

## 27 Agroalimentario

# ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN CIRCADIANA DE LOS HOMÓLOGOS DEL GEN *FLOWERING LOCUS T* EN VARIEDADES DE SÉSAMO CON DISTINTOS TIEMPOS DE FLORACIÓN

López, Miguel <sup>1</sup>; Oviedo de Cristaldo, Rosa<sup>2</sup>; Iehisa, Julio C. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción.

<sup>2</sup>Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional de Asunción.

### Resumen

El sésamo (*Sesamum indicum* L.) es uno de los cultivos importantes del Paraguay debido a que es generador de ingresos para pequeños agricultores. A pesar de ser uno de los cultivos más antiguos e importantes en el mundo, se han realizado muy pocos estudios a nivel genético, genómico y análisis funcional de genes. El tiempo de floración es uno de los factores que influyen en el rendimiento de los cultivos. Aunque existen diferencias en el tiempo de floración entre las variedades de sésamo, no se conoce el mecanismo por el cual se modifica este tiempo. Se conoce que el gen *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) induce la floración en las plantas. Como primer paso para dilucidar el mecanismo por el cual se modifica el tiempo de floración, se planteó buscar los homólogos de *FT* en sésamo y analizar la expresión circadiana de ellos utilizando variedades con floración temprana (K3) y tardía (Escoba blanca). Mediante la búsqueda BLAST se encontró cuatro genes en el genoma del sésamo cuya homología respecto a la proteína *FT* de *Arabidopsis thaliana* fueron 79% para *SiFTL1* (*FT*-like 1), 74% para *SiFTL2*, 71% para *SiFTL3* y 69% para *SiFTL4*. Para el análisis de expresión se realizó la extracción de ARN de hojas luego de cuatro semanas de la siembra, cultivándolas bajo condiciones de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Mediante la PCR en tiempo real de los productos de retrotranscripción (RT-qPCR) se reveló que los niveles de expresión de *SiFTL1* y *SiFTL2* son mayores en la variedad K3 que en la variedad Escoba. Por otro lado, el nivel de expresión de *SiFTL4* fue similar entre las dos variedades. No se pudo detectar la expresión de *SiFTL3* con los cebadores diseñados. Estos resultados indican que *SiFTL1* y *SiFTL2* podrían ser inductores de la floración en sésamo.

**Palabras-claves:** sésamo; FT, floración

## 1. Introducción

El sésamo (*Sesamum indicum*) es una planta herbácea de la familia Pedaliaceae, del orden Lamiales. Se la describe como “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 tales como las de disminuir los niveles de lípidos y colesterol en sangre, así como de antihipertensivo e antiinflamatorio (Bedigian, 2004; Hirata, y otros, 1996; Pathak, Rai, Kumari, Thapa, & Bhat, 2014).

En Paraguay, la mayoría de las fincas pertenecen a los pequeños productores, donde más del 80% de las mismas poseen una superficie menor a 20 hectáreas (DCEA, 2008). El cultivo del sésamo preferentemente en nuestro país es realizada en fincas pequeñas de hasta 5 has (Friedmann & Penner, 2009). La producción del sésamo alcanzó las 41.400 toneladas en el año 2014. De hecho, entre los años 2005 y 2007 el Paraguay se posicionó como el sexto mayor exportador de sésamo en el mundo con una exportación de 30.000 a 40.000 toneladas por año (FAOSTAT, 2015), debido a la alta calidad de sus semillas, teniendo como principal destino el exigente mercado japonés. Siendo el continente asiático el principal consumidor del sésamo a nivel mundial seguido por África (CAPEXSE, 2005).

El cultivo de sésamo requiere de temperaturas altas y constantes, la planta es extremadamente delicada al estancamiento de agua y a los vientos fuertes. Pudiendo ser atacadas también por enfermedades virósicas, *Fusarium spp.*, *Macrophomina phaseolina* y bacteriosis (Friedmann & 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 se evita la exposición a condiciones ambientales desfavorables al desarrollo, el periodo de cosecha de las semillas y la exposición a patógenos (Poland, Balint-Kurti, Wisser, Pratt, & Nelson, 2009; Jung & Müller, 2009). Las plantas inician la floración después de un período de desarrollo vegetativo. Durante éste proceso, llamado inducción floral, el meristemo apical del brote comienza a producir flores en lugar de hojas. Mediante la utilización de plantas modelos como la dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) y la monocotiledónea *Oryza sativa* L. (arroz), se han realizado estudios de caracterización de genes a través de análisis de mutantes, secuenciación y análisis complementarios, identificándose genes asociados a la floración (Cockram, y otros, 2007; Fonara, Montaigu, & Coupland, 2010). El gen principal inductor de la

floración es *FLOWERING LOCUS T (FT)*, considerado el florigeno, que tiene un papel preponderante en el proceso de transición floral, ya que, en primer lugar, es expresado en las hojas, y la proteína migra al meristemo apical a través del floema donde se une al factor de transcripción *FLOWERING LOCUS D (FD)* para promover la floración; y en segundo lugar constituye el integrador de las vías de regulación génicas que monitorizan los cambios en el medio ambiente, asegurando que la floración se produzca en las condiciones más favorables para maximizar el éxito reproductivo y la producción de semillas (Fonara, Montaigu, & Coupland, 2010; Blümel, Dally, & Jung, 2015).

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 del 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.

A pesar de su importancia y la larga historia del cultivo de sésamo, se han realizado muy pocos estudios a nivel genético, genómico y análisis funcional de los genes debido a la falta de información sobre un genoma de referencia (Wang, Xia, Zhang, Zhu, & Li, 2016). Por lo que no se conocen los homólogos de genes de las plantas modelo que actúan en la floración en sésamo. Actualmente se cuenta con un borrador del genoma de sésamo publicado en el 2013 (Zhang, y otros, 2013) que luego fue mejorado (Wang, Xia, Zhang, Zhu, & Li, 2016). Gracias a esto es posible realizar análisis de expresión de genes, cada vez más importante en muchos campos de la investigación porque constituye un paso básico para el conocimiento sistemático de los procesos biológicos, tales como el crecimiento y el desarrollo, y las vías de defensa contra el estrés biótico y abiótico. Como primer paso para dilucidar el mecanismo por el cual se modifica el tiempo de floración, se planteó buscar los homólogos de *FT* en sésamo y analizar la expresión circadiana de ellos utilizando variedades con floración temprana (K3) y tardía (Escoba blanca).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo General

- Analizar la expresión de los homólogos del gen *FT* en variedades de sésamo con distintos tiempos de floración

### 2.2. Objetivos Específicos

- Realizar la búsqueda de homólogos del gen *FT* de *Arabidopsis thaliana* en el genoma del sésamo
- Comparar la expresión de los homólogos del gen *FT* de sésamo entre las variedades con floración temprana y tardía

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Búsqueda de genes homólogos y construcción del árbol filogenético

Con el fin de obtener las secuencias del gen homólogo de *FT* en sésamo, se realizó una búsqueda por similitud recíproca, entre las secuencias proteicas de los genes mencionados en *Arabidopsis* (<https://www.arabidopsis.org/>) utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), enfrentando con el transcriptoma del sésamo (Zhang, y otros, 2013) con un umbral predefinido de  $10^{-30}$ , estas probables secuencias identificadas se volvieron a alinear con el proteoma de *Arabidopsis* con el mismo umbral establecido para verificar que sean genes ortólogos (búsqueda BLAST bidireccional) debido a que la presencia de un gen parálogo (duplicación de un gen en una especie) o la pérdida (delección) de un gen en una especie determinada puede ocasionar que se considere erróneamente dos genes en especies distintas como ortólogos en una búsqueda unidireccional. Posteriormente se realizó la identificación de regiones conservadas de las secuencias proteicas utilizando el programa Interproscan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) (Jones, Binns, & Chang, 2014). Las regiones conservadas fueron extraídas y alineadas empleando el programa ClustalW con una matriz BLOSUM. El árbol filogenético fue construido empleando las regiones conservadas de las secuencias proteicas para los homólogos de FT por el método del vecino cercano con el programa Mega 7.0 (<http://www.megasoftware.net>). Se realizó la prueba bootstrap con 1.000 repeticiones para el cálculo de porcentaje de confiabilidad.

#### 3.2. Diseño de cebadores

Se utilizó el programa Primer3Plus (<http://primer3plus.com/>) y las secuencias seleccionadas para el diseño de los cebadores, 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%) (Lee PD, 2002). Se realizó la comprobación *in silico* de su especificidad mediante la búsqueda BLAST de las secuencias diseñadas contra la base de datos de nucleótidos no redundantes de sésamo del National Center for Biotechnology Information (NCBI). En la tabla 1 se encuentra la descripción de los cebadores utilizados.

**Tabla 1. Descripción de cebadores diseñados.**

Nombre del Gen	Número de Acceso	Nombre de los Cebadores	Secuencia de cebadores 5'-3'	Tamaño del producto de amplificación (pb)	
<i>SiFTL1</i>	SIN_1009320	SiFTL1-1	F	GGCCCTCCCAAGTACTCAAC	111
			R	TGGGATCACTAGGGCTTGGA	
<i>SiFTL2</i>	SIN_1013025	SiFTL2-1	F	GGCCTCCCAAGTTGCTAAT	121
			R	TCCCGTAGGTGTGGGTTACT	
<i>SiFTL4</i>	SIN_1001827	SiFTL4-2	F	AGCACGGTTGAGCTACGAGT	115
			R	GAAAATCGTCGCCTCCAATA	

### 3.3. Obtención del Material Vegetal

Las semillas de sésamo de las variedades EB y K3 fueron provistas por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción. Se realizó la imbibición de las semillas sobre papel húmedo dentro de unas placas de Petri dejando incubar a temperatura ambiente en oscuridad por 48 h. Una vez observada la presencia de radículas con una longitud aproximada de 0,5 cm, se trasplantó a macetas de polipropileno, introducidas posteriormente dentro de unos contenedores, donde se cultivaron en condiciones de días cortos (12 h luz/12 h oscuridad), a temperatura aproximada de 28 °C. Las hojas fueron colectadas a la cuarta semana de la imbibición. Las extracciones se efectuaron cada 4 horas, considerando como tiempo 0 h, el momento en que se encendían las luces en los contenedores (0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h y 24 h). Se cortaron dos hojas del mismo nudo, de dos plantas de la misma variedad.

### 3.4. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Las hojas de sésamo congeladas en nitrógeno líquido, se molieron hasta obtener un polvo fino con un mortero. Se aisló el ARN total utilizando TriZol (Invitrogen, E.E.U.U.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Chomczynski & Sacchi, 1987).

La concentración de ARN y la pureza se determinaron utilizando un espectrofotómetro DS-11 (DeNovix, E.E.U.U), evaluando las relaciones de absorbancia a 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm.

Se sintetizó el ADNc de cadena simple mediante la transcripción inversa de 2 µg de ARN utilizando M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, E.E.U.U.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Manteniéndolas al finalizar a -20 °C hasta el momento de su uso.

### 3.5. Cuantificación de los productos de amplificación por RT-qPCR

Se realizó la RT-qPCR con los cebadores específicos, utilizando como templado los ADNc y una mezcla de reacción que contiene SYBR Green como revelador en el termociclador en tiempo real LightCycler Nano (Roche, Alemania).

Todas las muestras se amplificaron por triplicado. Como control negativo se realizaron reacciones sin el agregado del templado en la mezcla de reacción. Se obtuvieron los valores de ciclos de cuantificación (Cq) utilizando el programa del equipo LightCycler Nano. Las eficiencias de amplificación de cada cebador en la qPCR se determinaron utilizando el programa LinRegPCR (Ramakers, Ruijter, Depez, & Moorman, 2003). También se determinaron las temperaturas de desnaturalización del producto con el fin de corroborar que no existan amplificaciones inespecíficas o formación de dímeros.

### 3.6. Determinación del nivel de expresión de genes candidatos asociados a la floración y genes moduladores del ciclo circadiano en sésamo

Se analizaron los niveles de expresión relativa utilizando el método de  $\Delta\Delta Cq$  donde  $\Delta Cq$  es la diferencia del número de ciclos de PCR necesarios para alcanzar la fase logarítmica de la amplificación entre el gen de interés y el gen de referencia. Considerando como control a las muestras de la variedad Escoba a las 0 h. Se utilizó como normalizador al gen de *APT* (*ADENINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASA*). El análisis estadístico utilizado fue la prueba *t* para muestras independientes suponiendo varianzas iguales.

## 4. Resultados y Discusión

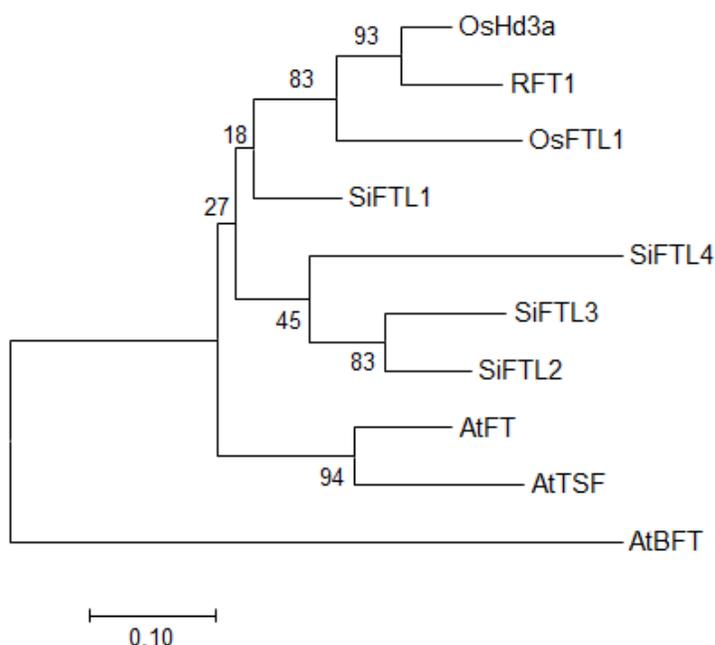
### 4.1. Búsqueda de genes homólogos de *FT*

Se consideraron secuencias homólogas al gen *FT* de *Arabidopsis* (*AtFT*), aquellas que mostraron mejor similitud (valor de *E* menores a  $10^{-30}$ ) mediante la búsqueda BLAST. También se descartaron los productos de *splicing* alternativos, escogiendo las secuencias más largas. Se encontraron en el genoma del sésamo cuatro genes que codifican para proteínas homólogas de *FT*, y fueron denominados *SiFTL1* (*FT-Like 1*), *SiFTL2*, *SiFTL3* y *SiFTL4* (Tabla 2). *SiFTL1* presentó la mejor similitud con *AtFT* con 78,7% de homología, seguidos por *SiFTL2* (74,1%), *SiFTL3* (70,9%) y *SiFTL4* (69,2%), mientras que la similitud entre las secuencias del sésamo fue de 70,7 a 82,5% (Tabla 2). El análisis filogenético indicó que estos cuatro genes se originaron por duplicaciones sucesivas de un gen: el gen *FT* estuvo presente en el ancestro común de arroz (monocotiledónea), *Arabidopsis* y sésamo (ambas dicotiledóneas) que luego de la separación de los géneros *Arabidopsis* y *Sesamum* ocurrió una primera duplicación de este gen para originar a *SiFTL1* y otro que luego de dos duplicaciones dio origen a *SiFTL2*, *SiFTL3* y *SiFTL4* (Figura 1).

Los eventos de duplicación génica es un evento importante en la evolución ya que permite conducir a la adquisición de nuevas funciones (Innan & Kondrashov, 2010). Eventos similar han ocurridos en *Arabidopsis* [donde *FT* y *TSF* son parálogos (Yamaguchi, Kobayashi, & Goto, 2005; D'Aloia, y otros, 2011)] y arroz (*Hd3a*, *RFT1* y *OsFTL1* son parálogos (Izawa, Oikawa, & Sugiyama, 2002). En el caso del *TSF*, éste actúa redundantemente con *FT* para la promoción de la floración aunque existe una diferencia en el patrón de expresión entre ellos (Yamaguchi, Kobayashi, & Goto, 2005). En el caso del arroz, *Hd3a* induce la floración en condiciones de días cortos (Kojima, Takahashi, & Kobayashi, 2002), mientras que *RFT1* es importante para la inducción de la floración en días largos (Komiya, Yokoi, & Shimamoto, 2009). En sésamo se conoce que ocurrió un evento de duplicación del genoma completo hace aproximadamente 70 millones de años y también varios eventos de duplicación de genes en tándem (Yu, y otros, 2017). Se requiere análisis adicionales para determinar el origen de los distintos *SiFTLs* en sésamo.

**Tabla 2.** Porcentaje de identidad entre secuencias de proteínas de FT

	SiFTL1	SiFTL2	SiFTL3	SiFTL4
AtFT	78,7	74,1	70,9	69,2
SiFTL1		81,6	71,9	74,5
SiFTL2			82,5	72,1
SiFTL3				70,7



**Figura 1.** Árbol filogenético de los homólogos de FT en *Arabidopsis*, arroz y sésamo. El árbol filogenético fue construido empleando la región conservada de la secuencia proteica y el método del vecino cercano. Las secuencias utilizadas de *A. thaliana* fueron: AtFT (código de locus: AT1G65480) y AtTSF (TWIN SISTER OF FT, AT4G20370); las de arroz (*Oryza sativa*): OsHd3a (Heading date 3A, LOC\_Os06g06320), RFT1 (Rice FT1, LOC\_Os06g06300) y OsFTL1 (LOC\_Os01g11940); y del sésamo: SiFTL1 (SIN\_1009320), SiFTL2 (SIN\_1013025), SiFTL3 (SIN\_1001826) y SiFTL4 (SIN\_1001827). La secuencia AtBFT (BROTHER OF FT AND TFL1, AT5G62040) de *A. thaliana* se utilizó como un grupo externo. El número en los nodos indica el porcentaje de confiabilidad calculada mediante la prueba de bootstrap con 1.000 repeticiones.

#### 4.2. Expresión relativa de genes homólogos asociados a la floración

Primeramente se midió el tiempo de floración para las dos variedades de sésamo bajo condiciones de días cortos. La variedad K3 fue la primera en florecer, con un promedio de 46 días luego de la imbibición y la variedad EB floreció a los 56 días de la imbibición (Tabla 3).

**Tabla 3.** Tiempo de floración de las dos variedades de sésamo en días cortos

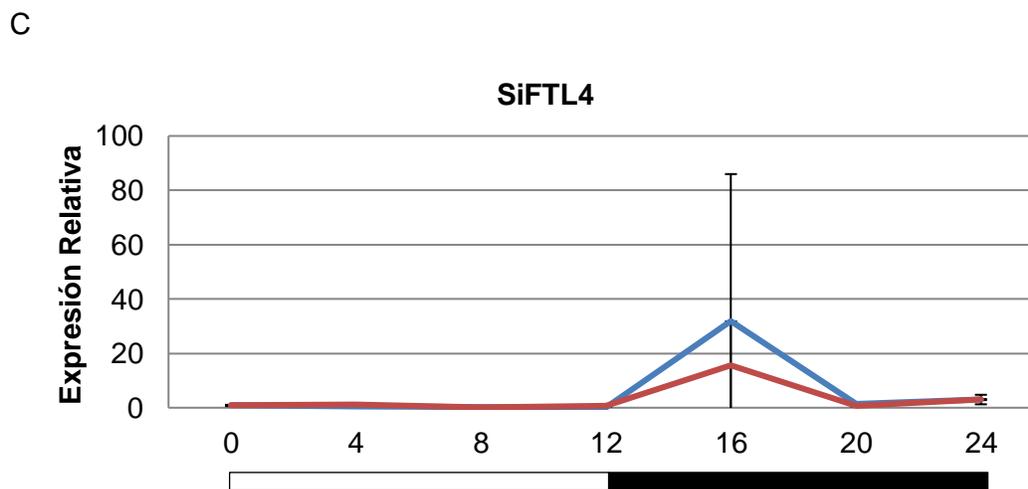
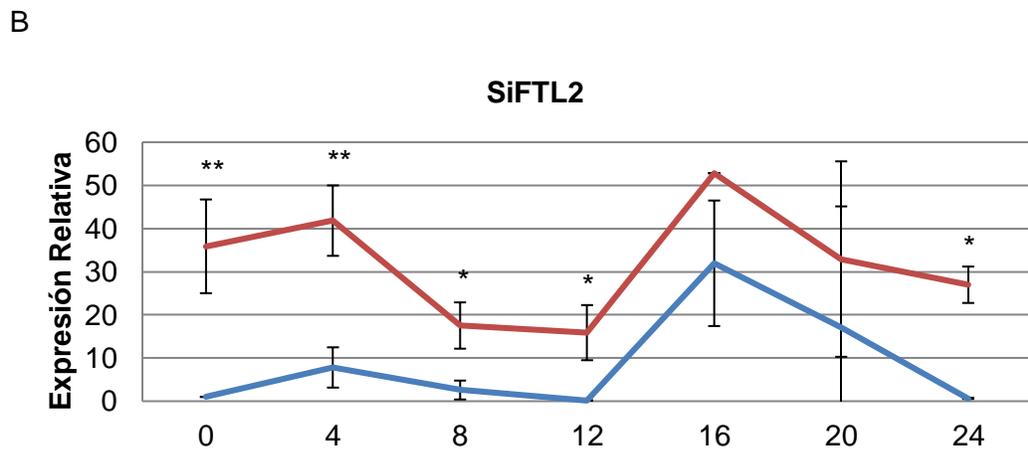
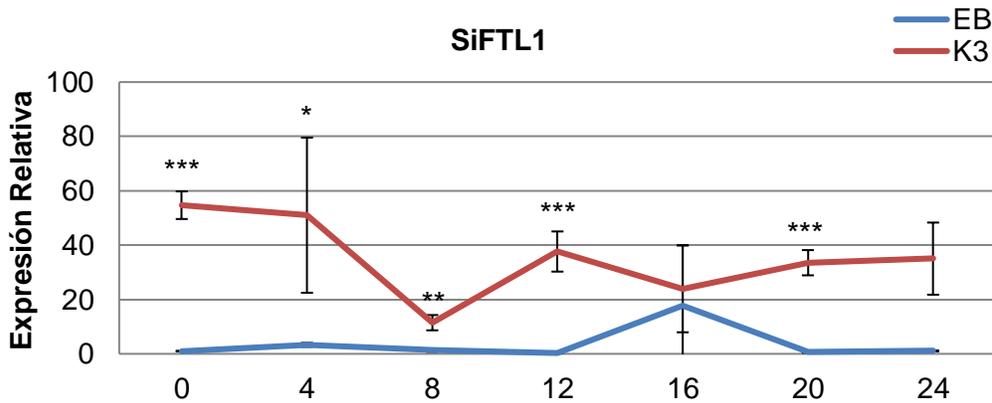
Variedad	Tiempo de floración*	Nivel de significancia <sup>†</sup>
<b>EB</b>	56 ± 3 días	P = 0,00022
<b>K3</b>	46 ± 2 días	

\*Días de floración luego de la imbibición. Promedio ± desviación estándar

<sup>†</sup>Prueba *t* de dos colas

El análisis de la expresión relativa de los genes homólogos a *FT* en sésamo reveló que el nivel de expresión del gen *SiFTL1* es mayor en la variedad temprana K3 que en la variedad tardía EB. En la variedad K3, *SiFTL1* presentó una expresión alta a las 0 h (momento en que empieza la exposición a la luz) que se mantuvo hasta las 4 h, luego ocurrió una disminución a las 8 h y que volvió a incrementar a las 12 h (inicio de la noche), manteniéndose casi constante durante toda la noche (Figura 2A). Por otro lado, en EB se observó un pico de expresión a las 16 h. En el caso del gen *SiFTL2*, el patrón de expresión fue similar entre las dos variedades: con un pico de expresión a las 4 h del inicio de la exposición a la luz, luego un descenso a entre 8 y 12 h y otro pico de expresión a las 16 h (Figura 2B). Se apreció un mayor nivel de expresión en la variedad K3 con relación a la variedad EB, donde la diferencia fue más pronunciada durante el día (entre 0 y 12 h). El gen *SiFTL4* presentó un pico de expresión en ambas variedades a las 16 h, sin una diferencia mayor en la expresión entre ellas (Figura 2C).

A Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina 17, 18 y 19 de octubre de 2018



**Figura 2.** Expresión Relativa de los genes **A)** *SiFTL1*, **B)** *SiFTL2* y **C)** *SiFTL4*. Muestras de hojas de las variedades EB (Azul) y K3 (Rojo) bajo exposición a días cortos (12 h/ 12 h). Normalización realizada con respecto a EB 0 h; réplicas analíticas.

## 5. Conclusiones

Mediante el análisis de expresión de estos genes se pudo correlacionar el nivel de *SiFTL1* y *SiFTL2* con la diferencia en el tiempo de floración: la expresión de ambos genes es significativamente mayor en la variedad temprana K3, principalmente durante el día (exposición a la luz). En cambio, *SiFTL4* no contribuyó en la diferencia fenotípica de estas variedades. Por lo tanto, se podría pensar que los parálogos *SiFTL1* y *SiFTL2* son inductores de la floración en sésamo. Se debe re-diseñar los cebadores para *SiFTL3* y analizar su expresión en estas variedades.

Se debe analizar también genes implicados en la regulación de la expresión de *FT* para identificar la vía alterada entre K3 y EB e identificar el gen causante de la diferencia fenotípica entre ellas. El polimorfismo en el gen causante se puede utilizar como un marcador molecular para la mejora del tiempo de floración del cultivo; así acortar el tiempo y reducir los recursos necesarios para la obtención de las nuevas variedades.

Bedigian, D. (2004). History and lore of sesame in southwest Asia. *Economic Botany*, 58(3), 329-353.

Blümel, M., Dally, N., & Jung, C. (Apr de 2015). Flowering time regulation in crops-what did we learn from Arabidopsis? *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 121-129.

CAPEXSE. (2005). Obtenido de CAPEXSE: <http://www.capexse.org.py/>

Chen, P., Chien, K., Su, T., Chang, C., Liu, T.-L., & Cheng, H. (2005). Dietary sesame reduces serum cholesterol and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolemia. *Nutr Res*, 25(6), 559-67.

Chomczynski, P. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature*.

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, 156-159.

Cockram, J., Jones, H., Leigh, F., O'Sullivan, D., Powell, W., Laurie, D., & Greenland, A. (2007). Control of Flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *Journal of Experimental Botany*, 1231-1244.

D'Aloia, M., Bonhomme, D., Bouché, F., Tamseddak, K., Ormenese, S., Torti, S., . . . Périlleux, C. (mar de 2011). Cytokinin promotes flowering of Arabidopsis via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *The plant journal*, 65(6), 972-979.

DCEA. (2008). *Censo agropecuario nacional Vol I*. San Lorenzo.

Espínola, G., Dionisio, D., & Cristaldo O, M. (2011). Variabilidad fenotípica de plantas de sésamo (*Sesamum indicum*), variedad Escoba, con tres ciclos de depuración. *Investigación Agraria*, 13(1), 5-12.

FAOSTAT. (2015). Obtenido de <http://faostat3.fao.org/>

Faure, S., Turner, A., Gruszkaa, D., Christodoulou, V., Davis, S., von Korff, M., & Laurie, D. (2012). Mutation at the circadian clock gene EARLY MATURITY 8 adapts domesticated

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina 17, 18 y 19 de octubre de 2018  
barley (*Hordeum vulgare*) to short growing seasons. *Proceedings of the National  
Academy of Sciences of the USA*, 109(21), 8328-8333.

- Fink, L., Seeger, W., Ermert, L., Hanze, J., Stahl, U., Grimminger, F., & Kummer, W. (1998).  
Bohle RM: Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med*, 4,  
1329-1333.
- Florentín Rolón, M., & Pereira Álvarez. (2015). *Adecuación de épocas de siembra de seis  
variedades comerciales de sésamo blanco en la zona norte de la Región Oriental del  
Paraguay*. IPTA, Encarnación, Paraguay.
- Fonara, F., Montaigu, A., & Coupland, G. (2010). Snapshot: control of flowering in Arabidopsis.  
*Cell (Cambridge)*, 141(3), 550-552.
- Friedmann, A., & Penner, R. (Diciembre de 2009). Sésamo: innovación en agronegocios.  
*USAID, Paraguay Vende*, 89.
- Gachon, C., & Charrier, B. (2004). Real-time PCR: what relevance to plant studies? *J Exp Bot*,  
55, 1445-1454.
- Gao, H., Jin, M., Zheng, X., Chen, J., Yuan, D., Xin, Y., & Wan, J. (2014). Days to heading 7, a  
major quantitative locus determining photoperiod sensitivity and regional adaptation in  
rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 111(46), 16337-  
16342.
- Heid, C., Stevens, J., Livak, K., & Williams. (1996). PM: Real time quantitative PCR. *Genome  
Res*, 6, 986-994.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time  
monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026-1030.
- Hirata, F., Fujita, K., Ishikura, Y., Hosoda, K., Ishikawa, T., & Nakamura, H. (1996).  
Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans. *Atherosclerosis*, 122(1), 135-  
136.
- Hong, S., Seo, P., Yang, M., Xiang, F., & Park, C. (2008). Exploring valid reference genes for  
gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BCM Plant*, 11,  
1-11.

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina 17, 18 y 19 de octubre de 2018  
IICA. (2014). *Evolución y situación del sesamo en el Paraguay*. Observatorio.

Innan, H., & Kondrashov, F. (feb de 2010). The evolution of gene duplications: Classifying and distinguishing between models. *Nature Reviews Genetics*, 11, 97-108.

Izawa, T., Oikawa, T., & Sugiyama, N. (2002). Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes & Development*(16), 2006-2020.

Jamann, T., Balint-Kurti, P., & Holland, J. (2015). QTL Mapping Using High-Throughput Sequencing. *Plant Functional Genomics*, 1284.

Jones, P., Binns, D., & Chang, H. (may de 2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.

Jung, C., & Müller, A. (2009). Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends in Plant Science*, 14(10), 563-573.

Kojima, S., Takahashi, Y., & Kobayashi, Y. (2002). Hd3a, a Rice ortholog of the arabidopsis FT promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiol*, 43(10), 1096-1105.

Komiya, R., Yokoi, S., & Shimamoto, K. (2009). A gene network for long-day flowering activates RFT1 encoding a mobile flowering signal in rice. *Development*, 136, 3443-3450.

Lee PD, S. R. (2002). Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res*, 292-297.

Martin, J., & Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Review Genetics*, 12, 671-682.

Morris, J. (Noviembre de 2009). Characterization of sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm regenerated in Georgia, USA. *Genet Resour Crop Evol*, 56(7), 925.

N, N. (Oct de 2011). Molecular Mechanisms Underlying the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant & Cell Physiology*, 52(10), 1709-1718.

Pathak, N., Rai, A., Kumari, R., Thapa, A., & Bhat, K. (May de 2014). Sesame crop: an undereploited oilseed holds tremendous potential for enhanced food value. *Agricultural Sciences*, 5(6), 519.

- Poland, J., Balint-Kurti, P., Wisser, R., Pratt, R., & Nelson, R. (2009). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14(1), 21-29.
- Ramakers, C., Ruijter, J., Depez, R., & Moorman, A. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 339, 62-66.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R., & Brown, P. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 467-470.
- SENAVE. (2017). *Boletín Nacional de Cultivares Protegidos y Comerciales*.
- sésamo, C. P. (2005). Obtenido de CAPEXSE: <http://www.capexse.org.py/>
- Shim, J., & Imaizumi, T. (2015). Circadian Clock and Photoperiodic Response in Arabidopsis: From Seasonal Flowering to Redox Homeostasis. *Biochemistry*(54), 157-170.
- Shrestha, R., Gómez-Ariza, J., & Brambilla, V. (2014). Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. *Annals of Botany*, 114(7), 1445-1458.
- Taylor and Francis Group. (2010). *The Genus Sesamum*. Boca Ratón, FL, EEUU: CRC Press Editorial.
- Tsuji, H., Tamaki, S., & Komiya, R. (2008). Florigen and the photoperiodic control of flowering in rice. *Rice*, 1(1), 25-35.
- Tsuji, H., Taoka, K., & 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.
- Turck, F., Coupland, G., & Fornara, F. (2008). Regulation and Identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T Moves Center Stage. *Plant Biol*, 59, 573-594.
- Turner, A., Beales, J., Faure, S., Dunford, R., & Laurie, D. (2005). The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science*, 310(5750), 1031-1034.
- Vandesompele, J., Preter, K., Poppe, B., Roy, N., & Paepe, A. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 1-12.

- Wang, L., Xia, Q., Zhang, Y., Zhu, X., & Li, D. (2016). Updated sesame genome assembly and fine mapping of plant height and seed coat color QTLs using a new high-density genetic map. *BCM Genomics*, 17(1), 31.
- Wei, L., Miao, H., Zhao, R., Han, X., Zhang, T., & Zhang, H. (2013). Identification and testing of reference genes for Sesame gene expression analysis by quantitative real-time PCR. *Planta*, 237(3), 873-89.
- Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., & Goto, K. (Aug de 2005). Twin sister of FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant Cell Physiol*, 46(8), 1175-1189.
- 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*, 18:257.
- 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. *Veg hist Archaeobot*, 24(6), 673-81.
- Zhang, H., Miao, H., Wang, L., Qu, L., Liu, H., & Wang, Q. (2013). Genome sequencing of the important oilseed crop *Sesamum indicum* L. *Genome Biol*, 14(1), 401.