

Genetic analysis of the *Antirrhinum majus* circadian clock

M.I. Terry⁽¹⁾, J. Weiss⁽¹⁾, M. Egea-Cortines⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidad Politécnica de Cartagena, Instituto de Biología Vegetal, Genética Molecular.
Plaza del Hospital s/n, 30202, Cartagena. mitl0@alu.upct.es

Resumen

El reloj circadiano está presente en los reinos bacteria, archaia y eucariota. Se considera un mecanismo adaptativo resultante de la alternancia del día y la noche debido a la rotación terrestre. Se encarga de regular los procesos biológicos de los organismos en relación con las condiciones ambientales. En plantas, según el modelo descrito en la crucifera *Arabidopsis thaliana*, (L.) Heynh, 1842), este reloj consta de una compleja red de genes regulados entre sí y se divide en tres bucles: central, de la mañana y de la tarde. Las principales vías de entrada a este reloj son la luz, la temperatura y los nutrientes. Se conocen diversos mutantes que han permitido el estudio y caracterización de estos genes, así mismo es posible reducir o incrementar la expresión de dichos genes para su investigación. Nuestro objetivo es estudiar este reloj biológico en la especie boca de dragón (*Antirrhinum majus*, L. 1753) en líneas mutantes y transgénicas, así como la influencia de los genes reloj en desarrollo vegetativo, reproductivo y emisión de volátiles.

Palabras clave: Arabidopsis; boca de dragón; genes reloj; ritmo circadiano; RNAi

Abstract

The circadian clock is present in all living kingdoms. It is considered a mechanism of adaptation to the alternance of day and night due to the rotation of the earth, it regulates biological processes of organisms, and coordinates their physiology with the environment. In plants, according to the model described in the crucifer *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, 1842), this clock has a complex network of genes regulated and divided into three loops: central, morning and evening. The main entrainment to the clock are light, nutrients and temperature. Various mutants that have allowed the study and characterization of these genes are known, so it is possible to reduce or increase the expression of these genes for investigation. Our goal is to study the biological clock in the specie snapdragon (*Antirrhinum majus*, L. 1753) in mutant and transgenic lines as well as the influence of clock genes in specific biological processes.

Keywords: Arabidopsis; circadian rhythm; clock genes; RNAi; snapdragon

1. Introducción

El reloj circadiano es un mecanismo autorregulado y endógeno presente en los seres vivos, desde bacterias hasta seres humanos, éste interviene en procesos metabólicos, de desarrollo y proporciona una serie de ventajas adaptativas, o dicho de otro modo, permite a un organismo “anticiparse” a los cambios periódicos en el ambiente. Este mecanismo es el resultado de la alternancia del día y la noche como consecuencia de la rotación de la Tierra, “circadiano” hace referencia a aquellos ciclos que ocurren con una periodicidad aproximada de 24 horas.

Las bases moleculares de este reloj han sido sobre todo estudiadas en un hongo (*Neurospora crassa*) y en la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), pero también en plantas, en *Arabidopsis thaliana*, el reloj consiste en una red formada por varios genes

regulados a nivel transcripcional y post-translacional cuyas principales vías de entrada son la temperatura y la luz, mediante fitocromos y criptocromos [1, 2]; según el modelo descrito en *Arabidopsis* distinguimos tres bucles. El bucle central está formado, principalmente por los genes *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* y *TIMING OF CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (TOC1)*, *TOC1* es responsable de reducir la expresión de *CCA1* y *LHY* y éstos a su vez, redundantes y homólogos de los factores de transcripción tipo Myb, se acumulan y se unen al promotor de *TOC1*, reduciendo así su expresión [3, 4], y reprimiendo de este mismo modo a *LUX ARRHYTHMO (LUX)* [5], componente del bucle de la tarde. *CCA1* y *LHY* tienen su pico de expresión durante el día e inducen la expresión de los genes *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 7 y 9 (PRR7, PRR9)* que junto a *PRR5* inhiben a *CCA1* y *LHY*; esta unión formada por *CCA1/LHY* y

PPR7/9/5 constituyen el bucle de la mañana [6, 4]. Finalmente, el bucle de la tarde está formado por *EARLY FLOWERING 3* y *4 (ELF3, ELF4)*, en ocasiones llamado complejo de la tarde (EC), y *LUX* que reprimen a *PPR9*, además *LUX* se reprime así mismo. *ZEITLUPE (ZTL)*, una proteína F-Box estabilizada por *GIGANTEA (GI)*, controla la degradación de *TOC1* [7]. En la Figura 1 se resumen estos bucles [4].

Para el estudio de estos genes, se utilizan líneas de plantas mutantes o plantas en las que se ha silenciado o sobreexpresado el gen objeto del estudio. La unión de una construcción que actúa como marcador, por ejemplo luciferasa, al promotor del gen *CAB2*, que codifica la proteína de unión a la clorofila, permite identificar mutantes comparando los picos de expresión con plantas silvestres [8]; por ejemplo, plantas mutantes *lhy-1* muestran una floración independiente del fotoperiodo [9], los dobles mutantes *lhy;cca1* aceleran o retrasan la floración, según el fotoperiodo [10]; *elf3-1* se comporta de manera similar a *lhy-1* en cuanto a tiempo de floración o elongación del hipocótilo se refiere [11], y finalmente, el mutante *toc1-1* puso de manifiesto la importancia de este elemento en la regulación del reloj circadiano en *Arabidopsis* [12].

Por otro lado, es posible silenciar o sobreexpresar un gen. Para silenciar la expresión de un determinado gen, se utiliza ARN de doble cadena e interferencia (RNAi, en inglés), [13, 14], la construcción con este RNAi se introduce en la planta a través un protocolo de infección con *Agrobacterium tumefaciens*; este mecanismo de silenciamiento se basa en que la enzima Dicer detecta y corta este ARN, estos fragmentos son incorporados al complejo RISC (RNA-induced silencing complex) que se enfrentan al ARN mensajero (RNAm) complementario, éste es cortado y degradado posteriormente. Así entre otros, se ha silenciado *LHY* en *Arabidopsis* mostrando que este gen es indispensable, junto a *CCA1*, para mantener la ritmicidad [15]. La sobreexpresión de un gen se lleva a cabo, entre otros, a través del promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV-35S) [16]; se ha descrito que la sobreexpresión de algunos de los genes que forman parte del reloj circadiano, producen alteraciones en el resto de componentes del reloj [17, 18].

Entre otras plantas modelos, cabe mencionar a la boca de dragón (*Antirrhinum majus*) especie perteneciente a la familia de las escrofulariáceas y distribuida por la cuenca mediterránea.

Muchos de sus fenotipos son altamente inestables lo que hace a esta planta especialmente interesante, esta inestabilidad se debe a los transposones, por ejemplo, pueden modificar la coloración de las flores [19]; además, existen al menos, 750 líneas mutantes disponibles [20], tales como *Deficiens*, *Centroradialis*, *Divaricata*, *compacta ähnlich*, *Nitida* o *Grandiflora*, en las que se ha estudiado el desarrollo floral [21, 22, 23, 24, 25]. Además de estos trabajos sobre el desarrollo floral y la asimetría de las flores, también es objeto de estudio en cuanto a emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que tienen entre otras funciones, atraer a polinizadores, actuar como repelentes de herbívoros [26] e incluso pueden resultar tóxicos para otras especies de plantas [27]. La emisión de estos compuestos está regulada y varía a lo largo del día, en el caso de la boca de dragón, estos volátiles se liberan sobre todo durante el día y atraen a polinizadores, como abejas [28], en cambio, para otras especies como la petunia (*Petunia spp.*) este máximo en la emisión se produce durante la noche y es polinizada por polillas [28, 29].

2. Objetivos

En el presente trabajo, se estudiará el reloj circadiano en la especie *Antirrhinum majus*, para ello disponemos de varias líneas mutantes (Figura 2), una de éstas es especialmente interesante ya que presenta un fenotipo y otras características, como la floración, claramente distintos comparado con líneas silvestres, como los descritos en otros mutantes (por ejemplo, *Arabidopsis lhy;cca1*) y tenemos como objetivo identificar el gen o los genes responsables; así mismo, también contamos con líneas en las que se han silenciado elementos de este reloj biológico. Otro trabajo a realizar, además de cuantificar las diferencias de expresión de los genes reloj en plantas mutantes, transgénicas y silvestres, es estudiar la emisión de volátiles y su variación en distintas condiciones de luz y temperatura en las líneas mencionadas con anterioridad.

3. Referencias bibliográficas

[1] Somers, D., Devlin, P., Kay, S. 1998. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*. 282(5393): 1488-1490.

- [2] Hotta, C., Gardner, M., Hubbard, K. et al. 2007. Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant Cell Environ.* 30(3): 333-349.
- [3] Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y. et al. 2002. LHY and CCA1 are partially redundant genes required for maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell.* 2: 629-641.
- [4] Calixto, C., Waugh, R., Brown, J. 2015. Evolutionary relationships among barley and *Arabidopsis* core circadian clock and clock-associated genes. *J Mol Evol.* 80: 108-119.
- [5] Hazen, S., Schultz, T., Pruneda-Paz, J. et al. 2005. LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *P Natl Acad Sci USA.* 102(29):10387-10392.
- [6] Nakamichi, N., Kita, M., Iso, T. et al. 2005. The *Arabidopsis* pseudo-response regulators, PRR5 y PRR7, coordinately play essential roles for circadian clock function. *Plant Cell Physiol.* 46(4): 609-619.
- [7] Kim, W., Fujiwara, S., Suh, S. et al. 2007. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature.* 449(7160): 356-360.
- [8] Millar, A., Carre, I., Strayer, C. et al. 1995. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science.* 267(5201): 1161-1163.
- [9] Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A. et al. 1998. The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell.* 93: 1219-1229.
- [10] Miyata, K., Calviño, M., Oda, A. et al. 2011. Suppression of late-flowering and semi-dwarf phenotypes in the *Arabidopsis* clock mutant *lhy-12;cca1-101* by *phyB* under continuous light. *Plant Signal Behav.* 6(8): 1-10.
- [11] Song, H. 2012. Interaction between the late elongated hypocotyl (LHY) and early flowering (ELF3) genes in *Arabidopsis* circadian clock. *Genes Genom.* 34(3): 329-337.
- [12] Somers, D., Webb, A., Pearson, M. et al. 1998. The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 125(3): 485-494.
- [13] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391: 806-811.
- [14] Wesley, S., Heliwell, C., Smith, N. et al. 2001. Construct design for efficient and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27(6): 581-590.
- [15] Alabadí, D., Yanovsky, M., Más, P. et al. 2002. Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 12(2): 757-761.
- [16] Holtorf, S., Apel, K., Bohlmann, H. 1995. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 29(4): 637-646.
- [17] Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M. et al. 2002. The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: II. Characterization with CCA1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol.* 43(1): 118-122.
- [18] Serikawa, M., Miwa, K., Kondo, T. et al. 2008. Functional conservation of clock-related genes in flowering plants: Overexpression and RNA interference analyses of the circadian rhythm in the monocotyledon *Lemna gibba*. *Plant Physiol.* 146(4): 1952-1963.
- [19] Luo, D., Coen, E., Doyle, S. et al. 1991. Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 1: 59-69.
- [20] Whibley, A., Baxter, C. 2004. *Antirrhinum*. *Curr Biol.* 14(7): 260-261.
- [21] Sommer, H., Beltrán, J., Huisjer, P. et al. 1990. DEFICIENS, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* 9(3): 605-613.
- [22] Zachgo, S., Silva, E., Motte, P. et al. 1995. Functional analysis of the *Antirrhinum* floral homeotic DEFICIENS gene in vivo and in vitro by using a temperature-sensitive mutant. *Development.* 121: 2861-2875.
- [23] Cremer, F., Lönning, W., Saedler, H. et al. 2001. The delayed terminal flower phenotype is caused by a conditional mutation in the CENTRORADIALIS gene of snapdragon. *Plant Physiol.* 126: 1131-1141.
- [24] Galego, L., Almeida, J. 2002. Role of DIVARICATA in the control of dorsoventral asymmetry in *Antirrhinum* flowers. *Gene Dev.* 16(7): 880-891.
- [25] Delgado-Benarroch, L., Weiss, J., Egea-Cortines, M. 2009. The mutants *compacta ähnlich*, *Nitida* and *Grandiflora* define developmental compartments and a compensation mechanism in floral development

in *Antirrhinum majus*. J Plant Res. 122(5): 559-569.

[26] Paré, P., Tumlinson, J. 1999. Uptake on planta-insect interactions volatiles as a defense against insect herbivores. Plant Physiol. 121: 325-331.

[27] Horiuchi, J., Badri, D., Kimball, B. et al. 2007. The floral methyl benzoate, from snapdragon (*Antirrhinum majus*) triggers phytotoxic effects in *Arabidopsis thaliana*. Planta. 226(1): 1-10.

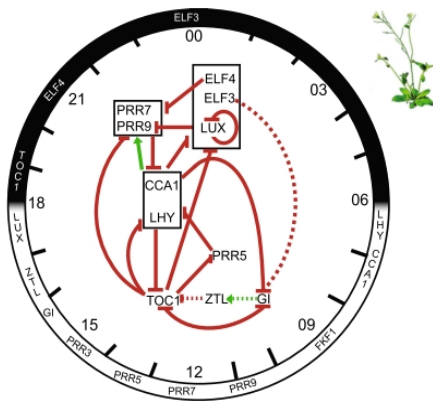
[28] Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C. et al. 2001. Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. Plant Cell. 13(10): 2333-2347.

[29] Dudareva, N., Murfitt, L., Mann, C. et al. 2000. Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. Plant Cell. 12(6): 949-961.

Figura 1. Bucles del reloj de *Arabidopsis*. La línea sólida indica bucles de retroalimentación transcripcional, la línea discontinua indica regulación post- translacional. El color verde indica activación, el color rojo, represión. [4]



Figura 2. Flores de *Antithirrinum majus*. A: flor típica. B: mutante compacta. C: mutante deficientes.



Tablas y Figuras

