ecosistemas REVISTA CIENTÍFICA Y TÉCNICA DE ECOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE
Año XII, Nº1 / 2003
Enero - Abril

Revisiones

Capel, J. Lozano R., Martínez-Zapater, J.M. y Jarillo, J.A. 2002. Ritmos y relojes circadianos de las plantas. *Ecosistemas* 2003/1 (URL: http//www.aeet.org/ecosistemas/031/revisiones2.htm)

Ritmos y relojes circadianos de las plantas

Juan Capel[1], Rafael Lozano[1], José M. Martínez-Zapater[2] y José A. Jarillo[2]

[1]Área de Genética, Dpto. de Biología Aplicada, Universidad de Almería, Carretera de Sacramento s/n, 04120 La Cañada, Almería.

[2]Dpto. de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de la Coruña km7, 28040 Madrid.

Las plantas necesitan coordinar toda su fisiología, y por ende su reproducción, con la información del ambiente que las rodea. Los ritmos biológicos permiten a las plantas anticiparse a ciertas condiciones exteriores cambiantes como luz y temperatura. Los encargados de generar los ritmos son los relojes biológicos, que a su vez utilizan la información del ambiente que rodea a la planta para actualizar su propio funcionamiento. Entre los ritmos biológicos los de mayor trascendencia para plantas y animales son los que ocurren con periodos cercanos a un día o ritmos circadianos. En los últimos años hemos asistido a una gran cantidad de descubrimientos acerca de la naturaleza del reloj circadiano de las plantas y de cómo éste controla proceso anuales tan importantes como la floración y la tuberización. Sin embargo aún estamos lejos de comprender, y por tanto manipular, este importante mecanismo biológico clave para la ecología y la producción de los vegetales.

De entre todos los procesos biológicos que ocurren con cierta periodicidad, quizá los de mayor relevancia son los que tienen lugar siguiendo la pauta del tiempo empleado por la tierra en rotar alrededor de su eje, o lo que es lo mismo, según los ciclos diarios de luz - oscuridad. Cuando se observa que un proceso continúa produciéndose de forma periódica en ausencia del estímulo ambiental que lo ocasiona, nos encontramos ante un ritmo biológico, que en el caso de tener una periodicidad diaria, y precisamente por el periodo de tiempo que ocupan, han sido denominados ritmos circadianos.

En la naturaleza se distinguen también procesos rítmicos cuyos periodos son más cortos de un día, y son denominados ritmos infradianos. Ejemplo de estos ritmos son los movimientos de circumnutación que acompañan al crecimiento de muchos vegetales, los cuales presentan periodos que oscilan entre 30 minutos y varias horas (Engelmann y Jhonsson, 1998). Por el contrario, los periodos menstruales de muchos animales son ritmos ultradianos, ya que los periodos con los que se producen oscilan entre pocos días en algunos roedores hasta periodos cercanos a los 30 días en los primates (Moore-Ede *et al*., 1982). Algunos de los ritmos con mayor trascendencia para el desarrollo de las plantas, tales como la tuberización o la floración, son también ritmos ultradianos que ocurren con periodicidad anual (Sweeney, 1987).

Si bien resulta evidente que las pautas de actividad de la mayoría de animales, incluido el hombre, son ritmos circadianos, los ritmos biológicos diarios se describieron científicamente por primera vez en plantas, a comienzos del siglo XVIII cuando el astrónomo francés de Mairan observó que plantas de mimosa (*Mimosa pudica* L.) que previamente habían sido crecidas en ciclos naturales de luz-oscuridad,

después de ser transferidas a oscuridad permanente continuaban abriendo y cerrando sus hojas con una ritmicidad cercana a 24 horas. Algunos años más tarde fue Linneo quien propuso que la apertura y cierre de los pétalos de diversas especies de plantas está controlada por los ritmos diarios de iluminación-oscuridad y diseñó un "reloj de flores", con el que simplemente mirando el estado de los pétalos de las flores de un jardín en el que creciesen las especies adecuadas, podría conocer la hora del día (Somers, 1999) .

Fue necesario que transcurriese casi un siglo hasta que se pudo demostrar que los ritmos del movimiento de las hojas de la mimosa están controlados de forma endógena, y no por algún tipo de influencia inadvertida de la rotación de la tierra. Este trascendental descubrimiento fue debido a la observación de que en completa oscuridad los ritmos de apertura y cierre de las hojas de la mimosa tienen periodos que oscilan entre 22-23 horas, lo cual descarta que sea la rotación de la tierra la responsable de esta actividad cíclica, y por el contrario demuestra que se trata de un ritmo controlado por un mecanismo celular endógeno que ha sido denominado reloj biológico o reloj circadiano.

Desde entonces la presencia del reloj biológico ha sido demostrada en muchos organismos, desde procariotas hasta la mayoría de eucariotas, hecho probablemente ocasionado porque el reloj circadiano supone una ventaja evolutiva para los organismos que lo poseen, puesto que les permite predecir y anticiparse a las condiciones cambiantes del exterior (Ouyang *et al*., 1998). Por tanto, se puede definir un ritmo circadiano como aquel que en ausencia de estímulos externos es mantenido por el reloj endógeno con periodos cercanos a 24 horas. En condiciones naturales mantener un proceso biológico con un periodo de 24 horas necesita de estímulos externos que ajusten la actividad del reloj. En la mayoría de sistemas estudiados estos estímulos son los ciclos naturales de luz-oscuridad y/o los cambios en la temperatura exterior, si bien en animales también se ha demostrado que la alimentación y la actividad son estímulos capaces de actualizar la información del reloj circadiano (Takahashi, 1995).

Además de necesitar continuamente de un estimulo para mantener actualizada la información temporal externa, los relojes circadianos tienen una propiedad que les hace únicos entre los procesos biológicos y es la denominada compensación de temperatura. Y es que al contrario de la mayoría de procesos bioquímicos, que son muy sensibles a la temperatura, los ritmos circadianos pueden alterar su fase debido a un cambio de temperatura, pero una vez estabilizada la nueva condición ambiental, no se observa efecto alguno sobre la periodicidad de los ritmos (Somers, 1999). Si bien la necesidad de esta cualidad de los relojes endógenos resulta evidente, ya que poca utilidad tendría un reloj que midiese distintos periodos dependiendo de la temperatura exterior, el mecanismo por el que se consigue es totalmente desconocido.

Ritmos circadianos en las plantas

Desde la observación original del astrónomo de Mairan, se conoce que el movimiento de las hojas de la mimosa está controlado por el reloj biológico. De igual manera se ha descrito que el crecimiento del hipocotilo de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, la especie modelo en biología molecular vegetal, muestra ritmos circadianos (Figura 1), aunque se desconoce el mecanismo por el que el reloj biológico controla la elongación de las células que componen este órgano de la planta. Sin embargo, la monitorización del crecimiento de las plantas de Arabidopsis es una tarea relativamente sencilla que ha permitido identificar muchos mutantes alterados en la longitud del periodo de este ritmo, y de esta forma ha sido posible identificar posibles componentes moleculares del reloj biológico. El movimiento

ecosistemas REVISTA CIENTÍFICA Y TÉCNICA DE ECOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE
Año XII, Nº1 / 2003
Enero - Abril

de los cotiledones es otro proceso biológico rítmico y circadiano, el cual está generado por la elongación diferencial de las células de los peciolos (Figura 1).

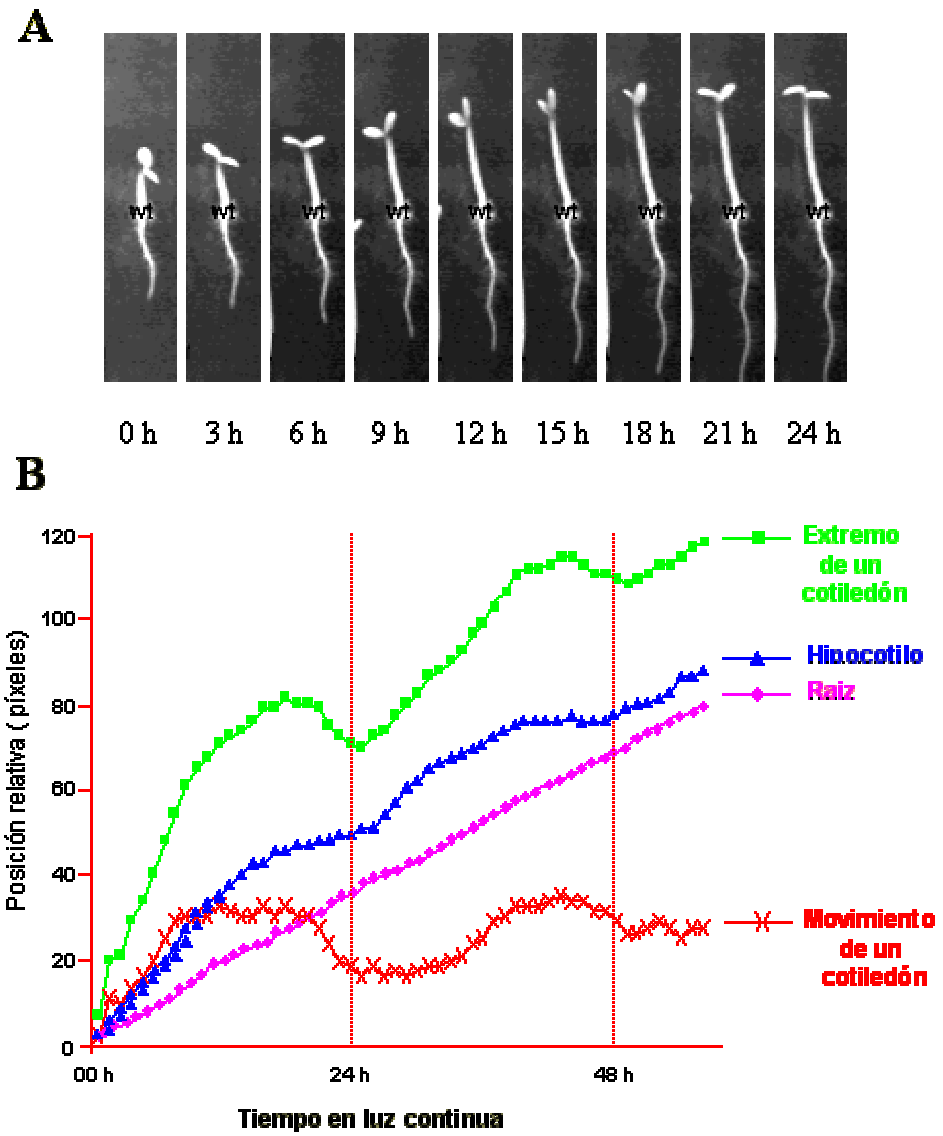

Figura 1. Ritmos circadianos en el crecimiento de una plántula de Arabidopsis. En A se muestran fotogramas de una plántula crecida previamente durante 3 días en ciclos de luz/oscuridad (12h:12h) y después colocada en luz continua de baja intensidad. Se muestran fotogramas de las primeras 24 horas en luz continua tomadas cada 3 horas. En B se muestra la posición relativa en píxeles de distintos órganos de la plantula mostrada en A, tales como el extremos de la raíz o el hipocotilo durante 60 horas en luz continua. El movimiento de un cotiledón se obtiene restando la posición del extremo del cotiledón a la posición del hipocotilo.

La apertura y cierre de los estomas, y por ende el intercambio gaseosos que se produce a través de poros, en condiciones adecuadas ocurre de manera rítmica y está controlada por el reloj biológico. Este último es el responsable de las reorganizaciones que muestra el citoesqueleto de las células oclusivas de los estomas, las cuales, a su vez, provocan la apertura y cierre de los poros estomáticos. Por tanto, no es de extrañar que la asimilación del CO_2 atmosférico, y en algunas especies parte del ciclo de Calvin, estén controlados también por el reloj biológico (Strayer y Kay, 1999).

ecosistemas REVISTA CIENTÍFICA Y TÉCNICA DE ECOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE
Año XII, Nº1 / 2003
Enero - Abril

Fue también en las plantas donde por primera vez se describió que cambios en la expresión génica estaban controlados por los ritmos circadianos. Los primeros genes descritos cuya expresión era regulada por el reloj biológico fueron algunos de los genes claves de la fotosíntesis, tales como los genes *CAB* que codifican para los complejos antena tipo I del fotosistema II o los genes *RBCS* que codifican para la subunidad pequeña de la RUBISCO (Piechulla, 1999). También se ha descrito que la transcripción de genes localizados en el genoma cloroplastidial están controlados de una forma circadiana (Harmer *et al*., 2001). De forma paralela se ha demostrado que muchos de los genes nucleares que participan en la fotosíntesis están controlados por el fotoperiodo y por el reloj endógeno, lo que supone una ventaja para las plantas, toda vez que el reloj biológico es el encargado de inducir a los genes que participan en la fase luminosa antes de que amanezca y, por el contrario, comienza a reprimir estos genes antes de que anochezca, con el consiguiente ahorro energético.

Las nuevas tecnologías que han surgido para el estudio de genomas completos han permitido recientemente determinar la secuencia completa de los genomas de Arabidopsis y arroz, lo que a su vez ha facilitado analizar todos los genes hasta ahora identificados. De esta forma, ha sido posible determinar que entre el 2% y el 6% de los genes de Arabidopsis analizados están controlados por el reloj circadiano (Harmer *et al*., 2000; Schaffer *et al*., 2001). Dos conclusiones pueden ser destacadas de estos experimentos: en primer lugar que pueden establecerse grupos de genes con similar periodo de transcripción y que se han encontrado grupos de genes que muestran máximos de transcripción en cualquiera de las fases del día o de la noche subjetivos; y en segundo lugar que probablemente este número de genes que se ha identificado bajo el control del reloj endógeno probablemente supone una subestimación del número total de genes que están controlados por el reloj circadiano (Harmer *et al*., 2000; Schaffer *et al*., 2001). Por ello que se ha sugerido que prácticamente todos los aspectos del metabolismo, y por ende de la fisiología de las plantas, estaría modulados por el reloj endógeno.

Llegada de información medioambiental al reloj.

El o los mecanismos por el que el reloj percibe los cambios de temperatura o incluso el mecanismo que permite al reloj la compensación de temperatura permanecen aún desconocidos. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la energía luminosa es percibida por las células, y como esa información es trasmitida al reloj, comienzan a ser muy bien conocidos (Devlin, 2002). En todos los sistemas biológicos, desde cianobacterias hasta humanos, es la luz perteneciente a la región azul del espectro luminoso la que es percibida por el reloj circadiano. Tanto en plantas como en animales son los fotorreceptores de luz azul tipo criptocromos los encargados de percibir dicha luz y transmitir la información al reloj circadiano (Cashmore *et al*., 1999). La gran diferencia entre estos sistemas es que en mamíferos los criptocromos son también componentes integrales del reloj, mientras que en plantas únicamente parecen actuar como moléculas fotorreceptoras (Harmer *et al*., 2001).

Además, los relojes circadianos vegetales son los únicos descritos con capacidad para percibir información luminosa del espectro del rojo al rojo lejano. Los fitocromos son los fotorreceptores responsables de percibir información en dicha región del espectro y son los encargados de transmitir dichos estímulos luminosos a los componentes del mecanismo del oscilador circadiano (Quail, 2002).

ecosistemas REVISTA CIENTÍFICA Y TÉCNICA DE ECOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE
Año XII, Nº1 / 2003
Enero - Abril

Mecanismo del oscilador

La energía luminosa y térmica es transmitida al denominado oscilador central del reloj que, en ultima instancia, es el encargado de mantener la periodicidad temporal, lo que le convierte en el componente más interesante de este mecanismo biológico. En sistemas tales como cianobacterias, insectos o incluso mamíferos, los componentes moleculares del oscilador central están perfectamente definidos, si bien se observa poca similitud entre las proteínas que forman parte de los respectivos osciladores. En todos estos sistemas se postula que el oscilador está compuesto por componentes positivos, proteínas que regulan e inducen la expresión de otras proteínas (componentes negativos) las cuales a su vez, reprimen a los elementos positivos, originándose un bucle de retroalimentación (Figura 2). En plantas solo recientemente se ha comenzado a identificar posibles componentes del oscilador central en Arabidopsis, y aún de muchas de las proteínas identificadas no se dispone de pruebas inequívocas que demuestren su función como componentes del mecanismo del oscilador. Las dos primeras proteínas que fueron señaladas como posibles componentes de reloj circadiano en plantas fueron CCA-1 y LHY, proteínas homólogas entre si que tienen como característica poseer un dominio de unión al ADN tipo *c-myb* (Carre y Kim, 2002). La sobrexpresión de los genes correspondiente (*CCA-1* y *LHY*) provoca arritmicidad en todos los procesos circadianos estudiados hasta el momento. Además se han identificado mutantes nulos de los genes *CCA-1* y *LHY1* (es decir, plantas mutantes que carecen de las proteínas CCA-1 y LHY1), y se ha observado que los dobles mutantes *cca1 lhy1* presentan periodos más cortos en la ritmicidad de diversos genes controlados por el reloj, indicando que LHY y CCA1 son componentes del oscilador central (Mizoguchi *et al*., 2002).

El primer gen de plantas que se demostró que codificaba para un componente negativo del oscilador central fue *TOC1*, ya que se ha descrito que las plantas mutantes para este gen muestran periodos significativamente más cortos en todos los ritmos circadianos estudiados, siendo la proteína codificada por este gen un nuevo tipo de proteína reguladora, nunca antes descrita en plantas (Strayer *et al*., 2000).

Recientemente se ha propuesto la existencia de una regulación recíproca entre TOC1 y CCA1/LHY en el reloj de Arabidopsis. TOC1 parece participar en la regulación positiva de la expresión de CCA1 y LHY mientras que LHY y CCA1 regulan de forma negativa TOC1, uniéndose a la secuencia promotora de TOC1, lo cual indicaría que son componentes del oscilador central de las plantas (Alabadi *et al*., 2001).

Un tercer tipo de mutantes alterados en el periodo de ritmos circadianos ha sido recientemente identificado, con la particularidad de que en ellos el periodo de los ritmos circadianos es más largo, fenotipo que ha servido para nombrar a los genes que codifican para estas proteínas *adagio* (Jarillo *et al*., 2001). El mutante *adagio1* (también llamado *zeitlupe*) en ciertas condiciones de iluminación es arrítmico, lo que indicaría que la proteína ADAGIO1 o bien sería un componente positivo del oscilador central o bien sería un intermediario entre los fotorreceptores y el oscilador. El hecho de que en el genoma de Arabidopsis existan tres genes *ADAGIO* muy similares podría explicar por qué los mutantes sencillos no son arrítmicos en todas las condiciones lumínicas. Se están generando dobles y triple mutantes de estos genes que ayuden a dilucidar, de una forma precisa la función que cada uno de ellos tiene en el mecanismo de control de los ritmos circadianos en Arabidopsis.

ecosistemas REVISTA CIENTÍFICA Y TÉCNICA DE ECOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE
Año XII, Nº1 / 2003
Enero - Abril

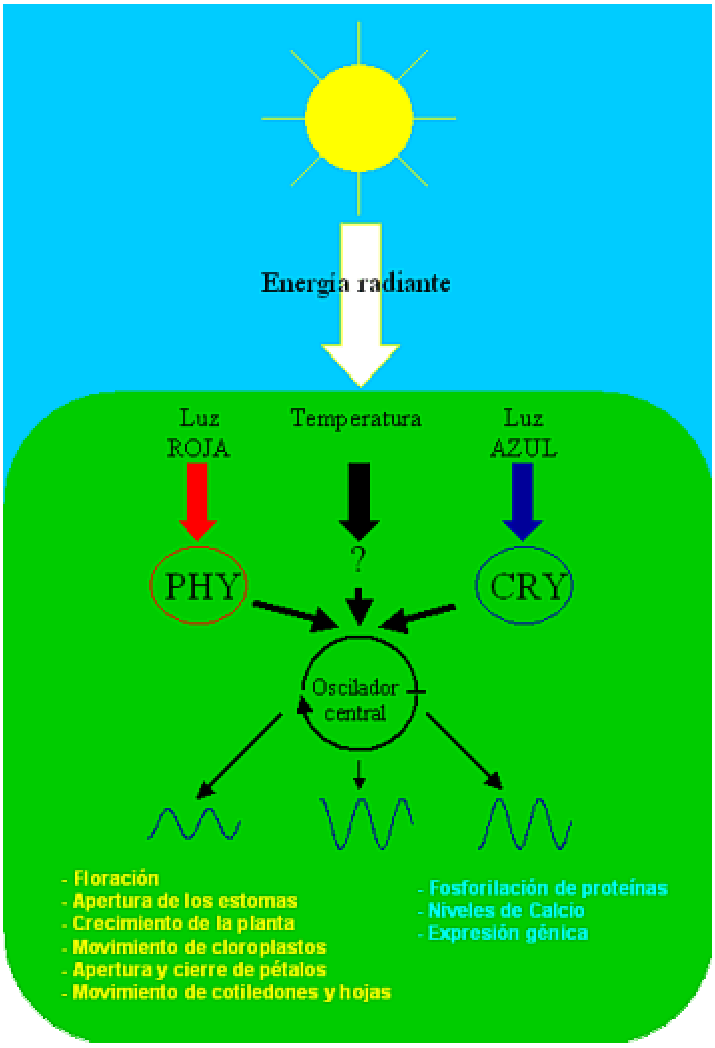

Figura 2. Representación esquemática del sistema circadiano en plantas. La energía luminosa del exterior es percibida por fotorreceptores como Fitocromos (PHY) y Criptocromos (CRY), si bien se desconoce el receptor de temperatura de la plantas. La información del exterior es transmitida al oscilador central que es el encargado de medir la longitud del periodo de diversos procesos como los que se destacan en amarillo (tiempo de floración, movimiento de las plantas, etc) a través del control de los procesos indicados en azul (control de la expresión génica, etc).

Salida de la información desde el oscilador central

Mutaciones que afectan al gen *adagio3* (también llamado *fkf1*), provoca alteraciones en los ritmos circadianos, así como un retraso muy significativo en el tiempo del proceso de la floración (Figura 3). Algunos otros mutantes de genes que codifican para componentes del reloj biológico también provocan alteraciones en el tiempo de floración. Así por ejemplo, las mutaciones *toc1* provocan un adelanto en el tiempo de floración , característica que además se encuentra en otros mutantes alterados en el reloj circadiano (tales como *early flowering3* y *4*), lo que demuestra que el reloj biológico participa en el

control de ritmos ultradianos, probablemente informando a la células correspondientes de la longitud del día y de la noche. Muy recientemente se ha demostrado que en Arabidopsis el reloj circadiano participa en el control de la floración regulando el nivel de expresión de dos genes claves de este proceso como son *CONSTANS* y *FT* (Yanovsky y Kay, 2002). Y también recientemente se ha demostrado que CONSTANS participa en el control fotoperiódico de la tuberización, lo cual implica que este gen, controlado a su vez por el reloj biológico, es clave para transmitir la información del reloj biológico, la cual es utilizada por la planta para el control de diversos procesos de la máxima importancia en la biología de las plantas (Martínez-Garcia *et al*., 2002).

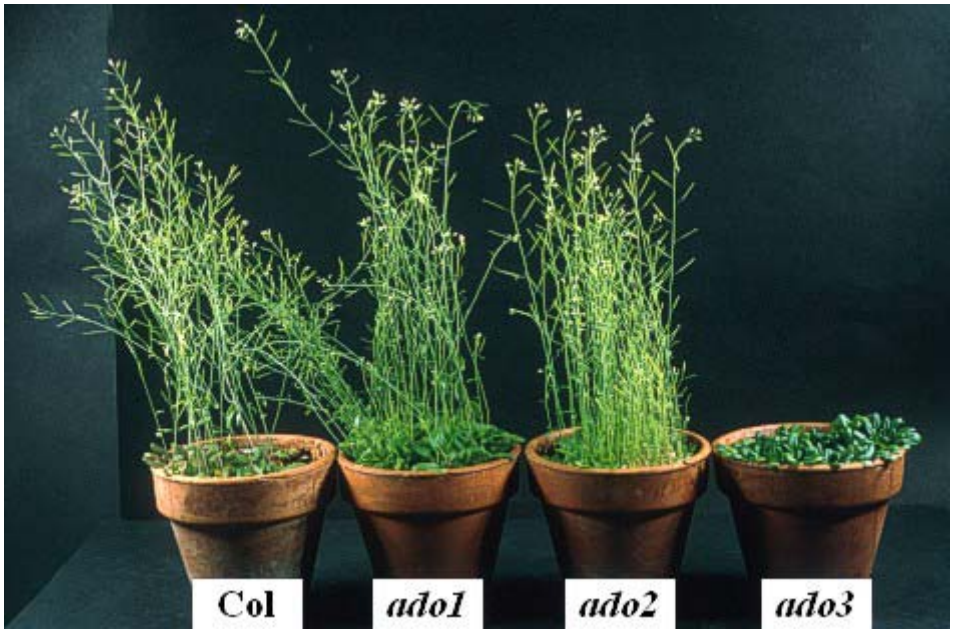

Figura 3. Tiempo de floración de plantas de Arabidopsis mutantes de los genes *adagio*. Las plantas de Arabidopsis del ecotipo Columbia (Col) y de los mutantes *adagio1* y *2* (*ado1* y *2*) florecen normalmente mientras que las plantas del mutante *adagio3* (*ado3*), muestran un fenotipo de floración tardía.

De todas las vías de transmisión de señales que parten desde el oscilador central, las que interviene en el control del tiempo de floración son las mejor conocidas de plantas. Sin embargo, cabe esperar que las nuevas herramientas moleculares de las que actualmente se dispone, las mejores de ellas derivadas del conocimiento de la secuencias nucleotídica completa del genoma de Arabidopsis, permitirán en un futuro no muy lejano identificar componentes de todas las vías de transmisión de señales que parten del oscilador central del reloj biológico y que participan en el control de multitud de procesos bioquímicos, biológicos y celulares.

Conclusiones

A pesar de que los ritmos circadianos fueron identificados por primera vez en las plantas, y que también fue en plantas donde se demostró que los ritmos circadianos están generados por el denominado reloj endógeno, aún no se conoce con suficiente detalle este mecanismo que resulta clave en la biología celular así como en la fisiología y la reproducción de las plantas. En los últimos años se han acumulado evidencias de múltiples procesos controlados por el reloj biológico, si bien no ha sido hasta recientemente cuando se han identificado algunos de los componentes implicados en la percepción de

los estímulos luminosos, y cómo esta información es transmitida hasta el componente clave del reloj, el denominado oscilador central, generado por la síntesis y degradación cíclica de determinadas proteínas. También muy recientemente se han identificado los primeros mediadores en la señal que, originada en el oscilador central, permite al reloj circadiano controlar procesos con periodos anuales como son la floración y la tuberización. Sin lugar a dudas en los próximos años asistiremos a descubrimientos que nos permitirán conocer con más detalle todos los componentes moleculares del reloj biológico así como profundizar en las vías de transmisión de señales que permiten al reloj circadiano controlar diferentes procesos metabólicos y fisiológicos de las plantas.

Referencias

Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P. y Kay, S.A. 2001. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. Science. 293: 880-883.

Carre, I.A. y Kim, J.Y. 2002. MYB transcription factors in the Arabidopsis circadian clock. J Exp Bot. 53:1551-1557.

Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J. y Liu, D. 1999. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. Science 284:760-765.

Devlin, P.F. 2002. Signs of the time: environmental input to the circadian clock. J. Exp. Bot. 53:1535-1550.

Doyle, M.R., Davis, S.J., Bastow, R.M., McWatters, H.G., Kozma-Bognar, L., Nagy, F., Millar, A.J. y Amasino, R.M. 2002. The *ELF4* gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. Nature 419: 74-77.

Engelmann, W. y Jhonsson, A. 1998. Rhythms in organ movement. En "Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants". Eds. Lumsden, P.J. y Millar, A.J. BIOS Scientific Publishers, Oxford. pp 35-50.

Harmer, S.L., Hogenesch, J.B. Straume, M., Chang, H.-S., Han, B., Panda, S. y Kay, S.A. 2000. Orchestrated trancription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. Science 290: 2110-2113.

Harmer, S.L., Panda, S. y Kay, S.A. 2001. Molecular bases of circadian rhythms. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 17: 215-253.

Jarillo, J.A., Capel, J., Tang, R.H., Yang, H.Q., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Cashmore, A.R. 2001. An Arabidopsis circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. Nature 410: 487-490.

McWatters, H.G., Bastow, R.M., Hall, A. y Millar, A.J. 2000. The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. Nature 408: 716-720.

Martínez-García J.F., Virgos-Soler, A. y Prat, S. 2002. Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the Arabidopsis flowering-time gene CONSTANS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:15211-15216.

Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.R., Carre, I.A. y Coupland G. 2002. LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis. Dev. Cell 2: 629-641.

Moore-Ede, M.C., Sulzman, F.M. y Fuller, C.A. 1982. The clock that time us. Harvard University Press. Cambridge, USA.

Ouyang, Y., Andersson, C.R., Kondo, T., Golden, S.S. y Jhonson, C.H. 1998. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8660–8664.

Piechulla, B. 1999. Circadian expression of the light-harvesting complex protein genes in plants. Chronobiol. Int. 16: 115-128.

Quail, P.H. 2002. Phytochrome photosensory signalling networks. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3: 85-93.

Schaffer, R., Landgraf, J., Accebi, M., Simon, V., Larson, M. y Wisman, E. 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. Plant Cell 13: 113-123.

Somers, D.E. 1999. The Physiology and Molecular Bases of the Plant Circadian Clock. Plant Physiol. 121: 9–19.

Strayer, C. y Kay, S.A. 1999. The ins and outs of circadian regulated gene expression. Current Opinion Plant Biol. 2: 114-120.

Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Mas, P., Panda, S., Kreps, J.A. y Kay, SA. 2000. Cloning of the Arabidopsis clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. Science 289: 768-771.

Sweeney, B.M. 1987. Rhythmic Phenomena in Plants. Academic Press, San Diego,USA.

Takahashi, J.S. 1995. Molecular Neurobiology and Genetics of Circadian Rhythms in Mammals. Annu. Rev. Neurosci. 18: 531-553.

Yanovsky, M.J. y Kay, S.A. 2002. Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. Nature 419: 308-312.