

Cronobiologia vegetal: aspectos fisiológicos de um relógio verde

Plant chronobiology: physiological aspects of a green clock

Ivan Santos Salles* e Marcos Silveira Buckeridge

Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

*Contato do autor: ivanss7@gmail.com

Resumo. Apesar de a maior parte dos trabalhos em cronobiologia ser desenvolvida em animais, os ritmos biológicos foram inicialmente detectados em plantas e importantes descobertas cronobiológicas ocorreram no campo da biologia vegetal. Muitos conceitos centrais, hoje amplamente aplicados para diversos organismos, foram inicialmente identificados em plantas. Esta revisão tem por objetivo apresentar as principais descobertas no campo da cronobiologia vegetal, a partir de uma perspectiva histórica, bem como, expor os principais eventos fisiológicos envolvidos em processos temporais nas plantas.

Palavras-chave. Cronobiologia, osciladores e ritmo circadiano.

Abstract. Although animals are the most frequent biological system in chronobiologic works, biological rhythms were originally described in plants and the history of chronobiology is permeated by important discoveries in the plant biology field. Many central concepts, nowadays widely applied to diverse organisms, have initially been identified in plants. The present review aims to introduce the main discoveries in plant chronobiology, adopting a historical approach, and to introduce the main physiological events involved in plant's endogenous timekeeping as well.

Keywords. Chronobiology, oscillators and circadian rhythm.

Recebido 31ago10

Aceito 21ago12

Publicado 27dez12

Cronobiologia: uma visão histórica

A percepção da existência e da importância dos ciclos naturais permeia a cultura de diversos povos, muitas vezes refletidos em lendas, mitos ou cultos religiosos. No entanto, a noção de que os organismos vivos poderiam acompanhar e responder a esses ciclos naturais é mais recente. Provavelmente o primeiro relato descritivo de um ciclo biológico foi feito por Andróstenes de Thasos em 325 a.C.

Andróstenes era historiador e acompanhava o exército de Alexandre, o Grande, em suas excursões de batalha. Em um dos acampamentos, ele passou a observar uma árvore de *Tamarindus indica*, o tamarindeiro, e descreveu a forma peculiar com que as folhas se fechavam durante a noite e se abriam durante o dia (Bretzl, 1903; Schildknecht, 1983).

A percepção da existência de ritmos em seres vivos foi um elemento importante na história. Porém, mais de dois mil anos se passaram até o surgimento da ideia de tais ciclos não serem uma mera resposta ao ambiente, mas sim o resultado de um mecanismo endógeno de geração de ritmos biológicos, influenciado pelo ambiente.

Esta ideia surgiu em 1729, proposta pelo astrônomo francês Jean Jacques de Mairan. Assim como Andróstenes,

de Mairan percebeu a existência de ciclos diários na movimentação foliar de uma planta, provavelmente uma mimosa, e decidiu isolá-la em um compartimento sem luz.

A constatação de que o ritmo nictinástico (movimentação foliar) mantinha-se mesmo em escuro constante foi objeto de publicação científica, mas na época não foi dada a devida importância ao fato. Somente 30 anos depois estes experimentos foram retomados (*apud* Moore-Ede e col., 1982, *apud* McClung, 2006).

Em 1759, Johann Gottfried Zinn, ao cultivar plantas de *Mimosa virgata* em um porão sob escuro constante, observou que a movimentação foliar não era afetada por variações de temperatura. Este fato inesperado fez com que Zinn propusesse, pela primeira vez, a existência de um mecanismo endógeno de geração de ritmos independente da temperatura ambiente (Cumming e Wagner, 1968).

Em 1832, Augustin Pyrame de Candolle, um botânico suíço, conseguiu medir o período do ritmo de movimentação foliar de uma planta em escuro constante. Ele mostrou que o período não era exatamente de 24h, sendo esta mais uma característica que indicaria a existência de um mecanismo endógeno de marcação do tempo (*apud* McClung, 2006).

No mesmo trabalho, de Candolle conseguiu ainda

inverter as fases do ritmo da movimentação foliar ao inverter as fases do ciclo claro/escuro ao qual as plantas estavam submetidas, demonstrando assim a importância do ciclo ambiental na expressão final do ritmo (*apud* Cumming e Wagner, 1968).

Em meados dos anos 1940, Erwin Bünning propôs, ao discutir fotoperiodismo, que o mecanismo de medida da duração do dia fosse controlado por um oscilador endógeno, com período de aproximadamente 24h (circadiano) (*apud* Cumming e Wagner, 1968). O mesmo Bünning ainda sugeriu que este oscilador teria sua expressão dividida em duas fases de aproximadamente 12h cada uma (uma vinculada ao claro e outra ao escuro), sendo que cada uma das fases apresentaria sensibilidade diferente a estímulos ambientais (*apud* Cumming e Wagner, 1968).

Nesta época, muitos estudos vinham sendo desenvolvidos, em diversas espécies animais e vegetais, com o objetivo de melhor entender os ciclos biológicos. Foi então que em 1960, no encontro sobre “Relógios Biológicos” (*Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*), ocorrido nos EUA, que a cronobiologia (do grego: *cronos* = tempo; *bios* = vida e *logos* = estudo) foi sistematizada como uma disciplina (Marques e Menna-Barreto, 2003). Este evento compilou as principais ideias e conhecimentos adquiridos ao longo dos anos e levantou novas questões a serem entendidas, gerando uma nova era no estudo dos ritmos biológicos, na qual as perguntas básicas seriam voltadas ao entendimento do funcionamento do próprio oscilador.

Circarritmos

O termo “circadiano” (do latim *circa* = cerca de e *dies* = dia) foi originalmente cunhado por Franz Halberg para definir ritmos com duração aproximada de 24h (McClung, 2006). O mesmo autor propôs a denominação “ultradianos” para ritmos com períodos menores que 20h e “infradianos” para aqueles com períodos maiores que 28h (Marques e Menna-Barreto, 2003). Atualmente, todo ritmo, seja qual for seu período, controlado por um ou mais osciladores endógenos é chamado “circarritmo” (como circamaré, circularunar, etc.) (Lumsden e Millar, 1998).

Mas, como saber se um ritmo é gerado por um relógio endógeno? Para um ritmo ser considerado um circarritmo ele deve apresentar três características básicas:

A) persistir em condições ambientais constantes (condição de livre curso).

B) ser passível de arrastamento: o oscilador deve entrar em ressonância com um ciclo ambiental e estabelecer com ele uma relação de fase estável. Em consequência, seu período torna-se igual ao do ciclo ambiental.

C) o período do ritmo endógeno deve apresentar compensação à temperatura, ou seja, apresentar um Q_{10} próximo a 1 (Harmer, 2009). Q_{10} é a taxa de modificação exibida por um processo biológico, quando a temperatura ambiente sofre uma variação de 10°C. Normalmente a velocidade das reações bioquímicas dobra ou triplica com o aumento de 10°C na temperatura, ou seja, apresentam um $Q_{10} = 2$ ou 3. No entanto, o Q_{10} da variação do período dos

ritmos circadianos vai de 0,8 a 1,4 (Dunlap e col., 2004). Um exemplo é *Phaseolus coccineus*, que exibe um Q_{10} de 1,2 no período da movimentação foliar (Bünning, 1931).

Osciladores e acoplamento

A base molecular de geração da oscilação circadiana baseia-se em alças de retroalimentação, com componentes positivos e negativos, envolvendo transcrição e tradução gênicas. Em plantas, já foram descobertas três alças principais, sendo uma central (responsável pela geração do ritmo) e duas de regulação fina do sistema (Harmer, 2009). Esta descoberta é interessante, principalmente ao pensarmos que todas as células carregam a maquinaria necessária para compor um oscilador endógeno, gerando a possibilidade de uma miríade de osciladores em uma mesma planta.

Atualmente as evidências apontam exatamente para isso. Não encontramos uma região, ou órgão, que concentre a função de relógio endógeno em vegetais; cada célula gera seu próprio ritmo, e muitas vezes, uma única célula apresenta mais de um oscilador (Lumsden e Millar, 1998; McClung, 2006; Harmer, 2009)

Os osciladores não geram ritmos exatamente iguais à 24h e, numa mesma planta, cada oscilador apresenta um período próximo, mas não exatamente igual aos outros (Lumsden e Millar, 1998). Então como a planta como um todo não fica dessincronizada?

Devemos primeiro pensar que os osciladores, quando em condições naturais, não estão em livre curso, mas arrastados por ciclos do ambiente. Além dos ciclos ambientais, sinais cíclicos da própria planta propiciam a sincronização dos osciladores entre si.

Em pequena escala, sinais de curta distância podem ser transmitidos para as células adjacentes por meio de plasmodesmata (junções citoplasmáticas entre células através de poros na membrana e parede celular). Os sinais transmitidos podem ser químicos ou elétricos (Ding, 1997).

Para transmissões em maiores distâncias, outros mecanismos estão presentes, como por exemplo, sinais hidráulicos, hormonais ou até açúcares (James e col., 2009).

Diversos trabalhos mostram que também hormônios podem atuar como sinais de sincronização endógena fraca. Giberelina, auxina e etileno são apontados como efetores em mudanças nas fases dos osciladores (Viswanathan e Subbaraj, 1983; Foster e Morgan, 1995; Machackova e col., 1997; Morgan e col., 1990; Ievinsh e Kreicbergs, 1992). No entanto, todos os agentes sincronizadores endógenos conhecidos apresentam uma baixa capacidade de manter uma relação de fase estável entre os osciladores da planta.

Thain e colaboradores (2000) demonstram que os osciladores de uma planta de tabaco podem ser regionalmente desacoplados, ou seja, órgãos distintos podem ser arrastados por ciclos ambientais em diferentes relações de fase. Neste experimento, diferentes órgãos de uma mesma planta (no caso duas folhas distintas) foram submetidos ao mesmo tempo, a tratamentos com ciclos claro/escuro

em oposição de fase, que mantinha uma das folhas no claro e a outra no escuro. Como resultado, as folhas apresentavam-se em oposição de fase, situação que se manteve quando a planta foi transferida para condições constantes. Isso indica que os resultados obtidos não foram devidos à presença de luz, e sim que os osciladores foram arrastados pelo ciclo claro/escuro.

Esta independência entre órgãos é um fenômeno aceitável ao observarmos a parte aérea das plantas, a qual está diretamente submetida ao ciclo claro/escuro. No entanto, ao analisarmos o conjunto de osciladores presentes nas raízes, torna-se pouco intuitivo pensarmos em uma sincronização direta pelo ciclo claro/escuro, o qual é o principal sincronizador em plantas. De fato, estudos feitos com raízes de *Arabidopsis* indicam a importância de fatores endógenos para a sincronização dos osciladores desse órgão (James e col., 2009). Este estudo aponta para uma sincronização do conjunto de osciladores das raízes de *Arabidopsis* proporcionada por um sinal advindo da parte aérea da planta. É levantada a possibilidade de a fotossíntese ser a responsável por tal sinalização (provavelmente um sinal de açúcar) (James e col., 2009).

Na verdade, o mecanismo molecular dos osciladores da porção radicular parece ser simplificado. Há evidências de que ocorra inativação de duas das alças de retroalimentação que compõem os osciladores. Esta situação sugere um papel secundário dos osciladores da raiz, que dependeriam de sinais temporais da parte aérea da planta (James e col., 2009).

Como plantas não possuem um sistema circulatório, qualquer informação advinda de sinais bioquímicos deve ser primeiramente enviada para a parte radicular e posteriormente redirecionada para outras partes do organismo (como no caso de hormônios não voláteis). Portanto, a raiz seria o local com a maior probabilidade de abrigar um oscilador central (que concentrasse informações ambientais e coordenasse os demais osciladores). Os resultados de James e colaboradores (2009) não corroboram esta hipótese. Os autores não identificaram um coordenador central nas raízes de *Arabidopsis*, mas demonstraram a existência de osciladores menos complexos, que dependem de outros osciladores para seu correto funcionamento.

A situação atual indica a existência de um sinal sistêmico capaz de acoplar os osciladores. Entretanto, o acoplamento parece ser fraco, o que depõe contra a ideia da existência de um sistema central de coordenação rítmica das plantas.

Vendo o mundo em vermelho e azul: sinais ambientais

Sabe-se que, de todos os ciclos ambientais, o ciclo claro/escuro é aquele que mais eficientemente arrasta os ritmos de uma planta (Lumsden e Millar, 1998). Os osciladores recebem a informação luminosa através da mediação de dois grupos principais de fotopigmentos, os fitocromos e os criptocromos (Devlin e Kay, 2000).

A família dos fitocromos é dividida em cinco componentes, enquanto a família dos criptocromos em apenas

dois. Os fitocromos atuam principalmente absorvendo luz na faixa do vermelho, enquanto os criptocromos atuam primordialmente na faixa do azul. Porém, sobreposições entre os espectros de absorção nas duas famílias são comuns (Ahmad, 1999; Briggs e Olney, 2001). Todos os membros das duas famílias participam como transdutores de informação luminosa para os osciladores (Devlin e Kay, 2000).

Em plantas é difícil diferenciar a via de transdução do sinal luminoso (aferência) do próprio oscilador. Isso porque os fotopigmentos mencionados, em associação com outras proteínas, podem induzir ou reprimir a expressão de genes do relógio diretamente no núcleo celular (Harmer, 2009). Da mesma forma, algumas proteínas componentes das alças de retroalimentação do relógio são apontadas como fotopigmentos que respondem a comprimentos de onda na faixa do azul (Martin-Tryon e col., 2007).

Uma vez que a concentração dos fotopigmentos oscila circadianamente (assim como a concentração das proteínas fotossensíveis, componentes das alças de retroalimentação do relógio) o organismo apresenta fases de maior ou menor sensibilidade ao sinal luminoso ambiental (Bognar e col., 1999; Hall e col., 2001; Toth e col., 2001). Esta característica do relógio de plantas faz com que a própria entrada do sinal luminoso seja controlada pelo relógio.

Outro fator que controla a entrada de luz é a produção, no final do dia, de uma proteína (ELF3) que diminui a fotossensibilidade da planta. O papel deste controle da entrada de luz no relógio ainda é mal entendido, mas sabemos que é importante para o correto funcionamento do relógio quando a planta está submetida a longas fotofases (fase de claro) (McWatters e col., 2000; Millar, 2004).

Eferências: fisiologia controlada pelo relógio

Como observado anteriormente, a comunicação entre os diversos relógios em uma planta pode ser fraca. No entanto, existe um controle altamente regulado dos processos fisiológicos circadianos.

A transdução do sinal do relógio para os eventos fisiológicos pode ser regulada em diferentes níveis.

O primeiro nível se dá no controle da transcrição gênica, ou seja, o relógio pode induzir ou reprimir a expressão de determinados genes (como ativar a produção hormonal ou genes envolvidos com a cadeia de transporte de elétrons) ao longo do dia e de acordo com a fase em que o oscilador se encontra (Harmer, 2009). De fato, já foram identificadas sequências específicas de nucleotídeos da região promotora de alguns genes, que definem a fase na qual esses genes serão expressos (Harmer e col., 2000).

O segundo nível do controle circadiano ocorre no momento da tradução. Alguns genes podem apresentar um nível constitutivamente constante de transcrição, mas a concentração de suas proteínas claramente exhibe um ritmo, originado pela regulação direta da tradução destes genes (McClung, 2001).

O terceiro nível conhecido é o controle da atividade

de determinadas proteínas. O controle é proporcionado principalmente pela fosforilação rítmica delas. A fosforilação pode ativar, desativar ou marcar as proteínas para degradação (Harmer, 2009).

O último, e menos rígido controle exercido pelo relógio biológico, é aquele que atua sobre as redes metabólicas como um todo. O processo consiste no controle circadiano de um ou mais componentes de uma rede metabólica, o que gera o controle de toda a rede (Harmer, 2009).

Este mecanismo muitas vezes é chamado de controle em “gate” (do inglês, “portão”), em que o evento fisiológico é limitado pelo relógio, mas não totalmente controlado por ele (Lumsden e Millar, 1998) (Nota: esta denominação pode causar alguma confusão, uma vez que em populações de animais, principalmente insetos, o termo “gate” é associado a outro processo; sugiro a leitura desta definição em Dunlap e col., 2004).

Múltiplos osciladores: vantagens adaptativas da marcação temporal

A existência de um mecanismo de marcação temporal endógeno possibilita ao organismo antecipar-se às variações cíclicas ambientais e não apenas responder a elas. Isso permite uma preparação fisiológica a diversas condições críticas, como preparar os fotossistemas para a chegada da luz no começo do dia ou, no caso de unicelulares, aumentar a proteção contra radiação UV nas horas críticas do dia (Enright, 1970; Lumsden e Millar, 1998; McClung, 2001;).

Experimentos em diferentes linhagens de cianobactérias (mutantes quanto ao período de seus ritmos) demonstram que quanto mais próximo o período do ritmo endógeno do período do ciclo ambiental, maior a probabilidade de sobrevivência da linhagem (Ouyang e col., 1998). Estes resultados demonstram a importância da existência de um ritmo endógeno, cuja oscilação intrínseca favorece a adaptação a um ambiente cíclico.

A existência de múltiplos osciladores pode facilitar ainda mais os mecanismos adaptativos, por aumentarem a plasticidade do sistema circadiano. Isto porque dois eventos controlados por dois osciladores diferentes podem estabelecer qualquer relação de fase entre si. Tal padrão ajuda a coordenar eventos metabólicos distintos ou mutuamente excludentes. Por exemplo, a atividade do metabolismo CAM (Crassulacean Acid Metabolism), o qual apresenta duas fases distintas, a fase de fixação de carbono e a de captação da energia luminosa (Lumsden e Millar, 1998; Duarte e col., 2005). Este padrão se altera ao longo do ano, dependendo das condições ambientais às quais o organismo está submetido, exigindo que a planta se adapte para melhor aproveitamento da água e energia luminosa disponíveis.

No entanto, devido ao fraco acoplamento entre osciladores em plantas, outro mecanismo capaz de coordenar processos mutuamente excludentes e variáveis ao longo do tempo seria a separação espacial destes processos (em tecidos ou mesmo células distintas de um mesmo tecido que apresentem relações de fase variáveis). Estes conjuntos celulares poderiam apresentar osciladores em rela-

ções de fases distintas e variáveis ao longo do ano. Assim, quando o órgão como um todo é analisado encontramos processos mutuamente excludentes sendo coordenados de formas distintas ao longo do ano.

É difícil especular sobre as situações que favoreceram o surgimento de um conjunto de osciladores fracamente acoplados. Podemos sugerir que tal fato seja relevante quando se pensa na composição da copa de uma planta. Eventualmente cada ramo está submetido a uma condição luminosa diferente dos demais. Assim a possibilidade de coordenação independente de cada ramo, ou até de cada folha, maximizaria a eficiência energética da planta como um todo.

Bibliografia

- Ahmad M. 1999. Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors. *Current Opinion in Plant Biology* 2:230-235.
- Bognar LK, Hall A, Adam E, Thain SC, Nagy F, Millar AJ. 1999. The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 14652±14657.
- Bretzl H. 1903. *Botanische Forschungen des Alexanderzuges*. Leipzig, Germany: B.G. Teubener.
- Briggs WR e Olney MA. 2001. Photoreceptors in Plant Photomorphogenesis to Data. Five Phytochromes, Two Cryptochromes, One Phototropin and One Superchrome. *Plant Physiology* 125:85-88.
- Bünning E. 1931. Untersuchungen über die autonomen tagesperiodischen Bewegungen der Primärblätter von *Phaseolus multiflorus*. *Jahb. Wiss. Bot.* 75:439-480.
- Cumming BG e Wagner E. 1968. Rhythmic processes in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 19:381-416.
- Devlin PF e Kay SA. 2000. Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12:2499-2510.
- Ding B. 1997. Cell-to-cell transport of macromolecules through plasmodesmata: a novel signaling pathway in plants. *Trends Cell Biol* 7:5-9.
- Duarte HM, Jakovljevic I, Kaiser F e Lüttge U. 2005. Lateral diffusion of CO₂ in leaves of the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoë daigremontiana* Hamet et Perrier. *Planta* 220:809-816.
- Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. 2004. *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Ed. Sinauer Associates, Inc.
- Enright JT. 1970. Ecological aspects of endogenous rhythmicity, *Annual Review* 1:221-238.
- Foster KR e Morgan PW. 1995. Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor*. IX. The ma3R allele disrupts diurnal control of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* 108:337-343.
- Hall A, Kozma-Bognar L, Toth R, Nagy F, Millar AJ. 2001. Conditional circadian regulation of PHYTOCHROME A gene expression. *Plant Physiology* 127:1808±1818.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, e Kay SA. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290:2110–2113.
- Harmer SL. 2009. The Circadian System in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology* 60:357-377.
- Ievinsh G e Kreicbergs O. 1992. Endogenous rhythmicity of ethylene production in growing intact cereal seedlings. *Plant Physiology* 100:1389 – 1391.

- James AB, Monreal JA, Nimmo GA, Kelly CL, Herzyk JP, GI, Nimmo HG. 2009. The Circadian Clock in *Arabidopsis* Roots Is a Simplified Slave Version of the Clock in Shoots. *Science* 322:1832-1835.
- Lumsden PJ e Millar AJ. 1998. Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants. Ed. BIOS Scientific Publishers Limited, UK.
- Machackova I, Chauvaux N, Dwitte W e Onkelen H. 1997. Diurnal fluctuations in ethylene formation in *Chenopodium rubrum*. *Plant Physiology* 113:981-985.
- Marques N e Menna-Barreto. 2003. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. 3 ed. Edusp: São Paulo.
- Martin-Tryon, EL, Kreps, JA, e Harmer, SL. 2007. GIGANTEA acts in blue light signaling and has biochemically separable roles in circadian clock and flowering time regulation. *Plant Physiol.* 143 473-486
- McClung RC. 2001. Circadian Rhythms in Plants. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 52:139-162.
- McClung RC. 2006. Plant Circadian Rhythms. *The Plant Cell* 18:792-803.
- McWatters HG, Bastow RM, Hall A. e Millar AJ. 2000. The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* 408:716-720.
- Millar AJ. 2004. Input signals to the plant circadian clock. *Journal of Experimental Bototany* 55:277-283.
- Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. 1982. *The Clocks that Time us: Physiology of the Circadian Timing System*. Cambridge, Harvard University Press.
- Morgan PW, He CJ, Degreef JA e Deproft MP. 1990. Does water deficit stress promote ethylene synthesis by intact plants? *Plant Physiology* 94:1616-1624.
- Ouyang Y, Ersson CR, Kondo T, Golden SS e Johnson CH. 1998. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95:8660-8664.
- Schildknecht H. 1983. Turgorins, Hormones of the Endogenous Daily Rhythms in Higher Organized Plants-Detection, Isolation, Structure, Synthesis, and Activity. *Angewandete Chemie International Edition in English* 22:695-710.
- Thain SC, Hall A, Millar AJ. 2000. Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Current Biology* 951-956.
- Toth R, Kevei E, Hall A, Millar AJ, Nagy F, Kozma-Bognar L. 2001. Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127:1607± 1616.
- Viswanathan N e Subbaraj R. 1983. Action of gibberelic-acid in plants-shifts of the circadian leaf-movement rhythm of a cotton plant, *Gossypium hirsutum*. *Caneidian Journal of Botany* 61:2527-2529