

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN
GÉNICA DE LA VÍA DEL FOTOPERIODO EN DOS
VARIETADES DE SÉSAMO (*Sesamum indicum* L.) CON
TIEMPOS DE FLORACIÓN TEMPRANA Y TARDÍA**

MIGUEL JESÚS LÓPEZ RIVAS

Tesis presentada a Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas. Mención: Biotecnología.

SAN LORENZO – PARAGUAY

MARZO – 2021

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN
GÉNICA DE LA VÍA DEL FOTOPERIODO EN DOS
VARIEDADES DE SÉSAMO (*Sesamum indicum* L.) CON
TIEMPOS DE FLORACIÓN TEMPRANA Y TARDÍA**

MIGUEL JESÚS LÓPEZ RIVAS

Orientador: Dr. **JULIO CÉSAR MASARU IEHISA OUCHI**

Tesis presentada a Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas. Mención: Biotecnología.

SAN LORENZO – PARAGUAY

MARZO – 2021

López Rivas, Miguel Jesús.

Análisis Comparativo de la Expresión Génica de la Vía del Fotoperiodo en Dos Variedades de Sésamo (*Sesamum Indicum* L.) con Tiempos de Floración Temprana y Tardía.. - - San Lorenzo : El Autor, 2021. VIII, 93 p.: fig. ; 30 cm.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas - UNA para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas. Mención: Biotecnología.

1. SESAMO. 2. GENETICA. I. Título.

**CDD: 583.95
L864a**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN
GÉNICA DE LA VÍA DEL FOTOPERIODO EN DOS
VARIETADES DE SÉSAMO (*Sesamum indicum* L.) CON
TIEMPOS DE FLORACIÓN TEMPRANA Y TARDÍA**

MIGUEL JESÚS LÓPEZ RIVAS

Aprobado en fecha 05 de Marzo de 2021.

Tribunal Examinador:

Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres

Prof. Dr. Miguel Ángel Campuzano Bublitz

Ing. Agr. (MSc.) Diego Dionisio González Espínola

Ing. Agr. (Ph.D.) Marcelo Sebastián Alborn Jover

FCQ/UNA

FCQ/UNA

FCA/UNA

SENAVE

Dr. Julio César Masaru Iehisa Ouchi
Tutor

Prof. Lic. Laura Joy Ramírez
Directora de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres por apoyarme en todo momento. Por la voz de aliento y buenos ánimos cada vez que ameritaba y así renovar energías.

También quiero agradecer al Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas – UNA por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación. No hubiese podido arribar a estos resultados de no haber sido por su incondicional ayuda.

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis. Gracias por la confianza en mí depositada.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNA por la provisión de insumos, material indispensable para llevar a cabo esta investigación.

A los profesores del programa de maestría, por la paciencia y la dedicación que me brindaron, por ser ejemplos y base fundamental para el crecimiento personal.

A mis compañeros y amigos, gracias a ellos, los años desarrollados fueron mucho más amenos y llevaderos.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA VÍA DEL FOTOPERIODO EN DOS VARIEDADES DE SÉSAMO (*Sesamum indicum* L.) CON TIEMPOS DE FLORACIÓN TEMPRANA Y TARDÍA

Autor: MIGUEL JESÚS LÓPEZ RIVAS

Orientador: Dr. JULIO CÉSAR MASARU IEHISA OUCHI

Resumen

El sésamo (*Sesamum indicum* L.) es uno de los cultivos más importantes en el Paraguay debido a que es generador de ingresos para pequeños productores. Una manera de obtener mejores rendimientos del cultivo es acortando el tiempo de floración. Si bien existen variedades con tiempo de floración temprana, se desconoce el mecanismo molecular que lo provoca. Se sabe que el gen *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) induce la floración en plantas, y que se encuentra regulada por diversas vías, siendo la principal la del fotoperiodo. Para dilucidar el mecanismo implicado en la diferencia del tiempo de floración se planteó analizar la diferencia en la vía del fotoperiodo entre dos variedades de sésamo con tiempos de floración temprana (K3) y tardía (NEB) mediante análisis de expresión de los genes bajo dos fotoperiodos (12/12 y 16/8 h). De las cuatro copias del gen *FT* que posee el sésamo, la expresión de *SiFTL1* (reportado previamente como *SiFT*) aumentó antes de la aparición de botones florales y presentó una mayor expresión en la variedad de floración temprana K3. Por lo que *SiFTL1* podría ser el principal inductor de la floración. *SiFTL2* también podría actuar como un inductor, debido que aumentó su expresión durante la transición floral. El gen *SiFTL4* podría ser un represor floral, ya que su expresión disminuyó a medida que se acercaba la transición al estado floral. El gen *SiFTL3* al parecer no participa en la regulación de la floración. La expresión de *SiCOL1a* (reportado anteriormente como *SiCOL2*) también fue superior en la variedad K3. Sin embargo, no se observó diferencias en el nivel de expresión de las dos copias de *GIGANTEA* (*GI*) entre las dos variedades. *SiCOL1a/SiCOL2* probablemente actúa junto con *SiGII* para inducir la expresión de *SiFTL1*. Mientras que *SiCOL1b* (reportado como *SiCOL1*) actúa como represor induciendo *SiFTL4* y reprimiendo la expresión de *SiFTL1*. No se pudo conocer la función de *SiGI2*. La alta expresión de *SiFTL1/SiFT* y *SiCOL1a/SiCOL2* en la variedad de floración temprana K3 se debe principalmente a la alteración en el reloj biológico y no a una alteración en la respuesta a la luz.

**COMPARATIVE GENE EXPRESSION ANALYSIS OF THE
PHOTOPERIOD PATHWAY IN TWO VARIETIES OF SESAME (*Sesamum
indicum* L.) WITH EARLY AND LATE FLOWERING TIMES**

Author: MIGUEL JESÚS LÓPEZ RIVAS

Advisor: Dr. JULIO CÉSAR MASARU IEHISA OUCHI

Summary

Sesame (*Sesamum indicum* L.) is one of the most important crops in Paraguay because it generates income for small farmers. Shortening the flowering time could improve crop yields. Although there are varieties with early flowering time, the molecular mechanism that causes it is unknown. The *FLOWERING LOCUS T (FT)* gene induces flowering in plants, and is regulated by various pathways, being the photoperiod the main one. As a first step to elucidate the mechanism involved in the difference in flowering time, it was proposed to analyze the difference in the photoperiod pathway between sesame varieties with early (K3) and late (NEB) flowering times through gene expression analyses under two photoperiods (12/12 and 16/8 h). Among the four copies of *FT* genes present in sesame, the expression of *SiFTL1* (previously reported as *SiFT*) increased before the appearance of flower buds and presented a higher expression in the early flowering variety K3. Therefore, *SiFTL1* could be the main inducer of flowering. *SiFTL2* could also act as an inducer, since its expression increased during flower transition. The *SiFTL4* gene could be a floral repressor, since its expression decreased during the transition from vegetative to reproductive phase. *SiFTL3* is probably not involved in regulation of flowering. Expression of *SiCOL1a* (reported as *SiCOL2*) was also higher in the early flowering variety K3. However, expression level of the two copies of *GIGANTEA (GI)* were similar between the two varieties. *SiCOL1a/SiCOL2* probably acts in combination with *SiGI1* to induce *SiFTL1*. In contrast, *SiCOL1b* (reported as *SiCOL1*) acts as floral repressor by inducing *SiFTL4* and down-regulating *SiFTL1*. The function of *SiGI2* could not be determined. The higher expression of *SiFTL1/SiFT* and *SiCOL1a/SiCOL2* in the early-flowering variety K3 seems to be due to the alteration in the circadian clock and not to the alteration of light response.

ÍNDICE

1. Introducción	10
1.1. Características Generales.....	10
1.2. Producción en el Paraguay	12
1.3. Tiempo de Floración.....	15
1.4. Planta de Días Largos:.....	16
1.5. Plantas de Días Cortos:.....	21
2. Objetivos	32
2.1. Objetivo General	32
2.2. Objetivos Específicos	32
3. Materiales y Métodos.....	33
3.1. Comparación de las regiones genómicas que contienen los genes implicados en la floración entre las distintas especies	33
3.2. Medición del tiempo de floración.....	35
3.3. Análisis de expresión circadiana de los probables genes inductores de la floración	35
3.4. Análisis de expresión de los probables genes inductores de la floración en distintos estadios del desarrollo	37
3.5. Determinación del nivel de expresión de los genes componentes del reloj biológico	38
3.6. Análisis del efecto de la interrupción nocturna sobre el tiempo de floración en las dos variedades	38
4. Resultados	39
4.1. Comparación de las regiones genómicas que contienen a los probables genes inductores de la floración en sésamo y en otras especies de Astéridas	39
4.2. Tiempo de floración de las variedades en distintos fotoperiodos	49
4.3. Nivel de expresión circadiana de los genes inductores florales.....	50
4.4. Identificación de los probables genes inductores de la floración.....	52
4.5. Análisis de expresión de los genes componentes del reloj biológico	60
4.6. Efecto de la interrupción nocturna sobre el tiempo de floración en las dos variedades ...	64
5. Discusión	66

5.1.	Origen probable de las múltiples copias de los genes <i>FT</i> , <i>CO</i> y <i>GI</i> de sésamo.....	66
5.2.	<i>SiFTL1</i> es el principal inductor floral y <i>SiFTL4</i> es un probable represor floral	68
5.3.	<i>SiCOL1a/SiCOL2</i> es un probable inductor de la floración mientras que <i>SiCOL1b/SiCOL1</i> un represor	70
5.4.	Posibles roles de <i>SiG11</i> y <i>SiG12</i> en la regulación de la floración	73
5.5.	Alteración en el reloj biológico podría estar asociada a la diferencia en el tiempo de floración en sésamo.....	75
5.6.	La vía de la luz no está implicada en la diferencia en el tiempo de floración de las dos variedades analizadas	77
6.	Conclusión	78
7.	Referencias Bibliográficas	79

1. Introducción

1.1. Características Generales

El sésamo (*Sesamum indicum* L.) o ajonjolí es una planta herbácea dicotiledónea de la familia Pedaliaceae, del orden Lamiales. Presenta flores gamopétalas, de cáliz pequeño y cinco sépalos, solitaria y pedicelo corto. Las corolas de color blanco o rosáceo, campanuladas con cinco lóbulos. Las hojas en la parte inferior del tallo son decusadas con un tamaño es de 3 a 17 cm de largo, por 1 a 5 cm de ancho, de forma lobulada en la base y lanceolada en la parte apical. El tallo es erecto, cilíndrico y cuadrangular de color verde-amarillo. Las plantas pueden ser muy ramificadas (hasta 26 tallos) o no ramificadas dependiendo de la variedad. Presentan una cápsula de 2 a 5 cm de largo como fruto, formada generalmente por dos carpelos divididos en dos para formar cuatro celdas, es pubescente y dehiscente dependiendo de la variedad con 15 a 25 semillas cada una. Las semillas son aplanadas, miden 2 a 4 mm de longitud y 1 a 2 mm de ancho (Bedigian, 2004; Morris, 2009; Penner, 2009) (Figura 1). Existen distintos tipos y variedades de la planta que pueden ser clasificadas según su ciclo, altura, ramificaciones y color de las semillas.

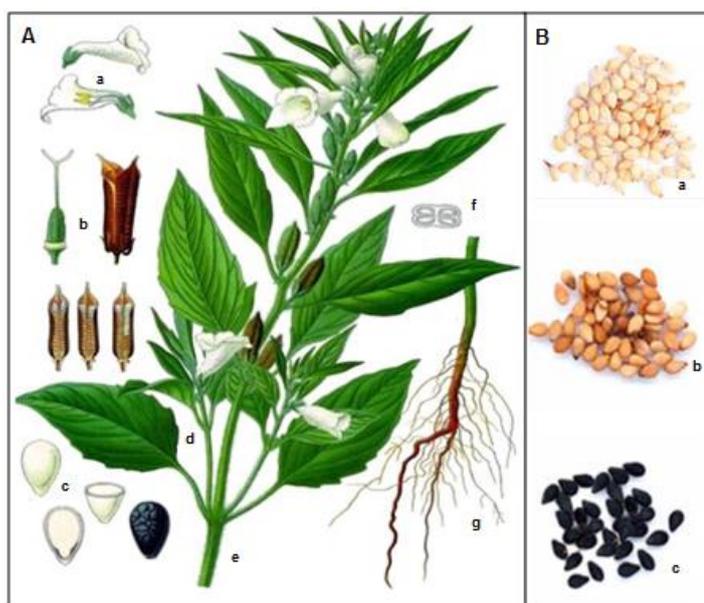


Figura 1. Descripción botánica del sésamo. A) Planta de sésamo y sus partes: a. flores; b. cápsula; c. semilla; d. hoja; e. tallo; f. corte transversal de la cápsula; g. raíz (Bedigian, 2010). B) Semillas de sésamo: a. semillas de color blanco; b. semillas de color dorado; c. semillas de color negro (Penner, 2009).

Según el ciclo se dividen en tres: de ciclos cortos o precoces (alcanzan la madurez fisiológica a los 80 días), intermedias (90 y 100 días) y las de ciclos largos (más de 110 días). Según la altura: existen las plantas de tipo normal (1,5 m) y las gigantes (en torno a los 2 m). Según las ramificaciones se distinguen: variedades de tallo único y ramificado. Según el color de las semillas: existen en tonos blancos, blancos crema, rojizos y negros (Penner, 2009).

Al sésamo se lo describe como la planta más vieja usada como semilla oleaginosa, así también es llamada la “Reina de las semillas oleaginosas”, por su resistencia a la oxidación y rancidez ya que posee una gran cantidad de aceites (entre 45 a 60%), a su vez contiene proteínas, vitaminas, minerales y dispone de antioxidantes tales como sesamolina, sesamina y sesamol. Se le confiere propiedades como la capacidad de disminuir el nivel de lípidos y colesterol en sangre, así como de antihipertensivo y antiinflamatorio. (Bedigian, 2004; Chen et al., 2005; Hirata et al., 1996; Niti Pathak, Rai, Kumari, Thapa, & Bhat, 2014).

En cuanto a la historia evolutiva del sésamo, se ha intentado elucidar mediante análisis filogenéticos (Yu et al., 2017). En donde se estima que dentro del linaje eudicotiledóneas, previa separación de los linajes Astéridas y Rósidas, ocurrió un evento de triplicación del genoma completo aproximadamente 130 millones de años atrás llamado evento gamma (γ) (Wolfe, 2001) (Figura 2). Basado en las relaciones evolutivas entre las especies de plantas en el clado Astéridas, se ha considerado que el genoma del sésamo divergió del linaje de *Solanum* aproximadamente 125 millones de años atrás, y de *Utricularia gibba* hace 98 millones de años atrás aproximadamente (L. Wang et al., 2014). Se estima también que el último evento de duplicación del genoma completo en el sésamo fue hace aproximadamente 71 millones de años atrás, posiblemente en paralelo con el evento de triplicación completa del genoma dentro del linaje *Solanum* (L. Wang et al., 2014). Además de la publicación del genoma del sésamo se han reportado la secuenciación de otras especies del clado Astéridas como *Olea Oeuropea* (olivo) (Unver et al., 2017) y *Mimulus guttatus* (flor de mono) (Hellsten et al., 2013), los cuales también han experimentado eventos de duplicación, triplicación del número de cromosomas dentro de su genoma (Fishman, Willis, Wu, & Lee, 2014).

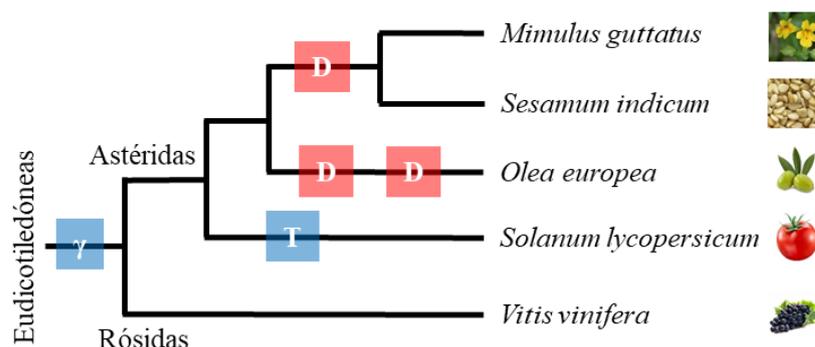


Figura 2. Eventos de duplicación y triplicación dentro del linaje de Astéridas. Los cuadros rojos representan eventos de duplicación del genoma, los cuadros azules indican eventos de triplicación del genoma.

Si bien el origen exacto del cultivo de sésamo es incierto, debido a la escasa evidencia del mismo en los sitios arqueológicos. Se presume que su cultivo se remonta entre los 3.000 y 2.500 a.C. en el valle de Harappa del subcontinente indio. En el siglo XVI llegó al continente americano, específicamente en Brasil, gracias a los navegantes portugueses. Posteriormente un siglo después, fue sembrado en Carolina del Sur de los Estados Unidos, por esclavos que lo habían traído de África (Bedigian, 2003, 2010a; Zech-Matterne, Tengberg, & Van Andringa, 2015).

En el Paraguay, es introducido por Moisés Bertoni a mediados del siglo XIX, pero en la década de 1.990 empieza a cultivarse especialmente en la Región Oriental de manera comercial (Penner, 2009).

1.2. Producción en el Paraguay

En Paraguay, la mayoría de las fincas pertenecen a los pequeños productores, donde más del 80% del total de las mismas poseen una superficie menor a 20 hectáreas (MAG/DGEEC, 2009). El sésamo en nuestro país es cultivado principalmente en fincas pequeñas de hasta 5 ha (Penner, 2009) (Figura 3). Se estima que unos 36.000 pequeños productores se dedican al cultivo demostrando la influencia que tiene sobre la economía familiar campesina, siendo así el sésamo, uno de los más importantes rubros generadores de ingresos para los productores de estas fincas pequeñas. Las principales zonas de producción se encuentran en la Región Oriental, específicamente en los departamentos de San Pedro y Concepción, que son los que registran una mayor superficie destinadas al cultivo (Vázquez, Delgado, Dubini, & Caballero, 2013) (Figura 4).

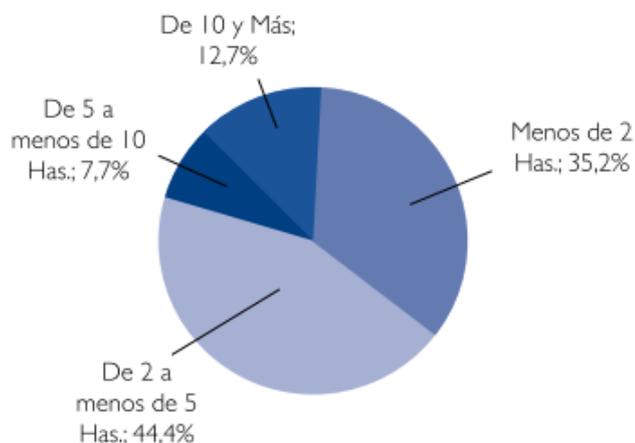


Figura 3. Distribución del cultivo de sésamo según tamaño de fincas. Datos del año 2008

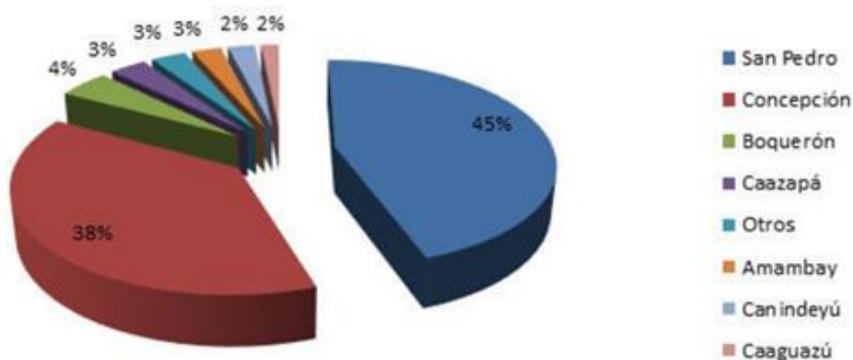


Figura 4. Porcentaje de cultivo de sésamo por departamento. Periodo 2014/2015

La producción de sésamo a nivel mundial alcanzó las 6000000 toneladas en el año 2018 y existen perspectivas de aumento. Paraguay es el cuarto mayor productor de sésamo en el continente americano, se encuentra luego de México, Guatemala y Venezuela, (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020). En el Paraguay se produjo en 18000 toneladas también en el año 2018. Sin embargo, cabe mencionar que el año 2.009 se alcanzó 65000 toneladas y un área de cultivo de 100000 ha. De hecho, entre los años 2005 y 2007 el Paraguay se posicionó como el sexto mayor exportador de sésamo en el mundo (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020), debido a la alta calidad de sus semillas, teniendo como principal destino de nuestras exportaciones el exigente mercado japonés. Siendo el continente asiático el principal consumidor del sésamo a nivel mundial seguido por África (CAPEXSE, 2019).

El Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semilla (SENAVE) registra las siguientes variedades: ALQ01, Nueva Escoba Blanca, Dorado, Negro, Escoba, F-06, INIA 1, IPTA-KO-7 CHORE PORA, Kemagro 2, Mbareté, SH1 y La Hermosa (SENAVE, 2020). La mayor parte de la superficie sembrada en nuestro país corresponde a la variedad Escoba, que es la preferida por los mercados compradores debido, sobre todo, al sabor de sus granos (González Espínola & Oviedo de Cristaldo, 2011).

La época de siembra influye en el rendimiento del cultivo, siendo la primera quincena de octubre la mejor época para la siembra de las variedades de ciclos largos (sensibles al fotoperiodo, requieren periodos largos de insolación) como Escoba y Mbareté, sin embargo, también existen variedades de ciclos cortos (insensibles al fotoperiodo) como la variedad coreana K3 o Kemagro 2 donde se considera mejor sembrarlas en épocas más tardías (Ayala Aguilera et al., 2010).

No obstante, el sésamo requiere una temperatura alta y constante, la planta es extremadamente delicada en cada estado de su crecimiento al estancamiento de agua, así también los vientos fuertes la perjudican porque le ocasionan el acame. Pudiendo ser atacadas por enfermedades virósicas, *Fusarium spp.*, *Macrophomina phaseolina* y bacteriosis (Penner, 2009). Un factor predominante para la obtención de un mejor rendimiento en los cultivos es el tiempo de floración. Ya que acortando los tiempos de floración evita la exposición a condiciones ambientales desfavorables al desarrollo, el periodo de cosecha de las semillas y la exposición a patógenos (Blümel, Dally, & Jung, 2015; Poland, Balint-Kurti, Wisser, Pratt, & Nelson, 2009). Aunque existe una variación en el tiempo de floración entre las variedades de sésamo, no se conoce el mecanismo genético de dicha variación. Por lo tanto, es importante identificar a los genes implicados en la diferencia en el tiempo de floración para utilizarlos como marcadores moleculares en la selección y obtención de nuevas variedades con tiempo de floración ideal para cada zona de cultivo.

1.3. Tiempo de Floración

La transición floral es un evento de desarrollo importante en el ciclo de vida de las plantas, en donde se producen cambios fisiológicos que establecen el paso de una etapa de desarrollo vegetativo (producción de tallo y hojas) a la etapa reproductiva (producción de flores y frutos) (M. Doyle, Sung, & Amasino, 2002). Las plantas en desarrollo primero pasan por una fase juvenil en la que se reprime la floración y se produce tejido fotosintético para ayudar a satisfacer las altas demandas energéticas de la reproducción. La duración de esta fase es específica para cada especie, pero puede diferir entre variedades. Una vez completada la fase juvenil, muchas plantas requieren adicionalmente señales ambientales para desencadenar la floración de manera a maximizar el éxito reproductivo y garantizar una producción de semilla suficiente para su diseminación. El tiempo de floración debe estar estrictamente regulado mediante la integración de factores ambientales (fotoperiodo, temperatura, calidad de la luz, disponibilidad de agua y nutrientes) con señales endógenas (edad, etapa de desarrollo) (Shrestha, Gómez-Ariza, Brambilla, & Fornara, 2014).

El tiempo de floración posee una respuesta a la duración relativa del día y la noche que se conoce como fotoperiodo (Thomas & D., 1997). El fotoperiodo se debe a la existencia de fluctuaciones estacionales que dependen de la latitud, es decir debido a la rotación de la tierra sobre su eje y su rotación alrededor del sol, ya que el grado de cambio de la duración del día aumenta a medida que uno se aleja del ecuador hacia los polos, este fotoperiodo se correlaciona con el cambio estacional y puede servir como indicador del mismo (Shim & Imaizumi, 2015). Dependiendo de sus requerimientos para la duración del día, las plantas se pueden clasificar en tres categorías: Plantas de días largos (DL), que florecen cuando la duración del día es mayor al de un umbral crítico (normalmente en verano); plantas de días cortos (DC) que florecen cuando la duración del día es menor al umbral crítico (normalmente en otoño); y las plantas de día neutro, que florecen independientemente de la duración del día (Tsuji, Taoka, & Shimamoto, 2011).

1.4. Planta de Días Largos:

1.4.1. *Arabidopsis thaliana*

- **Vía del fotoperiodo**

Se han sugerido varios modelos para explicar cómo las plantas logran reconocer la duración del día y la noche. Sin embargo, el modelo más aceptado es el de “coincidencia externa”, el cual es el resultado de la interacción entre el ritmo interno de la planta con las señales luminosas de su entorno, cuando ambas señales se solapan durante el día, se logra inducir la floración (Bünning, 1960; Pittendrigh, 1966). La forma en que funciona el modelo de coincidencia externa se ha dilucidado con mayor claridad en la planta modelo dicotiledónea de DL, *Arabidopsis thaliana*, una de las especies más investigadas con la que se han realizado estudios de caracterización de genes a través de análisis de mutantes, secuenciación y análisis complementarios, identificándose genes asociados a la floración.

En este modelo, la inducción floral ocurre solamente cuando la expresión del gen *CONSTANS (CO)*, que actúa como una señal interna, coincide con la señal externa que es la luz (Yanovsky & Kay, 2002). La expresión circadiana de *CO* está regulada por el reloj biológico y el fotoperiodo, y presenta el nivel máximo de expresión a las 16 h aproximadamente luego del inicio del estímulo de luz (Suárez et al., 2001). Sin embargo, la proteína *CO* se degrada en la oscuridad (Laubinger et al., 2006), por lo que su función solo se puede realizar si ésta se expresa antes del anoecer. En condiciones de DL, se logra coincidir el pico de expresión de *CO* con la presencia de luz al final del día. Por lo tanto, *CO* actúa como integrador de respuestas del reloj biológico y la señalización dependiente de la luz (Y. H. Song, Shim, Kinmonth-Schultz, & Imaizumi, 2015).

La proteína *CO* presenta dos dominios conservados: la caja B (similares a dedos de zinc) y el dominio CCT (presentes en *CO*, *CO-LIKE*, *TIMING OF CAB1* [TOC1]) (Robson et al., 2001). Mediante estos dominios *CO* interactúa con otras proteínas para unirse a elementos CCAAT que se encuentran en el promotor del gen *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Ben-Naim et al., 2006; Kumimoto et al., 2008; Y. H. Song, Lee, Lee, Imaizumi, & Hong, 2012). *FT*, considerado el florígeno, codifica a una molécula de señalización sistémica. El ARNm se sintetiza en las hojas (An et al., 2004; Takada & Goto, 2003), y la proteína *FT* sintetizada en las hojas migra a través

del floema hacia el meristemo apical de la planta (Corbesier et al., 2007; Kardailsky et al., 1999; Yasushi Kobayashi, Hidetaka Kaya, Koji Goto, Masaki Iwabuchi, Araki, 1999), donde interactúa con el factor de transcripción de tipo cremallera de leucina (bZIP) denominado *FLOWERING LOCUS D (FD)* formando un complejo que activa la transcripción de genes que promueven la floración (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005).

- **Regulación transcripcional de *CO***

Para una correcta inducción de la floración, es necesaria tanto la regulación circadiana de la transcripción de *CO*, así como la estabilización de la proteína mediante fotorreceptores (Y. H. Song et al., 2015).

La regulación transcripcional de *CO* depende del reloj biológico para establecer el ritmo de su oscilación. La represión de la expresión de *CO* durante la mañana está regulada por una familia de factores de transcripción con dominio Dof (DNA-binding with one finger) llamados *CYCLING DOF FACTOR (CDF)* (Imaizumi, Schultz, Harmon, Ho, & Kay, 2005; Y. H. Song, Ito, & Imaizumi, 2013) (Figura 5). La liberación de CDFs del promotor de *CO* ocurre por las tardes debido a la acción de un complejo inducido por la presencia de luz azul compuesto por las proteínas *GIGANTEA (GI)* (David, Armbruster, Tama, & Putterill, 2006) y *FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1)*. Éste último es una ubiquitina ligasa sensible a la luz azul para su activación (Sawa, Nusinow, Kay, & Imaizumi, 2007). Tanto la expresión de *GI* como la de *FKF1* están reguladas por el reloj biológico (Fowler et al., 1999; Imaizumi, Tran, Swartz, Briggs, & Kay, 2003; Y. H. Song et al., 2012). Los niveles de expresión de *FKF1* y *GI* coinciden bajo condiciones de DL, pero no en días cortos (Sawa et al., 2007). Por lo tanto, en DL el complejo GI-FKF1 dirige a las proteínas CDF para la degradación proteosómica mediada por su ubiquitinización (Imaizumi et al., 2005), obteniéndose así la expresión elevada de *CO* en estas condiciones.

- **Regulación postraduccional de CO**

La regulación postraduccional de CO es realizada principalmente por un complejo de proteínas que ubiquitinizan a CO para su degradación en el proteosoma durante la fase oscura (Jang et al., 2008; C. Lin & Shalitin, 2003; L. J. Liu et al., 2008; Saijo et al., 2003). Esta regulación nocturna es importante para prevenir la floración bajo condiciones de DC. Así también, durante las mañanas, otra proteína ubiquitina ligasa (E3) se une al motivo CCT de CO para degradarlo (Lazaro, Valverde, Piñeiro, & Jarillo, 2012) (Figura 5).

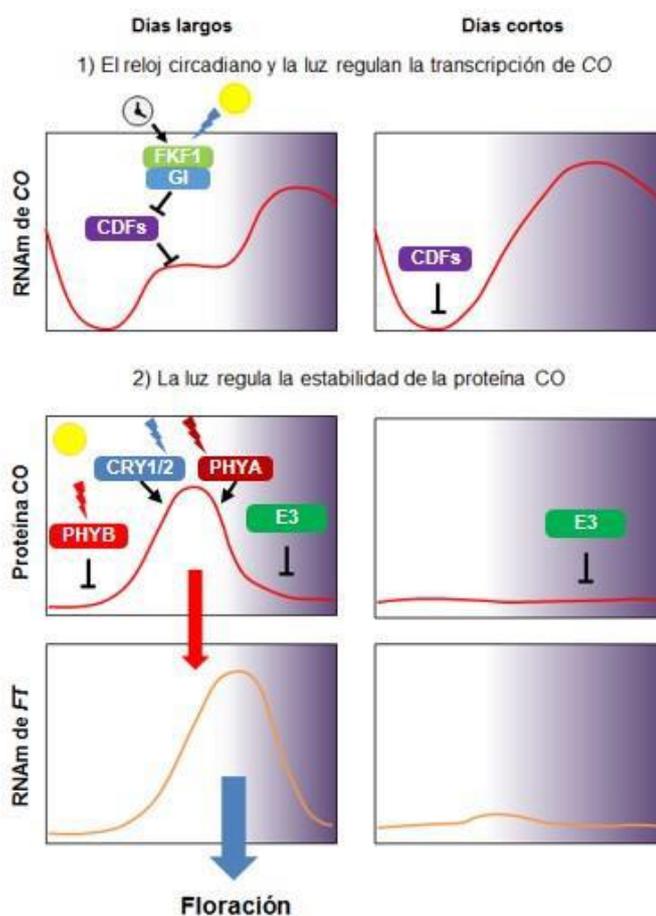


Figura 5. Regulación de la expresión de CO y FT en días largos y cortos en *A. thaliana*. La expresión de CO está regulada por el reloj biológico y la señal luminosa. 1) La proteína GI presenta una expresión rítmica la cual coincide bajo fotoperiodos de DL con la presencia del fotorreceptor FKF1, la formación del complejo GI-FKF1 degrada a una familia de represores CDFs permitiendo que CO se exprese antes del atardecer. Sin la intervención del complejo, CO solo se expresa durante la noche. 2) La proteína CO es estabilizada por la luz (azul y roja lejana) a través de la acción de CRYA1/2 y PHYA mientras que PHYB lo desestabiliza en presencia de luz roja al igual que durante la fase oscura, mediada por un complejo de Ubiquitinas Ligasas E3 que degrada a CO. La combinación de la regulación transcripcional y postraduccional permite que CO induzca la expresión de FT y por lo tanto promueva la floración solo en DL.

Existen dos fotorreceptores de luz roja/roja lejana, el fitocromo A (PHYA) y el PHYB que regulan de manera contrapuesta la estabilidad de la proteína CO (Valverde et al., 2004). PHYB degrada a CO por las mañanas en presencia de luz roja (600 a 700 nm). Por otro lado, la luz roja lejana (700 a 800 nm) y azul (400 a 500 nm) permiten la acumulación de CO en las últimas horas de la tarde en DL, lo que desencadena en la expresión de *FT* al anochecer. PHYA estabiliza a CO en presencia de la luz roja lejana específicamente al atardecer (Valverde et al., 2004). También están presentes dos fotorreceptores de luz azul denominados criptocromos 1 (CRY1) y CRY2, que se fosforilan en presencia de luz azul y una vez activados participan en la estabilidad de la proteína CO mediante la interrupción de la formación del complejo proteico encargado de degradar a CO (Lian et al., 2011; Bin Liu, Zuo, Liu, Liu, & Lin, 2011; Zuo, Liu, Liu, Liu, & Lin, 2011). Si bien, CRY1 y CRY2 se expresan constitutivamente a lo largo del día, la presencia de la luz azul al atardecer permite que actúen como represores de la degradación de CO en DL. Estos mecanismos de regulación transcripcional y postraducciona aseguran que CO active la expresión de *FT* solamente durante días largos.

- **Reloj biológico en *Arabidopsis***

Como ya se ha mencionado, varios de los genes implicados en la floración fotoperiódica de las plantas presentan una expresión circadiana. Por lo tanto, el reloj biológico constituye una parte importante de esta vía de inducción floral. El reloj biológico en *Arabidopsis* se encuentra compuesto principalmente por tres bucles de retroalimentación negativa interconectados que contienen genes que son expresados en distintos momentos a lo largo del día: el bucle central, el bucle de la mañana y el bucle de la noche (Shim & Imaizumi, 2015) (Figura 6).

El bucle central consta, por un lado, de dos factores de transcripción del tipo MYB estrechamente relacionados: *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* y *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* (Schaffer et al., 1998; Z. Y. Wang & Tobin, 1998); y por otro lado de *TOC1* (o *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 1 [PRR1]*). Los patrones de expresión de *CCA1/LHY* y *TOC1* son opuestos, es decir, *CCA1/LHY* presenta un nivel máximo de expresión al amanecer mientras que *TOC1* al anochecer. Esto se debe a que *CCA1/LHY* actúa como represor de *TOC1* (Alabadí et al., 2001), y ésta a su vez como represor de *CCA1/LHY* (Gendron et al., 2012). El

resto de los componentes del reloj biológico (como parte del bucle de la mañana o de noche) son necesarios para mantener la expresión circadiana de *CCA1/LHY* y *TOC1*.

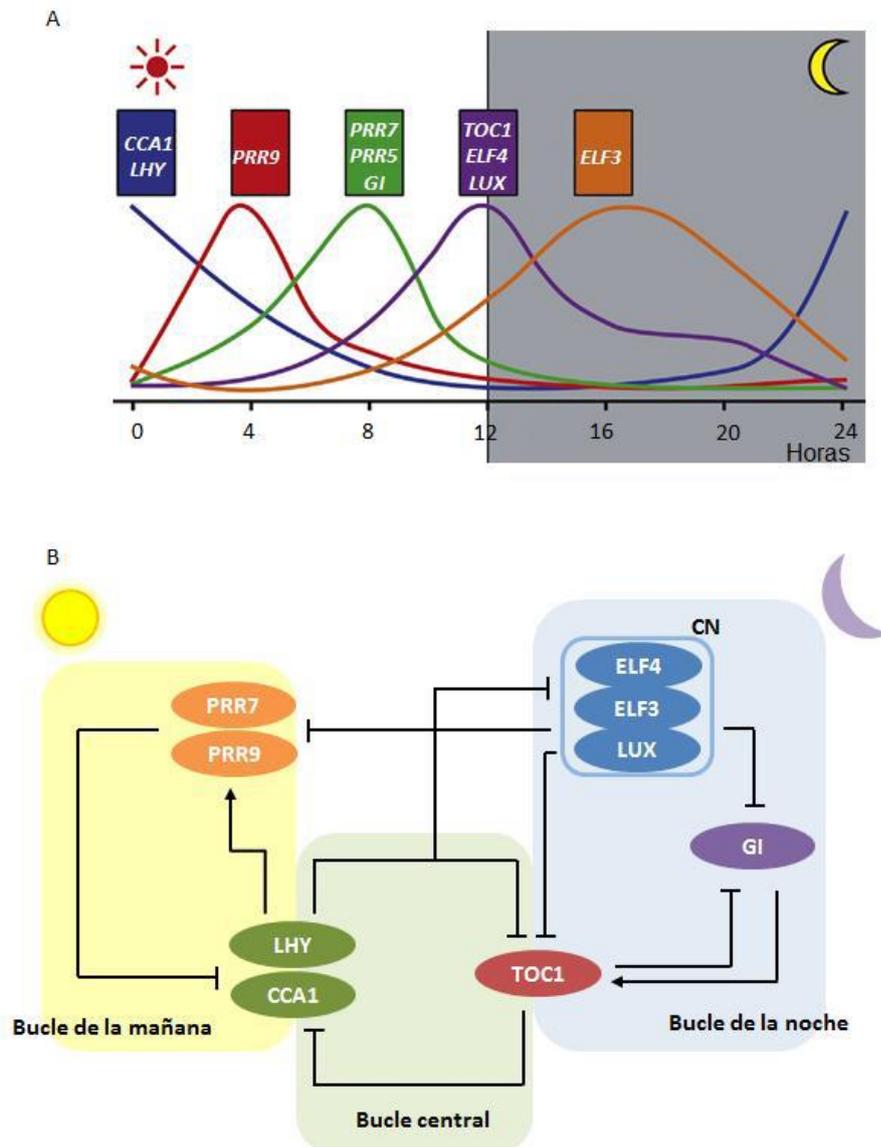


Figura 6. Red de regulación de los genes componentes del reloj biológico en *A. thaliana*. A) Perfiles de expresión diaria de los genes componentes del reloj biológico. Los niveles de expresión se trazan a intervalos de 4 h a lo largo del día, considerando como 0 h el amanecer (fondo blanco) y las 12 h como el atardecer (fondo gris). B) Representación de los tres bucles de retroalimentación y sus interacciones. El bucle del mañana constituido por PRR7/9 y LHY/CCA1 (fondo amarillo); el bucle central, LHY/CCA1 y TOC1 (fondo gris) y el bucle de la noche integrado por TOC1, GI y el complejo nocturno (CN) formado por ELF4/3 y LUX. La inducción de la expresión de un gen está representada como una línea con terminación en una flecha, mientras que la represión de la expresión se indica como una línea con terminación en una barra.

El bucle de la mañana conecta los componentes del reloj, tanto los que se expresan a las mañanas con los de la tarde, en donde *CCA1/LHY* induce principalmente la expresión de *PRR9* y *PRR7* (Farre, Harmer, Harmon, Yanovsky, & Kay, 2005; Nakamichi et al., 2007). Si bien los picos de expresión de *PRR9* y *PRR7* son diferentes durante la mañana, ambos codifican factores de transcripción que se unen en los promotores de *CCA1* y *LHY* reprimiendo su expresión (Nakamichi et al., 2010), por lo que la cantidad de *CCA1/LHY* va disminuyendo hacia la tarde. Debido a que *CCA1/LHY* reprimen a los genes que se expresan durante la tarde (como *PRR5* y *GI*) (K. Lee et al., 2005) y los de la noche (como *TOC1*, *LUX ARRHYTHMO* [*LUX*], *EARLY FLOWERING 4* [*ELF4*]) (M. R. Doyle et al., 2002; Hazen et al., 2005), su disminución hacia la tarde permite que se expresen estos genes reprimidos.

Por otro lado, durante la noche, *TOC1* actúa como represor de *PRR9*, *PRR7*, *LUX*, *ELF4* y a sí mismo (Huang et al., 2012). Tanto *ELF4* como *LUX* son capaces de formar un complejo nocturno (CN) gracias a la interacción de una proteína adaptadora, *ELF3* (Herrero et al., 2012). Este complejo nocturno se une al promotor de *PRR9* suprimiendo su expresión, permitiendo que se induzca *CCA1* y *LHY* hacia el amanecer (Chow, Helfer, Nusinow, & Kay, 2012; Herrero et al., 2012). Además, en el bucle de la noche ocurre la represión de *GI* (Huang et al., 2012), que junto con la represión de ésta por la mañana debido a *CCA1* y *LHY*, *GI* presenta una expresión circadiana con un nivel máximo antes del anochecer, el cual coincide con la expresión y activación de *FKF1* bajo condiciones de DL modulando la expresión rítmica de *CO*. De esta manera se integran la vía de señalización dependiente de la luz con el reloj biológico.

1.5. Plantas de Días Cortos:

1.5.1. Arroz (*Oryza sativa* L.)

- **La vía del fotoperiodo**

Otra planta modelo utilizada para la elucidación de mecanismos moleculares de control del tiempo de floración es el arroz, una planta monocotiledónea. A diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis*, en el arroz la respuesta fotoperiódica es opuesta, es decir, bajo condiciones de días largos se retrasa la floración aproximadamente 30 días, y bajo condiciones de días cortos se acorta el tiempo de floración (Hayama, Yokoi, Tamaki, & Yano, 2003). Otra característica de las plantas de días cortos es

que miden la duración de la noche y no de la duración de las horas de luz como las plantas de días largos, por lo que se puede retrasar el tiempo de floración mediante la aplicación un pulso de luz en el medio de la noche (interrupción nocturna).

La vía *GI-CO-FT* que se encuentra en *Arabidopsis* presenta su contrapartida en el arroz compuesto por *OsGI* (*Oryza sativa* - *GIGANTEA*), *HEADING DATE 1* (*Hd1*) y *HEADING DATE 3a* (*Hd3a*), respectivamente (Hayama et al., 2003; Izawa et al., 2002; Yano et al., 2000). En el genoma del arroz se encuentran varios genes parálogos (genes que se originaron mediante la duplicación dentro del genoma) de *FT*: además de *Hd3a*, *RICE FLOWERING LOCUS T 1* (*RFT1*) y *FT-LIKE 1* (*FTL1*) son capaces de promover la floración cuando se encuentran altamente expresados al amanecer en condiciones de DC, a diferencia de lo que ocurre con el gen *FT* de *Arabidopsis* que se encuentra altamente expresado a la media noche bajo fotoperiodos inductivos (Izawa et al., 2002; Kojima et al., 2002; Matsubara et al., 2012).

El gen *Hd1* se identificó inicialmente como un locus cuantitativo de respuesta al fotoperiodo, altamente homólogo a *CO* (Yano et al., 2000), lo cual supondría que funciona como un factor de transcripción. Sin embargo, no existe una evidencia de que tenga una interacción directa con el promotor de *Hd3a*. A diferencia de *CO*, *Hd1* promueve la floración en DC y la reprime en DL (Izawa et al., 2002; Yano et al., 2000) (Figura 7). Los niveles de ARNm de *Hd1* alcanzan su máxima expresión a la media noche (así como ocurre en *Arabidopsis*), y los niveles de *Hd3a* presentan un máximo aproximadamente 6 a 8 h después del pico de expresión de *Hd1*, es decir, hacia la mañana (Hayama et al., 2003; Ishikawa et al., 2005; X. Lin, Yamamoto, Sasaki, & Yano, 2000). En condiciones de DL, la presencia de la luz en el momento de la expresión de *Hd1* hace que la proteína actúe como represor de *Hd3a* ya sea modificando directamente la actividad de *Hd1* o alguna otra proteína que interactúa con *Hd1* (Ishikawa et al., 2011). Con respecto a la vía *GI-FKF1-CDFs* que regula la expresión de *CO*, en arroz, las proteínas *OsGI* y *OsFKF1* pueden interactuar entre sí y con una proteína CDF, denominada *OsDOF12*, de manera similar a sus homólogos de *Arabidopsis* (Han, Yoo, Lee, An, & Paek, 2015; D. Li et al., 2009). La sobreexpresión de *OsDOF12* aumenta la transcripción de *Hd3a* en DL (D. Li et al., 2009). Se evidenció además que *OsGI* actúa como inductor de *Hd1* sin importar la

duración del día (Hayama et al., 2003). Sin embargo, con *OsFKF1* y *OsDOF12* los niveles de *Hd1* no sufrieron alteraciones, por lo que la acción de ambos genes en la floración es diferente a la que presenta sus homólogos en *Arabidopsis* (Han et al., 2015; D. Li et al., 2009). En cuanto al patrón de expresión rítmica de *OsGI* y *OsFKF1* fueron similares a *Arabidopsis* con un pico antes del anochecer (Hayama et al., 2003; Murakami, Tago, Yamashino, & Mizuno, 2007). Debido a que *Hd1* se expresa a la media noche, se ha sugerido que la regulación de éste es debida a otro mecanismo distinto al de *Arabidopsis*. Además, la función de *OsDOF12* aparentemente es opuesta a los CDFs de *Arabidopsis*, promoviendo la floración.

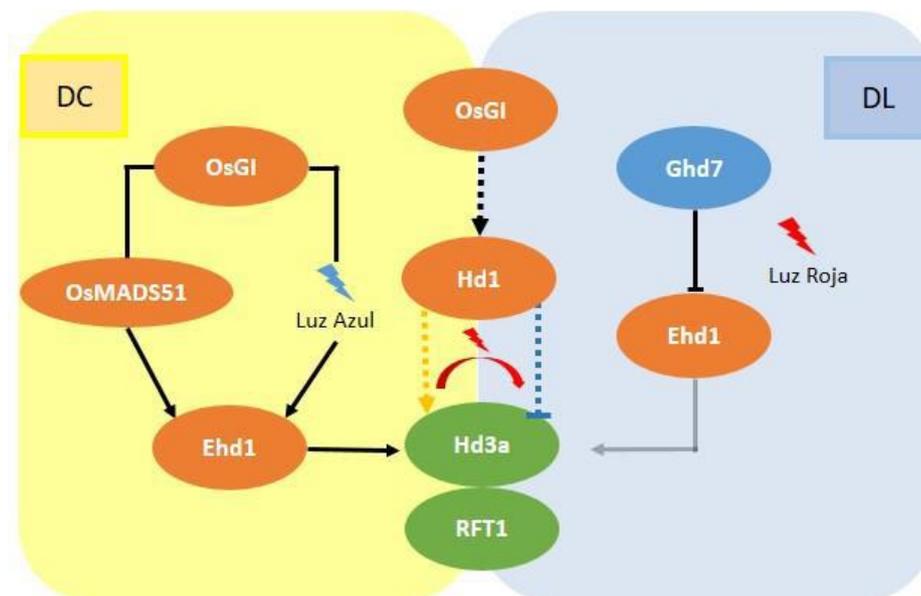


Figura 7. Red molecular de regulación de *Hd3a/RFT1* en el arroz. En condiciones de DC, la proteína *OsGI* activa la expresión de *Ehd1* de dos maneras, primero a través del factor de transcripción *OsMADS51* y otra dependiente de la señal luminosa (luz azul), y *Ehd1* induce la expresión de los florígenos *Hd3a* y *RFT1*. *OsGI* induce la expresión de *Hd1* independientemente de la duración del día mediante un mecanismo aún no dilucidado, mientras que *Hd1* bajo DC induce la expresión de *Hd3a*, pero bajo DL lo reprime. Así también, bajo DL, la presencia de la luz roja y de la proteína *Ghd7* reprimen la expresión de *Ehd1* de manera que no puede inducir la expresión de los florígenos. Círculos naranjas: inductores de la floración; azules: represores de la floración; verdes: florígenos. La inducción de la expresión de un gen está representada como una línea continua con terminación en una flecha, mientras que la represión de la expresión se indica como una línea continua con terminación en una barra, la línea en puntos indica que aún no se sabe el mecanismo de dicha regulación. Condiciones de días cortos: panel izquierdo; días largos (panel derecho).

En el caso particular de *OsGI* y *OsFKF1*, se observó también que son capaces de regular otros genes específicos que modulan el tiempo de floración que no presentan ortólogos en *Arabidopsis* (Han et al., 2015; L. K. Song, Lee, Hyo, Hong, & An, 2007). La floración en el arroz no requiere únicamente de la vía de señalización *OsGI-Hd1-Hd3a*. Otra forma de inducir a los florígenos es a través del gen *EARLY HEADING DATE 1 (Ehd1)*, que codifica un regulador de respuesta del tipo B capaz de unirse al ADN; que no presenta homólogo en *Arabidopsis* y aparentemente solo se encuentra en arroz (Doi et al., 2004). *Ehd1* promueve la floración bajo fotoperiodos de DC y DL al activar la transcripción de *Hd3a* y *RFT1*, a diferencia de *Hd1* que induce la floración solo en DC y no en condiciones de DL, donde actúa como represor (Doi et al., 2004). *Ehd1* presenta dos picos de expresión, antes y después de amanecer (Doi et al., 2004). *OsGI* es capaz de activar la expresión de *Ehd1* de dos maneras: primero, a través de la expresión de un factor de transcripción denominado *OsMADS51*, que promueve la expresión de *Ehd1* solo en condiciones de DC (L. K. Song et al., 2007) y otra dependiente de la señalización de la luz azul y *OsGI* que activa la expresión de *Ehd1* al amanecer (Itoh, Nonoue, Yano, & Izawa, 2010). La expresión de *Ehd1* se encuentra doblemente regulada por *OsGI*, que es importante para formar una respuesta en función a la duración del día.

Los represores de *Ehd1* son también necesarios para el control del fotoperiodo, entre los cuales se destaca *GRAIN NUMBER, PLANT HEIGHT, AND HEADING DATE 7 (Ghd7)* que codifica una proteína con dominio CCT y se expresa en condiciones de DL (Matsubara et al., 2012). Bajo DL, la expresión de *Ghd7* es alta por las mañanas y es suficiente para reprimir la transcripción de *Ehd1* y retrasar la floración. Pero a medida que aumenta el periodo de oscuridad, *Ghd7* disminuye su expresión por las mañanas impidiendo que reprima a *Ehd1* (Itoh et al., 2010). La expresión de *Ghd7* también se reduce en plantas que tuvieron un pulso de luz a la media noche (denominado interrupción nocturna) que convierten a los fitocromos a su forma inactiva (Ishikawa et al., 2005; Osugi, Itoh, Ikeda-Kawakatsu, Takano, & Izawa, 2011). De esta manera el modelo de coincidencia externa podría aplicarse al arroz: las expresiones de *Hd1* y *Ehd1* reguladas por el reloj biológico y la señal de luz externa mediada por los fitocromos generan la respuesta específica a la duración del día (Tsuji, Tamaki, Komiyama, & Shimamoto, 2008).

1.5.2. Soja (*Glycine max* L. Merr.)

- **La vía del fotoperiodo en Soja**

La soja es una planta dicotiledónea de floración temprana en DC al igual que el arroz, pero filogenéticamente no se encuentran relacionados. Siguiendo como modelo de regulación de la floración la vía de *GI-CO-FT* de *Arabidopsis*, se identificaron en el genoma de la soja 10 genes homólogos a *FT* de *Arabidopsis* que se agruparon en cinco pares en distintas regiones cromosómicas. De todos los candidatos, dos de ellos presentaron respuestas fotoperiódicas, denominados *GmFT5a* (*Glycine max* FT 5a) y *GmFT2a*; ambos presentaron patrones de expresión diurnos, aproximadamente 4 h luego del inicio de la fase luminosa similar al de arroz (Kong et al., 2010). Bajo fotoperiodos de DL presentan una expresión baja y por lo tanto una floración tardía. Mediante la expresión heteróloga de estos genes en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, se corroboró que ambos lograron reducir el tiempo de floración (Kong et al., 2010) (Figura 8).

Posteriormente se identificaron a *GmFT4* y *GmFT1a* que presentaban una alta expresión bajo DL mostrando un ritmo diurno de expresión; no así en DC (W. Liu et al., 2018; Zhai et al., 2014). La sobreexpresión de *GmFT1a* o *GmFT4* retrasaron la floración en plantas transgénicas de soja y *Arabidopsis* respectivamente (W. Liu et al., 2018; Zhai et al., 2014). El equilibrio de estos dos factores determina el tiempo de floración en la soja (*GmFT1a/4* vs *GmFT2a/5a*).

Así también, se encontraron 26 homólogos de *CO* (*GmCOL*) en el genoma de la soja, de los cuales dos pares homólogos *GmCOL1a/GmCOL1b* y *GmCOL2a/GmCOL2b*, mostraron la mayor similitud de secuencia con respecto al de *Arabidopsis*. La abundancia de ARNm de *GmCOL1a* y *GmCOL1b* fue mayor en DC y se alcanzó un pico al amanecer (no como sus homólogos de arroz y *Arabidopsis*) con un aumento en la expresión de *GmFT5a*. En contraste, la abundancia de ARNm de *GmCOL2a* y *GmCOL2b* fue significativamente menor (Wu et al., 2014). Aunque la sobreexpresión de estos genes en *Arabidopsis* pudo suplir la función de CO (Wu et al., 2014), cuando fueron sobreexpresados en soja retrasaron la floración en DL, reprimiendo la expresión de *GmFT5a* y *GmFT2a* y promoviendo la expresión de *GmFT4*, conduciendo a una floración tardía en condiciones de DL (D. Cao et al.,

2015; Wu et al., 2019). Hecho que se asemeja más a la regulación bifuncional mediada por *Hd1* del arroz dependiendo de la duración del día.

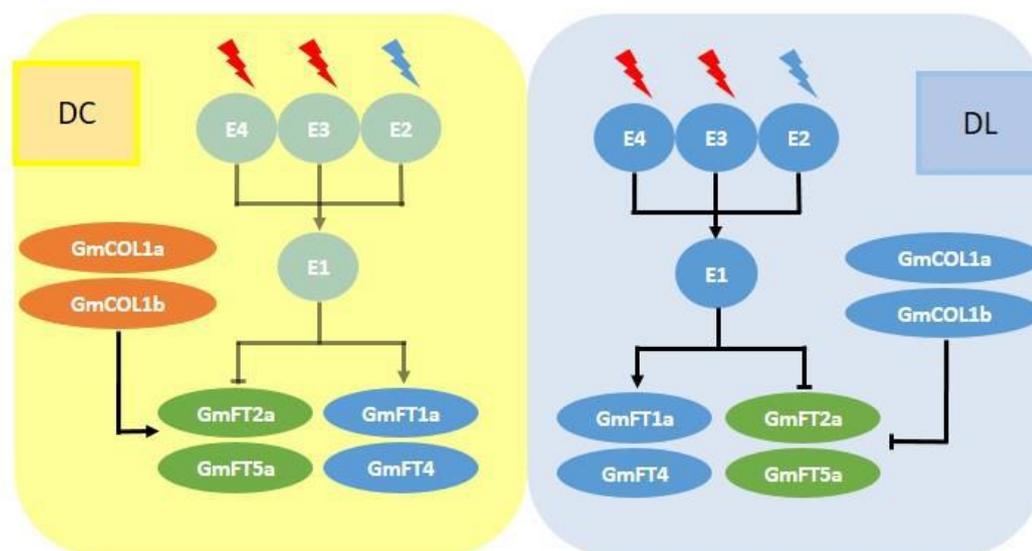


Figura 8. Propuesta de red molecular que regula el tiempo de floración en la soja. Bajo condiciones de DC (Izquierda), el gen *E1* está regulado a la baja, debido a que los loci *E4* (*GmPHYA2*) y *E3* (*GmPHYA1*) están ausentes; y la expresión circadiana de *E2* (*GmG1a/GmG13*) no coincide con exposiciones a la luz azul; por lo que se eleva la expresión de *GmFT2a* y *GmFT5a*; y disminuye *GmFT4* y *GmFT1a*, induciendo la floración. Así también *GmCOL1a/b* podrían actuar como inductores de la floración en DC. En condiciones de DL (Derecha), la expresión de *E1* aumenta debido a *E4*, *E3* y *E2*; el *E1* puede suprimir los niveles de *GmFT2a* y *GmFT5a*; y el aumento de *GmFT4* y *GmFT1a*, lo que lleva a una floración tardía, mientras que *GmCOL1a/b* podrían actuar como represores de la floración. La inducción de la expresión de un gen está representada como una línea continua con terminación en una flecha, mientras que la represión de la expresión se indica como una línea continua con terminación en una barra. Círculos naranjas: inductores de la floración; azules: represores de la floración; verdes: florigenos

Además de estudios basados en búsqueda de homólogos de genes conocidos en *Arabidopsis*, se han identificado 10 loci de madurez de la serie *E* que están implicados en la diferencia en el tiempo de floración entre las variedades de soja; de los cuales, cinco genes, *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7* y *E8* están relacionados con la sensibilidad al fotoperiodo en diferentes condiciones de luz (Buzzell, 1971; Buzzell & Voldeng, 1980; Cober, Tanner, & Voldeng, 1996; McBlain, Bernard, Cromeens, & Korczak, 1987). Sin embargo, no está claro como los loci *E7* y *E8* contribuyen a la respuesta fotoperiódica.

En el caso del locus *E1* codifica un probable factor de transcripción con una señal de localización nuclear y una región relacionada con un dominio de unión al ADN denominado B3. Además, se cuentan con dos genes homólogos, *E1La* y *E1Lb*. La expresión de *E1*, *E1La* y *E1Lb* se suprime en condiciones de DC, pero en DL se

produce dos picos durante la fase de luz. Estas tres proteínas actúan como represores de *GmFT2a* y *GmFT5a*, ya que el silenciamiento de *E1* y sus homólogos causa una sobreexpresión de *GmFT2a* y *GmFT5a* y por lo tanto, una temprana floración (Xu et al., 2015). Se ha sugerido que *E1* puede regular la expresión de *GmFT1a* (W. Liu et al., 2018), sin embargo, se desconoce si esta regulación es directa o indirecta. Además, *E1* induce la expresión de *GmCOL1a/b* bajo días largos, pero aún no se encuentra clara la regulación de *GmCOL1a/b* en la expresión de *E1* (D. Cao et al., 2015; Wu et al., 2019). Por otro lado, la regulación de la expresión de *E1* y *EILs* se encuentra bajo el control de los loci *E3* y *E4* (Xu et al., 2015). Estos loci fueron identificados como homólogos del fotorreceptor de luz roja/rojo lejano fitocromo PHYA en soja, *GmPHYA1* y *GmPHYA2* respectivamente (Baohui Liu et al., 2008; Watanabe et al., 2009). El alelo funcional del locus *E3* retrasa la floración en días largos en presencia de más luz roja que roja lejana (R/RL), mientras que el alelo funcional *E4* presenta menor efecto sobre el tiempo de floración (Cober et al., 1996).

En la soja se encuentran tres genes homólogos de GI: *GmGI1*, *GmGI2* y *GmGIa/GmGI3* (F. Li et al., 2013). El locus *E2* codifica a uno de los homólogos de *GI*, *GmGIa/GmGI3*. *E2* tiene dos alelos conocidos (Watanabe et al., 2011), el *E2* dominante funcional y el *e2* recesivo (F. Li et al., 2013; Watanabe et al., 2011). El alelo *E2* codifica una proteína de 1.170 aminoácidos, mientras que el alelo *e2* codifica una proteína truncada de 521 aminoácidos. En presencia del alelo *e2* se observa una floración temprana y una alta expresión de *GmFT2a*, pero no tiene efectos observables en la expresión de *GmFT5a* (Watanabe et al., 2011). Este resultado sugiere que *E2* suprime la floración en condiciones de días largos. Además, mediante ensayos de expresión ectópica en mutantes de *Arabidopsis* con *gi-2*, *E2* no puede reestablecer la inducción floral, mientras que *e2* reestableció parcialmente, pero no indujo la floración en plantas de *Arabidopsis* con *GI* funcional (Y. Wang et al., 2016). Por lo que *GmGI* podría actuar en forma diferente al gen *GI* de *Arabidopsis* y el loci *e2* podría tener una función distinta a *E2* en lugar de ser un alelo disfuncional.

Adicionalmente, *GmGI1* y *GmGI2* pueden interactuar con los dos ortólogos de *FKF1* que posee la soja, *GmFKF1* y *GmFKF2* (F. Li et al., 2013). Así también con el homólogo de *CDF*, *GmCDF1*, mientras que solo el extremo N-terminal fue suficiente

para que E2 interactúe con GmFKF1 (F. Li et al., 2013), mientras que alelo e2 interactuaba débilmente (Y. Wang et al., 2016). Por lo tanto, se necesitan más estudios para resolver esta inconsistencia para una mejor comprensión del papel del gen *E2* en el control de la floración.

Además de PHYA, otro importante receptor de las señales luminosas en el modelo de coincidencia externa son los criptocromos, la soja cuenta con seis homólogos de CRY, cuatro son homólogos de CRY1 (GmCRY1a-d) y dos son de CRY2 (GmCRY2a-b); donde se observó que GmCRY1a promovía la floración y presentaba una expresión rítmica diferente de acuerdo con la duración del día (Q. Zhang et al., 2008), no ocurriendo así con GmCRY2a, el cual se encuentra relacionado con la senescencia de las hojas dependiente de la luz azul (Meng, Li, Wang, Liu, & Lin, 2013). Se encontró correlación entre el nivel de acumulación proteica de GmCRY1a y el tiempo de floración que podría contribuir con la adaptación latitudinal de variedades chinas estudiadas (Q. Zhang et al., 2008). Sin embargo, no hubo diferencias claras en el nivel de expresión del ARNm, o en las secuencias de ADNc de GmCRY1a; por lo que esta diversificación entre variedades podría deberse a genes implicados en la regulación postranscripcionales, traducción, o modificaciones postraduccionales (Q. Zhang et al., 2008). Se requieren de más estudios para comprender como se modifica la acumulación proteica de GmCRY1a que contribuye a la diferencia de floración entre variedades de soja.

1.5.3. Gloria de la Mañana (*Ipomoea nil* L. Roth)

- **La vía del fotoperiodo en Gloria de la Mañana**

Gloria de la mañana (*Ipomoea nil*, anteriormente llamada *Pharbitis nil*) es una planta dicotiledónea de DC al igual que el arroz (Jackson, 2009). Se llegó a identificar inicialmente un gen ortólogo a CO de *Arabidopsis* en gloria de la mañana. La expresión de *PnCO* fue alta después de una fase oscura de 14 h, pero baja cuando esta fase fue igual o menor a 12 h (J. Liu, Yu, McIntosh, Kende, & Zeevaart, 2001). Por lo tanto, la expresión se encuentra regulada por el fotoperiodo. Mediante la expresión del gen *PnCO* funcional en mutante de *Arabidopsis* con *CO* no funcional se pudo restablecer el tiempo de floración (J. Liu et al., 2001).

Posteriormente se llegó a caracterizar un gen parálogo a *PnCO*, denominado *PnCOL1*. El cual también presentaba altas expresiones en DC, pero niveles casi indetectables bajo periodos de luz continua (S. J. Kim, Moon, Lee, Maeng, & Kim, 2003). Sin embargo, la sobreexpresión de *PnCOL1* no logró complementar la función de CO en mutantes de *Arabidopsis* con este gen no funcional (S. J. Kim et al., 2003).

Gloria de la mañana presenta además en su genoma dos homólogos de *FT*, denominados *PnFT1* y *PnFT2*. Estos genes se expresan solo si el periodo de oscuridad es lo suficientemente larga (superior a 11 h) independientemente de la duración del periodo de luz anterior (Hayama, Agashe, Luley, King, & Coupland, 2007). Ensayos de interrupción nocturna redujeron su expresión, evitando la floración; así como la sobreexpresión de *PnFT1* aceleró la floración en DL (Hayama et al., 2007). El momento de mayor abundancia del ARNm de *PnFTs* no se relacionó con la expresión de *PnCO* (Hayama et al., 2007). Lo que sugiere la existencia de una vía adicional que controla la expresión de *PnFT* en la oscuridad, diferente a lo que ocurre en otras plantas como arroz y *Arabidopsis*. *PnFT* podría estar regulado por un factor de transcripción diferente, un candidato es *FLOWERING-2 (PnFL-2)* (K. C. Kim, Han, Lee, Maeng, & Hur, 2011). El cual se acumula durante periodos de oscuridad en los cotiledones y hojas, pero está ausente en otros órganos. El ARNm de *PnFL-2* comienza a acumularse en los cotiledones luego de 6 h del inicio del periodo de oscuridad y alcanza un máximo entre 14 y 16 h. La interrupción nocturna elimina su acumulación (K. C. Kim et al., 2011).

Así también, se logró identificar un gen homólogo a *GI* en gloria de la mañana (*PnGI*), donde la expresión mostró ritmos diurnos claros que alcanzaron su punto máximo al anochecer en condiciones DC y DL (Higuchi et al., 2011). Mediante ensayos de sobreexpresión se sugiere que *PnGI* tiene una función inhibitoria de la floración (Higuchi et al., 2011). El nivel de expresión de *PnCO* no cambió dramáticamente, pero si se redujo la expresión de *PnFT1* en líneas transgénica que sobreexpresaban *PnGI* en comparación con las de tipo salvaje (Higuchi et al., 2011). Mediante los análisis de mutantes con *PnGI* no funcionales podría proporcionar información adicional sobre la relación de la vía GI – CO – FT en gloria de la mañana.

Actualmente no se cuenta con información sobre la regulación de *PnFT* para la inducción floral en esta planta y también sobre las funciones de otros genes responsables de la respuesta fotoperiódica, por ejemplo, los criptocromos y fitocromos ya que se observó la inducción o inhibición de la floración bajo exposiciones de luz azul o roja respectivamente (Yamazaki, Ishii, & Tanaka, 2007).

1.5.4. Sésamo (*Sesamum indicum*)

- **La vía del fotoperiodo en sésamo**

La floración en el sésamo es promovida principalmente por fotoperiodos cortos (Kumazaki et al., 2008). El tiempo de floración de variedades asiáticas difiere ampliamente de entre menos de 30 días a más de 90 días (Wei et al., 2015). Sin embargo, se han realizado pocos estudios para dilucidar el mecanismo molecular en el control de la floración. Gracias a la secuenciación del genoma realizada en el 2013 (H. Zhang et al., 2013) que posteriormente fue mejorada (L. Wang et al., 2016), han proporcionado secuencias de genoma de referencia de alta calidad y útiles para llevar a cabo la búsqueda de genes componentes del control fotoperiódico en el sésamo y su posterior caracterización. Tal es el caso que, recientemente se logró identificar y caracterizar genes homólogos a *CO* (Zhou, Liu, Li, Zhang, & Wei, 2018). De los 13 genes similares a *CO*, dos presentaron la relación más cercana con *CO* de *Arabidopsis*, denominados *SiCOL1* y *SiCOL2*. En el caso de *SiCOL2*, el análisis de secuencia mostró que carecía de uno de los dos dominios caja B. Además, el tiempo de floración en líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban *SiCOL2* fue más largo con respecto a *SiCOL1*, posiblemente debido a esta diferencia de secuencias (Zhou et al., 2018). Sin embargo, teniendo en cuenta los antecedentes en soja, se debe sobreexpresar *SiCOL1a* y *SiCOL1b* en sésamo y no en *A. thaliana* para conocer su rol en sésamo.

Los niveles de expresión en las hojas se encontraban significativamente más altas con un rápido aumento de 14 a 28 días; siendo 30 días para la aparición de botones florales y 40 días para la apertura de flores en la variedad en estudio (Zhou et al., 2018). Tanto *SiCOL1* como *SiCOL2* presentaron un nivel máximo de expresión en horas de la noche, aproximadamente dos horas antes del amanecer bajo condiciones de DL y cuatro horas antes bajo condiciones de DC (Zhou et al., 2018).

Utilizando una variedad con *SiCOL1* intacto y otra con una delección de 6 pb en la región codificante, se observó que la variedad con delección expresa menor nivel de *SiFT* en condiciones de DC (Zhou et al., 2018). Por otro lado, en condiciones de DL, la variedad con delección presentó mayor nivel de expresión de *SiFT* sugiriendo que *SiCOL1* actúa como inductor de *SiFT* en DC y represor en DL, así como sucede con *Hd1* y *Hd3a* en arroz. Sin embargo, esta delección ocurre en un sitio que no involucra a los dominios conservados por lo que es necesario confirmar si esta delección realmente afecta a la función de *SiCOL1*.

En nuestro trabajo previo, identificamos a cuatro genes homólogos a *FT* (López, Sotelo, & Iehisa, 2017), por lo que es necesario estudiar la implicancia de los tres homólogos de *FT* restantes de sésamo sobre la floración.

Además de *FT*, en nuestro trabajo previo se identificaron genes homólogos componentes del reloj biológico: se encontraron dos genes homólogos a *GI* (*SiG11* y *SiG12*), un gen para *LHY/CCA1* (*SiLHY*), dos homólogos para *PRR5* (*SiPRR5a* y *SiPRR5b*), uno para *PRR7* (*SiPRR7*) y dos para *TOC1* (*SiTOC1a* y *SiTOC1b*); y no se encontraron homólogos de *PRR3* y *PRR9* (López et al., 2017).

La disponibilidad de la secuenciación del genoma de sésamo nos posibilita comparar con análogos genómicos en sus parientes cercanos a través de un enfoque de genómica comparativa. Así también, sería de gran utilidad analizar la expresión de los probables genes inductores de la floración y de los genes componentes del reloj biológico y la realización de ensayos de mutantes con alelos disfuncionales o la sobreexpresión de estos genes para determinar la función de los mismos y tener indicios de cómo se regula el tiempo de floración en el sésamo.

La dilucidación del mecanismo molecular involucrado en la regulación del tiempo de floración permitiría desarrollar marcadores moleculares para la selección asistida en programas de mejoramiento de cultivos de sésamo con tiempos de floración más adecuados para cada ambiente. Sin embargo, aún no se han identificado los genes causantes de esta variación fenotípica. Mediante el análisis de expresión de los genes implicados en la floración y componentes del reloj biológico y la evaluación del efecto de la interrupción nocturna sobre la floración se podría identificar los candidatos de genes causales de esta alteración.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

- Analizar la diferencia en la vía del fotoperiodo entre dos variedades de sésamo con tiempos de floración temprana y tardía

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar la comparación de los bloques genómicos que contienen cada una de las copias de los genes implicados en la floración con especies filogenéticamente cercanas a sésamo
- Identificar genes candidatos implicados en la inducción de la floración mediante el análisis de su expresión entre las variedades de sésamo con floración temprana y tardía
- Analizar el nivel de expresión de los genes componentes del reloj biológico en condiciones de días largos y cortos
- Analizar el efecto de la interrupción nocturna sobre el tiempo de floración en las dos variedades de sésamo

3. Materiales y Métodos

3.1. Comparación de las regiones genómicas que contienen los genes implicados en la floración entre las distintas especies

En el trabajo anteriormente realizado se identificaron las secuencias de los probables genes inductores de la floración con copias múltiples como *SiFTs*, *SiCOs* y *SiGIs* (López et al., 2017). Ubicando estas secuencias en el genoma, se extrajeron los bloques genómicos que constan del gen de interés más 10 genes corriente arriba y 10 genes corriente abajo adyacentes al mismo (Figura 9A). Con las secuencias proteicas de estos bloques genómicos se realizó búsquedas por similitud recíproca empleando el programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) en el proteoma de: 1) sésamo para identificar a los bloques que originaron mediante la duplicación del genoma completo; y 2) otras especies filogenéticamente relacionadas, como las de *Mimulus guttatus*, *Olea europea* y *Solanum lycopersicum* (Hellsten et al., 2013; Unver et al., 2017; Zamir & Giuliano, 2012) para estimar el momento evolutivo de su origen.

La búsqueda por similitud recíproca se realizó primeramente comparando los genes presentes en los bloques genómicos del sésamo con el proteoma de las demás especies o del mismo sésamo mediante BLAST. De este resultado, los dos genes (considerando la duplicación del genoma completo) que presentaron mejor similitud con el de sésamo (utilizado como entrada) fueron utilizados para realizar una segunda búsqueda BLAST en el proteoma del sésamo (Figura 9B) con el fin de corroborar que la proteína que presenta la mejor similitud en el genoma de sésamo sea la proteína inicial utilizada como entrada. Solo aquellas secuencias que presentaron mejor similitud en ambas búsquedas (similitud en forma recíproca) fueron consideradas como pares homólogos. Se consideraron bloques sinténicos a aquellos bloques genómicos donde el orden de los pares homólogos permanecía relativamente conservado, ya que puede haber pequeños rearrreglos (pequeñas inversiones o inserción/delección de genes) (Figura 9C).

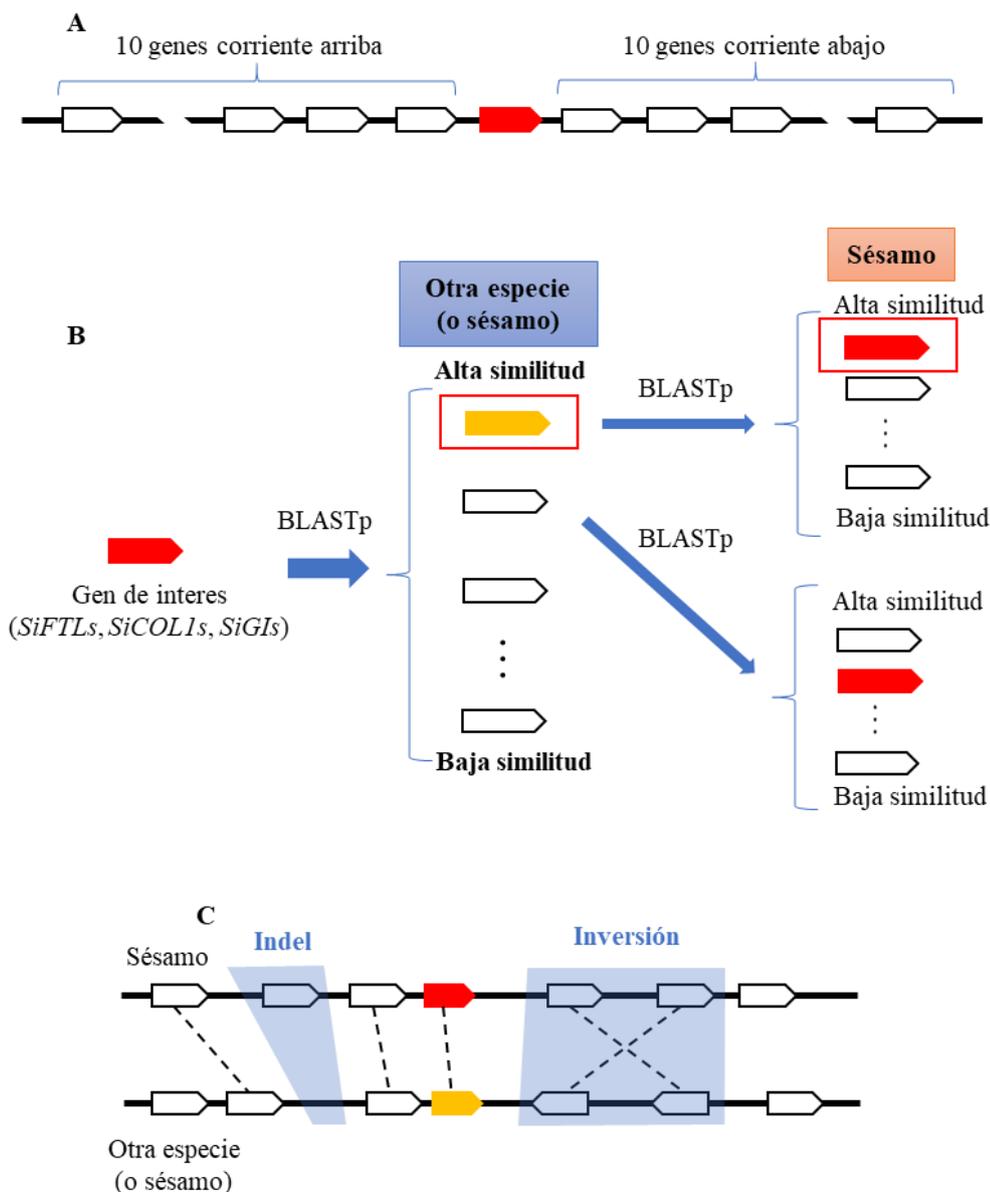


Figura 9. Esquema del proceso de comparación de las regiones genómicas que contienen los genes implicados en la floración entre las distintas especies. A) Esquema de un bloque genómico que contiene 10 genes corriente arriba del gen de interés y 10 genes corriente abajo. B) Búsqueda por similitud recíproca. Primero se realizó una búsqueda BLAST utilizando como entrada el gen de interés contra el proteoma de otra especie o el mismo sésamo. Las dos proteínas con mejor similitud se utilizaron para realizar una segunda búsqueda BLAST contra el proteoma de sésamo. Solo aquellas secuencias que presentaron de vuelta una mayor similitud con la proteína de interés (utilizada como entrada en la primera búsqueda) fueron consideradas como pares homólogos (indicadas en cuadro rojo). C) Comparación de regiones genómicas considerados como bloques genómicos homólogos o sinténicos. Línea discontinua: pares homólogos. Los ejemplos de inserción/delección (indel) e inversión son indicados. Pentágonos rojos: gen de interés (implicado en la floración en el sésamo) utilizado como entrada; pentágonos naranjas: gen homólogo en otras especies (o en el sésamo) con mejor similitud al de sésamo utilizado como entrada. Pentágonos blancos: otros genes no relacionados a la floración.

3.2. Medición del tiempo de floración

Las semillas de sésamo de las variedades Nueva Escoba Blanca (NEB, con floración tardía) y K3 (floración temprana) fueron provistas por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción.

Estas fueron germinadas previamente sobre papel húmedo dentro de placas de Petri dejando incubar a 24 °C en oscuridad por 48 h. Una vez observada la presencia de las radículas con una longitud entre 0,5 a 1 cm se realizó el trasplante en macetas de polipropileno conteniendo Sustrato Carolina Soil (Carolina Soil do Brasil, Rio Grande do Sul, Brasil).

Las plantas fueron cultivadas bajo condiciones de días cortos (DC [12 h luz/12 h oscuridad]) y días largos (DL [16 h luz /8 h oscuridad]) a 26°C. Las plantas fueron fertilizadas cada 15 días para la medición del tiempo de floración.

Se registraron el número de días pos-emergencia del cotiledón que transcurrieron hasta observar macroscópicamente la presencia del primer botón floral (BF) y la apertura de la primera flor en las plantas (AF). Considerando a esta última como el día de floración. Se evaluaron seis individuos para cada variedad. Los datos fueron comparados mediante el análisis de varianza (ANOVA) entre fotoperiodos y variedades.

3.3. Análisis de expresión circadiana de los probables genes inductores de la floración

Se realizó la colecta de las hojas de ambas variedades bajo condiciones de DL, a los 30 días pos-emergencia, con intervalos de cuatro horas durante 24 h. Considerando como tiempo cero el inicio de la fase de luz (momento en el que se enciende la luz), se obtuvieron muestras a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h. Las plantas fueron fertilizadas cada siete días.

Las hojas colectadas fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y se procedió a la maceración y posterior extracción de ARN utilizando el reactivo de Trizol® (Invitrogen, E.E.U.U.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se determinó mediante la lectura de la absorbancia de 220 a 330 nm, la concentración de ARN (ng/μl) y su pureza con las relaciones a 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm. Se utilizaron tres réplicas biológicas para cada tiempo por variedad.

Una vez corroborada la calidad del ARN, se realizó la síntesis de ADNc mediante la transcripción inversa de 1 µg de ARN utilizando la transcriptasa inversa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MLV) (Promega, E.E.U.U.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la dilución de las muestras 1:4 del ADNc sintetizado.

Para la cuantificación de los productos de amplificación por PCR en tiempo real se utilizó *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, EEUU). Se emplearon cebadores específicos para los genes *SiFTL*, *SiCOL* y *SiGI* que ya se habían diseñado en el trabajo anteriormente realizado (López et al., 2017). Se realizó el rediseño para los genes *SiFTL3*, *SiFTL4*, *SiGII* y *SiGI2* utilizando el programa Primer3Plus (<http://primer3plus.com/>) con los siguientes parámetros: el rango del tamaño de los productos fue de entre 100 – 200 pb, el rango del tamaño de los cebadores fue de entre 18 – 27 pb (óptimo de 20 pb), la temperatura de desnaturalización fue de entre 57 – 63 °C (óptimo de 60 °C) y el porcentaje de GC (Guanina y Citocina) fue de entre 20 – 80 % (óptimo de 50%). Se comprobó su especificidad mediante una PCR convencional en tiempo final. Las secuencias de los cebadores utilizados se encuentran en la Tabla 1.

Se obtuvieron los valores de ciclos de cuantificación (C_q , cycle quantification) que genera el termociclador *StepOnePlus™ RealTime PCR Systems* (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó como gen de referencia *ADENINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASA* (*SiAPT*) debido a su alta estabilidad en la expresión en estas condiciones según estudios previos (López et al., 2017). Se calculó el nivel de expresión relativa utilizando el método de $2^{-\Delta C_q}$; donde ΔC_q es la diferencia del C_q del gen de interés y el del gen de referencia de la misma muestra. El análisis estadístico utilizado fue la prueba t de Student para muestras independientes suponiendo varianzas iguales.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados

Nombre del Gen	ID del gen en el genoma del sésamo		Secuencia 5'-3'	Referencia
<i>SiFTL1</i>	SIN_1009320	F	GGCCCTCCCAAGTACTCAAC	(López et al., 2017)
		R	TGGGATCACTAGGGCTTGGA	
<i>SiFTL2</i>	SIN_1013025	F	GGCCTCCCCAAGTTGCTAAT	(López et al., 2017)
		R	TCCCGTAGGTGTGGGTTACT	
<i>SiFTL3</i>	SIN_1013026	F	AGCACGGTTGAGCTACGAGT	Presente trabajo
		R	GAAAAATCGTCGCCTCCAATA	
<i>SiFTL4</i>	SIN_1001827	F	GTGGCAGGACAGTGGCTAAT	(López et al., 2017)
		R	TTAGGTGTGGGTTGCTAGGG	
<i>SiCOL1a</i>	SIN_1004896	F	TCTTTGGTGGAAACGATGGAT	(López et al., 2017)
		R	ACGCTGTCGCTGTAATGTTG	
<i>SiCOL1b</i>	SIN_1019889	F	CCTCATATGCAAAGCCGATT	(López et al., 2017)
		R	GAGGGGCCGTAGAGAGTACC	
<i>SiGI1</i>	SIN_1015799	F	TGTTATTGGGTCAGCATCCA	Presente trabajo
		R	TTCATGGCTTACGCAGACAG	
<i>SiGI2</i>	SIN_1007477	F	TGGAACAACAGGACAGTGACA	Presente trabajo
		R	TTGAGTGGGAGGGAAATCAG	
<i>SiLHY</i>	SIN_1005758	F	ATGCCAAGCTGAAAGCTCAT	(López et al., 2017)
		R	TTGGGACCTTTCTCGTCATC	
<i>SiPRR7</i>	SIN_1011285	F	GCCATGCACAAAAACGACCT	(López et al., 2017)
		R	GTTGGTTTCGTTTGCCCTC	
<i>SiPRR5a</i>	SIN_1005900	F	CACTTTTGGGAGTGCTCCAT	Presente trabajo
		R	TGACGCACCAGAATGGTTTA	
<i>SiPRR5b</i>	SIN_1009237	F	CATCCCCAAGCACCTGTAAT	(López et al., 2017)
		R	TTGTCCGACCATGTGTGTCT	
<i>SiTOC1a</i>	SIN_1017486	F	ATATTCCACAATGCCCTCCA	Presente trabajo
		R	TGGAGGAATTCCCATACGAC	
<i>SiTOC1b</i>	SIN_1005989	F	CCACCACTGCTGCTCCTATT	Presente trabajo
		R	TGAGATTTGTCCTGTCCATTTG	
<i>SiAPT</i>	SIN_1011380	F	TTGCCAATGGACAAAGGGTT	(López et al., 2017)
		R	GAGGGTCGGGTCAAGTTAGG	

3.4. Análisis de expresión de los probables genes inductores de la floración en distintos estadios del desarrollo

Se realizó el análisis de expresión de los probables genes *SiFTs*, *SiCOL* y *SiGIs* a los 10, 20 y 30 días pos-emergencia bajo condiciones de DC y DL. Las muestras fueron colectadas a las 0, 4, 8 y 12 h.

La extracción, amplificación y análisis de expresión se realizó según la metodología antes mencionada (Sección 2.3.).

3.5. Determinación del nivel de expresión de los genes componentes del reloj biológico

Para el análisis de los genes componentes del reloj biológico del sésamo, se extrajo ARN a partir de hojas de plantas desarrolladas a los 20 días pos-emergencia bajo condiciones de DC y DL. Las muestras fueron colectadas a las 0, 4, 8 y 12 h.

La extracción, amplificación y análisis de expresión se realizó según la metodología antes mencionada (Sección 2.3.). Los cebadores utilizados para la amplificación fueron diseñados en el trabajo anteriormente realizado (López et al., 2017) y para los genes *SiPRR5a*, *SiTOC1a* y *SiTOC1b* fueron rediseñados según la metodología antes mencionada (Sección 2.3.). Las secuencias de los cebadores se encuentran en la tabla 1.

3.6. Análisis del efecto de la interrupción nocturna sobre el tiempo de floración en las dos variedades

Se cultivaron las dos variedades de sésamo en condiciones de 12 h luz/12 h oscuridad y con un estímulo de 2 h de luz en el medio del periodo correspondiente a la oscuridad (Figura 10). Es decir, se expusieron a 12 h de luz, seguida por 5 h de oscuridad, 2 h de luz y finalmente 5 h de oscuridad. El tratamiento se realizó diariamente desde la emergencia de la planta hasta llegar a la floración, registrando el día de aparición del primer botón floral y el tiempo de floración para cada planta. Las plantas fueron fertilizadas cada 15 días. Se evaluaron seis individuos para cada variedad. Los datos fueron comparados mediante el análisis de varianza (ANOVA) con los tiempos de floración bajo condiciones de días cortos y largos; y entre variedades.



Figura 10. Ensayo de interrupción nocturna. Las plantas fueron cultivadas bajo 12 h luz/12 h oscuridad con una interrupción de 2 h de luz a la noche. La barra blanca indica la presencia de luz, y las barras negras, la de oscuridad.

4. Resultados

4.1. Comparación de las regiones genómicas que contienen a los probables genes inductores de la floración en sésamo y en otras especies de Astéridas

En un estudio previo se ha identificado la presencia de múltiples copias en el genoma del sésamo de los probables genes inductores de la floración (López et al., 2017). Mediante la comparación de los bloques genómicos que contienen cada una de las copias de estos genes en el sésamo y especies filogenéticamente cercanas es posible inferir cuales de las copias pudo estar presente en el ancestro común de las Astéridas y que probablemente haya conservado su función como regulador de la floración.

4.1.1. Comparación de regiones genómicas que contienen a las copias de *FT*

Se identificaron los bloques sinténicos entre sésamo, *M. guttatus*, *O. europea* (olivo) y *S. lycopersicum* (tomate) que contienen a los genes *FT*. Para el bloque correspondiente al gen *SiFTL1* (anteriormente descrita como *SiFT* por Zhou y cols. [Zhou et al., 2018]) del sésamo se encontró un bloque sinténico dentro del genoma del sésamo que probablemente es el producto de la duplicación del genoma completo. Sin embargo, no se encontró un gen homólogo a *FT* dentro de este bloque. Los bloques sinténicos entre sésamo y *M. guttatus* se encuentran altamente conservados, observándose pequeñas inversiones (en el orden de los genes) y algunas inserciones o deleciones de los genes (Figura 11). En este bloque sinténico de *M. guttatus* se encontró el gen *MgFTL1*, el homólogo de *SiFTL1/SiFT*. En el genoma de olivo, se encontraron dos bloques sinténicos: uno conteniendo el gen *OeFTL2* y otro que contiene *OeFTL1* (Figura 12). Ambos bloques de olivo presentaron menor grado de conservación al comparar con el de sésamo, principalmente el correspondiente a *OeFTL1*. Al igual que en el olivo, en el genoma de tomate se encontraron dos bloques sinténicos al de *SiFTL1* de sésamo: uno que contiene tres copias de *FT* en tándem (*SiFTL2*, *SiFTL5* y *SiFTL6*) y otro que contiene *SiFTL1* (Figura 13). Este último bloque solo presenta dos genes (incluyendo *SiFTL1*) en común con el bloque de sésamo por lo que no fue considerado como sinténico con el de sésamo. La presencia de genes homólogos a *SiFTL1* en los mencionados bloques de las especies

filogenéticamente relacionadas indicaría que esta copia ya se encontraba presente en el ancestro común de las Astéridas (Tabla 2).

Cabe mencionar que en *M. guttatus* se identificaron dos genes adicionales homólogos a *SiFTL1*, *MgFTL2* y *MgFTL3*; dispuestos en tándem en el genoma, pero no se encontró un bloque sinténico a este en el genoma del sésamo. Por otro lado, no se pudo armar el bloque sinténico para el gen *OeFTL3*, que también presentó una alta identidad con *SiFTL1*, debido a que se encuentra en un *scaffold* aún no ensamblado en el genoma de *O. europea* y no posee la cantidad suficiente de genes adyacentes.

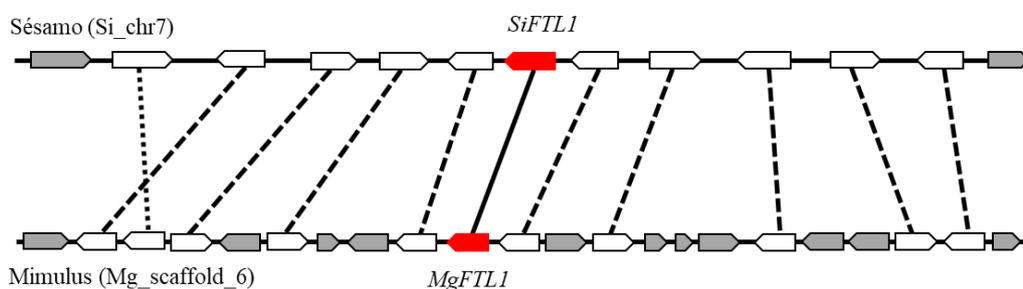


Figura 11. Bloques sinténicos entre sésamo y *Mimulus* que contienen las copias de *SiFTL1* y *MgFTL1*. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *FT*, *SiFTL1* (SIN_1009320) y *MgFTL1* (Migut.F01843.1), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

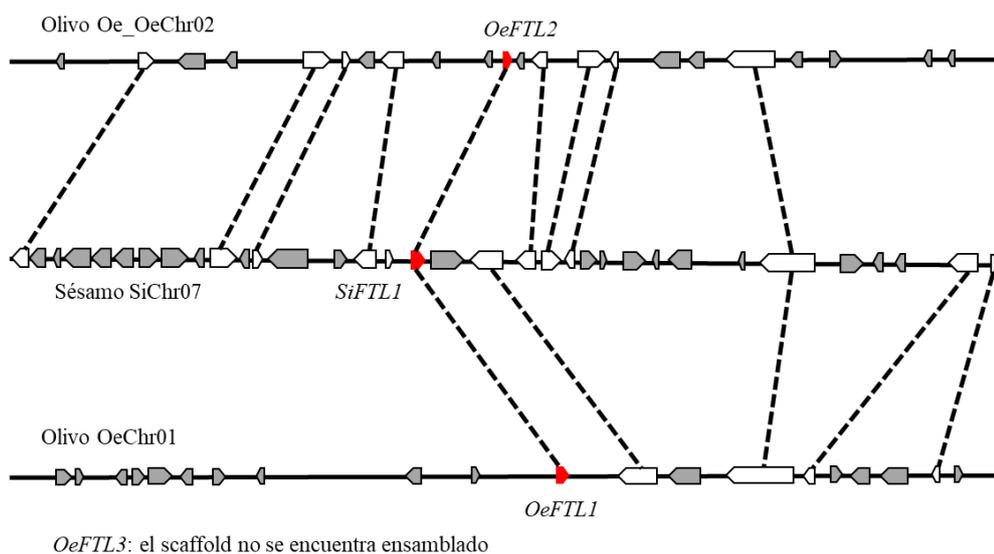


Figura 12. Bloques sinténicos entre sésamo y olivo que contienen las copias de *SiFTL1*, *OeFTL1* y *OeFTL2*. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *FT*, *SiFTL1* (SIN_1009320), *OeFTL1* (Oeu062033.1) y *OeFTL2* (Oeu007682.1), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

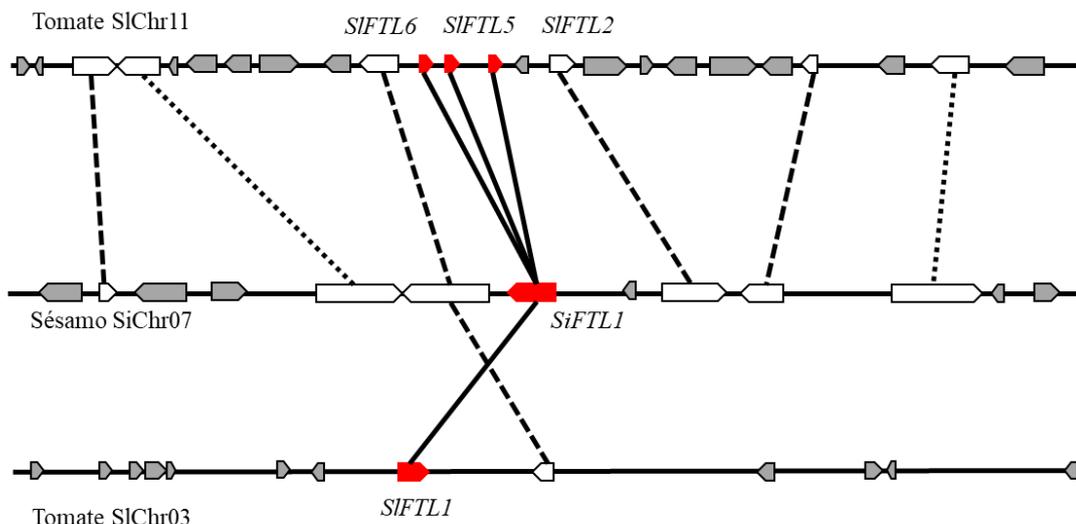


Figura 13. Bloques sinténicos entre sésamo y tomate que contienen las copias de *SiFTL1* y sus homólogos en tomate. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *FT*, *SiFTL1* (SIN_1009320), *SIFTL1* (Solyc03g063100.2.1), *SIFTL2* (Solyc11g008640.1.1), *SIFTL5* (Solyc11g008660.1.1) y *SIFTL6* (Solyc11g008650.1.1), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentra en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

Tabla 2. Presencia de las diferentes copias de *FT* en los bloques sinténicos de sésamo y otras especies pertenecientes al clado Astéridas

	Sésamo	<i>Mimulus</i>	Tomate	Olivo
<i>SiFTL1</i> (<i>SiFT</i>)	X	<i>MgFTL1</i>	<i>SIFTL2/5/6</i> *	<i>OeFTL2</i> <i>OeFTL1</i> †
<i>SIFTL2/3</i>	X	X	X	X
<i>SiFTL4</i>	X	<i>MgFTL4</i>	X	X

*Estos tres genes se encuentran en tándem sobre el mismo cromosoma.

†Este gen se encuentra en una región genómica diferente a la de *OeFTL2*.

En el caso del gen *SiFTL4*, se identificó un bloque sinténico dentro del genoma del sésamo. Sin embargo, no se encontró un homólogo de *FT* dentro del bloque. En cuanto a su homólogo en *M. guttatus*, se encontró en el bloque sinténico al bloque de sésamo que contiene al gen *SiFTL4* (Figura 14). Se observa una moderada conservación entre los bloques con algunas inserciones y deleciones de genes. No se encontraron genes ortólogos a *SiFTL4* y bloques sinténicos al bloque que contiene a *SiFTL4* en el genoma del olivo. En el tomate, se identificó un bloque sinténico, pero no se encontró el ortólogo de *SiFTL4*. Estos resultados sugieren que esta copia de *FT*

estuvo presente en el ancestro común del género *Sesamum* y *Mimulus*, pero ausente antes de la separación con el género *Olea*.

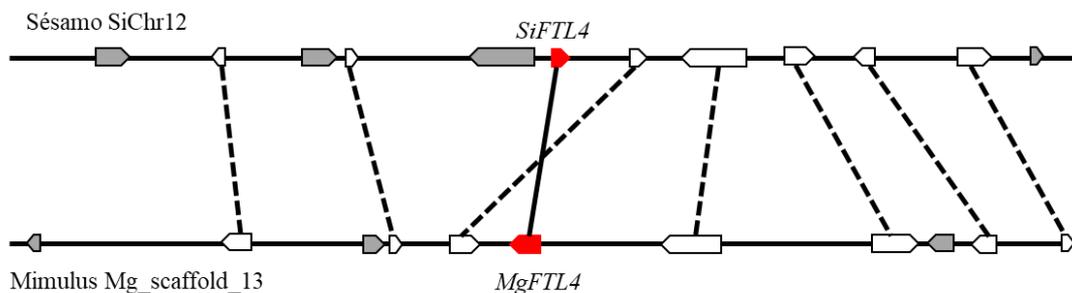


Figura 14. Bloques sinténicos entre sésamo y *Mimulus* que contienen las copias de *SiFTL4*, *MgFTL4*. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *FT*, *SiFTL4* (SIN_1001827) y *MgFTL4* (Migut.M00905.1.), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

En cuanto a los genes *SiFTL2* y *SiFTL3*, se encuentran dispuestos uno al lado del otro en el genoma de sésamo sugiriendo una duplicación en tándem. Se identificó un bloque sinténico dentro del genoma de sésamo, pero no se encontró un gen homólogo a *FT*. También se logró identificar bloques sinténicos en *M. guttatus* y tomate, pero no en el olivo. Sin embargo, no se encontraron genes ortólogos a *SiFTL2* y *SiFTL3* en estos bloques de *M. guttatus* y tomate (Figura 15). Esto sugiere que las copias de *SiFTL2* y *SiFTL3* se formaron posterior a la separación del género *Sesamum* y *Mimulus*.

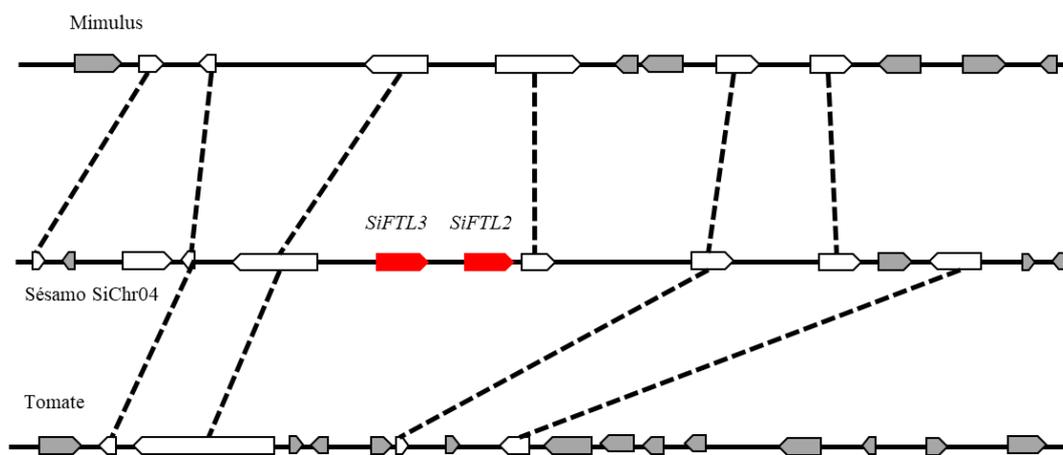


Figura 15. Bloques sinténicos entre sésamo y *Mimulus* que contienen las copias de *SiFTL2* y *SiFTL3*. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *FT*, *SiFTL2* (SIN_1013025) y *SiFTL3* (SIN_1013026), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

4.1.2. Comparación de regiones genómicas que contienen a las copias de *CO*

Zhou y cols. han denominado a las copias de *CO* de sésamo como *SiCOL1* y *SiCOL2* (Zhou et al., 2018). En el análisis intra-genómico de sésamo realizado en este trabajo, se observó una moderada conservación entre los bloques genómicos de *SiCOL2* y *SiCOL1* (Figura 16). Presenta pocas inversiones de genes, así como inserciones y deleciones genes que no presentan homólogos dentro de la región genómica comparada. Esto podría sugerir que el origen de una de las copias es debido a la duplicación del genoma completo que ha experimentado el sésamo. Por esta razón en el presente trabajo se denomina *SiCOL1a* a *SiCOL2* y *SiCOL1b* a *SiCOL1*.

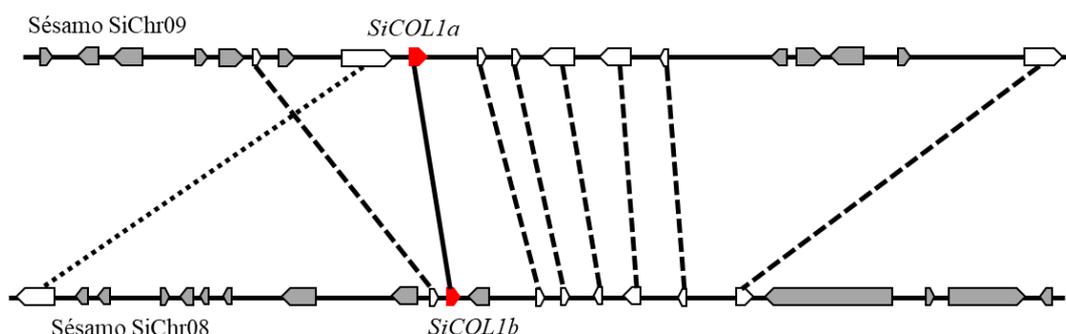


Figura 16. Bloques sinténicos entre sésamo que contienen las copias de *SiCOL1a* y *SiCOL1b*. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *CO*, *SiCOL1a* (SIN_1004896) y *SiCOL1b* (SIN_1019889), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

Se identificó un bloque sinténico entre sésamo y *Mimulus* que contenían al único gen homólogo de *CO* (*MgCOL*). Los bloques sinténicos entre *SiCOL1a* y *MgCOL* se encuentran altamente conservados con pocas inserciones y deleciones de genes (Figura 17A). Los bloques sinténicos entre *SiCOL1b* y *MgCOL* presentaron un mayor número de inserciones, deleciones e inversiones de genes (Figura 17B).

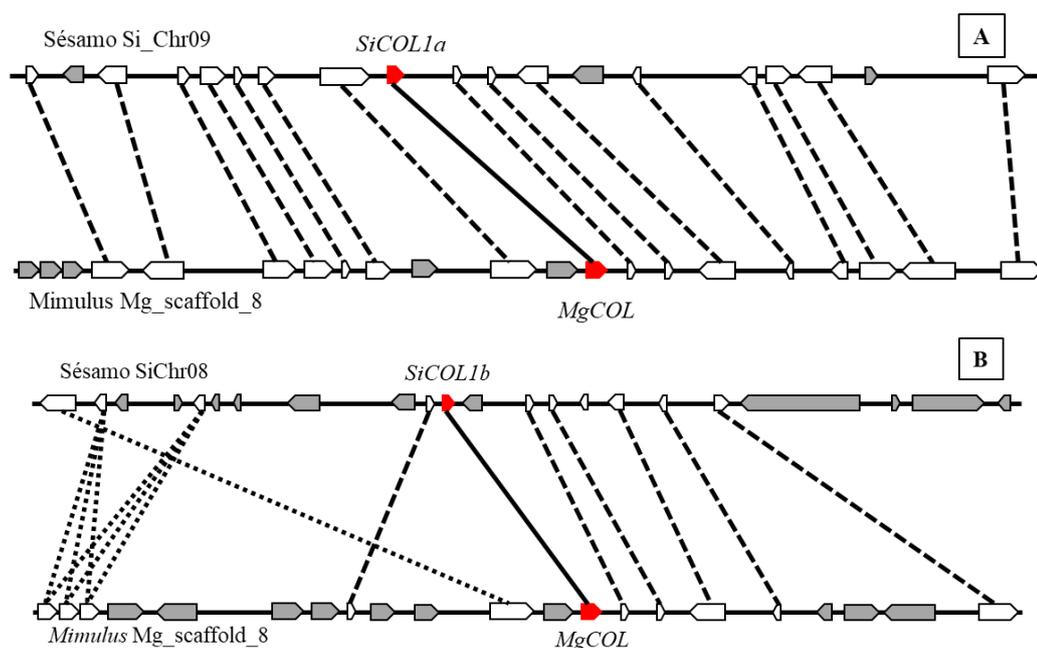


Figura 17. Bloques sinténicos entre sésamo y *Mimulus* que contienen las copias de *SiCOL1a*, *SiCOL1b* y *MgCOL*. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *CO*, A) *SiCOL1a* (SIN_1004896), B) *SiCOL1b* (SIN_1019889) y *MgCOL* (Migut.H00566.1.), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

Para el bloque que contiene al gen *SiCOL1a/SiCOL2* se identificaron tres bloques sinténicos en el genoma del olivo. El bloque donde se encuentra el gen *OeCOL4* es el que presentó mayor conservación con pocas inserciones y deleciones de genes (Figura 18A). El gen *SiCOL1a* y otros genes cercanos presentaron dos genes homólogos en el bloque genómico del olivo que contienen a *OeCOL1* y *OeCOL2* (Figura 18B). Esto podría sugerir la duplicación en tándem de este segmento del genoma del olivo. El bloque que contiene a *OeCOL3* fue el menos conservados entre los bloques sinténicos del sésamo y el olivo (Figura 18C). Para el bloque de sésamo donde se encuentra *SiCOL1b/SiCOL1* se identificaron dos bloques sinténicos en el olivo. Uno contiene a *OeCOL4* y el otro a *OeCOL3* (Figura 19). El último bloque solo presenta cuatro genes (incluyendo *OeCOL3*) en común con el bloque de *SiCOL1b*. En ambos casos, el grado de conservación es menor comparando con el bloque que contiene *SiCOL1a*.

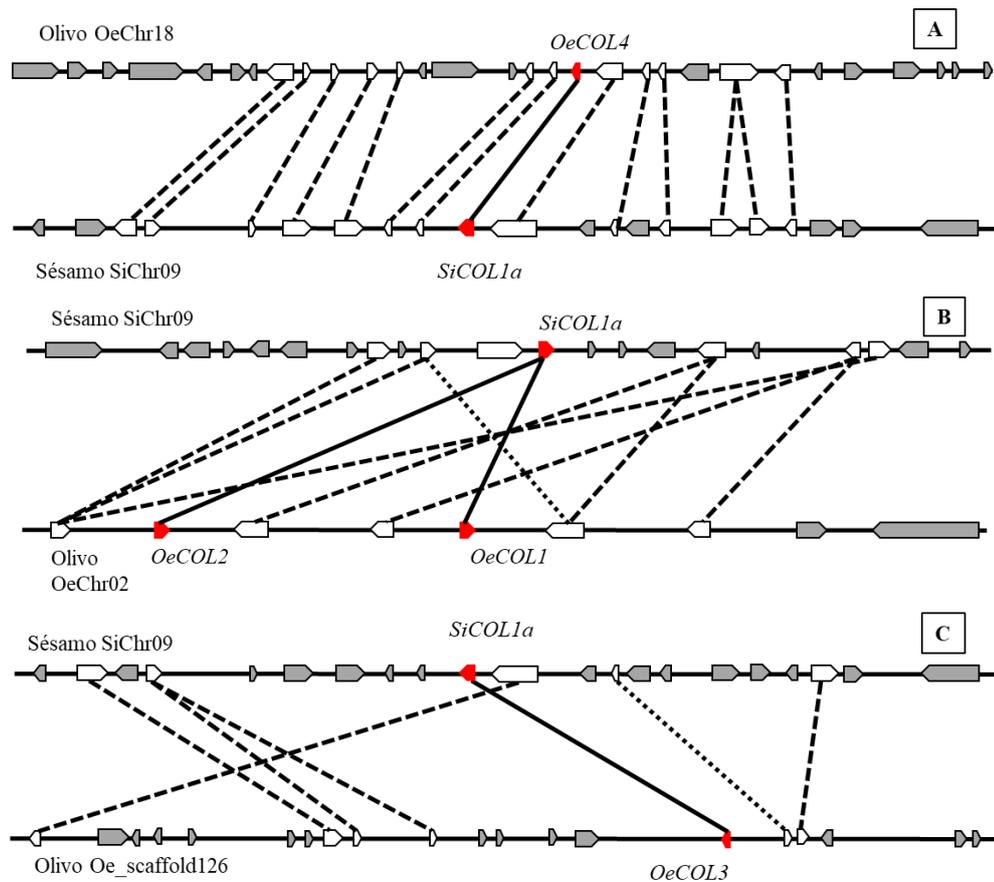


Figura 18. Bloques sinténicos entre sésamo y olivo que contienen las copias de *SiCOL1a* y sus homólogos en el olivo. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *CO*, *SiCOL1a* (SIN_1004896), A) *OeCOL4* (Oeu032856.1), B) *OeCOL1* (Oeu033426.1) y *OeCOL2* (Oeu033423.1) y C) *OeCOL3* (Oeu007103.1), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

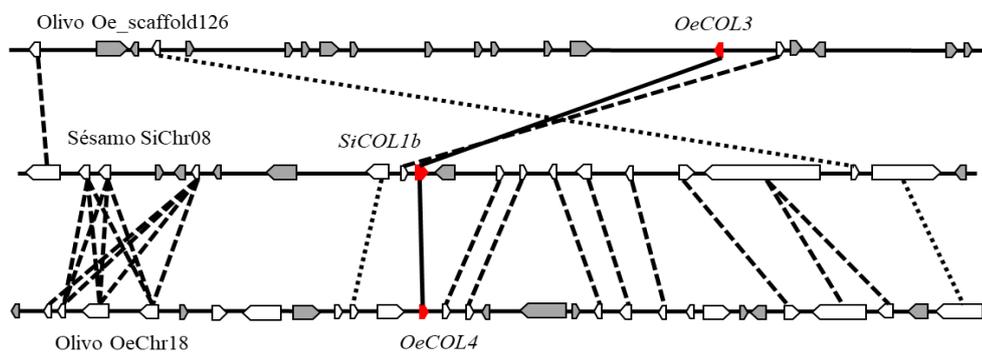


Figura 19. Bloques sinténicos entre sésamo y olivo que contienen las copias de *SiCOL1b* y sus homólogos en el olivo. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *CO*, *SiCOL1b* (SIN_1019889), *OeCOL4* (Oeu032856.1) y *OeCOL3* (Oeu007103.1), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

Entre sésamo y tomate se identificó un bloque sinténico. El bloque del tomate contenía cuatro genes homólogos de *CO*, *SiCOL1a*, *SiCOL1b*, *SiCOL2a* y *SiCOL2b*. El bloque que contiene *SiCOL1a* presentó mayor grado de conservación con su homólogo de tomate con pocas inserciones y deleciones; y algunas inversiones de genes (Figura 20A). Mientras que el bloque que contiene *SiCOL1b* presentó un menor número de genes homólogos en común con el bloque correspondiente de tomate (Figura 20B).

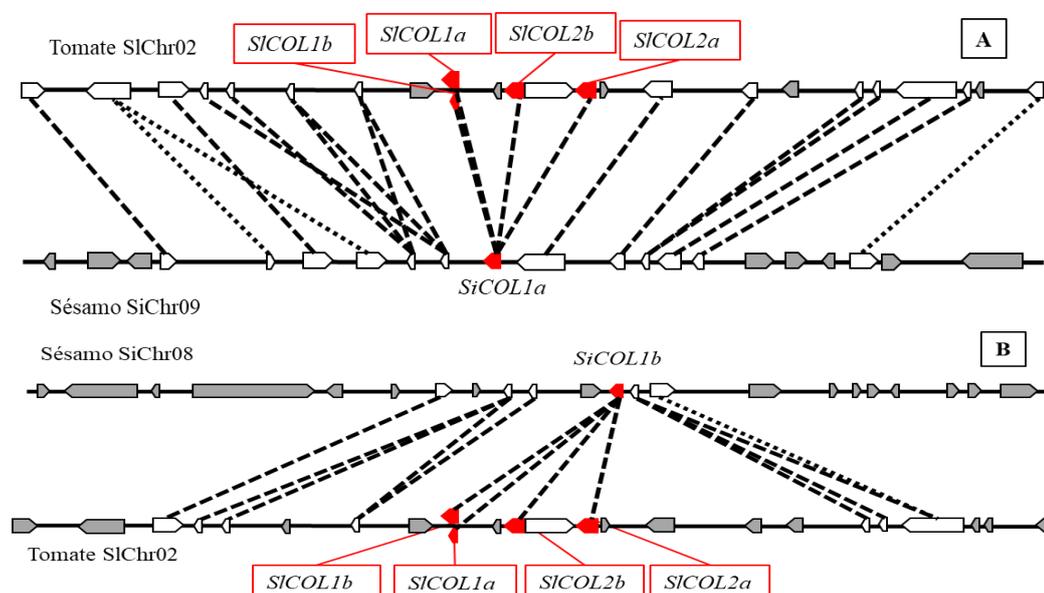


Figura 20. Bloques sinténicos entre sésamo y tomate que contienen las copias de *SiCOL1a*, *SiCOL1b* y sus homólogos en el tomate. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *CO*, A) *SiCOL1a* (SIN_1004896), B) *SiCOL1b* (SIN_1019889), *SiCOL1a* (Solyc02g089500.3.1), *SiCOL1b* (Solyc02g089493.1.1), *SiCOL2a* (Solyc02g089540.3.1) y *SiCOL2b* (Solyc02g089520.2.1), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

La presencia de genes homólogos a *SiCOL1a* y *SiCOL1b* en los mencionados bloques de las especies filogenéticamente relacionadas sugieren que en el ancestro común de las Astéridas ya contaba con al menos una de las copias de *CO* (Tabla 3).

El bloque genómico que contiene a *SiCOL1a* presentó una mayor conservación con los bloques sinténicos de *Mimulus*, olivo y tomate, que el bloque correspondiente a *SiCOL1b*. Esto podría indicar que *SiCOL1a* es la copia ancestral y que *SiCOL1b* probablemente se originó posterior a la separación del género *Sesamum* de *Mimulus*.

Tabla 3. Presencia de las diferentes copias de *CO* en los bloques sinténicos de sésamo y otras especies pertenecientes al clado Astéridas.

	Sésamo	<i>Mimulus</i>	Tomate	Olivo
<i>SiCOL1a</i> (<i>SiCOL2</i>)	<i>SiCOL1b</i>	<i>MgCOL</i>	<i>SICOL1b/1a/2b/2a</i>	<i>OeCOL4</i> <i>OeCOL3</i> <i>OeCOL1/2</i>
<i>SiCOL1b</i> (<i>SiCOL1</i>)	<i>SiCOL1a</i>	<i>MgCOL*</i>	<i>SICOL1b/1a/2b/2a*</i>	<i>OeCOL4*</i>

*Aunque se observa una homología con los bloques correspondiente a estos genes, el grado de conservación fue menor que el bloque de *SiCOL1a*.

4.1.3. Comparación de regiones genómicas que contienen a las copias de *GI*

Dentro del genoma del sésamo se encontraron bloques sinténicos que contenían a las dos copias de *GI*, *SiG11* y *SiG12* (Figura 21). Los cuales presentaron cinco pares homólogos (incluyendo a las copias de *SiGI*) entre los bloques con varias inserciones, deleciones e inversiones de genes. Sugiriendo que estas copias se pudieron haber originados mediante la duplicación del genoma completo de sésamo.

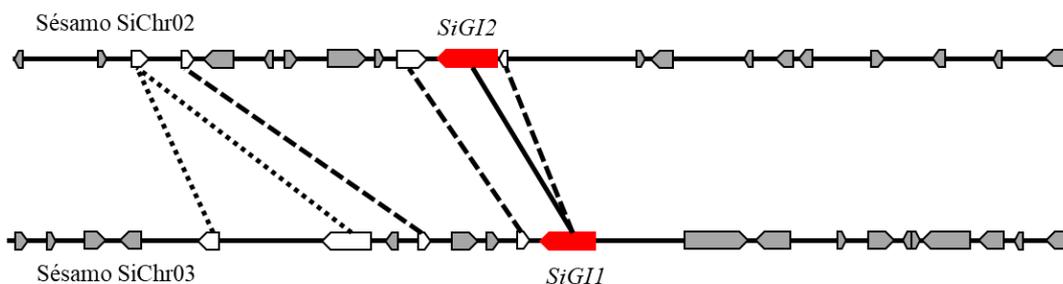


Figura 21. Bloques sinténicos entre sésamo que contienen las copias de *SiG11* y *SiG12*. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *GI*, *SiG11* (SIN_1015799) y *SiG12* (SIN_1007477), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

Se encontraron dos pares de bloques sinténicos entre sésamo y *Mimulus*. Ambos bloques de *Mimulus* contenían una copia de *GI* en cada uno de ellos. El bloque que contenía a *SiG11* presentó una mayor similitud con el bloque de *MgG11* que el de *MgG12* (Figura 22A). Por otro lado, el bloque que contiene a *SiG12* presentó mayor similitud con el bloque de *MgG12* comparando con el de *MgG11* (Figura 22B). Esto indicaría que *SiG11* y *MgG11* son ortólogos, así como *SiG12* y *MgG12*.

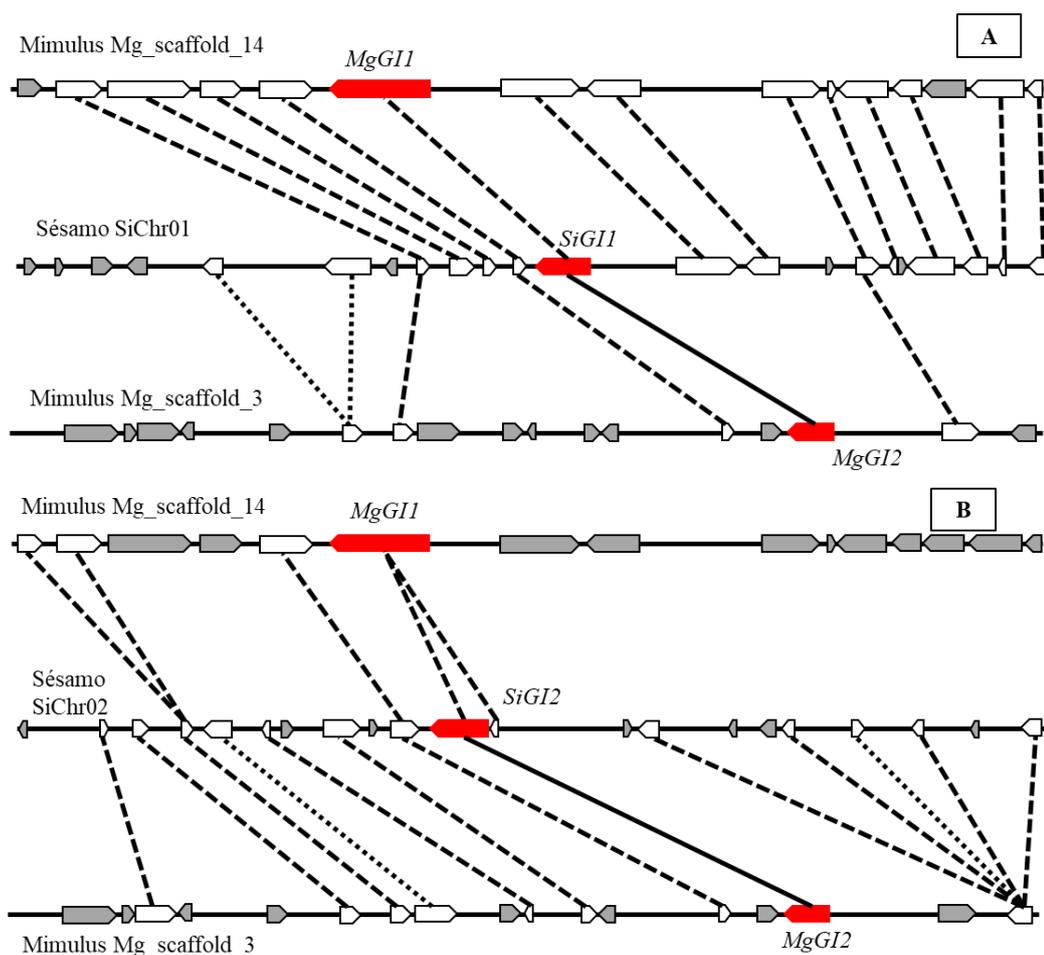


Figura 22. Bloques sinténicos entre sésamo y *Mimulus* que contienen las copias de *SiGI1*, *SiGI2* y sus ortólogos en *Mimulus*. Los pentágonos rojos indican genes homólogos a *GI*, A) *SiGI1* (SIN_1015799), B) *SiGI2* (SIN_1007477), *MgGI1* (Migut.N02951.1.) y *MgGI2* (Migut.C00380.1.), los pentágonos blancos indican genes homólogos que se encuentran en ambas especies y los pentágonos grises son genes que no presentaron homología dentro del bloque comparado. Los pares homólogos se encuentran indicados con líneas.

Con relación a los bloques genómicos de las otras dos especies estudiadas, olivo y tomate, se encontraron genes homólogos a *SiGI1* y *SiGI2*. Sin embargo, el número de pares homólogos entre los bloques no fue superior a cuatro genes, incluyendo a los genes homólogos a *GI*. Esto ha dificultado la identificación de la copia ancestral de *GI* en estas especies. Este resultado sugiere que *SiGI1/MgGI1* y *SiGI2/MgGI2* ya se encontraba en el ancestro común de sésamo y *Mimulus* y estas dos copias se originaron mediante la duplicación del genoma completo. Sin embargo, se desconoce el momento evolutivo en el que se originaron estas dos copias.

Tabla 4. Presencia de las diferentes copias de *GI* en los bloques sinténicos de sésamo y otras especies pertenecientes al clado Astéridas.

	Sésamo	<i>Mimulus</i>	Tomate	Olivo
<i>SiGI1</i>	<i>SiGI2</i>	<i>MgGI1</i>	ND	ND
<i>SiGI2</i>	<i>SiGI1</i>	<i>MgGI2</i>	ND	ND

ND: no determinado debido a poca conservación entre los bloques genómicos de las distintas especies.

4.2. Tiempo de floración de las variedades en distintos fotoperiodos

Con el fin de comprobar si el fenotipo observado en campo se reproduce bajo las condiciones experimentales del laboratorio, se determinó el tiempo de floración de las variedades NEB y K3 bajo fotoperiodos de 12 h de luz/12 h de oscuridad (12/12) y 16 h luz/8 h oscuridad (16/8).

Bajo fotoperiodo de 12/12, el tiempo transcurrido desde la emergencia del cotiledón hasta la aparición de botones florales y la apertura de pétalos fue significativamente menor en la variedad K3 que en NEB (Tabla 5). La aparición del primer botón floral tardó 4,8 días en la variedad NEB en comparación a K3, y con respecto a la apertura del primer pétalo NEB tardó 5,7 días frente a K3.

Bajo fotoperiodo de 16/8, se observó un retraso significativo de ambos parámetros en las dos variedades, afectando en mayor grado a la variedad NEB. En esta condición, la diferencia entre las variedades para la aparición de botones florales fue de 14 días, observado también una diferencia similar en el tiempo transcurrido para la apertura de los pétalos.

Tabla 5. Días luego de la emergencia de la plántula para la presencia de botones florales y apertura de pétalos.

Variedad	K3		NEB	
	12/12	16/8	12/12	16/8
Fotoperiodo (Horas de luz/oscuridad)				
Aparición de botón floral	27,5 ± 1,2 ^a	35,0 ± 0,0 ^b	32,3 ± 0,5 ^c	49,0 ± 0,0 ^d
Apertura de pétalos	38,0 ± 0,9 ^a	43,5 ± 0,6 ^b	43,7 ± 0,8 ^b	57,7 ± 1,0 ^c

Los datos se presentan como la media ± desviación estándar para las variedades K3 y NEB bajo condiciones de 12/12 (horas de luz/horas de oscuridad) y 16/8. El nivel de significancia fue evaluado por el análisis de la varianza (ANOVA) con posterior test de comparación múltiple de Tukey-HSD ($p < 0,05$)

4.3. Nivel de expresión circadiana de los genes inductores florales

Para conocer el patrón de expresión circadiana de los probables genes inductores de la floración (*SiFTLs*, *SiCOL1a*, *SiCOL1b*, *SiGII* y *SiGI2*) en sésamo, se realizó su análisis de expresión en ambas variedades bajo condiciones de 16/8 a los 30 días post-emergencia, considerando los resultados obtenidos del tiempo de floración en las condiciones experimentales. Para ello, se realizó la extracción de ARN total de las hojas cada cuatro horas durante 24 h.

El análisis de expresión de los genes *SiFTLs* reveló que el gen *SiFTL1* presenta su máxima expresión al inicio de la fase de luz (entre la 0 y 4 h) (Figura 23A). El nivel de expresión de este gen fue significativamente mayor en la variedad K3 con relación a NEB, principalmente a la 0 h. En esta condición de crecimiento no se detectó la expresión de *SiFTL2*, *SiFTL3* y *SiFTL4* en ambas variedades.

De modo similar a lo observado con *SiFTL1*, el pico máximo de expresión de los genes *SiCOL1a/SiCOL2* y *SiCOL1b/SiCOL1* fue a las 0 h (Figura 23B y 23C). El nivel de expresión de estos genes a las 0 h fue elevado, aunque no significativo, en la variedad K3 que en NEB. No obstante, se observó un aumento significativo de *SiCOL1b* en la variedad NEB a las 16 h (Figura 23B).

En el caso de los genes *SiGII* y *SiGI2*, no se observaron un patrón claro de expresión bajo fotoperiodo de 16/8 a los 30 días (Figura 23D y E). En el caso de *SiGII*, presentó un aumento de expresión a las 0 y 8 h en la variedad K3, mientras que en la variedad NEB se observó un aumento a las 8 y 16 h. Para el gen *SiGI2*, se pudo observar un patrón de expresión similar entre las variedades.

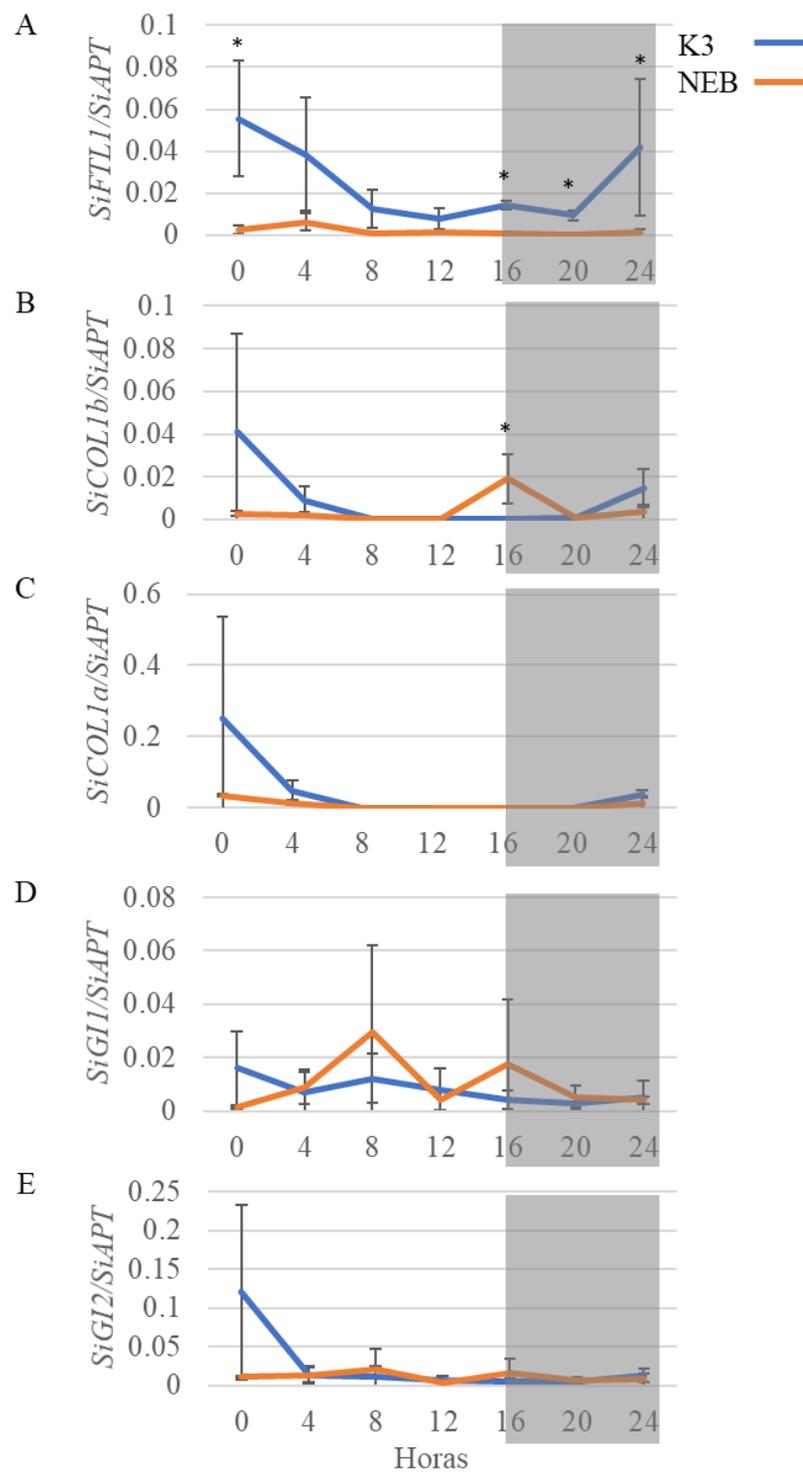


Figura 23. Niveles de expresión relativa de los probables genes implicados en la floración bajo fotoperiodo de 16/8. El análisis de expresión de A) *SiFTL1*, B) *SiCOL1b*, C) *SiCOL1a*, D) *SiGII* y E) *SiGI2* se realizó mediante la extracción de ARN de hojas de las variedades K3 (azul) y NEB (naranja) cultivadas durante 30 días. Se consideró como tiempo 0 al inicio de la fase de luz. Las muestras se colectaron cada 4 h durante 24 h, teniendo tres réplicas biológicas en cada punto. La normalización de la expresión de los genes se realizó respecto al gen *SiAPT*. Se aplicó la prueba *t* de Student, donde $*P < 0,05$.

4.4. Identificación de los probables genes inductores de la floración

Mediante el análisis de expresión de genes en diferentes estadios del desarrollo se podría identificar cual o cuales de los genes (o copia de los genes) estarían implicados en la regulación de la floración. Por dicho motivo, se realizó la extracción de ARN de las hojas a los 10, 20 y 30 días post-emergencia de ambas variedades y en los fotoperiodos de 12/12 y 16/8. Se analizó la expresión de los genes a las 0, 4, 8 y 12 h a partir del inicio de la fase de luz.

4.4.1. Análisis de expresión de *SiFTLs* bajo fotoperiodo de 12/12

Bajo fotoperiodo de 12/12, el gen *SiFTL1* presentó una expresión baja a los 10 días post-emergencia en ambas variedades (Figura 24A), que luego aumentó a los 20 días. Este aumento fue mayor en K3 a las 0 h, siendo el nivel aproximadamente 20 veces superior que la variedad NEB. Posteriormente la expresión disminuye a los 30 días post-emergencia en ambas variedades, coincidiendo con el momento posterior a la inducción floral. Con respecto al gen *SiFTL2*, se observa un aumento de expresión a los 20 y 30 días en la variedad K3, respectivamente a las 0 h y entre las 4 y 8 h (Figura 24B). *SiFTL2* en NEB no presentó diferencias notables en el nivel de expresión en los distintos estadios. El nivel del gen *SiFTL3* fue muy baja en las dos variedades, sin observar cambios notables en el nivel de expresión en los distintos estadios de ambas variedades (Figura 24C). En el caso de *SiFTL4*, se observó una mayor expresión a los 10 días en ambas variedades, siendo entre cuatro a ocho veces superior en K3 (Figura 24D). La relación del nivel de expresión de *SiFTL1* con respecto a *SiFTL4* en K3 a los 10 días fue de 0,21; a los 20 días fue 479,02 y a los 30 días 58,91. Esto indica que *SiFTL4* se expresa más en K3 en la fase vegetativa (antes de la inducción floral), y a medida que avanza el estadio aumenta la expresión de *SiFTL1* superando el nivel de *SiFTL4*. En el caso de NEB, a los 10 días la relación entre *SiFTL1/SiFTL4* fue de 0,04; a los 20 días fue 15,49 y a los 30 días fue 18,59, siendo en todo caso menor que la de K3.

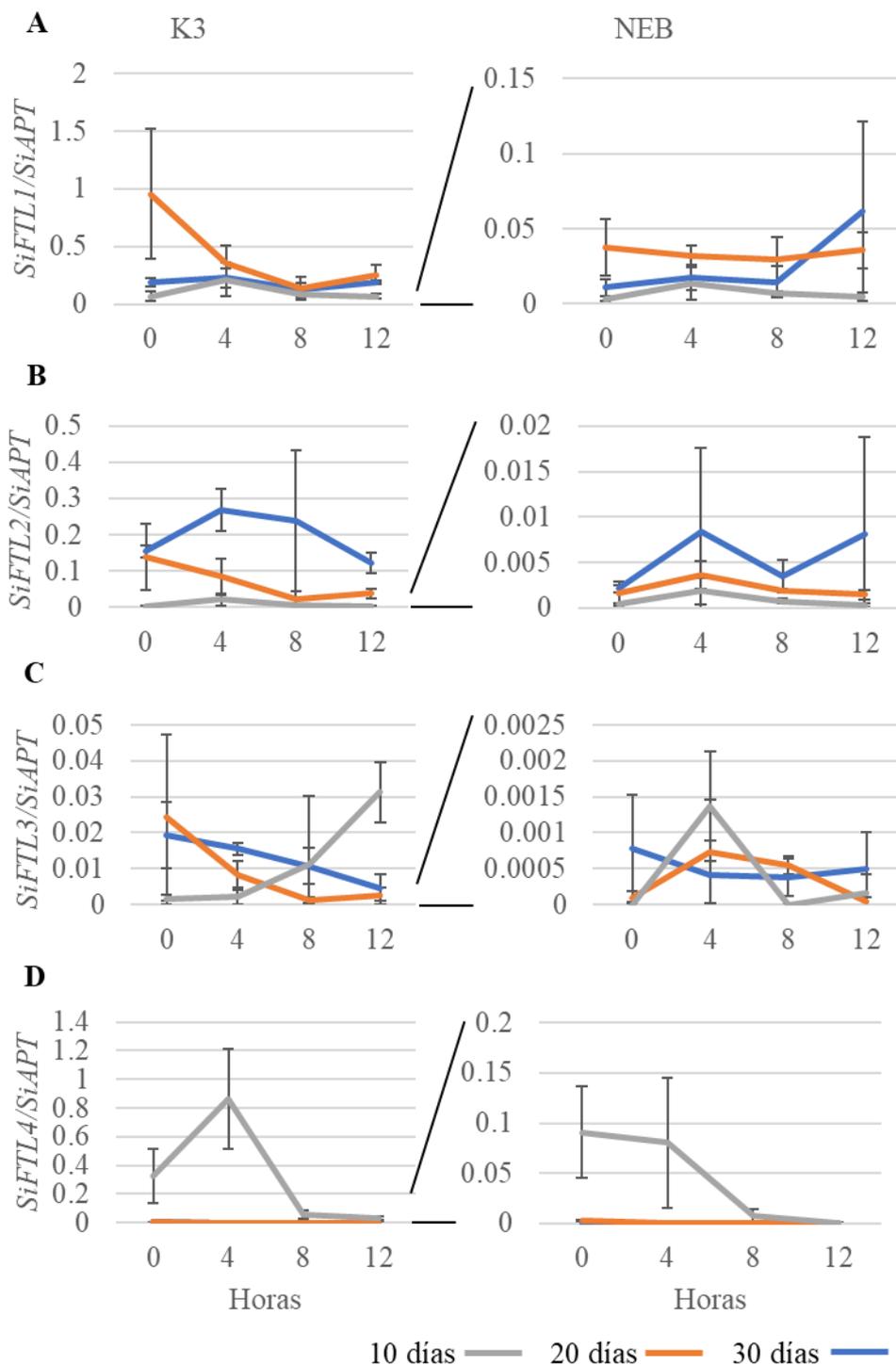


Figura 24. Niveles de expresión relativa de *SiFTLs* bajo fotoperiodo de 12/12. El análisis de expresión de A) *SiFTL1*, B) *SiFTL2*, C) *SiFTL3* y D) *SiFTL4* se realizó mediante la extracción de ARN de hojas a los 10 (gris), 20 (naranja) y 30 días (azul) pos-emergencia de las variedades K3 (izquierda) y NEB (derecha). Se consideró como tiempo 0 al inicio de la fase de luz. Las muestras fueron colectadas cada 4 h hasta las 12 h, teniendo tres réplicas biológicas en cada punto. La normalización del nivel de expresión de los genes fue realizada respecto al gen *SiAPT*.

4.4.2. Análisis de expresión de *SiCOL1a* y *SiCOL1b* bajo fotoperiodo de 12/12

El gen *SiCOL1b* presentó una expresión elevada a los 10 días en ambas variedades que luego decayó a los 20 y 30 días (Figura 25A). En la variedad K3, los niveles de expresión fueron 2,56 veces más con respecto a NEB a los 10 días, 2,32 veces superior a los 20 días y 4,19 veces a los 30 días. El nivel de expresión del gen *SiCOL1a* fue mayor con relación a *SiCOL1b* en ambas variedades (Figura 25B). También para *SiCOL1a*, la variedad K3 presentó un mayor nivel de expresión que NEB. Además, se observa una disminución de la expresión a los 30 días en ambas variedades.

4.4.3. Análisis de expresión de *SiGI1* y *SiGI2* bajo fotoperiodo de 12/12

En el caso de *SiGI1*, se observa un aumento de la expresión a los 20 días a las 12 h en ambas variedades (Figura 25C), que a los 30 días disminuye de vuelta a un nivel similar al de 10 días. En cambio, *SiGI2* presentó una disminución de la expresión a los 20 y 30 días (Figura 25D). Tanto *SiGI1* como *SiGI2* presentaron un nivel de expresión similar entre sí.

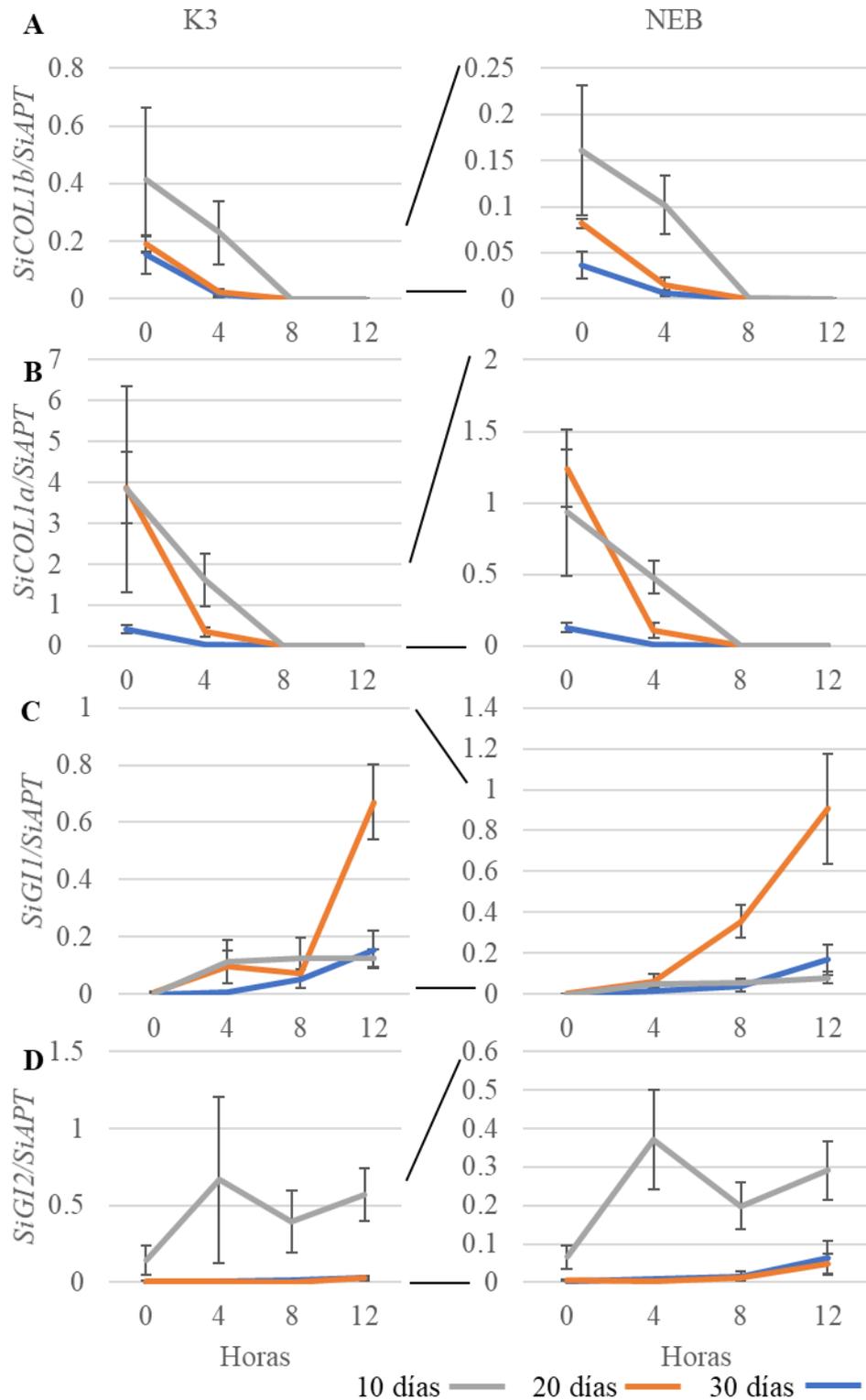


Figura 25. Niveles de expresión relativa de los probables reguladores de *SiFTLs* bajo fotoperiodo de 12/12. El análisis de expresión de A) *SiCOL1b*, B) *SiCOL1a*, C) *SiG11* y D) *SiG12* se realizó mediante la extracción de ARN de hojas a los 10 (gris), 20 (naranja) y 30 días (azul) pos-emergencia de las variedades K3 (izquierda) y NEB (derecha). Se consideró como tiempo 0 al inicio de la fase de luz. Las muestras fueron colectadas cada 4 h hasta las 12 h, teniendo tres réplicas biológicas en cada punto. La normalización del nivel de expresión de los genes fue realizada respecto al gen *SiAPT*.

4.4.4. Análisis de expresión de *SiFTLs* bajo fotoperiodo de 16/8

El patrón de expresión de los genes *SiFTLs* fue diferente en las plantas cultivadas en el fotoperiodo de 16/8. No se observó un aumento notable en el nivel de expresión de *SiFTL1* en los distintos estadios (Figura 26A). Siendo la variedad K3 la que presentó un mayor nivel de expresión. En el caso de los genes *SiFTL2*, *SiFTL3* y *SiFTL4* el nivel de expresión con relación a *SiFTL1* fue mucho menor en ambas variedades (Figura 26B-D), encontrando cerca del límite de detección.

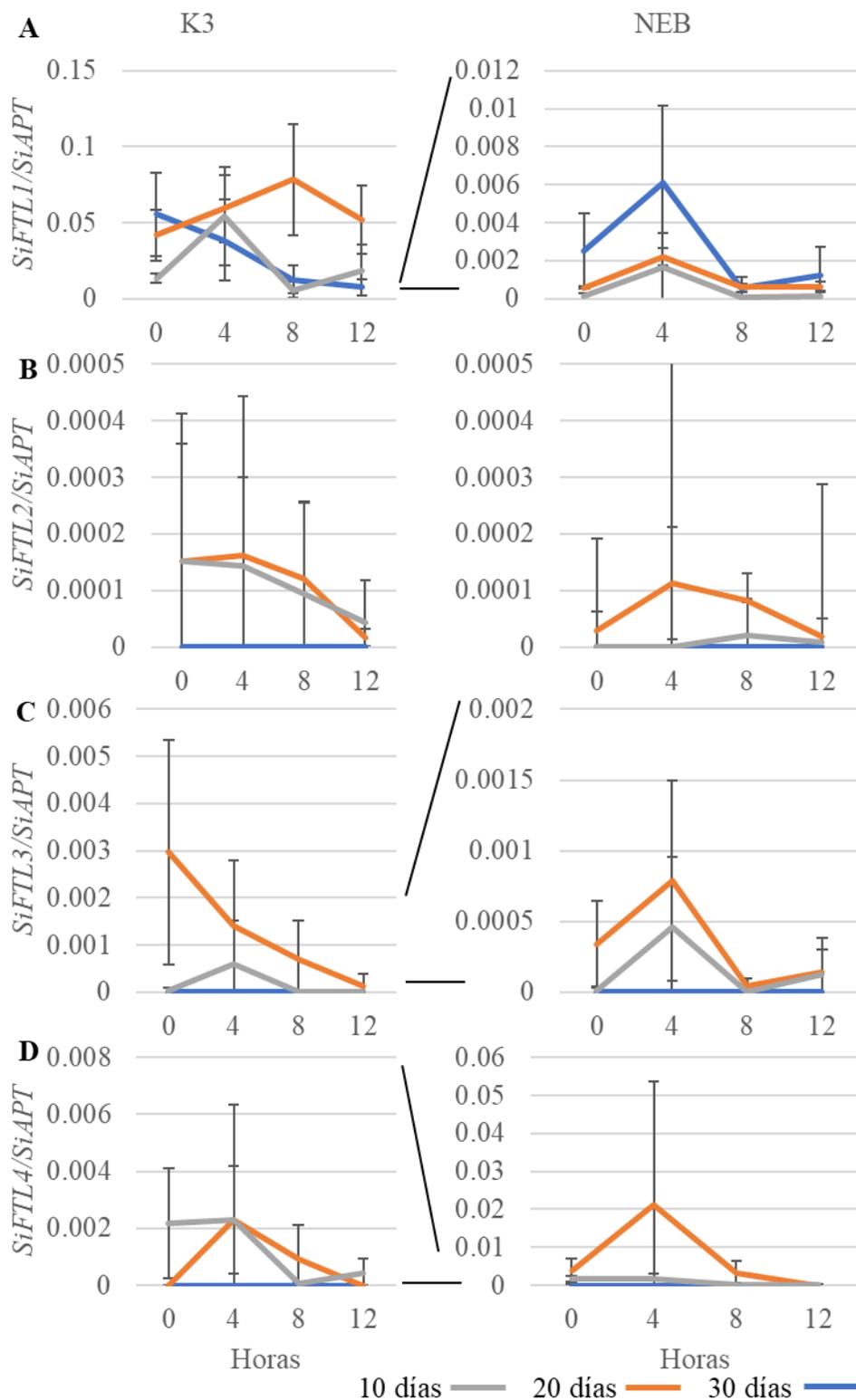


Figura 26. Niveles de expresión relativa de SiFTLs bajo fotoperiodo de 16/8. El análisis de expresión de A) *SiFTL1*, B) *SiFTL2*, C) *SiFTL3* y D) *SiFTL4* se realizó mediante la extracción de ARN de las hojas a los 10 (gris), 20 (naranja) y 30 días (azul) pos-emergencia de las variedades K3 (izquierda) y NEB (derecha). Se consideró como tiempo 0 al inicio de la fase de luz. Las muestras fueron colectadas cada 4 h hasta las 12 h, teniendo tres réplicas biológicas en cada punto. La normalización del nivel de expresión de los genes fue realizada respecto al gen *SiAPT*.

4.4.5. Análisis de expresión de *SiCOL1a* y *SiCOL1b* bajo fotoperiodo de 16/8

SiCOL1b/SiCOL1 presentó una disminución de la expresión a los 20 y 30 días en ambas variedades (Figura 27A). En la variedad K3, el nivel máximo se observó a las 0 h, mientras que en NEB la expresión máxima persistió hasta las 4 h. En el caso de *SiCOL1a/SiCOL2*, se observó un comportamiento diferencial entre las variedades (Figura 27B). En la variedad K3, el nivel de expresión se elevó a los 20 y 30 días con respecto a los 10 días. En la variedad NEB, hubo un ligero aumento en la expresión a los 20 días y luego a los 30 días disminuyó más que el nivel a los 10 días. A pesar de ello, el nivel de expresión de *SiCOL1a* fue superior al de *SiCOL1b* a los 20 y 30 días en ambas variedades.

4.4.6. Análisis de expresión de *SiGI1* y *SiGI2* bajo fotoperiodo de 16/8

Tanto *SiGI1* como *SiGI2* presentaron un patrón de expresión distinta al de las plantas cultivadas en fotoperiodo de 12/12. En el caso de *SiGI1*, se observó una disminución de la expresión a los 20 y 30 días, alcanzando el pico máximo a las 12 h en ambas variedades (Figura 27C). Por otro lado, *SiGI2* presentó el máximo de expresión a los 20 días que luego disminuyó a los 30 días hasta un nivel similar al de 10 días (Figura 27D). A los 20 días, en K3 la expresión fue elevando gradualmente de 0 h a 12 h, mientras que en NEB esta expresión se disminuyó ligeramente a las 12 h. El nivel de expresión tanto de *SiGI1* como *SiGI2* fue similar en ambas variedades.

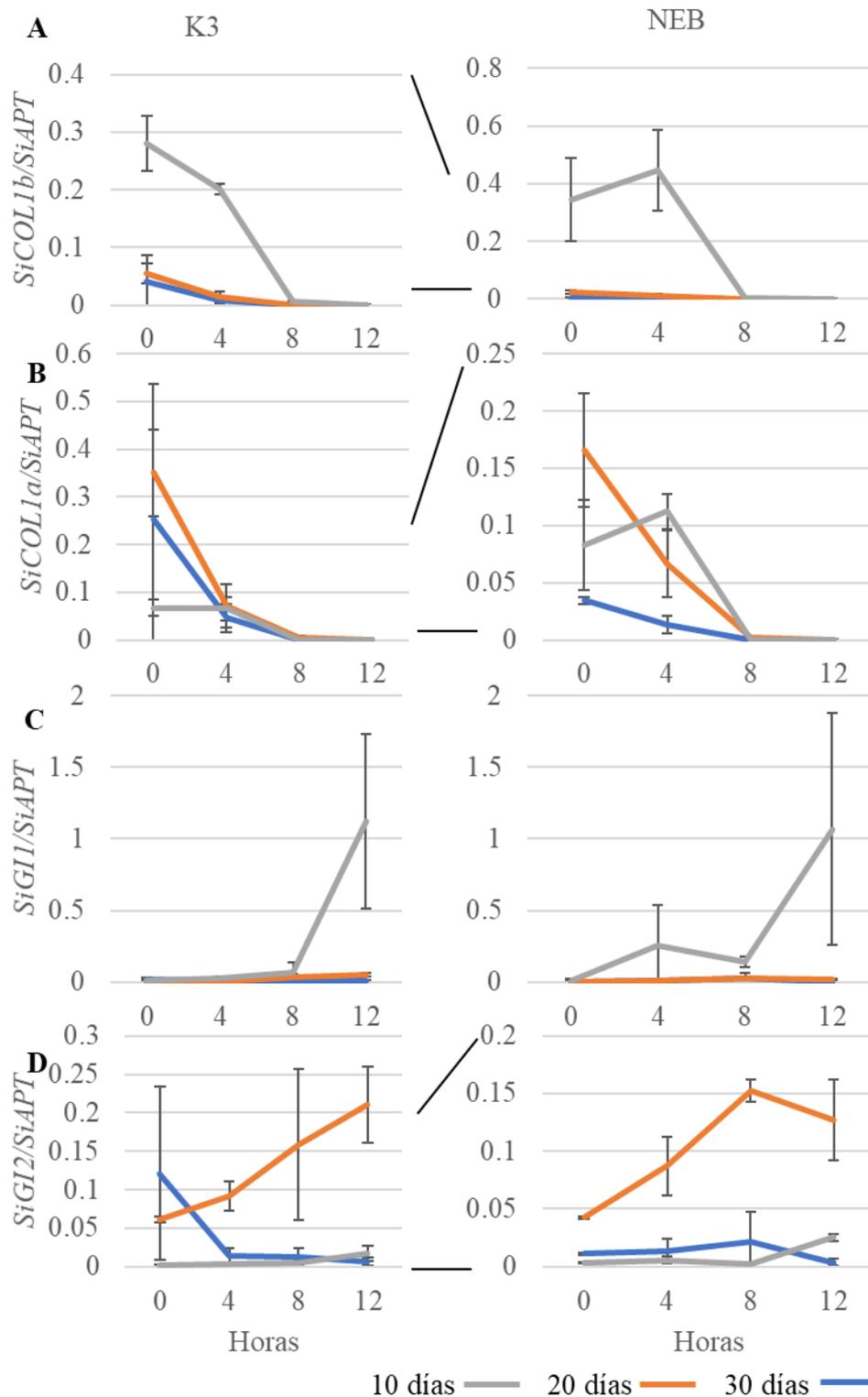


Figura 27. Niveles de expresión relativa de los probables reguladores de *SiFTLs* bajo fotoperiodo de 16/8. El análisis de expresión de A) *SiCOL1b*, B) *SiCOL1a*, C) *SiG11* y D) *SiG12* se realizó mediante la extracción de ARN de las hojas a los 10 (gris), 20 (naranja) y 30 días (azul) pos-emergencia de las variedades K3 (izquierda) y NEB (derecha). Se consideró como tiempo 0 al inicio de la fase de luz. Las muestras fueron colectadas cada 4 h hasta las 12 h, teniendo tres réplicas biológicas en cada punto. Para la normalización de los datos se utilizó el gen *SiAPT*.

4.5. Análisis de expresión de los genes componentes del reloj biológico

Con el fin de evaluar si la diferencia en la expresión de *SiFTLs*, *SiCOL1a* y *SiCOL1b* entre las variedades se debe o no a una alteración del ritmo circadiano, se procedió a analizar la expresión de los genes componentes del reloj biológico identificados en nuestro estudio previo (López et al., 2017). Considerando una fecha cercana a la floración en la variedad K3 y la observación de la diferencia en el nivel de expresión de los genes involucrados en la floración, se utilizaron muestras colectadas a los 20 días pos-emergencia en ambos fotoperiodos para el análisis.

Los genes que fueron seleccionados para el análisis son: *SiLHY*, *SiPRR7*, *SiPRR5s* y *SiTOC1s* que son los principales componentes del reloj biológico, y se evaluó la expresión entre 0 y 12 h en un intervalo de 4 h debido a que estos genes presentan su máxima expresión en ese intervalo de tiempo (López et al., 2017).

4.5.1. Análisis de expresión bajo fotoperiodos de 12/12

Bajo fotoperiodo de 12/12, la expresión del gen *SiLHY* presentó su máximo nivel a las 0 h (Figura 28A), con un nivel significativamente mayor en la variedad K3 respecto a NEB. En el caso del gen *SiPRR7* se observó un aumento de la expresión de 4 a 12 h, con una diferencia significativa a las 8 h entre las variedades (Figura 28B). El gen *SiPRR5a* presentó un patrón diferencial entre las variedades (Figura 28C). En la variedad K3 la expresión fue elevada (y significativa con respecto a NEB) a las 0 h y luego fue disminuyendo gradualmente hasta las 12 h. En cambio, la expresión en NEB se mantuvo casi constante de 0 a 8 h y luego disminuyó a las 12 h. El gen *SiPRR5b* presentó un aumento en la expresión de 8 a 12 h: a las 8 h la expresión fue significativamente elevada en NEB y luego esta relación se invierte, siendo la expresión significativamente mayor en K3 (Figura 28D). Con relación al gen *SiTOC1a* y *SiTOC1b*, se observó un aumento de expresión entre las 8 y 12 h, siendo el nivel de expresión muy parecida entre las variedades excepto en el gen *SiTOC1a* a las 8 h (Figura 28E y F).

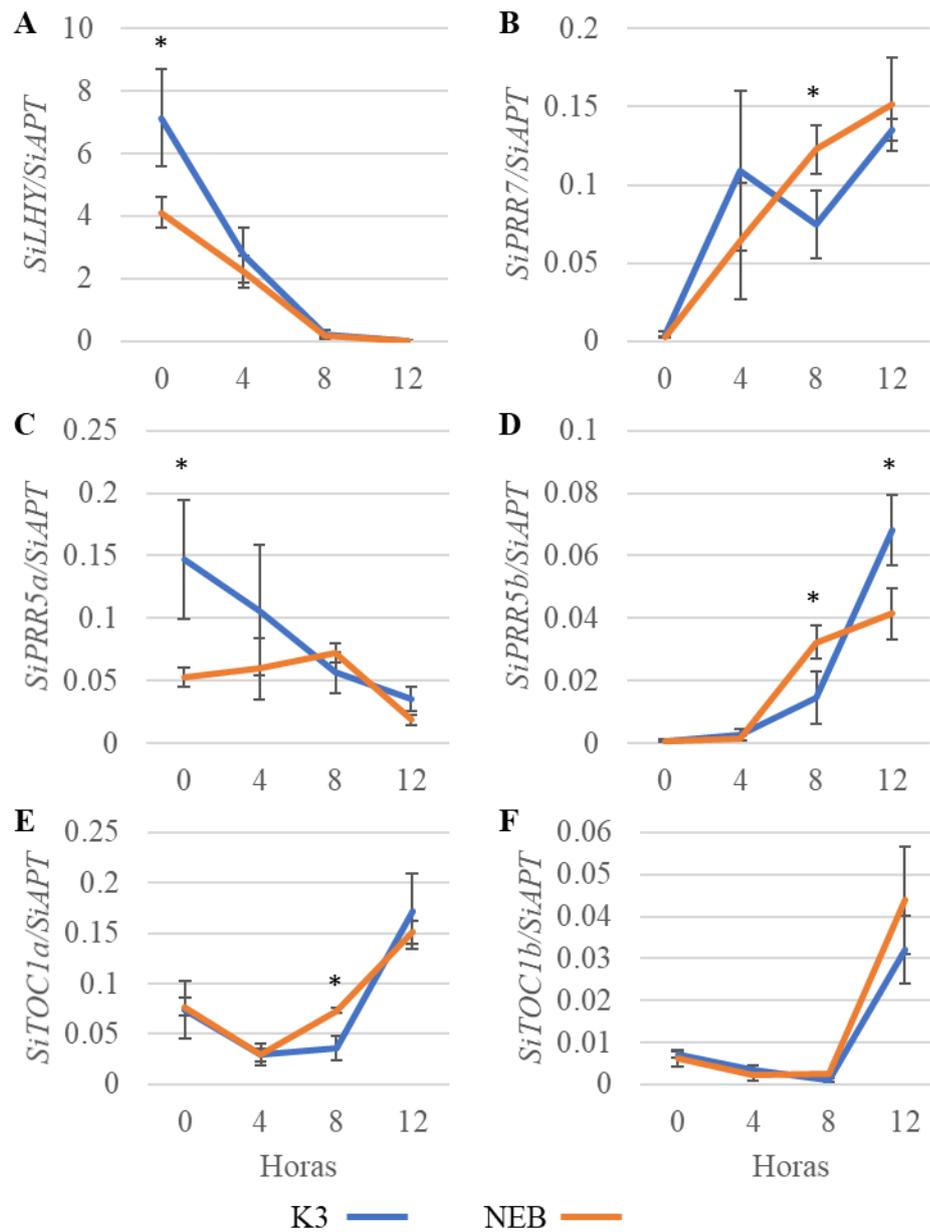


Figura 28. Niveles de expresión relativa de los genes componentes del reloj biológico bajo fotoperiodo de 12/12. El análisis de expresión de A) *SiLHY*, B) *SiPRR7*, C) *SiPRR5a*, D) *SiPRR5b* E) *SiTOC1a* y F) *SiTOC1b* se realizó mediante la extracción de ARN de las hojas a los 20 días pos-emergencia de las variedades K3 (azul) y NEB (naranja). Se consideró como tiempo 0 al inicio de la fase de luz. Las muestras fueron colectadas cada 4 h hasta las 12 h, teniendo tres réplicas biológicas en cada punto. La normalización del nivel de expresión de los genes fue realizada respecto al gen *SiAPT*.

4.5.2. Análisis de expresión bajo fotoperiodos de 16/8

Bajo fotoperiodo de 16/8, la expresión de *SiLHY* fue elevada entre las 0 y 4 h en ambas variedades sin evidenciar diferencias significativas entre ellas (Figura 29A). Este patrón de expresión fue ligeramente diferente con el de las plantas cultivadas en fotoperiodo de 12/12, donde la expresión de *SiLHY* se disminuyó a las 4 h. Otra diferencia entre fotoperiodos es el nivel de expresión, siendo alrededor de cuatro veces superior bajo fotoperiodo de 12/12.

En el caso de *SiPRR7*, el pico en ambas variedades fue entre las 8 y 12 h sin diferencias significativas entre ellas (Figura 29B). Con respecto a fotoperiodo de 12/12, se observa una disminución de la expresión a las 12 h en las plantas cultivadas bajo fotoperiodo de 16/8.

El gen *SiPRR5a* presentó un pico de expresión a las 8 h sin haber diferencias entre variedades (Figura 29C). Este patrón de expresión fue diferente a lo observado bajo fotoperiodo de 12/12, siendo esta diferencia en el patrón mucho mayor en la variedad K3 que en NEB.

En *SiPRR5b* se observa el pico de expresión a las 12 h en K3 y 8 h en NEB, habiendo diferencia significativa a las 12 h entre las variedades (Figura 29D). Con respecto al fotoperiodo de 12/12, en la variedad NEB se observó una disminución del nivel a las 12 h bajo fotoperiodo de 16/8.

En *SiTOC1a* se observó una expresión alta a las 0 h en ambas variedades, lo que difiere con respecto al fotoperiodo de 12/12 (Figura 29E). Este nivel disminuyó a las 4 h y luego aumentó ligeramente a las 8 h con un nivel significativamente mayor en NEB. En la variedad K3 se observó un aumento a las 12 h, mientras que en NEB la expresión fue similar a la de 8 h. En el caso de *SiTOC1b* el patrón de expresión fue similar al de las plantas cultivadas en fotoperiodo de 12/12, presentando mayor expresión a las 12 h en ambas variedades (Figura 29F).

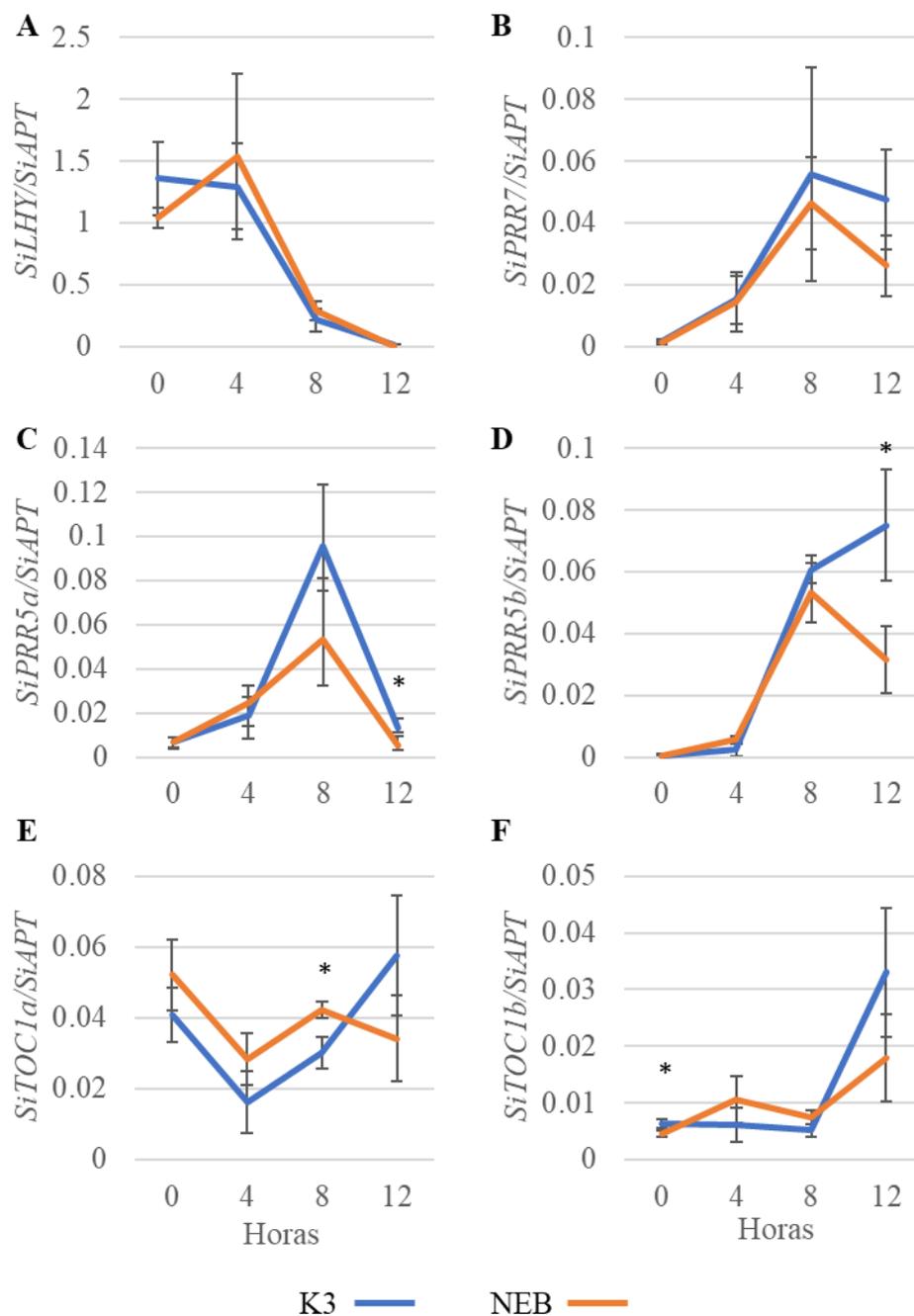


Figura 29. Niveles de expresión relativa de los genes componentes del reloj biológico bajo fotoperiodo de 16/8. El análisis de expresión de A) *SiLHY*, B) *SiPRR7*, C) *SiPRR5a* y D) *SiPRR5b* E) *SiTOC1a* y F) *SiTOC1b* se realizó mediante la extracción de ARN de las hojas a los 20 días pos-emergencia de las variedades K3 (azul) y NEB (naranja). Se consideró como tiempo 0 al inicio de la fase de luz. Las muestras fueron colectadas cada 4 h hasta las 12 h, teniendo tres réplicas biológicas en cada punto. La normalización del nivel de expresión de los genes fue realizada respecto al gen *SiAPT*.

4.6. Efecto de la interrupción nocturna sobre el tiempo de floración en las dos variedades

Otro factor que influye en la floración fotoperiódica en las plantas es la luz. En el caso de las plantas de días cortos, la deficiencia en la respuesta a la luz puede acelerar la floración (Ishikawa et al., 2005). Con el objeto de evaluar si la variedad K3 presenta alguna alteración en la respuesta a la luz, se estudió el efecto de la interrupción nocturna en el tiempo de floración. Para ello, se cultivaron las plantas bajo fotoperiodo de 12 h de luz, 5 h de oscuridad, 2 h de luz (interrupción nocturna) y 5 h de oscuridad. Si la variedad K3 presenta una respuesta normal, debe inhibir por completo la floración o al menos se debe observar un retraso en el tiempo de floración con respecto al fotoperiodo de 12/12.

En la variedad K3 la interrupción nocturna retrasó en forma significativa tanto el tiempo necesario desde la emergencia hasta la aparición del primer botón floral (Figura 30A) como el tiempo hasta la apertura de los pétalos (Figura 30B) con respecto al fotoperiodo de 12/12. Aunque se observó un ligero retraso con respecto al fotoperiodo de 16/8, la diferencia no fue significativa. En el caso de NEB, la interrupción nocturna retrasó significativamente ambos parámetros asociados a la floración con respecto al fotoperiodo de 12/12. Sin embargo, se observó un acortamiento significativo en el tiempo para la aparición de botón floral y un ligero acortamiento no significativo del tiempo para la apertura de los pétalos. Esta aceleración de la floración en NEB observada con la interrupción nocturna podría deberse a la activación de otras vías (ajenas a la vía del fotoperiodo) como la asociada a la edad debido a que esta variedad presentó signos de senescencia.

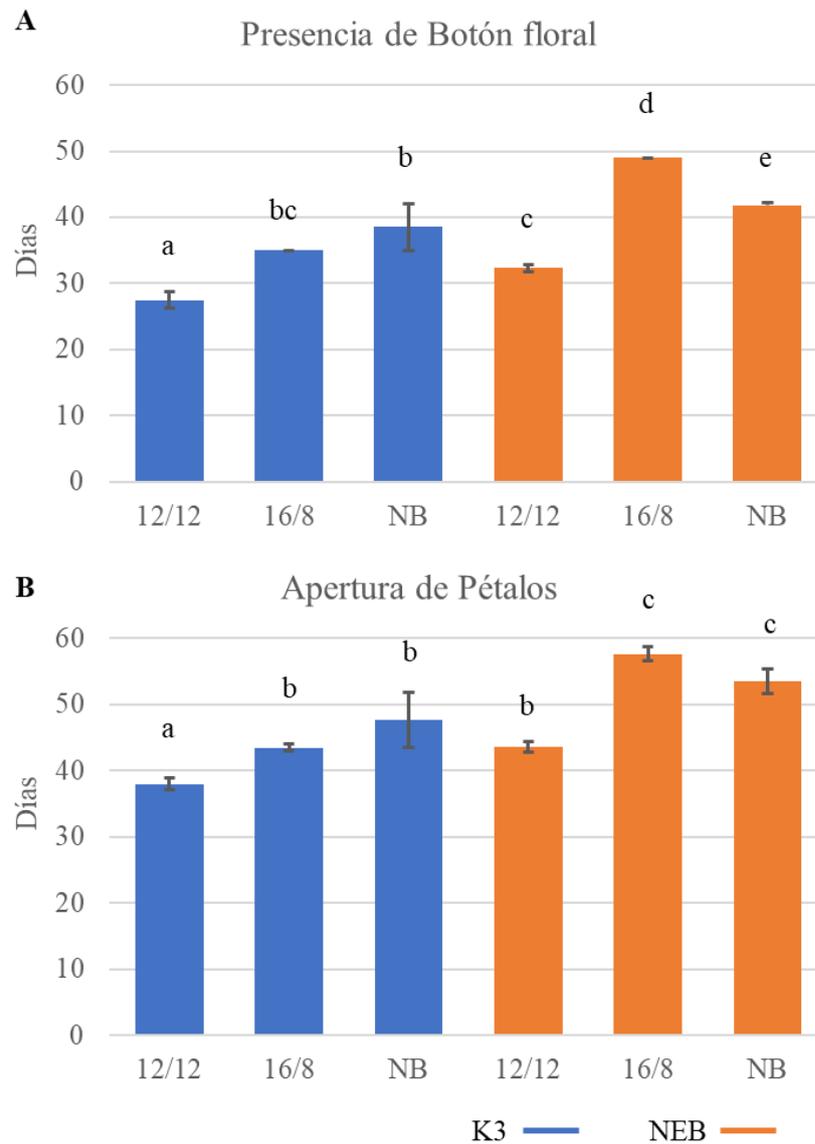


Figura 30. Efecto de la interrupción nocturna sobre el tiempo de floración. Días luego de la emergencia de la plántula para la A) aparición del primer botón floral y B) apertura del primer pétalo. El nivel de significancia fue evaluado mediante el análisis de varianza (ANOVA) con posterior test de comparación múltiple de Tukey-HSD ($p < 0,05$). Cada grupo consta de cinco individuos. 12/12: fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. 16/8: fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. NB: interrupción nocturna con un fotoperiodo de 12 h luz, 5 h oscuridad, 2 h luz y 5 h oscuridad.

5. Discusión

5.1. Origen probable de las múltiples copias de los genes *FT*, *CO* y *GI* de sésamo

Se han identificado múltiples copias de los genes implicados en la floración en el sésamo (López et al., 2017). La presencia de múltiples copias de genes es un hecho habitual en plantas (Blümel et al., 2015), que puede deberse a entrecruzamientos, transposones y la duplicación cromosómica o genómica (Jiao et al., 2012). Entre los eventos de duplicación, las duplicaciones en tándem ocurren con mayor frecuencia e involucran pequeñas regiones dentro del genoma (Hakes, Pinney, Lovell, Oliver, & Robertson, 2007). Después de la duplicación, estos genes pueden experimentar diferentes destinos evolutivos bajo presiones de selección diversificadas, incluida la de conservar la función, la subfuncionalización (Force et al., 1999; Stoltzfus, 1999), la neofuncionalización (Conant & Wolfe, 2008) y la pérdida de la función (J. A. Lee & Lupski, 2006). Por lo tanto, la duplicación de genes proporciona el material genético para la generación de nuevas funciones y una fuerza potenciadora de la evolución y adaptación a diferentes ambientes (Jiao et al., 2012).

La disponibilidad de genomas completos de diversas especies permite realizar análisis comparativo de todos los genes entre genomas de diferentes especies y dentro de cada genoma, y así reconstruir la historia evolutiva de cada gen.

En cuanto a las cuatro copias del gen *FT* presente en sésamo, los resultados del presente trabajo sugieren que el gen que dio origen a los ortólogos (el mismo gen en diferentes especies) de *SiFTL1* ya estuvo presente en el ancestro común de las Astéridas (Figura 31) debido a que el bloque genómico que contiene a *SiFTL1* presentó homología con las otras tres especies de Astéridas estudiadas. Por lo tanto, se puede considerar que *SiFTL1* es ancestral a las demás copias de *FT* de sésamo. *SiFTL4* probablemente se originó después de la separación del género *Olea* y antes de la separación de los géneros *Sesamum* y *Mimulus*. *SiFTL2* y *SiFTL3* se encuentran uno al lado del otro sobre el mismo cromosoma indicando que una de ellas se originó mediante la duplicación en tándem de la otra. Al parecer, estos dos genes son copias de *FT* únicas en el sésamo.

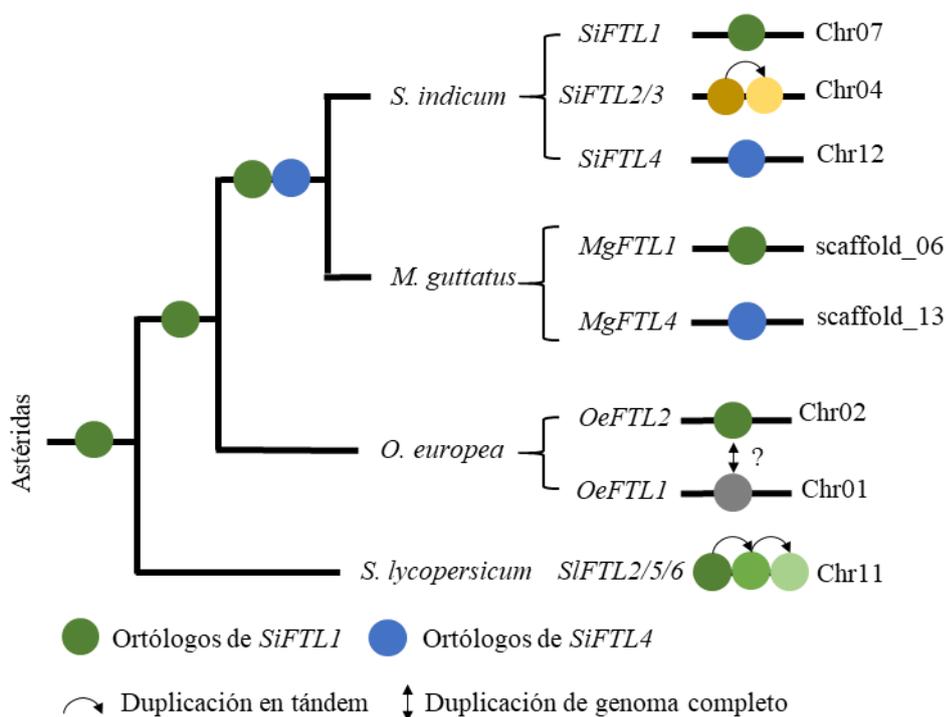


Figura 31. Modelo hipotético de la evolución de los genes *FT* en el sésamo y en las especies filogenéticamente relacionadas. Los ortólogos de *SiFTL1* están indicadas con círculos de color verde oscuro y los de *SiFTL4* con círculos azules. Las flechas curvas indican los probables eventos de duplicación en tándem y la flecha vertical indica el origen de la copia (círculo gris) mediante un evento probable de duplicación del genoma completo. *SiFTL2/3* probablemente son copias que se originaron únicamente en sésamo.

Con respecto al gen *CO*, el sésamo presenta dos copias del mismo, *SiCOL1a/SiCOL2* y *SiCOL1b/SiCOL1* (López et al., 2017; Zhou et al., 2018). Aunque estos dos genes se encuentran en cromosomas diferentes, los bloques genómicos que contienen dichos genes presentaron homología entre sí (Figura 16). Esto sugiere que una de ellas se originó mediante duplicación del genoma completo que ha ocurrido en sésamo (Figura 32). Tampoco se puede descartar la posibilidad de una duplicación segmentaria ya que puede involucrar hasta 200.000 nucleótidos (Samonte & Eichler, 2002; J. Zhang, 2003). De estas dos copias de sésamo, el bloque sinténico correspondiente a *SiCOL1a/SiCOL2* presentó una mayor conservación entre las especies analizadas. Por lo que es probable que este gen sea el ancestral y dio origen a *SiCOL1b/SiCOL1* en el sésamo.

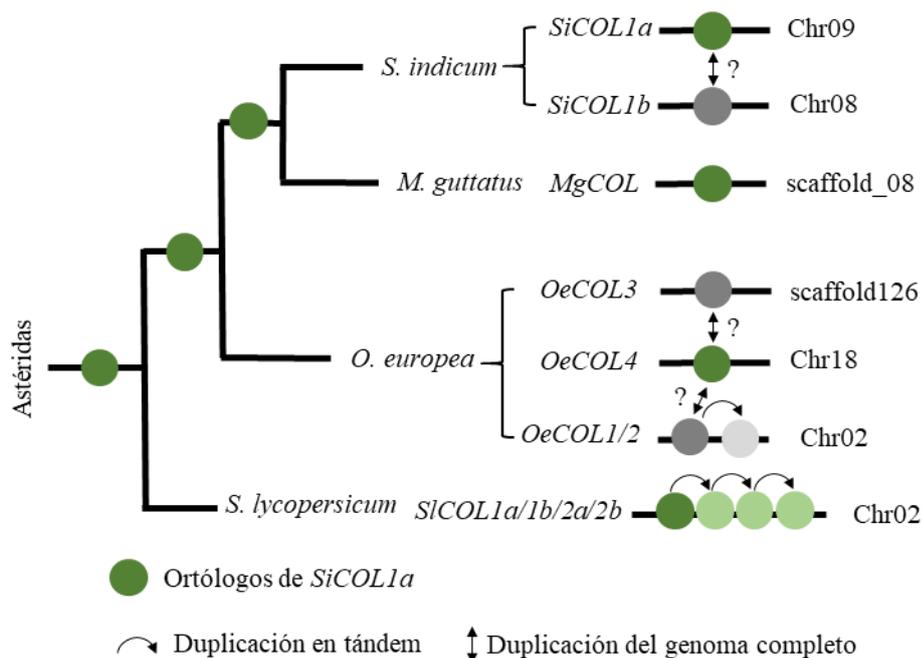


Figura 32. Modelo hipotético de la evolución de los genes COL en el sésamo y en las especies filogenéticamente relacionadas. Los círculos de color verde oscuro indican los ortólogos de *SiCOL1a/SiCOL2*. Las flechas curvas indican los probables eventos de duplicación en tándem y la flecha vertical indica el origen de la copia (círculo gris) mediante un evento probable de duplicación del genoma completo. *SiCOL1b* probablemente se originó mediante la duplicación del genoma completo que ocurrió en sésamo.

En cuanto a las copias de *GI*, ambos bloques genómicos del sésamo, que contienen a *SiGI1* y *SiGI2*, presentaron homología entre sí y con las dos copias presentes en *M. guttatus*. Por lo que ambas copias probablemente estuvieron presentes en el ancestro común de *Sesamum* y *Mimulus*. Sin embargo, no se encontraron similitud con los bloques genómicos de las demás especies estudiadas, probablemente debido a reordenamientos cromosómicos que sufrieron los bloques que contienen a estos genes. Por lo que no fue posible identificar cuál de las dos copias de *GI* de sésamo es el ancestral.

5.2. *SiFTL1* es el principal inductor floral y *SiFTL4* es un probable represor floral

Se conoce que el sésamo es una planta de días cortos facultativo, es decir, la exposición bajo fotoperiodos de días cortos es un factor que acelera la floración, sin embargo, no es indispensable para que florezca. Bajo fotoperiodos de 8 h de luz y 16 h de oscuridad, casi no se observan diferencias en el tiempo de floración entre las variedades de sésamo (Suddihyam, Steer, & Turner, 1992), incluyendo las

variedades K3 y NEB (Alvarenga, Sotelo, & Iehisa, 2020) utilizadas en el presente trabajo. Sin embargo, cuando la duración de la fase de luz supera 12 h se observa una diferencia significativa en el tiempo de floración entre las variedades (Tabla 5; Suddhiyam et al., 1992).

Se ha propuesto que el sésamo fue domesticado en India (Bedigian, 2003; N. Pathak, Bhaduri, Bhat, & Rai, 2015), indicando que la hora de luz máxima en su hábitat natural en el lugar de origen es alrededor de 13 a 14 h de luz (solsticio de verano). Por lo tanto, el fotoperiodo de 12/12 se acerca más a la condición de su hábitat original y el fotoperiodo de 16/8 sería una condición no muy común para esta especie. Considerando esto, la discusión se centra en los resultados obtenidos bajo fotoperiodo de 12/12.

El análisis de expresión de los genes *SiFTLs* utilizando las variedades K3 (floración temprana) y NEB (floración tardía) sugiere que *SiFTL1/SiFT*, el ancestral de las cuatro copias de *FT* de sésamo, es el principal inductor de la floración. Esto se debe a que, bajo fotoperiodo de 12/12, su expresión aumenta un poco antes de la aparición de botones florales y luego disminuye (Figura 24A; Tabla 5). Esta disminución del nivel de los inductores florales luego de la transición del estado vegetativo al reproductivo fueron también observados en otras plantas como arroz (Kojima et al., 2002), soja (Kong et al., 2010) y *Arabidopsis* (Yasushi Kobayashi, Hidetaka Kaya, Koji Goto, Masaki Iwabuchi, Araki, 1999). Además, el nivel de expresión de *SiFTL1* fue superior a las demás copias del gen *SiFTL* y superior en la variedad de floración temprana K3 (Figura 24). Sumado a estos, bajo fotoperiodo de 16/8 (poco común al sésamo) *SiFTL1* fue el único que presentó una alta expresión entre los genes *SiFTLs* (Figura 26), aunque fue menor que en el fotoperiodo de 12/12. Al igual que en fotoperiodo de 12/12, la variedad de floración temprana presentó mayor expresión de *SiFTL1* que la de floración tardía. Se desconoce si otras vías de inducción floral como la asociada a la edad o a la fitohormona giberelina presenta mayor efecto bajo fotoperiodo de 16/8 en sésamo.

Con respecto a *SiFTL2*, su aumento en el nivel de expresión durante la transición al estado reproductivo bajo fotoperiodo de 12/12 en K3 (Figura 24B) y bajo 8 h de luz/16 h de oscuridad en la variedad NEB (Alvarenga et al., 2020) sugiere que podría actuar en forma redundante con *SiFTL1* para la inducción de la floración. No se

puede descartar su rol en otros procesos que acompañan a la floración. Por otro lado, el nivel extremadamente bajo de *SiFTL3* (Figura 24D; Alvarenga et al., 2020) sugiere que éste pudo haber sufrido una neofuncionalización o subfuncionalización y que se encuentre cumpliendo otras funciones independientes a la regulación de la floración.

No obstante, *SiFTL4* podría estar funcionando como represor de la floración ya que inicialmente presenta una elevada expresión que luego disminuye a medida que se acerca a la transición del estado vegetativo a reproductivo (Figura 24D). Este cambio de función, del inductor al represor, en una o varias de las copias de *FT* fueron también observados en soja (*GmFTL4a* y *4b*) (Zhai et al., 2014), tabaco (*NtFTI*, 2 y 3) (Harig et al., 2012) y en orquídeas (*MonFT1A* y *MonFT1B*) (Ospina-Zapata, Madrigal, Alzate, & Pabón-Mora, 2020). Aunque el nivel de *SiFTL4* fue superior en la variedad K3 que en NEB a los 10 días pos-emergencia bajo fotoperiodo de 12/12, la relación del nivel de *SiFTL1/SiFTL4* fue menor en NEB (0,04) que en K3 (0,21) indicando una mayor represión de la floración en NEB. Además, la relación *SiFTL1/SiFTL4* a los 20 días pos-emergencia fue superior en K3 (479,02) que en NEB (15,49) lo que concuerda con la diferencia en el fenotipo observado entre las dos variedades.

5.3. *SiCOL1a/SiCOL2* es un probable inductor de la floración mientras que *SiCOL1b/SiCOL1* un represor

En cuanto a los genes *SiCOL1a/SiCOL2* y *SiCOL1b/SiCOL1*, ambos podrían ser reguladores de los *SiFTLs*, debido a que su expresión coincide, al menos en parte, con la expresión de los genes *SiFTLs*. Bajo fotoperiodo de 12/12, *SiCOL1a/SiCOL2* presentó mayor similitud con el patrón de expresión de *SiFTL1/SiFT* a los 20 y 30 días pos-emergencia (Figura 25A). Es decir, expresión elevada a los 20 días y luego disminuye a los 30 días, y el nivel es mayor en la variedad de floración temprana. Esto indica que *SiCOL1a/SiCOL2*, la copia ancestral de *CO* en sésamo, podría actuar como inductor de *SiFTLs* (Figura 33A). Sin embargo, *SiCOL1a/SiCOL2* es expresado también a los 10 días pos-emergencia, momento en el cual *SiFTL1/SiFT* y *SiFTL2* presentan baja expresión. Esto podría deberse a la expresión de *SiCOL1b/SiCOL1* que, según los resultados del presente trabajo sugiere una

participación como represor floral debido a que: 1) su expresión es alta a los 10 días pos-emergencia y disminuye cuando ocurre la inducción floral, y 2) concuerda con el patrón de expresión de *SiFTL4* que podría estar actuando como represor floral. Por lo tanto, *SiCOL1b/SiCOL1* podría actuar como represor floral induciendo la expresión de *SiFTL4* y reprimiendo a *SiFTL1* y *SiFTL2* (Figura 33A). La disminución de la expresión de *SiCOL1a/SiCOL2* y *SiCOL1b/SiCOL1* luego de la inducción floral coincide con el reporte de Zhou y cols. (Zhou et al., 2018). Sin embargo, dichos autores sugieren a *SiCOL1b/SiCOL1* como inductor de *SiFTL1/SiFT* y no como un represor floral con base a: 1) la sobre-expresión de *SiCOL1b/SiCOL1* en *A. thaliana* hace florecer dos días más rápido que las plantas con *SiCOL1a/SiCOL2* sobre-expresados; 2) *SiCOL1a* solamente contiene un dominio B-box en vez de dos como suelen tener los genes *CO* típicos; y 3) el patrón de expresión de *SiCOL1a/SiCOL2* no coincide con el de *SiFTL1/SiFT* bajo fotoperiodo de 9 h de luz/15 h de oscuridad en una de las dos variedades analizadas. Con respecto a la sobre-expresión de genes *CO* en *A. thaliana*, existen antecedentes en soja donde la sobre-expresión de *GmCOL1a* y *GmCOL1b* pudieron suplir la función de *CO* en *Arabidopsis* (Wu et al., 2014). Sin embargo, cuando sobre-expresaron en soja actuaron como represores florales y no como inductores (D. Cao et al., 2015; Wu et al., 2019). Por lo que se sugiere sobre-expresar o silenciar los genes *SiCOL1a/SiCOL2* y *SiCOL1b/SiCOL1* en el propio sésamo (y no en *A. thaliana*) para dilucidar su función en esta planta y el impacto de pérdida de un dominio B-box en *SiCOL1a/SiCOL2* sobre la inducción de la floración. Además, Zhou y cols. encontraron variedades de sésamo que no expresan *SiCOL1b/SiCOL1* debido a varias mutaciones en su promotor y dichas variedades presentaron floración temprana bajo fotoperiodo de 14 h luz/10 h oscuridad (Zhou et al., 2018). Esto sugiere también que *SiCOL1b/SiCOL1* es un represor y no un inductor de la floración. Los resultados del presente trabajo y de los trabajos previos (Alvarenga et al., 2020; Zhou et al., 2018) sugieren que además de *SiCOL1a/SiCOL2* se requiere(n) otro(s) factor(es) para la inducción de *SiFTL1/SiFT* y *SiFTL2*. Este factor o estos factores podrían suplir la pérdida de un dominio B-box de *SiCOL1a/SiCOL2*.

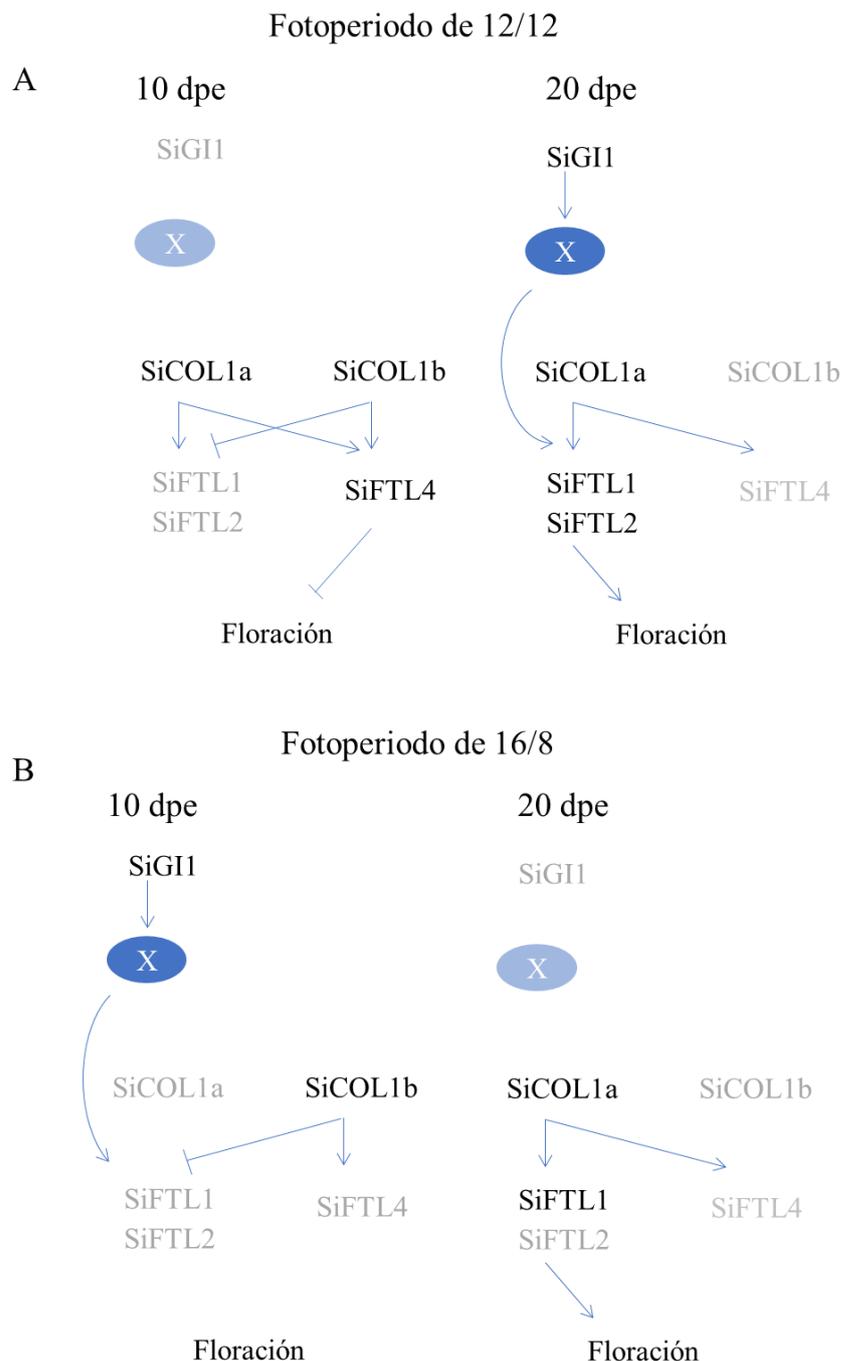


Figura 33. Propuesta de modelo para el control fotoperiódico de la floración del sésamo bajo condiciones de 12/12 y 16/8. A) bajo fotoperiodo de 12/12: a los 10 días pos-emergencia (dpe) (panel izquierdo) SiCOL1b/SiCOL1 actúa como represor de *SiFTL1/SiFT2* y *SiFTL4*, y probablemente junto con SiCOL1a/SiCOL2 induce la expresión de *SiFTL4*; resultando en la represión de la floración. A los 20 dpe (panel derecho), SiCOL1a/SiCOL2 y probablemente junto con un factor (X) regulador por SiGI1 inducen la expresión de *SiFTL1* y *SiFTL2*; resultando en la inducción de la floración. B) bajo fotoperiodo de 16/8: a los 10 dpe (panel izquierdo) SiCOL1b/SiCOL1 reprime la expresión de *SiFTL1/SiFT2* y *SiFTL2*. *SiFTL4* no se expresa probablemente debido a la baja expresión de *SiCOL1a/SiCOL2*. A los 20 dpe, SiCOL1a/SiCOL2 induce la expresión de *SiFTL1*. Sin embargo, la expresión de este último es menor que en 12/12, lo que podría explicar la floración tardía bajo este fotoperiodo.

Tanto para *SiCOL1a* y *SiCOL1b* presentan el pico de expresión solo por la mañana, que no coincide con el patrón de expresión de *CO* de *Arabidopsis* (Ledger, Strayer, Ashton, Kay, & Putterill, 2001). El patrón de expresión son más similares a *AtCOL1* y *AtCOL2* que presentan un pico de expresión solamente al amanecer (Ledger et al., 2001). Además, las dos proteínas de sésamo presentaron mayor homología con *AtCOL2* (López et al., 2017). Se han identificado patrones de expresión diurna similares a *SiCOL1a* y *SiCOL1b* en homólogos cercanos de *CO* de muchas plantas dicotiledóneas, incluida *Glycine max*, *Fragaria vesca*, *Pharbitis nil*, *S. tuberosum*, y *Vitis vinifera* (Almada, Cabrera, Casaretto, Ruiz-Lara, & Villanueva, 2009; D. Cao et al., 2015; González-Schain, Díaz-Mendoza, Zurczak, & Suárez-López, 2012; Kurokura, Samad, Koskela, Mouhu, & Hytönen, 2017; Ledger et al., 2001; J. Liu et al., 2001).

En cuanto al fotoperiodo de 16/8, el nivel de *SiCOL1a/SiCOL2* fue menor que en el fotoperiodo de 12/12 (Figuras 25B y 27B) mientras que el patrón de expresión de *SiCOL1b/SiCOL1* fue similar al de 12/12 (Figuras 25A y 27A). A pesar de la alta expresión de este último a los 10 días pos-emergencia, se observó una expresión muy baja de *SiFTL4* (Figura 26D). Esto podría indicar que para la inducción de *SiFTL4* se requiere la participación tanto de *SiCOL1a* como *SiCOL1b* en ambos fotoperiodos estudiados en el presente trabajo (Figura 33).

5.4. Posibles roles de *SiGII* y *SiGI2* en la regulación de la floración

Tanto los resultados obtenidos bajo condiciones de 12/12 como 16/8 sugieren que *SiGIs* no están implicados en la regulación de la expresión de *SiCOL1a* y *SiCOL1b*. En el caso de *SiGII*, bajo condiciones de 12/12 presentó una expresión elevada solamente a los 20 días pos-emergencia (Figura 25C), no pudiendo asociarse con el incremento de la expresión de *SICOL1a* y *SiCOL1b* a los 10 días (Figuras 25A y 25B). Mientras que bajo condiciones de 16/8, el patrón de expresión de *SiGII* no coincide con el patrón de las dos copias de *CO* a los 20 días pos-emergencia (Figuras 27A-C). Esto ocurre lo mismo con *SiGI2*, donde su expresión no coincide con la de *SiCOL1a* a los 10 días bajo fotoperiodo de 12/12 (Figuras 25B y 25D) y con la de *SiCOL1b* a los 10 días bajo fotoperiodo de 16/8 (Figuras 27A y 27D). Sin embargo,

no se puede descartar la posibilidad de que *SiGII* y *SiGI2* actúan sobre un factor común que a su vez regula la expresión de *SiCOL1a* y *SiCOL1b*.

Con respecto a la posibilidad de la regulación de *SiFTLs* a través de una vía paralela a la de *SiCOL1a* y *SiCOL1b*, el patrón de *SiGII* coincide con el aumento de *SiFTL1* a los 20 días bajo fotoperiodo de 12/12 (Figuras 24A y 25C). Sin embargo, la expresión de *SiGII* no se puede asociar a la expresión de *SiFTL1* bajo fotoperiodo de 16/8 (Figuras 26A y 27C). Una posibilidad es que el factor que complementa la función de *SiCOL1a/SiCOL2* es un factor regulado por *SiGII* (Figura 33), es decir, tanto *SiCOL1a/SiCOL2* como el factor regulado por *SiGII* deben estar presentes para la inducción de *SiFTL1*. Por otro lado, la expresión de *SiGI2* coincide con la de *SiFTL4* a los 10 días bajo fotoperiodo de 12/12 (Figuras 24D y 25D), pero no así bajo condiciones de 16/8 (Figuras 26D y 27D). En el caso de la inducción de *SiFTL4*, la acción combinada de *SiCOL1a* y *SiCOL1b* podría ser suficiente pero no se puede descartar la posibilidad de la participación de otro factor regulado por *SiGI2*.

En el caso del arroz y *Arabidopsis*, los homólogos de *GI* regulan directamente a los homólogos de *CO* (David et al., 2006). Sin embargo, en el caso de la soja el homólogo de *GI* al parecer no regula a los homólogos de *CO* (Watanabe, Harada, & Abe, 2012). Por lo que la regulación en sésamo podría ser semejante a la de soja, más que las de arroz y *Arabidopsis*. Si bien en especies como *Arabidopsis*, *GI* actúa regulando positivamente la expresión de *CO* (Sawa et al., 2007) y en otras especies como arroz y soja actuando como represores de *CO* (Izawa et al., 2011; F. Li et al., 2013; Mishra & Panigrahi, 2015). Para aclarar la función de las copias de *GI* en el sésamo se necesitaría sobre-expresarlos o silenciarlos para analizar su efecto sobre la floración.

Con respecto a la diferencia entre las variedades de sésamo analizadas, no se observó una diferencia en los niveles de expresión de *SiGII* y *SiGI2*. Por lo que no se puede explicar, al menos en base a su nivel de expresión, la diferencia fenotípica de las dos variedades.

5.5. Alteración en el reloj biológico podría estar asociada a la diferencia en el tiempo de floración en sésamo

Debido a que se evidenció una diferencia en el nivel de expresión de *SiCOL1a/SiCOL2* y *SiCOL1b/SiCOL1* entre las variedades K3 y NEB, y debido a que estos genes presentan un patrón de expresión circadiana, se analizó la expresión de los genes componentes del reloj biológico en estas variedades para conocer si la alteración en el nivel de expresión de *SiCOL1a* y *SiCOL1b* se debe a alguna alteración en el reloj biológico. En especies como *A. thaliana*, arroz y otras se conoce que la expresión circadiana de los genes *CO* se encuentra regulada por el reloj biológico (Griffiths, Dunford, Coupland, & Laurie, 2003; Nemoto, Kisaka, Fuse, Yano, & Ogihara, 2003; Shin et al., 2003; Suárez et al., 2001).

El patrón de expresión de *SiLHY* bajo fotoperiodo de 12/12 coincide con los genes *LHY* y *CCA1* de *Arabidopsis* y *OsLHY* de arroz (Nakamichi et al., 2010; Yoshitake et al., 2015). El nivel máximo de expresión de *SiPRR7* se encuentra un poco desplazado hacia las horas de la tarde en comparación con sus ortólogos de *Arabidopsis* (*AtPRR7*) y arroz (*OsPRR73* y *OsPRR37*) (Matsushika, Makino, Kojima, & Mizuno, 2000; Yoshitake et al., 2015). El patrón de expresión de *SiPRR5a* fue más similar al de *AtPRR9* de *Arabidopsis* (Matsushika et al., 2000). *SiPRR5b* presentó un patrón de expresión parecido a sus homólogos *AtPRR5* y *OsPRR95* (Matsushika et al., 2000; Yoshitake et al., 2015). Cabe mencionar que *SiPRR5a*, *SiPRR5b*, *AtPRR5*, *AtPRR9* y *OsPRR95* fueron originados de un gen ancestral común (López et al., 2017; Takata, Saito, Saito, & Uemura, 2010). Los genes *SiTOC1a* y *SiTOC1b* se encontraron con el máximo nivel de expresión a las 12 h de manera semejante a sus ortólogos *AtTOC1* y *OsPRR1* (Matsushika et al., 2000; Yoshitake et al., 2015).

Bajo fotoperiodos de 12/12, los genes *SiLHY*, *SiPRR7*, *SiPRR5a* y *SiPRR5b* presentaron una expresión diferencial entre las variedades (Figura 28); de los cuales *SiLHY* y *SiPRR5a* presentaron niveles notablemente superiores en la variedad K3 que en NEB. Esto sugiere que la alteración en el reloj biológico es el causante de la diferencia en el tiempo de floración entre las variedades analizadas. De hecho, la alta expresión de *SiLHY* y *SiPRR5a* en K3 coincide con la alta expresión de *SiCOL1a/SiCOL2* y *SiFTL1/SiFT*; que bajo fotoperiodos de 16/8, la expresión de

SiLHY y *SiPRR5a* es similar entre las dos variedades y el nivel tanto de *SiCOL1a/SiCOL2* como el de *SiFTL1/SiFT* es menor en K3 comparados a los de fotoperiodo de 12/12.

Tanto *SiLHY* como *SiPRR5a* no parecen ser el gen causante de la variación en el tiempo de floración debido a que, a los 20 días pos-emergencia el nivel de *SiCOL1a/SiCOL2* baja drásticamente a las 4 h (Figura 25B y 27B) mientras que *SiLHY* aún mantiene un nivel relativamente alto bajo condiciones de 12/12 (Figura 28A) o un nivel elevado bajo condiciones de 16/8 (Figura 29A). En forma similar, no se puede explicar el patrón de *SiCOL1a/SiCOL2* con el patrón de expresión de *SiPRR5a* (Figuras 28C y 29C), es decir, este último tampoco es un regulador de la expresión de *SiCOL1a*. Estos resultados sugieren que *SiCOL1a/SiCOL2*, *SiLHY* y *SiPRR5a* podrían estar regulados por un mismo factor, el gen causante de la variación en el tiempo de floración, ya sea en forma directa o indirecta.

La diferencia en la expresión de los genes componentes del reloj entre las variedades es más notable bajo condiciones de 12/12 que bajo 16/8, lo que podría sugerir que el gen causante es un gen que se expresa durante la fase de la oscuridad (noche) o que se expresa durante la fase de la luz y que tiene efecto durante la fase de la oscuridad. Uno de los genes que cumple esta última condición podría ser *SiGII* debido a que en *Arabidopsis* *GI* controla el reloj biológico actuando indirectamente sobre el control de la expresión de *AtTOC1* (y por ende *AtLHY* y *AtCCA1*) (Huang et al., 2012; K. Lee et al., 2005). Además, en varias especies vegetales fueron observados que las mutaciones en los homólogos de *GI* causan alteración en el tiempo de floración (Mishra & Panigrahi, 2015). Así mismo, un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) sobre el gen *SiGII* fue asociado a la variación en el tiempo de floración en un estudio de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés *Genome wide association study*) utilizando 705 genotipos de sésamo (Wei et al., 2015). Aunque se haya asociado el SNP (o el gen) con la variación fenotípica, los resultados de GWAS deben ser validados o confirmados mediante transgénesis o cartografía genética (mapeo de genes) utilizando una población F₂ o una población más avanzada obtenida cruzando dos variedades con fenotipo contrastante. Esto se debe a que el SNP (o el gen) asociado al fenotipo no cumple ninguna función relacionada al fenotipo y que en realidad está estrechamente ligado (ubicado muy

cerca en el genoma) al gen causante real. Por lo tanto, el gen *SiGII* podría ser un fuerte candidato que causa la diferencia en el tiempo de floración entre las variedades K3 y NEB. Debido a que su nivel de expresión fue similar entre las dos variedades (Figuras 25C y 27C), la causa podría ser una mutación en el gen que altera la función normal de *SiGII*. Se requiere estudios adicionales para verificar esta hipótesis.

5.6. La vía de la luz no está implicada en la diferencia en el tiempo de floración de las dos variedades analizadas

Se ha reportado que la alteración de la vía de la luz, principalmente en los fitocromos (receptores de luz roja/roja lejana) afecta al tiempo de floración (K. Cao et al., 2016; Ishikawa et al., 2005; Pearce et al., 2017; Reed, Nagatani, Elich, Fagan, & Chory, 1994). El análisis del efecto de la interrupción nocturna en el tiempo de floración ha comprobado que la vía de la luz no se encuentra alterada en las dos variedades analizadas debido a que se observaron retrasos en el tiempo de floración (Figura 30).

En el caso de la variedad NEB, la interrupción nocturna indujo un retraso en el tiempo de floración con respecto al de fotoperiodo de 12/12 pero se observó un ligero acortamiento con respecto al de 16/8. Suddhiyam y cols. han reportado que existen variedades de sésamo con tiempo de floración menor bajo fotoperiodo de 15 h luz/9 h oscuridad comparado con el de fotoperiodo de 13 h luz/11 h luz (Suddhiyam et al., 1992). Es decir, aceleración de la floración en fotoperiodos de días largos a pesar de ser una planta de días cortos. Esto podría deberse a la activación de otras vías, como por ejemplo la relacionada a la edad que acelera la floración (Simpson & Dean, 2002).

6. Conclusión

En este trabajo se identificó a *SiFTL1/SiFT*, la copia ancestral de *FT* en sésamo, como el principal inductor de la floración en el sésamo. *SiFTL2* también podría estar funcionando como inductor floral, mientras que *SiFTL4* es un probable represor floral.

SiCOL1a/SiCOL2, probable copia ancestral de *CO* en sésamo, al parecer actúa como inductor de *SiFTL1/SiFT*, mientras que *SiCOL1b/SiCOL1* es un probable represor floral.

SiGII probablemente actúa en forma conjunta con *SiCOL1a/SiCOL2* para la inducción de *SiFTL1/SiFT*. Sin embargo, no se pudo conocer la función de *SiGI2* con los datos obtenidos en el presente trabajo.

La alta expresión de *SiFTL1/SiFT* y *SiCOL1a/SiCOL2* en la variedad de floración temprana K3 se debe principalmente a la alteración en el reloj biológico y no a una alteración en la respuesta a la luz.

7. Referencias Bibliográficas

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Yasufumi, D., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., ... Araki, T. (2005). FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex. *Science*, 309(5737), 1052–1056.
- Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M. J., Harmon, F. G., Más, P., & Kay, S. A. (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science*, 293(5531), 880–883.
- Almada, R., Cabrera, N., Casaretto, J. A., Ruiz-Lara, S., & Villanueva, E. G. (2009). VvCO and VvCOL1, two CONSTANS homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds. *Plant Cell Reports*, 28(8), 1193–1203.
- Alvarenga, N., Sotelo, P. H., & Iehisa, J. C. M. (2020). *Evaluación del efecto del fotoperiodo sobre el tiempo de floración y niveles de expresión de posibles inductores florales en dos genotipos de sésamo.*
- An, H., Roussot, C., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Piñeiro, M., ... Coupland, G. (2004). CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development*, 131(15), 3615–3626.
- Ayala Aguilera, L., Barrios, L. R., Borsy, P., Delgado, V., Florentin, M., Gadea, R., ... Talavera, N. (2010). Una orientación para técnicos y productores Una orientación para técnicos y productores. *Proyecto Manejo Sostenible de Recursos Naturales.*
- Bedigian, D. (2003). Evolution of sesame revisited: Domestication, diversity and prospects. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(7), 779–787.
- Bedigian, D. (2004). History and Lore of Sesame in Southwest Asia. *Economic Botany*, 58(3), 330–353.
- Bedigian, D. (2010a). Characterization of sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm: A critique. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57(5), 641–647.
- Bedigian, D. (2010b). *Sesame. The genus Sesamum* (1st Editio).
- Ben-Naim, O., Eshed, R., Parnis, A., Teper-Bamnolker, P., Shalit, A., Coupland, G., ... Lifschitz, E. (2006). The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant Journal*, 46(3), 462–476.

- Blümel, M., Dally, N., & Jung, C. (2015). Flowering time regulation in crops-what did we learn from Arabidopsis? *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 121–129.
- Bünning, E. (1960). Biological clocks. Cold Spring Harb. *Quant. Biol*, 25, 1–9.
- Buzzell, R. I. (1971). *F' LUORESCENT-DAYLENGTH CONDITIONS*. 703–707.
- Buzzell, R. I., & Voldeng, H. D. (1980). Inheritance of Insensitivity to Long Daylength. *Soybean Genetics Newsletter*, 7, 26–29.
- Cao, D., Li, Y., Lu, S., Wang, J., Nan, H., Li, X., ... Kong, F. (2015). GmCOL1a and GmCOL1b function as flowering repressor in soybean under long-day conditions. *Plant and Cell Physiology*.
- Cao, K., Cui, L., Ye, L., Zhou, X., Bao, E., & Zhao, H. (2016). Effects of Red Light Night Break Treatment on Growth and Flowering of Tomato Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(April), 1–8.
- CAPEXSE. (2019). Sésamo. Recuperado de <http://www.capexse.org.py/>
- Chen, P. R., Chien, K. L., Su, T. C., Chang, C. J., Liu, T. L., Cheng, H., & Tsai, C. (2005). Dietary sesame reduces serum cholesterol and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolemia. *Nutrition Research*, 25(6), 559–567.
- Chow, B. Y., Helfer, A., Nusinow, D. A., & Kay, S. A. (2012). ELF3 recruitment to the PRR9 promoter requires other Evening Complex members in the Arabidopsis circadian clock . *Plant Signaling & Behavior*, 7(2), 170–173.
- Cober, E. R., Tanner, J. W., & Voldeng, H. D. (1996). Genetic control of photoperiod response in early-maturing, near- isogenic soybean lines. *Crop Science*, 36(3), 601–605.
- Conant, G. C., & Wolfe, K. H. (2008). Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Reviews Genetics*, 9(12), 938–950.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., ... Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science*, 316(5827), 1030–1033.
- David, K. M., Armbruster, U., Tama, N., & Putterill, J. (2006). Arabidopsis GIGANTEA protein is post-transcriptionally regulated by light and dark. *FEBS Letters*, 580(5), 1193–1197.
- Doi, K., Izawa, T., Fuse, T., Yamanouchi, U., Kubo, T., Shimatani, Z., ...

- Yoshimura, A. (2004). Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1. *Genes and Development*, *18*(8), 926–936.
- Doyle, M. R., Davis, S. J., Bastow, R. M., McWatters, H. G., Kozma-Bognár, L., Nagy, F., & Millar, A. J. (2002). The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, *419*(6902), 74–77.
- Doyle, M., Sung, S.-B., & Amasino, R. (2002). The Genetic Control of Flowering Time. *Annual Plant Reviews*, *6*, 35–64.
- Farre, E. M., Harmer, S. L., Harmon, F. G., Yanovsky, M. J., & Kay, S. A. (2005). Overlapping and Distinct Roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Current Biology*, *15*, 47–54.
- Fishman, L., Willis, J. H., Wu, C. A., & Lee, Y. W. (2014). Comparative linkage maps suggest that fission, not polyploidy, underlies near-doubling of chromosome number within monkeyflowers (*Mimulus*; Phrymaceae). *Heredity*, *112*(5), 562–568.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). FAOSTAT. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/>
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., & Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, *151*(4), 1531–1545.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., ... Putterill, J. (1999). GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *The EMBO Journal*, *18*(17), 4679–4688.
- Gendron, J. M., Pruneda-Paz, J. L., Doherty, C. J., Gross, A. M., Kang, S. E., & Kay, S. A. (2012). *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(8), 3167–3172.
- González-Schain, N. D., Díaz-Mendoza, M., Zurczak, M., & Suárez-López, P. (2012). Potato CONSTANS is involved in photoperiodic tuberization in a graft-transmissible manner. *Plant Journal*, *70*(4), 678–690.

- González Espínola, D. D., & Oviedo de Cristaldo, R. M. (2011). Variabilidad fenotípica de plantas de sésamo (*Sesamum indicum* L.), variedad Escoba, con tres ciclos de depuración. *Investigación Agraria*, 2(1), 5–12.
- Griffiths, S., Dunford, R. P., Coupland, G., & Laurie, D. a. (2003). The Evolution of CONSTANS-Like Gene Families in. *Society*, 131(April), 1855–1867.
- Hakes, L., Pinney, J. W., Lovell, S. C., Oliver, S. G., & Robertson, D. L. (2007). All duplicates are not equal: The difference between small-scale and genome duplication. *Genome Biology*, 8(10).
- Han, S. H., Yoo, S. C., Lee, B. D., An, G., & Paek, N. C. (2015). Rice FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (OsFKF1) promotes flowering independent of photoperiod. *Plant Cell and Environment*, 38(12), 2527–2540.
- Harig, L., Beinecke, F. A., Oltmanns, J., Muth, J., Müller, O., Rüping, B., ... Noll, G. A. (2012). Proteins from the FLOWERING LOCUS T-like subclade of the PEBP family act antagonistically to regulate floral initiation in tobacco. *Plant Journal*, 72(6), 908–921.
- Hayama, R., Agashe, B., Luley, E., King, R., & Coupland, G. (2007). A Circadian Rhythm Set by Dusk Determines the Expression of *FT* Homologs and the Short-Day Photoperiodic Flowering Response in *Pharbitis*. *The Plant Cell*, 19(10), 2988–3000.
- Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., & Yano, M. (2003). *Adaptation of photoperiodic control.pdf*. 422(April), 15–18.
- Hazen, S. P., Schultz, T. F., Pruneda-Paz, J. L., Borevitz, J. O., Ecker, J. R., & Kay, S. A. (2005). LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29), 10387–10392.
- Hellsten, U., Wright, K. M., Jenkins, J., Shu, S., Yuan, Y., Wessler, S. R., ... Rokhsar, D. S. (2013). Fine-scale variation in meiotic recombination in *Mimulus* inferred from population shotgun sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), 19478–19482.
- Herrero, E., Kolmos, E., Bujdoso, N., Yuan, Y., Wang, M., Berns, M. C., ... Davis, S. J. (2012). EARLY FLOWERING4 recruitment of EARLY FLOWERING3

- in the nucleus sustains the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell*, 24(2), 428–443.
- Higuchi, Y., Sage-Ono, K., Sasaki, R., Ohtsuki, N., Hoshino, A., Iida, S., ... Ono, M. (2011). Constitutive expression of the GIGANTEA ortholog affects circadian rhythms and suppresses one-shot induction of flowering in *pharbitis nil*, a typical short-day plant. *Plant and Cell Physiology*, 52(4), 638–650.
- Hirata, F., Fujita, K., Ishikura, Y., Hosoda, K., Ishikawa, T., & Nakamura, H. (1996). Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans [1]. *Atherosclerosis*, 122(1), 135–136.
- Huang, W., Pérez-García, P., Pokhilko, A., Millar, A. J., Antoshechkin, I., Riechmann, J. L., & Mas, P. (2012). Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science*, 335(6077), 75–79.
- Imaizumi, T., Schultz, T. F., Harmon, F. G., Ho, L. A., & Kay, S. A. (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science*, 309(5732), 293–297.
- Imaizumi, T., Tran, H. G., Swartz, T. E., Briggs, W. R., & Kay, S. A. (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in Arabidopsis. *Nature*, 426(6964), 302–306.
- Ishikawa, R., Aoki, M., Kurotani, K. I., Yokoi, S., Shinomura, T., Takano, M., & Shimamoto, K. (2011). Phytochrome B regulates Heading date 1 (Hd1)-mediated expression of rice florigen Hd3a and critical day length in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 285(6), 461–470.
- Ishikawa, R., Tamaki, S., Yokoi, S., Inagaki, N., Shinomura, T., Takano, M., & Shimamoto, K. (2005). Suppression of the Floral Activator Hd3a Is the Principal Cause of the Night Break Effect in Rice. *The Plant Cell*, 17(December), 3326–3336.
- Itoh, H., Nonoue, Y., Yano, M., & Izawa, T. (2010). A pair of floral regulators sets critical day length for Hd3a florigen expression in rice. *Nature Genetics*, 42(7), 1–5.
- Izawa, T., Mihara, M., Suzuki, Y., Gupta, M., Itoh, H., Nagano, A. J., ... Nagamura, Y. (2011). Os- *GIGANTEA* Confers Robust Diurnal Rhythms on the Global

- Transcriptome of Rice in the Field. *The Plant Cell*, 23(5), 1741–1755.
- Izawa, T., Oikawa, T., Sugiyama, N., Tanisaka, T., Yano, M., & Shimamoto, K. (2002). Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes and Development*, 16(15), 2006–2020.
- Jackson, S. D. (2009). Plant responses to photoperiod. *New Phytologist*, 181(3), 517–531.
- Jang, S., Marchal, V., Panigrahi, K. C. S., Wenkel, S., Soppe, W., Deng, X. W., ... Coupland, G. (2008). Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO Journal*, 27(8), 1277–1288.
- Jiao, Y., Leebens-Mack, J., Ayyampalayam, S., Bowers, J. E., McKain, M. R., McNeal, J., ... dePamphilis, C. W. (2012). A genome triplication associated with early diversification of the core eudicots. *Genome Biology*, 13(1), R3.
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Sioux, K., Nguyen, J. T., ... Weigel, D. (1999). Activation Tagging of the Floral Inducer FT. *Science*, 286(5446), 1962–1965.
- Kim, K. C., Han, J. A., Lee, J., Maeng, J., & Hur, Y. (2011). Gene encoding PnFL-2 with TIFY and CCT motifs may control floral induction in *Pharbitis nil*. *Genes and Genomics*, 33(3), 229–236.
- Kim, S. J., Moon, J. H., Lee, I., Maeng, J., & Kim, S. R. (2003). Molecular cloning and expression analysis of a CONSTANS homologue, PnCOL1, from *Pharbitis nil*. *Journal of Experimental Botany*, 54(389), 1879–1887.
- Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T., & Yano, M. (2002). Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant and Cell Physiology*, 43(10), 1096–1105.
- Kong, F., Liu, B., Xia, Z., Sato, S., Kim, B. M., Watanabe, S., ... Abe, J. (2010). Two Coordinately Regulated Homologs of FLOWERING LOCUS T Are Involved in the Control of Photoperiodic Flowering in Soybean. *Plant Physiology*, 154(3), 1220–1231.
- Kumazaki, T., Yamada, Y., Karaya, S., Tokumitsu, T., Hirano, T., Yasumoto, S., ... Michiyama, H. (2008). Effects of day length and air temperature on stem

- growth and flowering in sesame. *Plant Production Science*, 11(2), 178–183.
- Kumimoto, R. W., Adam, L., Hymus, G. J., Repetti, P. P., Reuber, T. L., Marion, C. M., ... Ratcliffe, O. J. (2008). The Nuclear Factor Y subunits NF-YB2 and NF-YB3 play additive roles in the promotion of flowering by inductive long-day photoperiods in *Arabidopsis*. *Planta*, 228(5), 709–723.
- Kurokura, T., Samad, S., Koskela, E., Mouhu, K., & Hytönen, T. (2017). *Fragaria vesca* CONSTANS controls photoperiodic flowering and vegetative development. *Journal of Experimental Botany*, 68(17), 4839–4850.
- Laubinger, S., Marchal, V., Le Gourrierec, J., Wenkel, S., Andrian, J., Jang, S., ... Hoecker, U. (2006). Erratum: *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability (Development) vol. 133 (3213-3222). *Development*, 133(22), 4608.
- Lazaro, A., Valverde, F., Piñeiro, M., & Jarillo, J. A. (2012). The *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase HOS1 negatively regulates CONSTANS abundance in the photoperiodic control of flowering. *Plant Cell*, 24(3), 982–999.
- Ledger, S., Strayer, C., Ashton, F., Kay, S. A., & Putterill, J. (2001). Analysis of the function of two circadian-regulated CONSTANS-LIKE genes. *Plant Journal*, 26(1), 15–22.
- Lee, J. A., & Lupski, J. R. (2006). Genomic Rearrangements and Gene Copy-Number Alterations as a Cause of Nervous System Disorders. *Neuron*, 52(1), 103–121.
- Lee, K., Onouchi, H., Mizoguchi, T., Wright, L., Fujiwara, S., Cremer, F., ... Coupland, G. (2005). Distinct roles of GIGANTEA in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17(8), 2255–2270.
- Li, D., Yang, C., Li, X., Gan, Q., Zhao, X., & Zhu, L. (2009). Functional characterization of rice OsDof12. *Planta*, 229(6), 1159–1169.
- Li, F., Zhang, X., Hu, R., Wu, F., Ma, J., Meng, Y., & Fu, Y. F. (2013). Identification and molecular characterization of FKF1 and GI homologous genes in soybean. *PLoS ONE*, 8(11), 26–28.
- Lian, H. L., He, S. B., Zhang, Y. C., Zhu, D. M., Zhang, J. Y., Jia, K. P., ... Yang, H. Q. (2011). Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes and Development*, 25(10),

1023–1028.

- Lin, C., & Shalitin, D. (2003). Cryptochrome Structure and Signal Transduction. *Plant Biology*, *54*, 469–496.
- Lin, X., Yamamoto, T., Sasaki, T., & Yano, M. (2000). Characterization and detection of epistatic interactions of 3 QTLs, Hd1, Hd2, and Hd3, controlling heading date in rice using nearly isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 1021–1028.
- Liu, Baohui, Kanazawa, A., Matsumura, H., Takahashi, R., Harada, K., & Abe, J. (2008). Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome A gene. *Genetics*, *180*(2), 995–1007.
- Liu, Bin, Zuo, Z., Liu, H., Liu, X., & Lin, C. (2011). Arabidopsis cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes and Development*, *25*(10), 1029–1034.
- Liu, J., Yu, J., McIntosh, L., Kende, H., & Zeevaart, J. A. D. (2001). Isolation of a CONSTANS ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering. *Plant Physiology*, *125*(4), 1821–1830.
- Liu, L. J., Zhang, Y. C., Li, Q. H., Sang, Y., Mao, J., Lian, H. L., ... Yang, H. Q. (2008). COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in Arabidopsis. *Plant Cell*, *20*(2), 292–306.
- Liu, W., Jiang, B., Ma, L., Zhang, S., Zhai, H., Xu, X., ... Han, T. (2018). Functional diversification of Flowering Locus T homologs in soybean: GmFT1a and GmFT2a/5a have opposite roles in controlling flowering and maturation. *New Phytologist*, *217*(3), 1335–1345.
- López, M., Sotelo, P. H., & Iehisa, J. C. M. (2017). *Análisis Comparativo de la Expresión Circadiana de Genes Asociados a la Floración y Componentes del Reloj Biológico en variedades de Sesamum indicum con Distintos Tiempos de Floración*.
- MAG/DGEEC. (2009). Censo Agropecuario Nacional. *San Lorenzo*, *1*, 195–201.
- Matsubara, K., Ogiso-Tanaka, E., Hori, K., Ebana, K., Ando, T., & Yano, M. (2012). Natural variation in Hd17, a homolog of arabidopsis ELF3 that is involved in rice photoperiodic flowering. *Plant and Cell Physiology*, *53*(4), 709–716.

- Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M., & Mizuno, T. (2000). Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: Insight into the plant circadian clock. *Plant and Cell Physiology*, *41*(9), 1002–1012.
- McBlain, B. A., Bernard, R. L., Cromeens, C. R., & Korczak, J. F. (1987). A Procedure to Identify Genes Affecting Maturity Using Soybean Isoline Testers. *Crop Science, Crop Breeding, Genetics & Cytology*, *27*(6), 1127–1132.
- Meng, Y., Li, H., Wang, Q., Liu, B., & Lin, C. (2013). Blue light-dependent interaction between cryptochrome2 and CIB1 regulates transcription and leaf senescence in soybean. *Plant Cell*, *25*(11), 4405–4420.
- Mishra, P., & Panigrahi, K. C. (2015). GIGANTEA - an emerging story. *Frontiers in Plant Science*, *6*(JAN), 1–15.
- Morris, J. B. (2009). Characterization of sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm regenerated in Georgia, USA. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *56*(7), 925–936.
- Murakami, M., Tago, Y., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2007). Comparative overviews of clock-associated genes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Plant and Cell Physiology*, *48*(1), 110–121.
- Nakamichi, N., Kiba, T., Henriques, R., Mizuno, T., Chua, N. H., & Sakakibara, H. (2010). PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, *22*(3), 594–605.
- Nakamichi, N., Kita, M., Niinuma, K., Ito, S., Yamashino, T., Mizoguchi, T., & Mizuno, T. (2007). *Arabidopsis* clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway. *Plant and Cell Physiology*, *48*(6), 822–832.
- Nemoto, Y., Kisaka, M., Fuse, T., Yano, M., & Ogihara, Y. (2003). Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the CONSTANS flowering time gene in transgenic rice. *Plant Journal*, *36*(1), 82–93.
- Ospina-Zapata, D. A., Madrigal, Y., Alzate, J. F., & Pabón-Mora, N. (2020). Evolution and Expression of Reproductive Transition Regulatory Genes FT/TFL1 With Emphasis in Selected Neotropical Orchids. *Frontiers in Plant*

- Science*, 11(April), 1–19.
- Osugi, A., Itoh, H., Ikeda-Kawakatsu, K., Takano, M., & Izawa, T. (2011). Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in rice. *Plant Physiology*, 157(3), 1128–1137.
- Pathak, N., Bhaduri, A., Bhat, K. V., & Rai, A. K. (2015). Tracking sesamin synthase gene expression through seed maturity in wild and cultivated sesame species - a domestication footprint. *Plant Biology*, 17(5), 1039–1046.
- Pathak, Niti, Rai, A. K., Kumari, R., Thapa, A., & Bhat, K. V. (2014). Sesame Crop: An Underexploited Oilseed Holds Tremendous Potential for Enhanced Food Value. *Agricultural Sciences*, 05(06), 519–529.
- Pearce, S., Shaw, L. M., Lin, H., Cotter, J. D., Li, C., & Dubcovsky, J. (2017). Night-break experiments shed light on the Photoperiod 1-mediated flowering. *Plant Physiology*, (April).
- Penner, A. F. (2009). Sésamo, Innovación en Agronegocios. *United States Agency International Development, Paraguay Vende*, 89.
- Pittendrigh, C. S. (1966). The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae: a model for the photoperiodic clock. *Pflanzenphysiol*, 54, 275–307.
- Poland, J. A., Balint-Kurti, P. J., Wissler, R. J., Pratt, R. C., & Nelson, R. J. (2009). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14(1), 21–29.
- Reed, J. W., Nagatani, A., Elich, T. D., Fagan, M., & Chory, J. (1994). Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiology*, 104(4), 1139–1149.
- Robson, F., Costa, M. M. R., Hepworth, S. R., Vizir, I., Piñeiro, M., Reeves, P. H., ... Coupland, G. (2001). Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant Journal*, 28(6), 619–631.
- Saijo, Y., Sullivan, J. A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., ... Deng, X. W. (2003). *The COP1–SPA1 interaction.pdf*. (203), 2642–2647.
- Samonte, R. V., & Eichler, E. E. (2002). Evolution of the Primate Genome. *Genetics*, 3(January), 1–8.
- Sawa, M., Nusinow, D. A., Kay, S. A., & Imaizumi, T. (2007). FKF1 and

- GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science*, 318(5848), 261–265.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carré, I. A., & Coupland, G. (1998). The late elongated hypocotyl mutation of Arabidopsis disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell*, 93(7), 1219–1229.
- SENAVE. (2020). Cultivares protegidos y comerciales. En *Boletín Nacional*.
- Shim, J. S., & Imaizumi, T. (2015). Circadian clock and photoperiodic response in Arabidopsis: From seasonal flowering to redox homeostasis. *Biochemistry*, 54(2), 157–170.
- Shin, B.-S., Lee, J.-H., Lee, J.-H., Jeong-Hyun-Joo, Yun, C.-H., & Kim, J.-K. (2003). Circadian regulation of rice (*Oryza sativa* L.) CONSTANS-like gene transcripts. *Molecules and Cells*, 17(January), 10–16.
- Shrestha, R., Gómez-Ariza, J., Brambilla, V., & Fornara, F. (2014). Molecular control of seasonal flowering in rice, Arabidopsis and temperate cereals. *Annals of Botany*, 114(7), 1445–1458.
- Simpson, G. G., & Dean, C. (2002). Arabidopsis, the Rosetta Stone of Flowering Time? *Science*, 296(3), 285–289.
- Song, L. K., Lee, S., Hyo, J. K., Hong, G. N., & An, G. (2007). OsMADS51 is a short-day flowering promoter that functions upstream of Ehd1, OsMADS14, and Hd3a1. *Plant Physiology*, 145(4), 1484–1494.
- Song, Y. H., Ito, S., & Imaizumi, T. (2013). Flowering time regulation: Photoperiod- and temperature-sensing in leaves. *Trends in Plant Science*, 18(10), 575–583.
- Song, Y. H., Lee, I., Lee, S. Y., Imaizumi, T., & Hong, J. C. (2012). CONSTANS and ASYMMETRIC LEAVES 1 complex is involved in the induction of FLOWERING LOCUS T in photoperiodic flowering in Arabidopsis. *Plant Journal*, 69(2), 332–342.
- Song, Y. H., Shim, J. S., Kinmonth-Schultz, H. A., & Imaizumi, T. (2015). Photoperiodic Flowering: Time Measurement Mechanisms in Leaves. *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115555>
- Stoltzfus, A. (1999). On the possibility of constructive neutral evolution. *Journal of*

- Molecular Evolution*, 49(2), 169–181.
- Suárez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., & Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*, 410 (April), 1116–1120.
- Suddihyam, P., Steer, B. T., & Turner, D. W. (1992). The flowering of sesame (*Sesamum indicum* L.) in response to temperature and photoperiod. *Australian Journal of Agricultural Research*, 43(5), 1101–1116.
- Takada, S., & Goto, K. (2003). TERMINAL FLOWER2, an Arabidopsis Homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, Counteracts the Activation of. *Society*, 15(December), 2856–2865.
- Takata, N., Saito, S., Saito, C. T., & Uemura, M. (2010). Phylogenetic footprint of the plant clock system in angiosperms: Evolutionary processes of Pseudo-Response Regulators. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 1–14.
- Thomas, B., & D., V.-P. (1997). Photoperiodism in Plants. *Academic Press*.
- Tsuji, H., Tamaki, S., Komiya, R., & Shimamoto, K. (2008). Florigen and the photoperiodic control of flowering in rice. *Rice*, 1(1), 25–35.
- Tsuji, H., Taoka, K. I., & Shimamoto, K. (2011). Regulation of flowering in rice: Two florigen genes, a complex gene network, and natural variation. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(1), 45–52.
- Unver, T., Wu, Z., Sterck, L., Turktas, M., Lohaus, R., Li, Z., ... Van de Peer, Y. (2017). Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(44), E9413–E9422.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., & Coupland, G. (2004). Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science*, 303(5660), 1003–1006. <https://doi.org/10.1126/science.1091761>
- Vázquez, V., Delgado, R., Dubini, A. de, & Caballero, J. (2013). *Cultivos Potenciales para Exportación INFORME FINAL*. (II), 48–57.
- Wang, L., Xia, Q., Zhang, Y., Zhu, X., Zhu, X., Li, D., ... Zhang, X. (2016). Updated sesame genome assembly and fine mapping of plant height and seed coat color QTLs using a new high-density genetic map. *BMC Genomics*, 17(1),

- 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2316-4>
- Wang, L., Yu, S., Tong, C., Zhao, Y., Liu, Y., Song, C., ... Zhang, X. X. X. X. (2014). Genome sequencing of the high oil crop sesame provides insight into oil biosynthesis. *Genome Biology*, *15*(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r39>
- Wang, Y., Gu, Y., Gao, H., Qiu, L., Chang, R., Chen, S., & He, C. (2016). Molecular and geographic evolutionary support for the essential role of GIGANTEA in soybean domestication of flowering time. *BMC Evolutionary Biology*, *16*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0653-9>
- Wang, Z. Y., & Tobin, E. M. (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, *93*(7), 1207–1217. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81464-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81464-6)
- Watanabe, S., Harada, K., & Abe, J. (2012). Genetic and molecular bases of photoperiod responses of flowering in soybean. *Breeding Science*, *61*(5), 531–543. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.61.531>
- Watanabe, S., Hideshima, R., Zhengjun, X., Tsubokura, Y., Sato, S., Nakamoto, Y., ... Harada, K. (2009). Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus E3. *Genetics*, *182*(4), 1251–1262. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.098772>
- Watanabe, S., Xia, Z., Hideshima, R., Tsubokura, Y., Sato, S., Yamanaka, N., ... Harada, K. (2011). A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the GIGANTEA gene is involved in soybean maturity and flowering. *Genetics*, *188*(2), 395–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.125062>
- Wei, X., Liu, K., Zhang, Y., Feng, Q., Wang, L., Zhao, Y., ... Zhang, X. (2015). Genetic discovery for oil production and quality in sesame. *Nature Communications*, *6*(May), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms9609>
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., & Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, *309*(5737), 1056–1059. <https://doi.org/10.1126/science.1114358>
- Wolfe, K. H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization.

- Nature Reviews Genetics*, 2(5), 333–341. <https://doi.org/10.1038/35072009>
- Wu, F., Kang, X., Wang, M., Haider, W., Price, W. B., Hajek, B., & Hanzawa, Y. (2019). Transcriptome-Enabled Network Inference Revealed the GmCOL1 Feed-Forward Loop and Its Roles in Photoperiodic Flowering of Soybean. *Frontiers in Plant Science*, 10(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01221>
- Wu, F., Price, B. W., Haider, W., Seufferheld, G., Nelson, R., & Hanzawa, Y. (2014). Functional and evolutionary characterization of the CONSTANS gene family in short-day photoperiodic flowering in soybean. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085754>
- Xu, M., Yamagishi, N., Zhao, C., Takeshima, R., Kasai, M., & Watanabe, S. (2015). The Soybean-Specific Maturity Gene E1 Family of Floral Repressors Controls Night-Break Responses through Down-Regulation of FLOWERING LOCUS T Orthologs 1 [OPEN]. *Plant Physiology*, 168(August), 1735–1746. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00763>
- Yamazaki, K., Ishii, Y., & Tanaka, I. (2007). Spectral sensitivity of the promotion and inhibition of flowering in morning glory (*Ipomoea pes-caprae*). *Environmental Control in Biology*, Vol. 45, pp. 75–83. <https://doi.org/10.2525/ecb.45.75>
- Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T., ... Sasaki, T. (2000). Hd1, a Major Photoperiod Sensitivity Quantitative Trait Locus in Rice, Is Closely Related to the Arabidopsis Flowering Time Gene CONSTANS. *The Plant Cell*, 12(12), 2473–2484. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.12.2473>
- Yanovsky, M. J., & Kay, S. A. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature*, 419(6904), 308–312. <https://doi.org/10.1038/nature00996>
- Yasushi Kobayashi, Hidetaka Kaya, Koji Goto, Masaki Iwabuchi, Araki, T. (1999). *A Pair of Related Genes with*. 286(December), 1960–1963. Recuperado de www.sciencemag.org
- Yoshitake, Y., Yokoo, T., Saito, H., Tsukiyama, T., Quan, X., Zikihara, K., ... Tanisaka, T. (2015). The effects of phytochrome-mediated light signals on the developmental acquisition of photoperiod sensitivity in rice. *Scientific Reports*,

- 5(Ld), 16–18. <https://doi.org/10.1038/srep07709>
- Yu, J., Wang, L., Guo, H., Liao, B., King, G., & Zhang, X. (2017). Genome evolutionary dynamics followed by diversifying selection explains the complexity of the *Sesamum indicum* genome. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3599-4>
- Zamir, D., & Giuliano, G. (2012). *The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution* *The Tomato Genome Consortium (TGC)*. *485*(7400), 635–641. <https://doi.org/10.1038/nature11119>
- Zech-Matterne, V., Tengberg, M., & Van Andringa, W. (2015). *Sesamum indicum* L. (sesame) in 2nd century bc Pompeii, southwest Italy, and a review of early sesame finds in Asia and Europe. *Vegetation History and Archaeobotany*, *24*(6), 673–681. <https://doi.org/10.1007/s00334-015-0521-3>
- Zhai, H., Lü, S., Liang, S., Wu, H., Zhang, X., Liu, B., ... Xia, Z. (2014). GmFT4, a homolog of FLOWERING LOCUS T, is positively regulated by E1 and functions as a flowering repressor in soybean. *PLoS ONE*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089030>
- Zhang, H., Miao, H., Wang, L., Qu, L., Liu, H., Wang, Q., & Yue, M. (2013). Genome sequencing of the important oilseed crop *Sesamum indicum* L. *Genome Biology*, *14*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-1-401>
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: An update. *Trends in Ecology and Evolution*, *18*(6), 292–298. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00033-8)
- Zhang, Q., Li, H., Li, R., Hu, R., Fan, C., Chen, F., ... Lin, C. (2008). Association of the circadian rhythmic expression of GmCRY1a with a latitudinal cline in photoperiodic flowering of soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(52), 21028–21033. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810585105>
- Zhou, R., Liu, P., Li, D., Zhang, X., & Wei, X. (2018). Photoperiod response-related gene SiCOL1 contributes to flowering in sesame. *BMC Plant Biology*, *18*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1583-z>
- Zuo, Z., Liu, H., Liu, B., Liu, X., & Lin, C. (2011). Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in arabidopsis. *Current Biology*, *21*(10), 841–847. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.048>