entiende que el mecanismo existe en alto- $CO_2$  en una forma de baja afinidad y que el bajo- $CO_2$  induce un estado de alta afinidad. Por otra parte, el significado de bajo- $CO_2$  también se ha visto modificado: aunque originalmente la inducción del mecanismo se describió y caracterizó utilizando aire como condiciones de bajo- $CO_2$ , en muchos casos la inducción se estudia gaseando los cultivos con aire empobrecido en  $CO_2$  (20-30 ppm), habiéndose publicado la existencia de estados de baja,

media y alta afinidad del mecanismo, correspondientes a condiciones de alto-CO<sub>2</sub>, bajo-CO<sub>2</sub>/350 ppm (aire) y bajo-CO<sub>2</sub>/30 ppm.

Como parámetro indicativo de la operatividad y de la inducción del mecanismo se utiliza la afinidad fotosintética aparente por el C<sub>i</sub> extracelular (K<sub>0,5</sub> (C<sub>i</sub>)). Las células inducidas presentan una K<sub>0,5</sub> (C<sub>i</sub>) inferior a la de las no inducidas, y los mutantes-alto-CO<sub>2</sub> (mutantes incapaces de crecer en bajo-CO<sub>2</sub>) presentan valores alrededor de dos órdenes superiores a la estirpe silvestre. Curiosamente, al consultar la amplia bibliografía aparecen discrepancias. Por una parte, los valores absolutos de K<sub>0,5</sub> presentan notables variaciones: por ejemplo, los valores para células alto-CO<sub>2</sub> oscilan entre 400 μM (Schwarz *et al.*, 1988) y 50 μM (Schwarz *ET AL.*, 1992), de tal manera que los más bajos de células no inducidas se confunden con los típicos de células inducidas. Otro dato es que el nivel de CO<sub>2</sub> presente en el aire en unas ocasiones induce un cambio claro de K<sub>0,5</sub> (C<sub>i</sub>) y en otras no, como ha ocurrido en *Synechococcus* PCC 7002 (Badger y Andrews, 1981; Sültemeyer y cols, 1995) y en *Synechococcus* PCC7942 (Kaplan, 1990; Yu *et al.*, 1994). Por otra parte, la amplitud de las diferencias entre células inducidas y no inducidas suele ser de un orden de magnitud (x10, x20), aunque también se han publicado diferencias de 1000 veces para *Synechococcus* PCC 6301 (Miller y cols., 1984; Turpin *et al.*, 1984). De acuerdo con nuestra experiencia, tanto con *Synechococcus* PCC 7942 como con distintas cianobacterias filamentosas, el cambio en K<sub>0,5</sub> (C<sub>i</sub>) se induce con la misma extensión en condiciones de bajo-CO<sub>2</sub>/350 ppm como en bajo CO<sub>2</sub>/20 ppm, estando la diferencia entre células inducidas y no inducidas dentro de un orden de magnitud (Fig. 2). Si se estudia la evolución de K<sub>0,5</sub> (C<sub>i</sub>) en el tiempo a partir del cambio de condiciones de suministro de CO<sub>2</sub> encontramos una posible explicación para algunas de las contradicciones de la bibliografía: el cambio durante la transferencia de alto-CO<sub>2</sub> a bajo-CO<sub>2</sub>/20 ppm es inmediato, mientras que en la transferencia a bajo-CO<sub>2</sub>/350 ppm tiene un desfase de 3 h (Fig. 3). Como consecuencia, las células transferidas a aire pueden manifestar valores de K<sub>0,5</sub> (C<sub>i</sub>) correspondientes a células no inducidas, medio inducidas o totalmente inducidas según el momento en que se evalúen. Los casos en que se han

registrado tres órdenes de diferencia entre inducidas y no inducidas se podrían explicar por coincidir con la circunstancia de no haber compensado las células alto-CO<sub>2</sub> previamente al ensayo, lo que conduce a valores exageradamente altos.

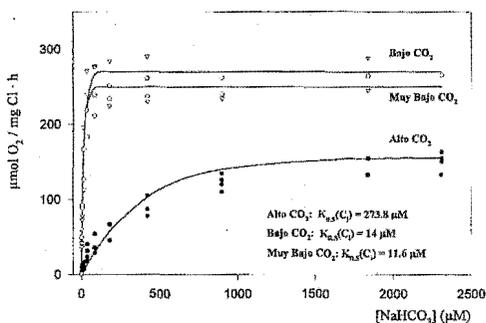


Figura 2. Respuesta de la fotosíntesis *in vivo* de *Synechococcus* PCC 7942 a la concentración de C<sub>i</sub> en el medio. A) Células alto-CO<sub>2</sub>, B) células bajo-CO<sub>2</sub>/350 ppm, C) células bajo-CO<sub>2</sub>/20 ppm. Condiciones del ensayo: células en punto de compensación, tampón HEPES-NaOH 20 mM libre de CO<sub>2</sub>, pH 8, 30°C, 300  $\mu$ einstein m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

A la hora de explicar el funcionamiento del MCC (mecanismo de concentración de carbono), aparece discrepancia en el primer elemento: el transporte de C<sub>i</sub>. Mientras que en el trabajo de referencia con *Anabaena variabilis* (Kaplan *et al.*, 1980), y posteriormente el grupo de Israel con *Synechococcus* PCC 7942 (Schwarz *et al.*, 1988), encuentran que la inducción va acompañada de un gran incremento en la V<sub>max</sub>, sin modificación de su K<sub>0.5</sub>, el grupo australiano registra todo lo contrario, tanto en esta estirpe como en la PCC 7002; es decir, un notable incremento en la afinidad por el transporte de C<sub>i</sub> sin modificación de la V<sub>max</sub> (Price y Badger, 1989; Sültemeyer *et al.*, 1998). En cuanto a la acumulación interna de C<sub>i</sub> ("C<sub>i</sub> pool"), punto central sobre el que descansa

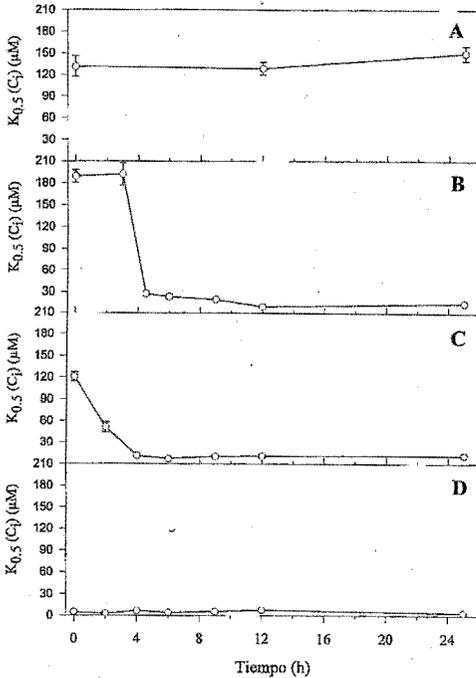


Figura 3. Evolución en el tiempo de  $K_{0,5} (C_i)$  para fotosíntesis en *Synechococcus* PCC 7942. A) Células mantenidas en alto- $CO_2$ , B) células transferidas a  $t=0$  de condiciones de alto- $CO_2$  a bajo- $CO_2/350$ ppm, D) células transferidas a  $t=0$  de condiciones de alto- $CO_2$  a bajo- $CO_2/20$  ppm, D) células transferidas a  $t=0$  de condiciones de bajo- $CO_2/350$  ppm a bajo- $CO_2/20$  ppm. Para condiciones de ensayo, ver figura 2.

el MCC, en su publicación pionera de 1980 Kaplan *et al.* presentaron un trabajo fundamental, con espectaculares datos de acumulación obtenidos mediante la técnica de centrifugación filtrante en aceites de silicona. Sin embargo, los trabajos posteriores del Prof. Kaplan en relación con el MCC han sido hechos con *Synechococcus* PCC 7942, y los datos de acumulación presentados desde entonces, o bien indican falta de acumulación frente al medio (Schwarz *et al.*, 1988) o bien se contradicen (Marcus *et al.*, 1986; Marco *et al.*, 1993). Por su parte, el grupo australiano ha empezado a publicar desde el año 1994 una serie de trabajos en los que hace estimaciones indirectas del “ $C_i$  pool” por medio de una técnica de espectrometría de masas, con la que obtiene resultados muy repetitivos y en los que este parámetro oscila entre 15 y 25 mM en las células no inducidas y entre 55 y 65 mM en las inducidas (Sültemeyer *et al.*, 1995; 1997a; 1997b; 1998). Curiosamente, el organismo que utilizan como modelo, la estirpe marina *Synechococcus* PCC 7002, muestra

(según Bloye *et al.*, 1990) una modesta alteración en el MCC en condiciones de bajo-CO<sub>2</sub>.

Una de las evidencias más claras de la importancia de este elemento en el MCC es la incapacidad de crecer en bajo-CO<sub>2</sub> que muestran los mutantes-alto-CO<sub>2</sub> defectuosos en transporte/acumulación de C<sub>i</sub>. Un caso bien estudiado es el mutante N5 de *Synechococcus* PCC 7942, cuyo fenotipo mutante se puede explicar como la consecuencia del fallo de la empización del transporte (Marco *et al.*, 93).

El modelo hipotético de funcionamiento del MCC asigna un papel relevante a los carboxisomas. De estar en equilibrio químico HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>2</sub> en el citosol, la alta concentración de C<sub>i</sub> intracelular que predice el modelo supondría una pérdida insostenible de C<sub>i</sub> en forma de CO<sub>2</sub> por simple difusión. Por eso, de acuerdo con el modelo, sólo el 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub> del C<sub>i</sub> citosólico se encuentra en forma de CO<sub>2</sub>, y el equilibrio de las especies de C<sub>i</sub> se alcanza únicamente en el interior del carboxisoma, donde una anhidrasa carbónica acelera *in situ* el equilibrio, suministrando directamente concentraciones saturantes de CO<sub>2</sub> a la rubisco allí localizada.

Un argumento a favor de la importancia de los carboxisomas en el metabolismo del C<sub>i</sub> es el notable incremento en la expresión morfológica de estas estructuras en condiciones de limitación de C<sub>i</sub>. En *Anabaena* PCC 7119 la frecuencia de carboxisomas aumenta de forma discreta al transferir las células de condiciones alto-CO<sub>2</sub> a bajo-CO<sub>2</sub>/aire, y de forma espectacular al transferirlas a condiciones de cultivo sin Na<sup>+</sup>, condiciones en las que se bloquea la absorción de C<sub>i</sub> (Fig. 4). La activa generación de nuevos carboxisomas en estas condiciones permite identificar distintas estructuras con ellos relacionadas y proponer un modelo de biogénesis de estos cuerpos poliédricos (Orús *et al.*, en prensa).

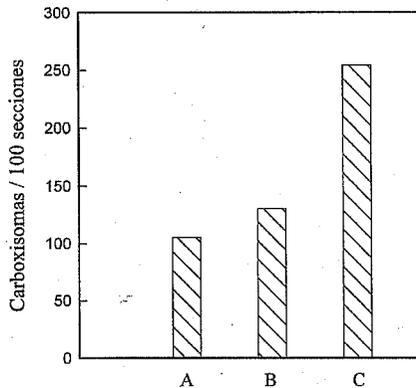


Figura 4. Frecuencia de carboxisomas en células de *Anabaena* PCC 7119 en relación con la disponibilidad de  $C_i$ . A) Células alto- $CO_2$ , B) células bajo- $CO_2/350$  ppm, C) células bajo- $CO_2/350$  ppm en medio de cultivo deficientes en  $Na^+$ . Metodología: microscopía electrónica de transmisión, n400 por tratamiento.

Un abordaje que ha proporcionado repetidas evidencias de la implicación de los carboxisomas en el MCC ha sido el de los mutantes-alto- $CO_2$ . Por una parte, en el antes citado mutante N5 el déficit interno de  $C_i$  va acompañado de una sobreexpresión de carboxisomas. Por otra, distintos mutantes-alto- $CO_2$  carecen de carboxisomas típicos, pudiendo presentar estructuras relacionadas. Aunque en algunos casos las anomalías detectadas a nivel de carboxisomas podrían ser un efecto indirecto de la lesión génica, en otros parece muy probable que la incapacidad de crecer en bajo- $CO_2$  sea consecuencia del fallo de algunos de los polipéptidos estructurales del carboxisoma. Así ocurre con M3 (Ronen-Tarazi *et al.*, 1995), O221 (Friedberg *et al.*, 1989) y N1 (Martínez *et al.*, 1997), cuyas lesiones génicas se localizan en los genes *ccmJ*, *ccmN* y *ccmO*, que muestran homología con el gen *csoS1*, correspondiente a un polipéptido de la cubierta de los carboxisomas de la bacteria quimiolitotrofa *Thiobacillus neapolitanus* (English *et al.*, 1994).

El haber detectado revertientes de mutantes-alto- $CO_2$  con carboxisomas alterados en los que la recuperación de la capacidad para

crecer en bajo-CO<sub>2</sub> va unida a la recuperación de expresar carboxisomas normales, es otra prueba de su implicación en el MCC (Rodríguez *et al.*, 1995).

ORGANISMO DE EXPERIMENTACIÓN	CARBOXISOMAS	EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS
ESTIRPE SILVESTRE	27.39 (13 - 52)	12.09 (4 - 22)
M3	8.82 (6.74 - 11.46)	0.13 (0.1 - 0.16)
EK6	30.65 (16 - 45)	8.8 (4 - 22)
NI	22.77 (14 - 31)	19.9 (16.3 - 25.1)
D4	5.72 (2 - 8)	0.33 (0.11 - 0.98)
N5	21.75 (15.3 - 36.4)	11.32 (6.2 - 20.47)

**Tabla 1.-** Actividad anhidrasa carbónica de la estirpe silvestre y de distintos mutantes que requieren alto CO<sub>2</sub> de la especie *ynechococcus* PCC7942 expresada en unidades Wilbur-Anderson (mg proteína)<sup>-1</sup>. Entre paréntesis se indican los valores mínimos y máximos respectivamente, medidos en cada caso.

Probablemente el punto más controvertido del MCC sea la aceptación de la presencia de una anhidrasa carbónica como integrante del carboxisoma. Los intentos fallidos de demostrarlo se han justificado con la predicción del modelo según la cual la proporción de este enzima en el carboxisoma ha de ser muy baja. Utilizando un método polarográfico de alta sensibilidad se detecta actividad en fracciones de carboxisomas, así como una actividad claramente disminuida en fracciones de carboxisomas aislados de los mutantes M3 y D4, los cuales presentan anomalías en la expresión de carboxisomas (Tabla 1). Una prueba indirecta pero muy concluyente sería la demostración de que el empleo de un inhibidor de anhidrasas carbónicas afectara de alguna manera a la fijación de CO<sub>2</sub> por fracciones aisladas de carboxisomas. Efectivamente, ésta se ve ligeramente afectada por la presencia del inhibidor etoxizolamida (Fig. 5), pero el rango de inhibición no se corresponde con lo que cabría esperar. Otra evidencia indirecta es que a concentraciones limitantes de C<sub>i</sub> la sensibilidad de la rubisco carboxisomal al O<sub>2</sub> es menor que la de la soluble (Martínez *et al.*, 1997). La evidencia más concluyente hasta la fecha es el recién aparecido trabajo de So y Espie (1998) en el que localizan en

*Synechocystis* PCC 6803 un gen homólogo al *icfA* que Fukuzawa *et al.* (1992) identificara en *Synechococcus* PCC 7942 como una anhidrasa carbónica. Tras expresar el citado gen en *E. coli* y generar un antisuero, el marcaje se asocia preferentemente a la fracción del extracto celular de *Synechocystis* que contiene los carboxisomas. Para que este experimento constituya la prueba irrefutable tan largamente buscada de la existencia de una anhidrasa carbónica carboxisomal, “sólo” requiere ser repetida con una fracción purificada de carboxisomas en lugar de la simplemente enriquecida, que es la que se consigue con la metodología actual.

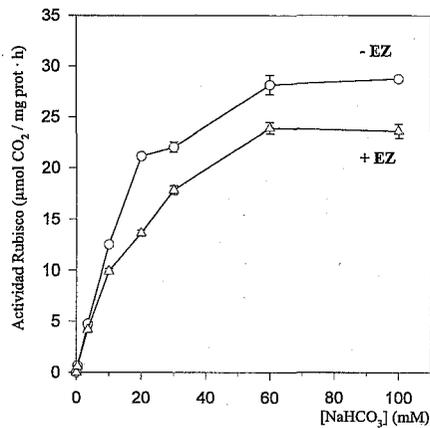


Figura 5. Actividad de rubisco en fracciones enriquecidas en carboxisomas A) en ausencia B) en presencia de etoxizolamida. Aislamiento de carboxisomas por el método de Price *et al.* (1992). Ensayo de actividad rubisco, midiendo fijación de <sup>14</sup>C según método de Badger y Price (1989).

Damos por hecho que este MCC es real, aunque su existencia se ha investigado en contadas cianobacterias, básicamente en varias estirpes de *Synechococcus* y de *Synechocystis*, no siempre con resultados positivos. ¿Cuál es la causa de que en cerca de 20 años de intensa investigación no se hayan conseguido pruebas concluyentes? Según mi punto de vista, dos son las circunstancias que han obstaculizado el camino directo al objetivo. En primer lugar, no se ha contemplado la posibilidad de que la afinidad fotosintética aparente que muestran *in vivo* estas cianobacterias sea un

mero reflejo de la actuación del sistema de transporte de  $\text{HCO}_3^-$ . En segundo lugar, como controles se han utilizado sistemáticamente células alto- $\text{CO}_2$ , que son un mero artefacto de laboratorio.

Desde hace algún tiempo, la comparación de datos de cinética de transporte de  $\text{HCO}_3^-$  aparecidos en la bibliografía con las curvas de respuesta fotosintética al  $\text{C}_i$  extracelular (de las que extraemos los valores de  $K_{0,5}$  para fotosíntesis) me hizo plantearme el primer punto. Recientemente se han publicado cinéticas de transporte y cinéticas de fijación de carbono de células *in vivo* que coinciden en alto grado, así como la coincidencia de que la modificación de ambas cinéticas es insensible a cloranfenicol y a distintos inhibidores de protein-fosfatasa, siendo en cambio sensible a inhibidores de protein-quinasa (Sültemeyer *et al.*, 1998). Por otra parte, células bajo- $\text{CO}_2$  deficientes en  $\text{Na}^+$  recuperan los valores de  $K_{0,5}$  ( $\text{C}_i$ ) correspondientes a células inducidas al añadir al medio de ensayo dicho elemento (indispensable para el transporte de  $\text{HCO}_3^-$ ) (Orús *et al.*, en prensa), lo que de nuevo señala la dependencia directa que tiene del transporte de  $\text{HCO}_3^-$  el estado de alta o baja afinidad del MCC.

En cuanto al otro aspecto: ¿tiene sentido que las células tengan previsto un sistema de regulación para adecuar su metabolismo al cambio de alto- $\text{CO}_2$  a bajo- $\text{CO}_2$  cuando las condiciones de alto- $\text{CO}_2$  no se dan en la Naturaleza? Según nuestra experiencia, las células cultivadas en alto- $\text{CO}_2$  están artificialmente llenas de  $\text{C}_i$ , siendo ese el motivo de que tardan alrededor de 3 h en alcanzar el punto de compensación de  $\text{CO}_2$  y de que se comporten de modo muy poco repetitivo. De acuerdo con nuestros resultados (preliminares), en estas condiciones el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  se encuentra en su estado de baja afinidad y, al transferir las células a condiciones de bajo- $\text{CO}_2$ , se recuperan los niveles fisiológicos de  $\text{C}_i$  interno y el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  funciona con alta afinidad.

Opino que el sentido fisiológico de la regulación del MCC de alta y baja afinidad no está pensado para situaciones de limitación de carbono tal como se han entendido hasta ahora. Baso esta opinión en dos argumentos. En primer lugar, cuando se interpretan los cambios del MCC

en función de la disponibilidad de carbono, el estado de baja afinidad se corresponde con condiciones de  $C_i$  no limitante, pero para detectar tal estado en condiciones de laboratorio hay que llevar a las células a una situación irreal. El estado de alta afinidad, por su parte, se corresponde con situaciones de  $C_i$  limitante, pero en nuestras condiciones de experimentación este estado se alcanza con concentraciones de  $HCO_3^-$  en el medio de cultivo de alrededor de 1 mM, concentraciones que no actuarían como limitantes en un medio natural. El segundo argumento se refiere a que el  $C_i$  raramente actúa en condiciones naturales como factor limitante, siendo los más corrientes la luz, el N, el P y el Fe. Por tanto, más que para responder a situaciones de limitación de carbono con un estado de alta afinidad, tendría sentido que la regulación del MCC estuviera prevista para responder con un estado de baja afinidad a situaciones naturales en las que, al actuar otros factores como limitantes, conviniese evitar el desperdicio energético de un transporte y acumulación de  $C_i$  innecesario. Es decir, según este punto de vista, el MCC no estaría regulado exclusivamente por el nivel de  $C_i$  disponible en el medio sino por la capacidad de asimilar este nutriente que tuvieran las células en cada momento en función de las demás variables.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Badger MR, Andrews T (1981) Photosynthesis and inorganic carbon usage by the marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Plant Physiol 70:517-523
- Badger MR, Price GD (1989) Carbonic anhydrase activity associated with the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. Plant Physiol 89:51-60
- Bloye S, Silman NJ, Mann NH, Carr, NG (1992) Bicarbonate concentration by *Synechocystis* PCC 6803. Plant Physiol 99:601-606
- English RS, Lorbach SC, Qin X, Shively JM (1994) Isolation and characterization of a carboxysome shell gene from *Thiobacillus neapolitanus*. Mol Microbiol 12:647-654
- Fridlyand L, Kaplan A, Reinhold L (1996) Quantitative evaluation of the role of a putative CO<sub>2</sub>-scavenging entity in the cyanobacterial CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism. BioSystems 37:229-238
- Friedberg D, Kaplan A, Ariel R, Kessel M, Seiffers J (1989) The 5' flanking region of the gene encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is crucial for growth of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 at the level of CO<sub>2</sub> in air. J Bacteriol 171:6069-6076
- Fukuzawa H, Suzuki E, Komukai Y, Miyachi S (1992) A gene homologous to chloroplast carbonic anhydrase (*icfA*) is essential to photosynthetic carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC 7942. Proc Natl Acad Sci USA 89: 4437-4441
- Kaplan A (1990) Analysis of high CO<sub>2</sub> requiring mutants indicates a central role for the 5' flanking region of *rbc* and for the carboxysomes in cyanobacterial photosynthesis. Can J Bot 68: 1303-1310

- Kaplan A, Badger MR, Berry JA (1980) Photosynthesis and the intracellular inorganic pool in the bluegreen alga *Anabaena variabilis*: response to external CO<sub>2</sub> concentration. *Planta* 149:219-226
- Marco E, Ohad N, Schwarz R, Lieman-Hurwitz J, Gabay C, Kaplan A (1993) High CO<sub>2</sub> concentration alleviates the block in photosynthetic electron transport in an *ndhB*-inactivated mutant of *Synechococcus* sp PCC 7942. *Plant Physiol* 101: 1047-1053
- Marcus Y, Schwarz R, Friedberg D, Kaplan A (1986) High CO<sub>2</sub> requiring mutant of *Anacystis nidulans* R2. *Plant Physiol* 82:610-612
- Martínez I, Orús MI, Marco E (1997) Carboxysome structure and function in a mutant of *Synechococcus* that requires high levels of CO<sub>2</sub> for growth. *Plant Physiol Biochem* 35:137-146
- Miller AG, Turpin DH, Calvin DT (1984) Growth and photosynthesis of the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>—limited chemostats. *Plant Physiol* 75:1064-1070
- Orús MI, Rodríguez-Buey ML, Marco E, Fernández-Valiente E (1998) Biogenesis of carboxysomes in *Anabaena* sp strain PCC 7119 in relation to the induction of the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism. *Planta*, en prensa
- Orús MI, Rodríguez-Buey ML, Martínez F, Marco E (1995) Biogenesis and ultrastructure of carboxysomes from wild type and mutants of *Synechococcus* sp strain PCC 7942. *Plant Physiol* 107:1159-1166
- Price MR, Badger GD (1989) Ethoxycarbonyl amide inhibition of CO<sub>2</sub> uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 without apparent inhibition of internal carbonic anhydrase activity. *Plant Physiol* 89:37-43
- Price MR, Coleman JR, Badger GD (1992) Association of carbonic anhydrase with carboxysomes isolated from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Physiol* 100: 784-793

- Reinhold L, Zviman X, Kaplan A (1989) A quantitative model for carbon fluxes and photosynthesis in cyanobacteria. *Plant Physiol Biochem* 27:945-954
- Reinhold L, Kosloff R, Kaplan A (1991) A model for inorganic carbon fluxes and photosynthesis in cyanobacterial carboxysomes. *Can J Bot* 69:984-988
- Ronen-Tarazi M, Lieman-Hurwitz J, Gabay C, Orús MI, Kaplan A (1995) The genomic region of *rbcLS* in *Synechococcus* PPC 7942 contains genes involved in the ability to grow under low CO<sub>2</sub> concentration and in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol* 108: 1461-1469
- Schwarz R, Friedberg D, Kaplan A (1988) Is there a role for the 42 kilodalton polypeptide in inorganic carbon uptake by cyanobacteria? *Plant Physiol* 88:284-288
- Schwarz R, Lieman-Hurwitz J, Hassidim M, Kaplan A (1992) Phenotypic complementation of high CO<sub>2</sub>-requiring mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 by inosine 5'-monophosphate. *Plant Physiol* 100:1987-1993
- So AKC, Espie GS (1998) Cloning, characterization and expression of carbonic anhydrase from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Mol Biol* 37:205-215
- Sültemeyer D, Klughammer B, Ludwig M, Badger MR, Price GD (1997a) Random insertional mutagenesis used in the generation of mutants of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 with an impaired CO<sub>2</sub> concentrating mechanism. *Aus J Plant Physiol* 24:317-327
- Sültemeyer D, Klughammer B, Ludwig M, Badger MT, Price GD (1998) Fast induction of high-affinity HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in cyanobacteria. *Plant Physiol* 116:183-192
- Sültemeyer D, Price GD, Bryant DA, Badger MR (1997b) *PsaE*- and *NdfF*-mediated electron transport affect bicarbonate transport

rather than carbon dioxide uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7002. *Planta* 201:36-42

Sültemeyer D, Price GD, Yu JW, Badger MR (1995) Characterisation of carbon dioxide and bicarbonate transport during steady-state photosynthesis in the marine cyanobacterium *Synechococcus* strain PCC 7002. *Planta* 197:597-607

Yu JW, Price GD, Badger MR (1994) A mutant isolated from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 is unable to adapt to low inorganic carbon conditions. *Plant Physiol* 104:605-611