

Fotocontrol de la síntesis de clorofila *a* y de ficocianina en la cianobacteria *Calothrix crustacea* Schousboe

A. D. Luzardo, F. X. Niell y F. López-Figueroa*

Departamento de Ecología
Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Campus Universitario de Teatinos s/n.
E- 29071 - Málaga (España).

(Recibido el 15 de octubre de 1990)

A. D. LUZARDO, F. X. NIELL and F. LÓPEZ-FIGUEROA. *Photocontrol of Chlorophyll a and Phycocyanin Synthesis in the Cyanobacterium Calothrix crustacea Schousboe*. Rev. esp. Fisiol., 47 (3), 109-114, 1991.

Chlorophyll *a* and phycocyanin synthesis in the cyanobacterium *Calothrix crustacea* Schousboe (ecophene *Rivularia bullata*) have been studied in white light after the application of red and green light pulses. The light quality produces a complementary pattern in the pigment synthesis. Chlorophyll synthesis is stimulated by red light pulses whereas phycocyanin synthesis is by green light pulses. Because the effect of red light on chlorophyll synthesis shows some far-red photoreversibility, the action of phytochrome is proposed. The green light effect on phycocyanin synthesis is only partially reversed by far-red light. This reversion is lost after incubation in white light for two hours. The effect of green light on phycocyanin synthesis could not only be due to phytochrome since theoretically in green light the level of the active form of phytochrome is lower than in red light. Thus, the action of a specific green light photoreceptor is proposed.

Key words: *Calothrix crustacea*, Chlorophyll *a*, Green-light photoreceptor, Photoregulation, Phycocyanin, Phytochrome.

La síntesis de pigmentos fotosintéticos es un proceso fotorregulado (24, 27). El tamaño de la antena fotosintética se ve afectado por la intensidad de luz (25). En cianobacterias a baja intensidad de luz au-

menta el contenido tanto de clorofila como de ficobiliproteínas y a alta intensidad decrece. Además, es conocido que la síntesis de biliproteínas, las cuales pueden representar un 50 % de las proteínas totales, está regulada por la clase espectral de la luz incidente (5, 18, 24). La luz roja es-

* A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

timula la síntesis de ficocianina y la luz verde de ficoeritrina (5). Este fenómeno conocido como adaptación cromática ha sido observado en algunas cianobacterias (24) y, recientemente, en algas rojas (14). Se desconoce con exactitud el mecanismo de acción de la luz, pero en *Fremyella diplosiphon* se ha demostrado que los cambios en la composición de biliproteínas se deben a distintos niveles de transcripción de los genes que las codifican y no a cambios en la velocidad de recambio (17).

Aún no se han aislado los fotorreceptores que controlan la síntesis de biliproteínas y de clorofila en cianobacterias. En algas rojas y verdes, la síntesis de clorofila *a* parece estar regulada por un fotorreceptor de luz azul (7, 8) y por un fotorreceptor reversible de luz roja y roja lejana denominado fitocromo, actuando de forma independiente (11, 13) o conectado con un fotorreceptor de luz azul (10, 11). El fitocromo ha sido detectado espectro e inmunoquímicamente en varias algas (12, 26), pero aún no en cianobacterias. Por otro lado, la síntesis de biliproteínas en cianobacterias está controlada por un sistema fotorreversible rojo/verde (17, 25). BJÖRN (1) aisló unos pigmentos fotorreversibles que denominó ficocromos y propuso que éstos controlaban varias respuestas fotomorfológicas en cianobacterias. Sin embargo se ha cuestionado la relación entre estos fotorreceptores y las respuestas fotorreguladas (3). MURAKAMI y FUJITA (16) han propuesto que los ficocromos son estados de agregación bien definidos de las mismas biliproteínas. En algas rojas, LÓPEZ-FIGUEROA *et al.* (13) han demostrado la acción del fitocromo en la síntesis de biliproteínas, pero se desconoce si este fotorreceptor actúa también en cianobacterias.

En este trabajo se describe el efecto de la luz roja y verde en la síntesis de pigmentos fotosintéticos en la cianobacteria *Calothrix crustacea*. Se aplican pulsos de luz roja lejana con el fin de estudiar la posible acción del fitocromo.

Material y Métodos

La cianobacteria *Calothrix crustacea*, morfotipo *Rivularia bullata*, carente de ficoeritrina, fue recolectada en el intermareal de Calaburras (Málaga). El material se mantenía en el laboratorio como ya se ha descrito (10).

Fuentes de luz y medidas de radiación.

— El material fue irradiado con tubos fluorescentes Silvania de luz roja (R) (F 20W/R), luz verde (V) (F 20W/G) y luz blanca (LB) (F 20W/CW). La luz roja lejana (RL) se obtuvo con una lámpara halógena tubular de 300 W situada detrás de una cubeta de agua de 10 cm de ancho, empleada como filtro de calor, y de un filtro RL (Schott SFK, λ max 720 nm, ancho de banda = 55 nm). En la fig. 1 se muestra el flujo fotónico espectral relativo de las cuatro fuentes de luz utilizadas. Los espectros se realizaron con un espectrorradiómetro modelo Li-Cor 1800 UW. El flujo fotónico en luz blanca continua fue de $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, el de los pulsos R y V fue de $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y el de los pulsos RL de $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Diseño experimental. — Los ensayos se realizaron con suspensión de cianobacterias ($5 \text{ g p.f.} \times \text{l}^{-1}$) en agua de mar filtrada a través de un filtro Whatman GF/C de

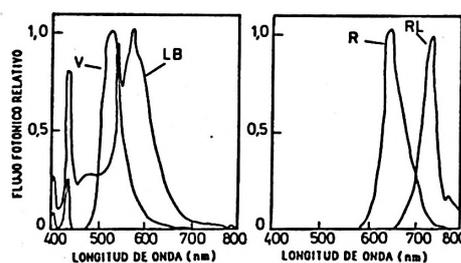


Fig. 1. Flujo fotónico espectral relativo en las diferentes fuentes de luz empleadas. V = verde, LB = blanca, R = roja y RL = roja lejana.

1,2 μm de diámetro de poro a la que se añadía 5 μM NO_3K (11). Las suspensiones se sometían a pulsos de luz R y V de 30 min de duración. Para determinar la posible acción del fitocromo, se aplicaban después pulsos de luz RL de 10 min de duración. Luego, se mantenían en oscuridad durante una hora y finalmente, se iluminaban durante 3 h con luz blanca (11). Paralelamente, se realizaba un control en la oscuridad (Cosc), por incubación durante 4 h en oscuridad sin aplicación previa de pulsos de luz. La concentración de clorofila (Cl *a*) y ficocianina (FC) se estimaba antes de la aplicación de los pulsos, tras una hora en oscuridad y después de iluminar 15, 30, 60, 120 y 180 min con luz blanca. A cada tiempo indicado se tomaron al menos 3 muestras, calculándose la media y la desviación típica. La desviación típica se encuentra entre 10-14 % (figs. 2, 3, 4).

Determinación de la concentración de pigmentos. —La Cl *a* se extrajo en acetona neutralizada con CO_3Na_2 como ya se ha descrito (11). La concentración (mg Cl *a* por gramo de peso seco) se determinó espectrofotométricamente de acuerdo con las ecuaciones de TAILLING y DRIVER (23). El ensayo no discrimina entre Cl *a* y clorofilida *a*. La FC se extrajo a 4 °C en un tampón fosfato 0,1 M a pH 6,5. La concentración (mg FC por gramo de peso seco) fue determinada espectrofotométricamente usando las ecuaciones dicromáticas de KURSAR y ALBERTE (9) con máximo para la FC a $\lambda = 615$ nm. La $\lambda = 750$ nm fue utilizada como línea de base.

Resultados

La síntesis de Cl *a* en *Calothrix crustacea* es fuertemente inducida por luz roja (fig 2a). Tras el pulso de 30 min R y 1 h de oscuridad se produce un incremento de más de 3 veces respecto al contenido inicial. La concentración de Cl *a* es 2 veces

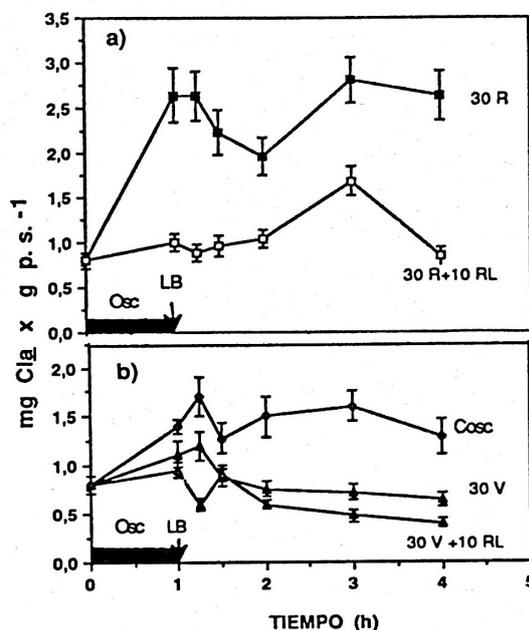


Fig. 2. Variación de la concentración de clorofila *a* (Cl *a*) en la oscuridad (1h) y en luz blanca (LB) tras la aplicación de pulsos de: (a) luz roja (R) o luz roja más luz roja lejana (R + RL) o (b) luz verde (V) o de luz verde más luz roja lejana (V + RL).

Se representa la variación de la concentración de clorofila en un control en la oscuridad (Cosc). Se indica mediante una flecha el momento en que comienza la iluminación con luz blanca.

más alta que en el control en la oscuridad. Tras encender la luz blanca se produce una ligera pérdida de pigmentos para incrementar de nuevo a las 3 h de iluminación. La luz RL revierte la respuesta estimuladora de la luz R incluso después de 1 h en luz blanca (fig. 2a). Los pulsos de luz verde no estimulan la síntesis de Cl *a* produciéndose una destrucción neta de pigmentos durante la incubación en LB (fig. 2b). El efecto de la luz verde se revierte por luz roja lejana (fig. 2b).

La síntesis de FC, al contrario que la de clorofila, apenas se incrementa en luz blanca al aplicar pulsos de luz R (fig. 3a),

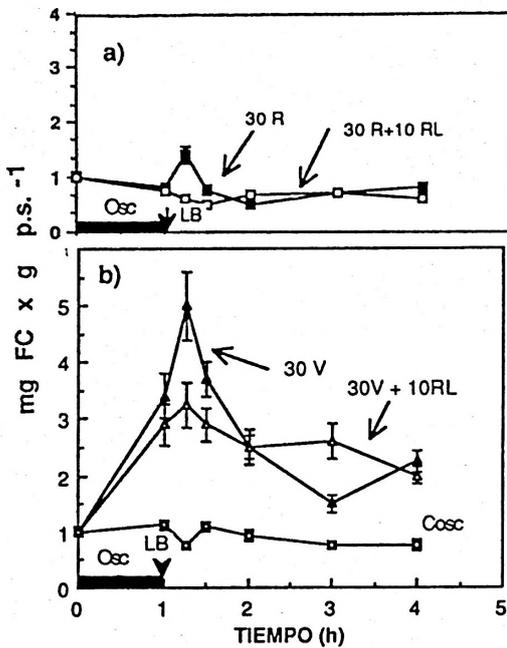


Fig. 3. Variación de la concentración de ficocianina (FC) bajo los mismos tratamientos indicados en la fig. 2.

pero es mayor que en el control en la oscuridad. El efecto de la luz roja no se revierte por luz roja lejana. La síntesis de FC, en cambio, se estimula fuertemente tras pulsos de luz V (fig. 3b). La concentración de FC tras 30 min V y 1 h en oscuridad es aproximadamente 3 veces mayor que la del control en oscuridad. Al iluminar con luz blanca se produce una pérdida clara de pigmentos. A las 3 h se observa en LB un ligero incremento, manteniéndose la concentración 2 veces más alta que en el control en oscuridad (fig. 3b). La luz RL revierte la respuesta inductiva de la luz V sólo parcialmente, anulándose tras incubación durante 2 h en LB.

La relación FC/Cl *a* decrece a lo largo del tiempo cuando se aplican pulsos de luz R y aumenta cuando éstos son de luz V (fig. 4). La relación es mucho mayor tras pulsos de luz V (fig. 4b) que tras pulsos de luz R (fig. 4a). Los pulsos de luz RL

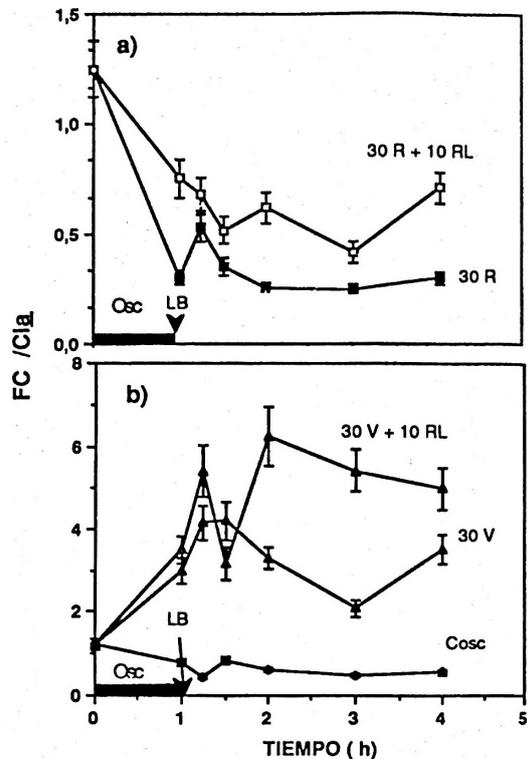


Fig. 4. Variación de la relación Ficocianina:Clorofila *a* (FC/Cl *a*).

Los tratamientos lumínicos como en la fig. 2.

tras R o V aumentan el valor de la relación FC/Cl *a*. En el control en la oscuridad, la relación FC/Cl *a* es similar a la de los tratamientos R, pero mucho más baja que la de los tratamientos V.

Discusión

La síntesis de clorofila en *Calothrix crustacea* está claramente estimulada por luz roja. Debido a que este efecto inductivo fue parcialmente revertido por luz roja lejana, se propone la acción del fitocromo. No obstante, sólo mediante un espectro de acción tanto de la estimulación como de la reversión del efecto se podría determinar de forma inequívoca la acción de este fotorreceptor. La acción conjunta

del fitocromo y de un fotorreceptor azul (criptocromo) en la síntesis de clorofila ha sido detectada en varias plantas (15). En algas verdes se demuestra la acción específica de luz azul vía criptocromo (6, 7, 21) y LÓPEZ-FIGUEROA y NIELL (11) proponen la acción del fitocromo en el alga roja *Porphyra umbilicalis* y la acción conjunta de fitocromo y criptocromo en el alga verde *Ulva rigida* (11) y en el alga roja *Corallina elongata* (10). En cianobacterias se han descrito otras respuestas controladas por el fitocromo como la germinación de esporas en *Anabaena fertilissima* (19).

Por otro lado, la síntesis de FC parece estar controlada por luz verde a través de un sistema parcialmente reversible por luz RL. La luz R, en cambio, no induce la síntesis de FC. Estos resultados contrastan con los obtenidos en otras cianobacterias (5, 24) donde la luz estimuladora de la síntesis de FC es la luz R y la inhibidora, la luz V. Esta aparente contradicción puede explicarse como una adaptación original del equipo pigmentario de *Calothrix crustacea* a la clase de luz. Esta cianobacteria carece de ficoeritrina por lo que no se puede hablar de adaptación cromática complementaria en sentido estricto. En este trabajo se demuestra, en cambio, la existencia de una respuesta complementaria de la Cl *a* y de la FC: estimulación de la síntesis de Cl *a* en luz roja y estimulación de la síntesis de FC en luz verde. En términos de respuesta a la clase espectral de la luz incidente, la Cl *a* lo haría como la FC de otras cianobacterias y la FC como la ficoeritrina. La ficocianina aunque presenta su máxima absorción en luz roja (615 nm) posee mayor absorción que la Cl *a* en luz verde, con lo cual el incremento de FC frente a Cl *a* en luz verde tendría un sentido adaptativo. *Calothrix crustacea* podría modular su equipo pigmentario en función de la clase de luz en el sistema litoral. Así, en aguas turbias donde predomina la luz verde (4) se produciría un incremento de FC optimizándose probablemente la capacidad fotosintética. Por otro

lado, la rápida respuesta a la luz roja observada en el laboratorio podría producirse en la naturaleza al amanecer y al atardecer cuando se observan drásticos cambios en la relación de luz R:RL (2). Además, una adaptación complementaria podría producirse en las diversas células de *Calothrix*: las células expuestas a la irradiación solar directa presentarían un contenido en FC menor que las células de las partes internas, donde predominaría la luz verde y roja lejana debido a la absorción de luz roja y azul por las clorofilas de las células expuestas. El campo lumínico sería similar al descrito bajo doseles vegetales en sistemas terrestres (22). Esta estrategia se ha demostrado en *Calothrix* ya que se alcanza una relación FC/Cl *a* más alta en luz verde que en luz roja y además más alta cuando se aplica luz RL tras R o V.

Debido a que en luz verde el nivel de fitocromo en su forma activa P_{fr} es más bajo que en luz roja (15, 20), la fuerte inducción de la síntesis de FC en luz verde no puede explicarse sólo por la posible acción del fitocromo. Se propone así la participación de un fotorreceptor específico de luz verde.

La respuesta a la clase espectral de la luz incidente es relativamente rápida como previamente se ha observado en macroalgas (11, 14). La luz blanca aplicada tras la hora de oscuridad no modifica la respuesta cualitativa a los pulsos de luz pero sí la cuantitativa. El mecanismo de fotorreacción inducido por pulsos no necesita de luz continua como se demostró en macroalgas (10, 11). La luz continua podría ejercer un efecto modulador alterando la velocidad de renovación pigmentaria, como ya se ha observado en el alga roja *Corallina elongata* (10).

En resumen, se propone que la síntesis de Cl *a* está bajo el control del fitocromo y la de FC, regulada por un fotorreceptor verde. Se describe una estrategia complementaria original del equipo pigmentario: la cantidad de Cl *a* aumenta tras pulsos de luz R y la de FC tras pulsos de luz verde.

Como resultado, la relación FC/Cl *a* aumenta en luz verde lo que optimizaría probablemente la capacidad fotosintética y el crecimiento de *Calothrix crustacea* en esas condiciones lumínicas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el marco del Proyecto CAICYT n° 1063 (España)

Resumen

Se estudia la síntesis de clorofila *a* y de ficocianina en la cianobacteria *Calothrix crustacea* en luz blanca tras la aplicación de pulsos de luz roja y verde. La clase espectral de la luz incidente determina un patrón complementario en la síntesis pigmentaria. La síntesis de clorofila es estimulada por luz roja mientras que la de ficocianina por luz verde. Debido a que el efecto de luz roja sobre la síntesis de clorofila muestra una reversión parcial tras aplicar luz roja lejana, se propone la acción del fitocromo. El efecto de la luz verde sobre la síntesis de ficocianina, en cambio, se revierte sólo parcialmente por luz roja lejana, manteniéndose sólo hasta un período de 2 horas en luz blanca. El efecto de la luz verde sobre la síntesis de ficocianina no puede ser debido al fitocromo ya que teóricamente el nivel de fitocromo activo es menor en luz verde que en luz roja. Así, se propone la acción de un fotorreceptor específico de luz verde.

Palabras clave: *Calothrix crustacea*, Clorofila *a*, Ficocianina, Fitocromo, Fotorreceptor de luz verde, Fotorregulación.

Bibliografía

1. Björn, L. O.: *Q. Rev. Biophys.*, 12, 1-23, 1979.
2. Chambers, P. y Spence, D. H. N.: *J. Ecol.*, 72, 495-503, 1984.
3. De Kok, J., Braslavsky, S. E. y Spruit, C. J.: *Photochem. Photobiol.*, 34, 705-707, 1981.
4. Dring, M. J.: *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39, 157-174, 1988.
5. Haury, J. y Bogorad, L.: *Plant Physiol.*, 60, 835-839, 1977.
6. Humbeck, K., Hoffmann, B. y Senger, H.: *Planta*, 173, 205-212, 1988.
7. Jeffrey, S. W.: En «Blue light effects in biological systems» (H. Senger, ed.). Springer-Verlag, Berlín, 1984, pp. 497-508.
8. Kowallick, W. y Schürmann, R.: En «Blue light effects in biological systems» (H. Senger, ed.). Springer-Verlag, Berlín, 1984, pp. 352-358.
9. Kursar, T. A. y Alberte, R. S.: *Plant Physiol.*, 72, 409-414, 1983.
10. López-Figueroa, F. y Niell, F. X.: *Rev. esp. Fisiol.*, 44, 287-294, 1988.
11. López-Figueroa, F. y Niell, F. X.: *Physiol. Plant.*, 76, 391-397, 1989.
12. López-Figueroa, F., Lindemann, P., Braslavsky, S. E., Schaffner, K., Schneider-Poetsch, A. W. y Rüdiger, W.: *Botanica Acta*, 102, 178-180, 1989.
13. López-Figueroa, F., Pérez, R. y Niell, F. X.: *J. Photochem. Photobiol. B*, 4, 185-193, 1989.
14. López-Figueroa, F. y Niell, F. X.: *Mar. Biol.*, 104, 321-327, 1990.
15. Mohr, H.: En «The blue light syndrome» (H. Senger, ed.). Springer-Verlag, Berlín, 1980, pp. 97-109.
16. Murakami, A. y Fujita, Y.: *Photochem. Photobiol.*, 36, 605-608, 1983.
17. Oelmüller, R., Grossman, A. R. y Briggs, W. R.: *Plant Physiol.*, 88, 1084-1091, 1988.
18. Ohki, K., Watanabe, M. y Fujita, Y.: *Plant Cell Physiol.*, 23, 651-656, 1982.
19. Reddy, P. M. y Talpasyi, E. R. S.: *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 176, 105-107, 1981.
20. Rüdiger, W.: En «Structure and Bonding» (J. D. Dunity y J. B. Goodenough, eds.). Springer-Verlag, Berlín, 1980, pp. 101-140.
21. Senger, H. y Bauer, B.: *Photochem. Photobiol.*, 45, 939-946, 1987.
22. Smith, H.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 33, 481-518, 1982.
23. Talling, J. F. y Driver, D.: *Marine and Freshwater*, 7633, 142-146, 1963.
24. Tandeau de Marsac, N. T.: *J. Bact.*, 130, 82-91, 1977.
25. Tandeau de Marsac, N. T., Mazel, D., Damerval, T., Guglielmi, G., Capuano, V. y Houmard, J.: *Photos. Res.*, 18, 99-132, 1988.
26. Taylor, A. O. y Bonner, B. A.: *Plant Physiol.*, 42, 762-766, 1967.
27. Vogelmann, T. C. y Scheibe, J.: *Planta*, 143, 233-239, 1978.