

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“IDENTIFICACIÓN DE GENES DE REFERENCIA EN  
*Lupinus mutabilis* Sweet PARA ESTUDIOS CUANTITATIVOS  
DE EXPRESIÓN GÉNICA”**

Presentada por:

**SUSAN MARIBEL LINARES HUAPAYA**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGA**

Lima – Perú

**2023**


---

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

## Document Information

|                          |                                       |
|--------------------------|---------------------------------------|
| <b>Analyzed document</b> | Susan_Linares_tesis.docx (D152678840) |
| <b>Submitted</b>         | 2022-12-08 20:47:00                   |
| <b>Submitted by</b>      | Gaston Zolla                          |
| <b>Submitter email</b>   | gzolla@lamolina.edu.pe                |
| <b>Similarity</b>        | 0%                                    |
| <b>Analysis address</b>  | gzolla.unalm@analysis.arkund.com      |

## Sources included in the report

|          |  |  |
|----------|--|--|
| <b>W</b> | URL: <a href="https://research.hanze.nl/ws/files/26068177/Libbio_A5_booklet_WEB.pdf">https://research.hanze.nl/ws/files/26068177/Libbio_A5_booklet_WEB.pdf</a> Vandesompele,<br>Fetched: 2022-12-08 20:48:00 |  <b>1</b> |
|----------|--|--|

## Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD DE CIENCIAS

"IDENTIFICACIÓN DE GENES DE REFERENCIA EN *Lupinus mutabilis* Sweet PARA ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE EXPRESIÓN GÉNICA"

Presentada por:

Linares Huapaya Susan Maribel

Tesis para optar el Título de:

BIÓLOGA

LIMA-PERÚ 2022

ÍNDICE

ÍNDICE 2 RESUMEN 9 SUMMARY 10 I. INTRODUCCIÓN 11 II. REVISIÓN LITERARIA 13 2.1 GENERALIDADES de *Lupinus mutabilis* Sweet 13 2.1.1 Clasificación taxonómica 13 2.1.2 Origen y distribución 13 2.1.3 Descripción botánica 14 2.1.4 Diversidad genética 14 2.1.5 Importancia de *Lupinus mutabilis* 15 2.2 EXPRESIÓN GENÉTICA 16 2.2.1 Cuantificación de expresión de genes 16 2.2.2 Metodologías usadas en la identificación de genes de referencia 17 2.2.3 Genes de referencia 18 2.2.4 Genes de referencia en plantas 19 2.2.5 Importancia de genes de referencia 19 2.2.6 Inestabilidad de los genes de referencia 20 III. MATERIALES Y MÉTODOS 21 3.1 MATERIALES 21 3.1.1 Bibliotecas 21 3.1.2 Material vegetal 21 3.1.3 Reactivos y soluciones 21 3.1.4 Sustratos y nutrientes 21 3.1.5 Equipos de laboratorio e instrumentos 22 3.2 MÉTODOS 22 3.2.1 Etapa in silico 22 3.2.1.2 Pruebas de homocedasticidad 24 3.2.2 Etapa experimental 26 IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES 28 6.1 Análisis y selección de los transcritos 28 6.2 Descripción de los genes de referencia candidatos seleccionados 33 6.3 Validación de los genes de referencia 36 6.3.1 Validación de los genes de referencia en condiciones de solución hidropónica La Molina 36 6.3.2 Validación de los genes de referencia en condiciones de solución Murashige y Skoog (MS) 41 V. CONCLUSIONES 45 VI. RECOMENDACIONES 46 VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47 VIII. ANEXOS 56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Genes de referencia candidatos seleccionados mediante 5 pruebas de homocedasticidad (p.valor <0.05) 30

Tabla 2: Selección de los genes candidatos por un FPKM (<40) y CV del p.valor de las pruebas de homocedasticidad (>0.20) 34

Tabla 3: Información de genes de referencia candidatos.....36

ÍNDICE DE FIGURAS

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“IDENTIFICACIÓN DE GENES DE REFERENCIA EN  
*Lupinus mutabilis* Sweet PARA ESTUDIOS CUANTITATIVOS  
DE EXPRESIÓN GÉNICA”**

Presentada por:

**SUSAN MARIBEL LINARES HUAPAYA**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGA**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Mg.Sc. Maria del Rosario Josefina Castro Muñoz  
PRESIDENTE

---

Mg. Katty Ogata Gutierrez  
MIEMBRO

---

Mg. Sc. Roberto Ramos Mansilla Samaniego  
MIEMBRO

---

Dr. Jorge Eduardo Jimenez Davalos  
ASESOR

---

Ph.D. Gaston Enrique M. Zolla Benites  
Co Asesor

## **DEDICATORIA**

*A mi abuela Zenobia Quispe de Huapaya*

*Tu fortaleza y tu buen corazón siempre han sido mi guía.*

*Este logro también es tuyo mamita.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Silvia y Julio por todo el esfuerzo que han hecho para apoyarme en cada paso que he dado.

A mi hermano Julio por los consejos y el apoyo que siempre me brindó.

A mi asesor Ph.D. Jorge Jiménez Dávalos y mi co-asesor Ph.D. Gastón Enrique Martin Zolla Benites por contribuir en mi formación académica impartida en los cursos de biología experimental y posteriormente, asesorarme en la realización de esta investigación.

Al Vice-Rectorado de Investigación de la Universidad Nacional Agraria La Molina por el financiamiento de este proyecto.

A Mg. Sc. Manuel Hidalgo y Mg. Sc. Cynthia Ramos, cuyos trabajos de investigación como parte del proyecto 451-PNICP-BRI-2014 fueron el punto de partida para la realización de la presente investigación.

A todo el equipo del Laboratorio de Biotecnología del PIPS en Cereales y Granos Nativos por todas las vivencias compartidas. Han contribuido enormemente en mi crecimiento personal.

A mis amigas y compañeras de estudio, Joshelin y Eva, las risas nunca faltaron y lo más importante, siempre estuvimos para apoyarnos. Los días en la universidad no hubieran sido lo mismo sin ustedes. Por siempre MDM.

A A. Sebastian, gracias por escucharme y decirme que te cuente el final.

# ÍNDICE GENERAL

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN .....  | ix |
| SUMMARY .....  | x  |
| I. INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA .....   | 3  |
| 2.1 GENERALIDADES de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.....                   | 3  |
| 2.1.1 Clasificación taxonómica.....  | 3  |
| 2.1.2 Origen y distribución .....  | 3  |
| 2.1.3 Descripción botánica .....   | 4  |
| 2.1.4 Diversidad genética .....  | 4  |
| 2.1.5 Importancia de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.....                   | 5  |
| 2.2 EXPRESIÓN GENÉTICA .....   | 6  |
| 2.2.1 Cuantificación de expresión de genes .....                           | 6  |
| 2.2.2 Metodologías usadas en la identificación de genes de referencia..... | 6  |
| 2.2.3 Genes de referencia .....  | 7  |
| 2.2.4 Genes de referencia en plantas.....                                  | 8  |
| 2.2.5 Importancia de genes de referencia .....                             | 9  |
| 2.2.6 Inestabilidad de los genes de referencia .....                       | 9  |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 11 |
| 3.1 MATERIALES .....   | 11 |
| 3.1.1 Bibliotecas .....  | 11 |
| 3.1.2 Material vegetal.....  | 11 |
| 3.1.3 Reactivos y soluciones .....   | 11 |
| 3.1.4 Sustratos y nutrientes.....  | 12 |
| 3.1.5 Equipos de laboratorio e instrumentos .....                          | 12 |
| 3.2 MÉTODOS.....   | 13 |
| 3.2.1 Etapa in silico .....  | 13 |
| 3.2.2 Etapa experimental.....  | 16 |

|   |    |
|---|----|
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....   | 18 |
| 4.1 Análisis y selección de los transcritos.....  | 18 |
| 4.2 Descripción de los genes de referencia candidatos seleccionados.....                              | 23 |
| 4.3 Validación de los genes de referencia .....   | 26 |
| 4.3.1 Validación de los genes de referencia en condiciones de solución<br>hidropónica La Molina.....  | 26 |
| 4.3.2 Validación de los genes de referencia en condiciones de solución<br>Murashige y Skoog (MS)..... | 31 |
| V. CONCLUSIONES .....   | 35 |
| VI. RECOMENDACIONES .....   | 36 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA .....   | 37 |
| VIII. ANEXOS .....  | 46 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1: Genes de referencia candidatos seleccionados mediante 5 pruebas de homocedasticidad (p.valor >0.05) .....            | 19 |
| Tabla 2: Selección de los genes candidatos por un FPKM (>40) y CV del p.valor de las pruebas de homocedasticidad (<0.20)..... | 23 |
| Tabla 3: Información de genes de referencia candidatos .....  | 25 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Diagrama de flujo del procedimiento de selección de los candidatos de genes de referencia.....   | 14 |
| Figura 2: Análisis de expresión relativa de genes del grupo I (proteínas ribosomales) a nivel de hoja, tallo y raíz en <i>Lupinus mutabilis</i> . .... | 28 |
| Figura 3: Análisis de expresión relativa de genes del grupo II en hoja, tallo y raíz de <i>Lupinus mutabilis</i> . ....                                | 30 |
| Figura 4: Análisis de expresión relativa de genes del grupo III para dos tipos de tejidos en <i>Lupinus mutabilis</i> :.....                           | 32 |
| Figura 5: Análisis de expresión relativa de genes del grupo IV para tres tipos de tejidos en <i>Lupinus mutabilis</i> .....                            | 34 |

## ÍNDICE DE ANEXOS

|  |    |
|--|----|
| Anexo 1: Genes de referencia estables en plantas .....   | 47 |
| Anexo 2: Análisis de las 5 pruebas de homocedasticidad (*media).....   | 58 |
| Anexo 3: Secuencia de primers para los genes candidatos de referencia .....  | 63 |
| Anexo 4: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPL11 ( $\alpha=0.05$ )<br>bajo condiciones de solución La Molina.....       | 63 |
| Anexo 5: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPS18 ( $\alpha=0.05$ )<br>bajo condiciones de solución La Molina.....       | 63 |
| Anexo 6: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPS27L ( $\alpha=0.05$ )<br>bajo condiciones de solución La Molina.....      | 63 |
| Anexo 7: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia V-ATPasa a<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina ..... | 64 |
| Anexo 8: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia V-ATPasa b<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina ..... | 64 |
| Anexo 9: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia ERF3 ( $\alpha=0.05$ )<br>bajo condiciones de solución La Molina.....        | 64 |
| Anexo 10: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia OEP24 a<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....   | 64 |
| Anexo 11: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia OEP24 b<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....   | 64 |
| Anexo 12: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RAD52 ( $\alpha=0.05$ )<br>bajo condiciones de solución La Molina.....      | 65 |
| Anexo 13: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia CESA1 a<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....   | 65 |
| Anexo 14: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia CESA1 b<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....   | 65 |
| Anexo 15: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia Atg45170<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....  | 65 |

|  |    |
|--|----|
| Anexo 16: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPL11 ( $\alpha=0.05$ )<br>bajo condiciones de solución MS .....                  | 65 |
| Anexo 17: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPS18 ( $\alpha=0.05$ )<br>bajo condiciones de solución MS .....                  | 66 |
| Anexo 18: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RAD52 ( $\alpha=0.05$ )<br>bajo condiciones de solución MS .....                  | 66 |
| Anexo 19: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia OEP24 a<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS.....                 | 66 |
| Anexo 20: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia OEP24 b<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS.....                 | 66 |
| Anexo 21: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia V-ATPasa a<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS.....              | 66 |
| Anexo 22: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia V-ATPasa b<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS.....              | 67 |
| Anexo 23: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPS27L<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS.....                  | 67 |
| Anexo 24: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia CESA1 a<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS.....                 | 67 |
| Anexo 25: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia CESA1 b<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS.....                 | 67 |
| Anexo 26: Análisis de variancia para el gen candidato a referencia Atg45170<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS.....                | 67 |
| Anexo 27: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPL11<br>( $\alpha= 0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....     | 67 |
| Anexo 28: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPS18<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....      | 68 |
| Anexo 29: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPS27L<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....     | 68 |
| Anexo 30: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia V-<br>ATPasa a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina..... | 68 |

|   |    |
|---|----|
| Anexo 31: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia V-ATPasa b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina ..... | 68 |
| Anexo 32: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia ERF3 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....       | 69 |
| Anexo 33: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia OEP24 a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....    | 69 |
| Anexo 34: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia OEP24 b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....    | 69 |
| Anexo 35: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RAD52 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....      | 69 |
| Anexo 36: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia CESA1-a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina.....     | 69 |
| Anexo 37: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia CESA1-b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....    | 70 |
| Anexo 38: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia Atg45170 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina .....   | 70 |
| Anexo 39: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPL11 ( $\alpha= 0.05$ ) bajo condiciones de solución MS .....            | 70 |
| Anexo 40: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPS18 ( $\alpha= 0.05$ ) bajo condiciones de solución MS .....            | 70 |
| Anexo 41: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RAD52-2 ( $\alpha= 0.05$ ) bajo condiciones de solución MS .....          | 70 |
| Anexo 42: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia OEP24 a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS.....            | 71 |
| Anexo 43: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia OEP24 b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS.....            | 71 |
| Anexo 44: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia V-ATPasa a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS .....        | 71 |
| Anexo 45: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia V-ATPasa b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS .....        | 71 |

|   |    |
|---|----|
| Anexo 46: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPS27L<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS .....   | 71 |
| Anexo 47: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia CESA1-<br>a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS ..... | 72 |
| Anexo 48: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia CESA1-<br>b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS ..... | 72 |
| Anexo 49: Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia Atg45170<br>( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS ..... | 72 |
| Anexo 50: Tabla de composición y concentración de las soluciones La Molina y<br>Murashige y Skoog (MSP01) .....                             | 72 |

## RESUMEN

Los estudios de patrones de expresión en genes requieren mediciones precisas y reproducibles. Por lo que se requiere un control de reacción interno; es decir, un gen de referencia. El cual tenga una variación mínima en su expresión en diferentes tipos de células y bajo condiciones. Es así que muchos genes housekeeping han sido usados como genes de referencia en plantas; tales como, GAPDH, EF-1 $\alpha$ , UBQ, UBC, EIF1 y factores de transcripción eucariota. Sin embargo, no siempre han sido apropiados. Además, el número de estos genes en plantas sigue siendo limitado y en *Lupinus mutabilis* S, no se han reportado. En ese sentido, se planteó identificar y validar genes de referencia en esta especie para estudios de expresión genética. Para ello, se trabajó con el transcriptoma de brotes florales en desarrollo y tejido vegetativo, el mismo que fue filtrado mediante 3 criterios de selección: 1) el coeficiente de variación (CV) <0.10 con un valor promedio de FPKM >10, 2) 5 pruebas de homogeneidad de varianza: Levene, Barlett, F-test, Fligner-Kligner y Hartley (p. valor > 0.05) y 3) CV del p. valor < 0.20 con un valor promedio de FPKM >40. Lo que resultó en la selección de 16 candidatos a genes de referencia. Los mismos que fueron validados por RT-PCR en hoja, tallo y raíz. Finalmente, se identificaron 8 genes: RPL11, RPS18, RPS27L, ERF3, OEP24, CESA, AT4G27220, y V-ATPasa, que mostraron un nivel de expresión constante y sin diferencias significativas (P<0.05) a nivel de hoja, tallo y raíz para *Lupinus mutabilis* bajo condiciones de solución hidropónica La Molina y los genes (RAD52-2 Y CESA) presentaron estabilidad en su expresión, en dos tipos de tejido bajo condiciones de solución hidropónica La Molina y Murashige y Skoog, respectivamente.

**Palabras clave:** genes de referencia, genes housekeeping, *Lupinus mutabilis*, transcriptoma.

## SUMMARY

Gene expression studies require precise and reproducible measurements. Therefore, a reference gene as internal reaction control is needed; which shows a minimal variation in its expression at different tissues under different conditions or treatments. Thus, many housekeeping genes have been used as reference genes in plants; such as, GAPDH, EF-1, UBQ, UBC, EIF1 and eukaryotic transcription factors. However, they have not always been appropriate for gene expression studies. Furthermore, the number of these genes in plants remains limited and there are not studies in *Lupinus mutabilis* S. Thus, the aim of this research was to identify and validate reference genes in this species for gene expression studies. For this, we worked with the transcriptome of the developing flower buds and vegetative tissue, which was filtered through three selection criteria: 1) the coefficient of variation (CV) < 0.10 with an average value of FPKM > 10, 2) five tests of homogeneity of variance: Levene, Barlett, F-test, Fligner-Kligner and Hartley (p-value > 0.05) and 3) CV of p-value < 0.20 with an average value of FPKM > 40. This allowed to selected 16 candidate reference genes, which were validated by RT-PCR in leaf, stem and root. Finally, 8 genes were identified: RPL11, RPS18, RPS27L, ERF3, OEP24, CESA, At4g27220, and V-ATPase, these genes showed a constant expression level and without significant differences (P <0.05) at the leaf, stem and root level for *Lupinus mutabilis* S. that were grown with La Molina hydroponic solution and two genes (RAD52-2 and CESA) showed gene expression stability under La Molina and Murashige and Skoog Basal Nutrient solution conditions, respectively.

**Keywords:** reference genes, housekeeping genes, *Lupinus mutabilis*, transcriptome

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú posee una gran biodiversidad, equivalente al 10% del total mundial (Busmann & Sharon, 2014) que en gran medida contribuye a su economía (UNCTAD, 2018). Uno de estos recursos genéticos es el tarwi, *Lupinus mutabilis*, leguminosa originaria de los Andes de América del Sur, domesticada por primera vez en el norte peruano (Atchison *et al.*, 2016; Dávila, 1987). La cual posee un alto valor nutricional, principalmente por sus elevados porcentajes de proteína y aceites presentes en su semilla (Gross *et al.*, 1988). Los que la comparan, con la soya e incluso como una alternativa de cambio a la proteína animal (Wellesley *et al.*, 2015). Por lo que este cultivo podría garantizar la seguridad alimentaria del Perú.

Por otro lado, este cultivo suministra nitrógeno a los agroecosistemas gracias a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con los rizobios (Jensen *et al.*, 2012). Asimismo, puede desarrollarse en tierras secas y adaptarse a diferentes condiciones, gracias a su gran variabilidad en cuanto a adaptación a suelos, precipitación, temperatura, altitud, periodo vegetativo y tolerancia a enfermedades y plagas (Angus *et al.*, 2001; Entz *et al.*, 2001; Lefroy *et al.*, 2001; Mujica, 1990). Todo esto demuestra el gran potencial del cultivo y como su mejoramiento podría incentivar en su consumo directo y agroindustrial.

Se sabe que varias características de importancia económica se encuentran controladas generalmente por varios genes (Zhang *et al.*, 2020). En tal sentido, se hace necesario conocer los patrones de expresión de esos genes para entender su dinámica de la expresión genética y los diferentes procesos biológicos (Kumar *et al.*, 2016). Entre las técnicas más usadas para la detección y cuantificación de la transcripción de ARNm están el Northern Blot, hibridación in situ (Parker & Barnes, 1999), la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (Weis *et al.*, 1992), la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa reacción (RT-qPCR) (Ginzinger, 2002), microarrays (Bucher, 1999) y ARN-seq (Wang *et al.*, 2009).

El análisis de expresión génica requiere mediciones precisas y reproducibles de los niveles transcripcionales de los genes de interés. Por lo que se debe tener en cuenta las condiciones



que modulan su expresión (Derveaux *et al.*, 2010), de modo que se requiere necesariamente el uso de un control de reacción interno junto con el gen evaluado para calibrar la variabilidad experimental; es decir, un gen de referencia (Chen *et al.*, 2011); Kozera y Rapacz, 2013). El cual debe expresarse a un nivel constante y estable en diferentes tipos de células y bajo diferentes tratamientos. Así mismo, debe demostrar la variabilidad resultante de las imperfecciones de la tecnología utilizada y los procedimientos preparatorios (Caracausi *et al.*, 2017; Kozera & Rapacz, 2013); lo que asegurará que cualquier tipo de variación solo sea la generada por la cantidad de material genético analizado.

Los primeros genes de referencia usados fueron los genes housekeeping. Genes constitutivos (Caracausi *et al.* 2017) requeridos para el mantenimiento de las funciones básicas de la célula (Joseph *et al.*, 2018), que se expresan en todas las células en condiciones normales, independientemente del tipo de tejido, etapa de desarrollo, estado de ciclo o la condición externa (Eisenberg y Levanon, 2013). Los genes de referencia más utilizados en plantas son Glicerlaldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de alargamiento-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), poliubiquitina (UBQ), actina,  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina, 18S rRNA, 25S ARNr, enzima conjugadora de ubiquitina E2 (UBC), factor de iniciación eucariota 1 (EIF1) y factores de transcripción eucariota (Kozera & Rapacz, 2013; Zheng Wang *et al.*, 2014). Sin embargo, no todos han sido apropiados (Rocha-Martin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016), por lo que su validación es requerida para cada especie.

Existe un número limitado de genes de referencia validados en plantas, y hasta el momento no se tienen reportes para *Lupinus mutabilis*, por lo que la presente investigación busca identificar y validar genes de referencia en *L. mutabilis* que puedan servir como un control interno para deslindar cualquier tipo error en la cuantificación de su expresión genética. Los cuales, deben ofrecer estabilidad para su empleo en futuros estudios de expresión y cuantificación genética.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 GENERALIDADES de *Lupinus mutabilis* Sweet

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica

*Lupinus mutabilis* pertenece a la división Magnoliophyta, clase Magnolipsida, orden Fabales y a la familia de las fabaceas. Esta familia ha sido clasificada de forma aceptada, en tres subfamilias: Caesalpinieae, Mimosoideae, y Papilionoideae (Azani *et al.*, 2017). Esta última incluye varias legumbres de importancia alimentaria (Wolko *et al.*, 2011). Como lo es, el género *Lupinus*, un grupo monofilético que está incluido en la tribu Genisteeae (Ainouche & Bayer, 2000).

Esta especie presenta el epíteto de *mutabilis*, que en Latín significa cambiante, debido al cambio de color que toman sus flores a lo largo del desarrollo de la planta (Eastwood & Hughes, 2018).

#### 2.1.2 Origen y distribución

*Lupinus mutabilis*, conocido comúnmente como tarwi es una leguminosa originaria de la zona andina de América del Sur (Dávila, 1987; Jacobsen & Mujica, 2008) y es la única especie de *Lupinus* americano domesticada y cultivada (Blanco, 1982). El análisis RAD seq realizado por Atchison y colaboradores (2016) refiere que fue domesticada por primera vez en el norte del Perú, probablemente en la región de Cajamarca, de su progenitor putativo silvestre, *Lupinus piurensis*.

El tarwi se distribuye desde Colombia hasta el norte de Argentina, en un amplio rango de altitudes de 1500 a 3800 m s.n.m. (Jacobsen y Mujica, 2008). Actualmente, el cultivo tiene importancia agrícola en Ecuador, Perú y Bolivia (Mercado, 2018). El cual ha disminuido por falta de difusión de las formas de uso y su sabor amargo, a pesar de su gran valor nutritivo y resistencia a factores climáticos adversos en las zonas de cultivo (Jacobsen y Mujica, 2008). En Perú, se cultiva principalmente alrededor del lago Titicaca, desde Ilave hasta la frontera con Bolivia en Desaguadero (Jacobsen y Mujica, 2008). Así como en Cajamarca, Cuzco, Huancayo, Cajamarca y Ayacucho (Jacobsen y Mujica, 2006). Por otro lado, en la

Unión Europea se viene desarrollando el proyecto de investigación LIBBIO para aprovechar las variedades de tarwi adaptadas a estas zonas. Los países que conforman este proyecto son Portugal, España, Rumania, Austria, Países Bajos, Islandia, Alemania y Grecia (van Haren y Arnason, 2017).

### 2.1.3 Descripción botánica

El tarwi es un arbusto anual o bienal de hábito erecto. Presenta un tallo principal o ramificado de 1-2.5 m de altura a veces ligeramente leñosos en la base. Sus hojas son palmadas digitadas con 5-9 folíolos por hoja. La inflorescencia es un racimo terminal de 10 cm, pudiendo llegar hasta 40 cm de alto, que presenta de 1-8 flores por verticilo, el color común es azul brillante con una franja central blanca y una mancha amarilla brillante que cambia a naranja cuando empieza a marchitarse, mientras que la franja central se oscurece hasta un azul púrpura. Contiene, normalmente de 5-8 vainas oblongas por infrutescencia, las cuales miden 52-120 mm de largo, 7-20 mm de ancho y 6-9 mm de espesor, que presentan normalmente de 3-7 semillas indehiscentes. Las semillas generalmente son oblongas, pero pueden ser elípticas o ligeramente rómbicas de 8-11 mm de largo, 6-9 mm de ancho y 4-6 mm de ancho, de un color blanco-crema, marrón, gris claro, negro o una combinación de estos (Eastwood & Hughes, 2018).

### 2.1.4 Diversidad genética

*Lupinus mutabilis* es una especie autógama, con flores hermafroditas, pero con un nivel predominante de alogamia (Blanco-Galdós, 1982). Se han reportado diferentes rangos de fertilización cruzada por insectos, fluctuando entre 4 a 11% (Blanco-Galdós, 1982). Mientras, que Camarena y colaboradores (2012) reportan entre 5 a 10 % de polinización cruzada.

Existe una gran variabilidad en cuanto a la arquitectura de la planta, adaptación a suelos, precipitación, temperatura, altitud y periodo vegetativo; asimismo varía en precocidad, contenido de proteínas, aceite, alcaloides, rendimiento, tolerancia a enfermedades y plagas. Así como en el color del grano, planta y flor. En ese sentido, el trabajo de Chirinos-Arias y colaboradores (2015), usando marcadores ISSR (inter secuencias simples repetidas), comprueba su alta variabilidad genética. La región que comprende Perú, Ecuador y Bolivia es donde se encuentra mayor variabilidad genética (Mujica, 1990).

Algunas de las especies de *Lupinus* andino, incluida *Lupinus mutabilis* tienen un nivel de ploidía de  $2n=48$  (Gladstones, 1998). Además, esta especie pertenece a un grupo de plantas

paleoploides que presenta un número básico de cromosomas  $x=6$  (Naganowska *et al.*, 2003), probablemente producto de alo y autoploidización, junto con otros reordenamientos cromosómicos, como el caso de *L. angustifolius*, ocasionando duplicaciones en regiones de su genoma (Kroc *et al.*, 2014). Por otro lado, el estudio realizado por Guilengue y colaboradores (2019) asigna en promedio un tamaño de genoma (2C) de 2.05 pg (2001.2 Mbp) para *L. mutabilis* con variaciones que revelan diferencias significativas entre accesiones. Asimismo, concluyen que no existe relación entre el tamaño del genoma y los rasgos morfológicos.

#### 2.1.5 Importancia de *Lupinus mutabilis* Sweet

En el Perú se cultivan aproximadamente 10 628 hectáreas de tarwi, con un rendimiento promedio de 1335kg/ha (Mercado *et al.*, 2018). El crecimiento acumulado del 2010 al 2013 fue de 15%. Lo que se ha visto reflejado en una lenta evolución de su industria. (INEI, 2017). Las regiones que más han contribuido a su producción son La Libertad, Cusco y Puno, con alrededor del 78% de la producción (MINAGRI, 2017).

Por otro lado, en Perú persiste una alta tasa de desnutrición y anemia infantil (Flores Bendezú *et al.*, 2015). En ese sentido, el tarwi se presenta como una alternativa de lucha, pues su semilla tiene un alto contenido de proteínas (41-51%) y aceites (14-24%) (Gross *et al.*, 1988), comparable a la soya. Incluso, denominándola como “soya andina” (Jacobsen & Mujica, 2006; Tapia, 2015). Asimismo, se presenta como una alternativa a la proteína animal, posibilitando el cambio de las dietas basadas en carne (Wellesley *et al.*, 2015). Además, la semilla presenta la mayoría de aminoácidos esenciales, fibra dietética y ácidos grasos (Carvajal-Larenas *et al.*, 2016).

Una de las proteínas que presenta la semilla de tarwi es la conclutina (Carvajal-Larenas *et al.*, 2016; Foley *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 1997). Esta proteína ha ganado interés, desde que se ha demostrado sus beneficios en la salud cardiovascular, el control de la resistencia a la insulina y la diabetes, así como a las moléculas antiinflamatorias (Belski *et al.*, 2011; Lima-Cabello *et al.*, 2017; Magni *et al.*, 2004). Otra de las proteínas presentes, es la ferritina, la cual fue encontrada en el perfil proteico del lupino realizado por (Strozycki y colaboradores (2007). Esto ha aumentado el valor nutricional del tarwi.

El tarwi, al ser una leguminosa, suministra nitrógeno a los agroecosistemas gracias a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con los rizobios (Smith *et al.*, 2007), estimulando la productividad de los cultivos en rotación. (Lima-Cabello *et al.*, 2017)

Rodríguez *et al.*, (2016) mencionan que, en cuanto a contribución en la fijación de nitrógeno en el suelo, el tarwi fija un equivalente de 350 a 750 kilos de urea por hectárea. Además, puede desarrollarse en tierras secas (Angus *et al.* 2001; Entz *et al.* 2001; Lefroy *et al.* 2001).

## **2.2 EXPRESIÓN GENÉTICA**

### **2.2.1 Cuantificación de expresión de genes**

Identificar que genes se expresan y en qué niveles es esencial para entender la dinámica de la expresión genética y los diferentes procesos biológicos de forma integral (Zhang *et al.*, 2020). La habilidad para cuantificar los niveles de expresión específico de un gen es un tema central en la investigación de la función de un gen (Liu *et al.*, 2016). Los métodos más usados para medir cuantitativamente los niveles de expresión genética son el Northern Blot, hibridación *in situ* (Parker & Barnes, 1999), la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) (Weis *et al.* 1992), microarrays (Bucher, 1999) y RNA-seq (Wang *et al.*, 2009).

Actualmente, la técnica de secuenciación de próxima generación, ARN-seq (secuenciación de ARN) se viene usando en la medición de los niveles de expresión de ARN. Esta técnica de secuenciación del transcriptoma (Wang *et al.*, 2009) permite determinar y cuantificar los niveles de expresión de genes bajo diferentes condiciones ambientales, en respuesta a diferentes estímulos, estados de desarrollo y comparación de distintos tratamientos de un organismo, órgano o tejido (Ekblom y Galindo, 2011; Van verk *et al.*, 2013). La alta frecuencia de su uso en diferentes experimentos, la convierte en una herramienta para encontrar nuevos candidatos a genes de referencia. Sobre todo, porque no solo se limita a especies modelos (Carmona *et al.*, 2016).

### **2.2.2 Metodologías usadas en la identificación de genes de referencia**

Existen diferentes métodos para la identificación de genes de referencia. Entre ellos, RT-PCR, es utilizada por muchos años para la identificación de estos genes (Dheda *et al.*, 2004; Ullmannová & Haskovec, 2003; Wu *et al.*, 2000; Gerard *et al.*, 2000; Savli *et al.*, 2003). Esta técnica es una variante de la PCR, donde se usa la enzima transcriptasa reversa para obtener ADNc a partir de ARN, para finalmente amplificar el ADNc por PCR tradicional o en tiempo real (Bustin & Nolan, 2009).

El análisis secuencial de expresión genética (SAGE), es una técnica de perfil de secuencia genética (Hu, 2006) usada para obtener un análisis completo de los patrones de expresión

genética de un conjunto de datos. En la que se analiza la data registrada para luego evaluar la especificidad de los genes de referencia por PCR cuantitativa (qPCR) y analizar los resultados (Chari *et al.* 2010).

El análisis microarrays es una técnica muy utilizada que ha permitido para identificar genes de referencia cuando la especie en estudio tiene un genoma de referencia, como *Arabidopsis thaliana* (Chia *et al.*, 2010; Heng *et al.*, 2011; Too y Ling, 2011). Se ha descubierto que, para algunos casos, los datos de microarrays normalizados tradicionalmente son más estables que los encontrados por PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR) y qPCR (Maccoux *et al.*, 2007; Gur-Dedeoglu *et al.*, 2009).

Los métodos de análisis de varianza (ANOVA) unidireccional también han sido utilizados en algunos estudios de expresión genética, logrando identificar genes de referencia (Fu *et al.* 2010).

La herramienta de secuenciamiento ARN-seq, preferida actualmente sobre el análisis microarray, pues es un método que permite evaluar los cambios en expresión global (Wang *et al.*, 2009). Entre otras ventajas, produce valores de expresión que se correlacionan mejor con los resultados obtenidos por qPCR (Wang *et al.*, 2009) y los niveles de proteínas (Fu *et al.*, 2009).

### 2.2.3 Genes de referencia

Las técnicas de cuantificación de expresión genética necesitan de una normalización del nivel de expresión de ARN. Es así que comúnmente se viene utilizando un ARN de referencia para relacionar la cantidad de ARN de una especie dada; pues se expresan a un nivel constante (Caracausi *et al.* 2017; Eisenberg y Levanon, 2013).

Los genes de referencia son genes que cumplen el rol de control de reacción interno con secuencias diferentes al gen en estudio (Kozera & Rapacz, 2013) y que presenta un nivel de expresión que no se ve afectado por factores experimentales (Chervoneva *et al.*, 2010). Según Caracausi *et al.* (2017) el gen de referencia ideal para un estudio de expresión genética “debe expresarse a un nivel medio-alto para una fácil detección, debe expresarse a un nivel constante/ estable en diferentes tipos de células y dentro del mismo tipo de célula sometidas a diferentes tratamientos, y debe mantener estas características en los-diferentes tejidos del organismo”. Estos requisitos maximizaran su utilidad en estudios de expresión. Mientras que Kozera y Rapacz (2013) indican, que “debe mostrar una variabilidad mínima en su expresión

entre los tejidos y los estados fisiológicos del organismo; así como demostrar la variabilidad resultante de las imperfecciones de la tecnología utilizada y los procedimientos preparatorios”; ya que expondrá cualquier tipo de variación que no tenga que ver con la generada por la cantidad de material genético.

Desde el punto de vista biológico, los requisitos teóricos de un gen de referencia ideal se asemejan a lo de los genes housekeeping, los cuales se expresan constitutivamente (Caracausi *et al.* 2017). Los genes housekeeping son genes requeridos para el mantenimiento de las funciones básicas de la célula, como división celular, crecimiento y desarrollo, apoptosis, procesos fisiológicos, metabolismo, entre otros (Joseph *et al.*, 2018). Por su naturaleza, se espera que se expresen en todas las células de un organismo en condiciones normales, independientemente del tipo de tejido, etapa de desarrollo, estado de ciclo o la condición externa (Eisenberg y Levanon, 2013).

Es así que los primeros genes de referencia usados fueron genes housekeeping, pues codificaban proteínas involucradas en funciones estructurales y en el metabolismo celular básico (Carmona *et al.*, 2016). Actualmente, siguen siendo usados ampliamente como controles internos para estudios de expresión genética (Thellin. *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2010; Vandesompele *et al.*, 2002). Sin embargo, se sabe que no todos son apropiados para su uso (Rocha-Martin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016) por lo que debe ser validados para su uso como genes de referencia.

#### 2.2.4 Genes de referencia en plantas

En la actualidad, se han realizado numerosos estudios de evaluación y validación de genes de referencia para muchas especies de plantas, tales como *Arabidopsis thaliana* (Czechowski *et al.*, 2005), papa (Nicot *et al.*, 2005), arroz (Kim *et al.*, 2003), tomate (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008), soja (Jian *et al.*, 2008), caña de azúcar (Iskandar *et al.*, 2004), maní (Jiang *et al.*, 2011), tabaco (Schmidt y Delaney, 2010). Esto, como resultado de un aumento en la data disponible y el desarrollo de varios enfoques matemáticos que han permitido el estudio de la expresión génica (Kozera y Rapacz, 2013).

Los genes housekeeping más usados como genes de referencia de manera tradicional son gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), factor de alargamiento-1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ), poliubiquitina (*UBQ*), actina,  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina, *18S rRNA*, *25S ARNr*, enzima conjugadora de ubiquitina E2 (*UBC*), factor de iniciación eucariota 1 (*EIF1*) y factores de transcripción eucariota. (Kozera & Rapacz, 2013). Los que han sido usados indistintamente

para muchas especies; sin embargo, no siempre han presentado una expresión constante (Wang *et al.*, 2014). (Ver ANEXO 1)

#### 2.2.5 Importancia de genes de referencia

La importancia de los genes de referencia radica en la necesidad de su uso en experimentos que involucran comparación de la expresión de un gen en estudio por la variación de una condición (Joseph *et al.*, 2018). Tales como, factor de estrés biótico y abiótico, etapas de desarrollo, tratamiento, enfermedad, entre otros (Reverter *et al.*, 2008). El análisis de la expresión un gen en estudio implica una serie de procesos, los que son propensos a variaciones de muestra, preparación, cuantificación y manipulación (Pfaffl 2004; Guénin *et al.* 2009). Estas variaciones pueden superarse normalizando los niveles de ARNm del gen en estudio con el nivel del ARNm del gen de referencia. Lo que permitirá comparar distintos experimentos realizados en el mismo laboratorio (Bustin, 2002) y así poder obtener resultados confiables (Chari *et al.*, 2010). Por lo tanto, es indispensable identificar un gen de referencia adecuado para cualquier análisis de expresión genética.

#### 2.2.6 Inestabilidad de los genes de referencia

Existen diferentes estudios que cuestionan la confiabilidad de algunos genes como genes de referencia (Caradec *et al.*, 2010). Pues, presentan niveles de expresión genética que pueden variar tanto por sus funciones celulares y por las condiciones experimentales (Greer *et al.*, 2010)

Ke y colaboradores (2000) indican que algunos genes de referencia son muy susceptibles a cambios ambientales, como variaciones en la temperatura, estrés y otros cambios. Por lo que, un gen de referencia usado para un experimento puede no ser apto para otro, así sea para el mismo organismo (Atkinson *et al.*, 2013; Lacroix & Citovsky, 2013; H. Y. Wu *et al.*, 2014; T. Wu *et al.*, 2014; Xin *et al.*, 2013). Incluso podría mostrar variabilidad en diferentes órganos de la planta (Wang *et al.*, 2013) o en distintas etapas de su desarrollo (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008), o tener una expresión uniforme en distintos órganos de una misma planta, pero en determinadas etapas de desarrollo (Coker & Davies, 2003; Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008).

Por lo tanto, es indispensable que los resultados experimentales que involucran el uso de genes de referencia deban validarse (Radonić *et al.*, 2004). Es así, que se han desarrollado distintos métodos para verificar y seleccionar genes de referencia. Métodos como, Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) y NormFinder



(Andersen *et al.*, 2004). De manera, que los experimentos que no han realizado un proceso adecuado de selección, deben ser validados, antes de su uso en nuevos experimentos (Dundas & Ling, 2012)

## III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 MATERIALES

#### 3.1.1 Bibliotecas

- 6 bibliotecas del transcriptoma de la parte vegetativa de *Lupinus mutabilis* sometidas a estrés hídrico.
- 6 bibliotecas del transcriptoma de brotes florales en desarrollo de *Lupinus mutabilis*.

#### 3.1.2 Material vegetal

- Semillas de *Lupinus mutabilis* var. Andenes

#### 3.1.3 Reactivos y soluciones

- Agarosa
- Agua libre de nucleasas
- Agua destilada
- Bromuro de etidio
- Buffer TAE y TE
- Cloroformo
- Etanol puro
- Isopropanol
- Kit de cDNA
- Kit de ADNasa
- Nitrógeno líquido
- Primers
- TRI-REAGENT

### 3.1.4 Sustratos y nutrientes

- Arena
- Vermiculita
- Solución nutritiva La Molina
- Murashige y Skoog (MSP01)

### 3.1.5 Equipos de laboratorio e instrumentos

- Autoclave
- Balanza analítica
- Bisturí
- Cámara de electroforesis
- Congeladora -80°C, -20°C
- Fuente de poder
- Macetas
- Matraz Erlenmeyer (PIREX)
- Microcentrífuga
- Micropipetas 1-2, 20, 200 y 1 000 ul
- Microtubos (EPPENDORF) 2ml
- Morteros
- Nanofotómetro (IMPLEN NP80)
- Pilonas
- Pinza
- Termociclador (BIORAD T100)
- Termomixer (EPPENDORF)
- Transiluminador UV
- Vórtex (HEIDOLPH REAXtop)

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Etapa *in silico*

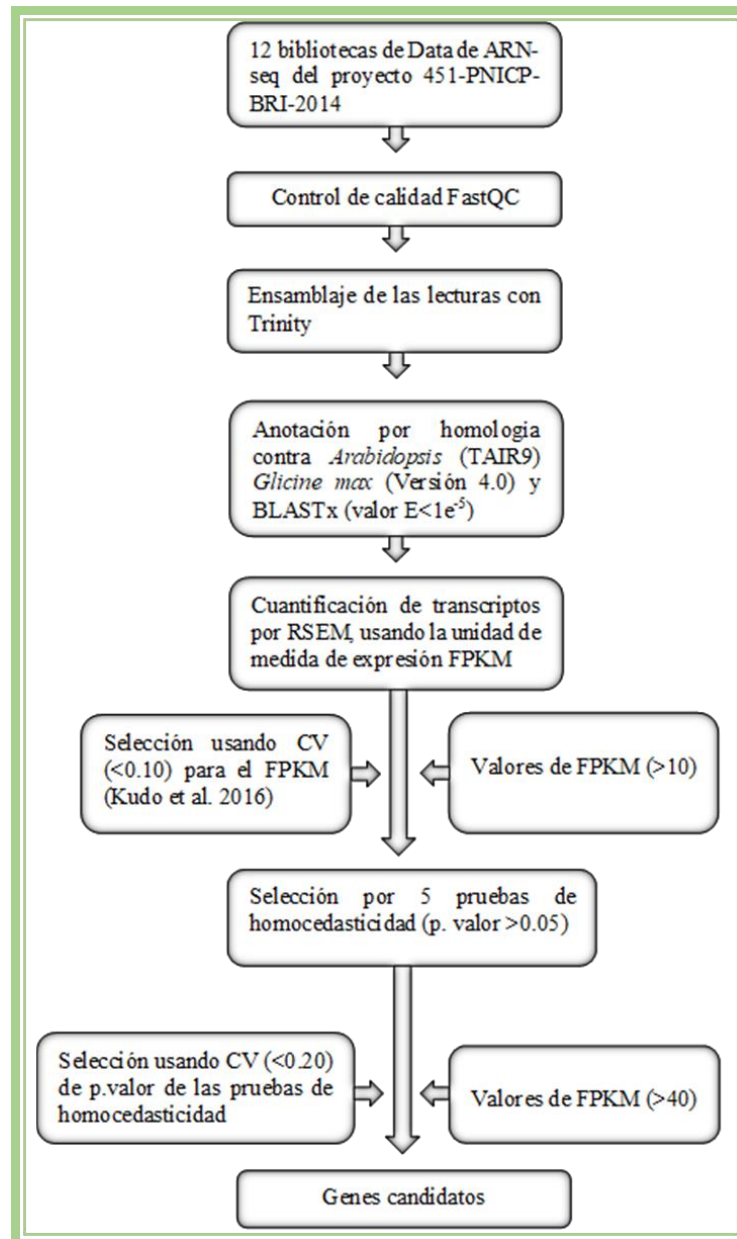
#### 3.2.1.1 Selección de los genes candidatos de referencia

Para la selección de los genes de referencia candidatos se utilizó 12 bibliotecas de data ARN-seq provenientes del proyecto 451-PNICP-BRI-2014 del transcriptoma de la parte vegetativa bajo estrés hídrico (Hidalgo Rodríguez, 2021) y de brotes florales en desarrollo (Ramos Otiniano, 2021) de *Lupinus mutabilis* S. El secuenciamiento de ambos transcriptomas se hizo en conjunto con un total de 290 466 840 millones y 308 012 510 millones de reads iniciales, respectivamente para cada experimento. Solo se consideraron las lecturas con puntuación phred  $\geq 30$ , sin adaptador y con una longitud  $\geq 20$  pb.

Las bibliotecas pasaron por un control de calidad por el programa FastQC, en el que se eliminó las muestras de baja calidad y de bajo porcentaje de alineamiento. Luego, se realizó el ensamblaje de lecturas en Trinity y la anotación por homología contra la base de datos genéticos de Arabidopsis (TAIR9, <http://www.arabidopsis.org/>), *Glycine max* (Version 4.0, [ftp://ftp.jgipf.org/pub/JGI\\_data/phyto-zome/v4.0/Gmax](ftp://ftp.jgipf.org/pub/JGI_data/phyto-zome/v4.0/Gmax)), utilizando el algoritmo BLASTX con un valor típico de corte de valor E  $< 1e^{-5}$  en las bases de datos de NCBI, incluida la no redundante (NR). Seguidamente, se realizó la cuantificación de los transcritos por RSEM utilizando la unidad de medida de expresión FPKM (fragmentos por kilobase de transcritos por millón de fragmentos alineados).

Luego que cada transcrito contó con un valor único de FPKM, se utilizó el valor de cada una de las 12 entradas de cada biblioteca para seleccionar los genes candidatos. Es así que para el primer criterio de selección, se usó el coeficiente de variación (CV) como un índice para evaluar la variación en la expresión de los genes, seleccionando aquellos genes con  $CV < 0.10$  (Kudo *et al.*, 2016) y con un valor promedio de FPKM de gen superior a 10. Para el segundo criterio de selección, se usaron 5 pruebas de homogeneidad de varianza: Levene, Barlett, F-test, Fligner-Kligner y Hartley, seleccionando aquellos genes que para cada una de las pruebas tuvieron un p. valor  $> 0.05$ . Como requisito previo, se usaron las pruebas de Shapiro-Wilk y de Kolmogorov-Smirnov, (Yim *et al.*, 2015) para determinar si las variaciones en la expresión génica siguen una distribución normal o si están sesgadas. En el tercer criterio de selección se utilizó el CV de los valores p.valor de cada una de las pruebas de homogeneidad de varianza, seleccionando los que tuvieron un  $CV < 0.20$  y con un valor promedio de FPKM superior a 40. Los genes que finalmente pasaron por estos 3 criterios fueron los candidatos

a genes de referencia para los que se diseñaron primers específicos para su validación por RT-PCR en hoja, tallo y raíz.



**Figura 1:** Diagrama de flujo del procedimiento de selección de los candidatos de genes de referencia

### 3.2.1.2 Pruebas de homocedasticidad

#### a. Prueba de F-test

Se utiliza para probar si las varianzas de dos muestras independientes son iguales. La distribución se forma por la división de dos variables chi-cuadrado independientes divididas por sus grados de libertad respectivamente (García, 2017).

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2},$$

$$F = \frac{(m-1) \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{(n-1) \sum_{i=1}^m (Y_i - \bar{Y})^2}.$$

Donde  $s_1^2 > s_2^2$  y tiene una distribución F con  $m-1$  y  $n-1$  grados de libertad bajo  $H_0$ . La prueba rechaza la hipótesis nula si:

$$F > F_{\frac{\alpha}{2}, N_1-1, N_2-1}$$

### b. Prueba de Hartley $F_{max}$

Usada para el análisis de varianza para verificar si dos grupos diferentes tienen una varianza similar. La prueba calcula la razón entre la varianza más grande de los grupos y la varianza más pequeña (García, 2017).

$$F_{max} = \frac{\max S_i^2}{\min S_j^2}$$

Se rechaza si  $H_0$  si  $F_{max} > F_{\max, \alpha, \nu}$ , donde se debe tomar en cuenta los parámetros de distribución:  $m$ ; grados de libertad del numerador,  $\nu = n-1$ ; grado de libertad en el denominador y  $k$ ; número de muestras.

### c. Prueba de Levene

La prueba de Levene ofrece una alternativa más robusta, ya que es poco sensible a la desviación de la normalidad. Esta prueba rechaza la hipótesis de que las varianzas son iguales con un nivel de significancia  $\alpha$ , si  $W > F_{\alpha, k-1, N-k}$ , donde;  $k-1$ : grados de libertad en el numerador y  $N-k$ : grados de libertad en el denominador a un nivel de significancia  $\alpha$  y  $Z_{ij} = |X_{ij} - \bar{X}_{i.}|$ , siendo  $\bar{X}_{i.}$  es la medio del  $i$ -ésimo subgrupo.

$$W = \frac{(N - k) \sum_{i=1}^k n_i (\bar{Z}_{i.} - \bar{Z}_{..})^2}{(k - 1) \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Z_{ij} - \bar{Z}_{i.})^2}$$

#### d. Prueba de Barlett

Introducida por Bartlett en 1937 es una de las pruebas que se utiliza con más frecuencia para probar la homogeneidad de las varianzas (Conover *et al.*, 1981). Esta prueba no requiere que los tamaños de las muestras por tratamiento sean iguales y sensible a desviaciones del supuesto de normalidad.

#### e. Prueba de Fligner-Kligner

Introducida por Fligner-Killeen (1976) y modificada por Conover *et al.* (1981), para probar homogeneidad de varianzas. Esta prueba es menos sensible a desviaciones del supuesto de normalidad.

### 3.2.2 Etapa experimental

#### 3.2.2.1 Crecimiento de la planta y cosecha

Se trabajó con las semillas de *Lupinus mutabilis* var. Andenes del Laboratorio de Biotecnología del PIPS de cereales y granos nativos. Las semillas fueron desinfectadas por 10 minutos en una solución de Benomyl (1 g.L<sup>-1</sup>) y germinadas en placas Petri con agua destilada. Las plántulas fueron sembradas bajo condiciones de invernadero usando una mezcla de arena con vermiculita en proporción 2:1. La mitad de las plántulas fueron regadas con solución hidropónica La Molina y la otra mitad con la solución de nutrientes basales de Murashige y Skoog (MSP01). Se cosecharon 3 tipos de órganos: raíz, tallo y hoja y se tomaron 3 réplicas para cada órgano.

#### 3.2.2.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total se aislará con TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego se lo tratará con DNAsa I (Fermentas) para eliminar la contaminación del ADN genómico. Se sintetizó cDNA con oligo dT (Invitrogen) usando el sistema de síntesis SuperScript® III First-Strand (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante

### 3.2.2.3 Diseño de primers

Se diseñaron a partir de los genes seleccionados de las 12 bibliotecas previamente secuenciadas y su diseño se realizó con el software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), teniendo en cuenta las siguientes características: una temperatura de 58°- 60°C, una longitud de 20-24 pb, de 40-60 % GC y una longitud del amplificado de 100 a 150 pb. Además, se utilizó oligo-calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) para evaluar autodimerización, formación de horquilla y autoanillamiento.

### 3.2.2.4 Validación del nivel de expresión del gen de referencia candidato

La RT-PCR semicuantitativa se llevó a cabo con los primers diseñados para cada uno de los genes candidatos con los cDNAs de hoja, tallo y raíz. Los parámetros de RT-PCR consistieron en un preciclo de 94°C durante 2 min seguido de 33 ciclos que consistieron en 94°C durante 30 s, x°C durante 1 min y 72°C durante 40 s (x es el T<sub>m</sub> de los primers en el Anexo 3). Luego se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos y una temperatura de conservación de 4°C. Los cambios de expresión fueron determinados midiendo las intensidades de la banda en un gel de agarosa con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) del National Institute of Health (USA) (Zolla *et al.*, 2013).



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Análisis y selección de los transcritos

Para el primer criterio de selección de los genes de referencia candidatos, se empleó un coeficiente de variación ( $CV < 0.10$ ) y un valor FPKM  $> 10$ . El valor de FPKM es una estimación aceptada comúnmente para el nivel de expresión en unigenes (Mortazavi *et al.*, 2008). Flegel *et al.* (2013) indican una escala de equivalencia entre FPKM y el nivel expresión génica, en tal sentido 1 FPKM corresponde a una expresión baja, 10 FPKM a una expresión moderada y 100 FPKM a una expresión alta. Por su parte, Kudo *et al.*, (2016) refieren que los valores de FPKM deben estar por encima de 10. Pues este valor representó el límite inferior del nivel de expresión génica de al menos 15 transcritos usados como genes de referencia. El coeficiente de variación (CV) es un estadístico empleado en el análisis de expresión de genes (Novak *et al.* 2002) y su variación a partir del valor FPKM (de Jonge *et al.*, 2007; Zhuang *et al.*, 2015). Czechowski *et al.* (2005) y Narsai *et al.* (2010) sugieren que genes con valores de CV bajos se expresan de forma estable y que el valor de corte debe ser de al menos 0.3. Finalmente, se utilizó el criterio de Kudo *et al.* (2016), por contar con solo dos experimentos de ARN-seq. De esta manera, se pudo seleccionar 297 genes candidatos (Tabla Anexo 1, Figura 1)

Para reducir el número de genes candidatos se empleó un segundo criterio de selección. Donde se usaron pruebas de homocedasticidad para evaluar la variabilidad en la expresión de los genes. Los valores de expresión génica son específicos de cada gen por lo que se espera se cumplan los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (Huang *et al.*, 2004), Sin embargo, Simmons y Peddada (2007) indican que la expresión génica no es homocedástica a lo largo del tiempo. En tal sentido es necesario evaluar la homocedasticidad al analizar los datos de expresión génica. Así como lo ha utilizado Arun *et al.* (2015) para evaluar genes de referencia seleccionados en *Bicyclus anynana*. En ese sentido, se decidió trabajar con 5 pruebas de homogeneidad de varianzas: Levene, Barlett, F-test, Fligner-Kligner y Hartley. Las mismas que presentan diferentes grados de robustez a la desviación de los supuestos de normalidad (Correa *et al.*, 2006), debido a la dispersión de los datos. El

análisis de la normalidad de los datos fue un requisito previo al análisis de la homocedasticidad. Se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y de Kolmogorov-Smirnov, como lo propuso Yim *et al.* (2015), al ser una forma de determinar si las variaciones en la expresión génica siguen una distribución normal o si están sesgadas. Esto permitió seleccionar 193 genes candidatos (Tabla 1), los que presentaron un p.valor mayor a 0.05 ( $\alpha$ ) para cada una de las pruebas realizadas.

**Tabla 1:** Genes de referencia candidatos seleccionados mediante 5 pruebas de homocedasticidad (p.valor >0.05)

| Gene_id               | Pruebas de normalidad |                    | Pruebas de homocedasticidad |         |        |                 |         |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------------|---------|--------|-----------------|---------|
|                       | Shapiro-Wilk          | Kolmogorov-Smirnov | Levene                      | Barlett | F-test | Fligner-Kligner | Hartley |
| TRINITY_DN10129_c0_g1 | 0.247                 | 0.205              | 0.197                       | 0.055   | 0.054  | 0.335           | 0.054   |
| TRINITY_DN12076_c0_g1 | 0.811                 | 0.866              | 0.957                       | 0.796   | 0.796  | 0.989           | 0.796   |
| TRINITY_DN12386_c0_g1 | 0.428                 | 0.72               | 0.154                       | 0.546   | 0.547  | 0.128           | 0.547   |
| TRINITY_DN12694_c0_g1 | 0.862                 | 0.541              | 0.357                       | 0.642   | 0.643  | 0.293           | 0.643   |
| TRINITY_DN13672_c0_g1 | 0.389                 | 0.564              | 0.647                       | 0.523   | 0.524  | 0.755           | 0.524   |
| TRINITY_DN13980_c0_g1 | 0.253                 | 0.566              | 0.676                       | 0.407   | 0.407  | 0.877           | 0.407   |
| TRINITY_DN15552_c0_g1 | 0.429                 | 0.618              | 0.551                       | 0.715   | 0.716  | 0.174           | 0.716   |
| TRINITY_DN16357_c0_g1 | 0.921                 | 0.828              | 0.819                       | 0.633   | 0.633  | 0.86            | 0.633   |
| TRINITY_DN16764_c0_g1 | 0.881                 | 0.881              | 0.428                       | 0.437   | 0.438  | 0.339           | 0.438   |
| TRINITY_DN17114_c0_g1 | 0.195                 | 0.123              | 0.288                       | 0.661   | 0.662  | 0.495           | 0.662   |
| TRINITY_DN17322_c0_g3 | 0.466                 | 0.623              | 0.415                       | 0.679   | 0.68   | 0.782           | 0.68    |
| TRINITY_DN17590_c0_g1 | 0.422                 | 0.805              | 0.072                       | 0.226   | 0.227  | 0.254           | 0.227   |
| TRINITY_DN18240_c0_g1 | 0.378                 | 0.578              | 0.702                       | 0.92    | 0.921  | 0.662           | 0.921   |
| TRINITY_DN18572_c0_g1 | 0.216                 | 0.584              | 0.138                       | 0.288   | 0.288  | 0.23            | 0.288   |
| TRINITY_DN18747_c0_g2 | 0.248                 | 0.574              | 0.07                        | 0.072   | 0.072  | 0.854           | 0.072   |
| TRINITY_DN18802_c0_g1 | 0.201                 | 0.165              | 0.845                       | 0.866   | 0.867  | 0.878           | 0.867   |
| TRINITY_DN18893_c0_g2 | 0.541                 | 0.201              | 0.956                       | 0.845   | 0.845  | 0.753           | 0.845   |
| TRINITY_DN18909_c0_g1 | 0.997                 | 0.91               | 0.705                       | 0.832   | 0.833  | 0.557           | 0.833   |
| TRINITY_DN19015_c5_g1 | 0.403                 | 0.424              | 0.105                       | 0.274   | 0.275  | 0.199           | 0.275   |
| TRINITY_DN19121_c0_g1 | 0.485                 | 0.504              | 0.158                       | 0.213   | 0.214  | 0.1             | 0.214   |
| TRINITY_DN19139_c0_g2 | 0.69                  | 0.72               | 0.372                       | 0.728   | 0.728  | 0.615           | 0.728   |
| TRINITY_DN19209_c0_g2 | 0.327                 | 0.765              | 0.492                       | 0.649   | 0.65   | 0.707           | 0.65    |
| TRINITY_DN19543_c1_g1 | 0.483                 | 0.464              | 0.235                       | 0.387   | 0.388  | 0.321           | 0.388   |
| TRINITY_DN19576_c0_g2 | 0.541                 | 0.934              | 0.089                       | 0.283   | 0.283  | 0.96            | 0.283   |
| TRINITY_DN19583_c1_g1 | 0.11                  | 0.441              | 0.323                       | 0.696   | 0.696  | 0.254           | 0.696   |
| TRINITY_DN19598_c0_g1 | 0.111                 | 0.108              | 0.97                        | 0.94    | 0.94   | 0.686           | 0.94    |
| TRINITY_DN19603_c0_g1 | 0.566                 | 0.871              | 0.674                       | 0.749   | 0.749  | 0.599           | 0.749   |
| TRINITY_DN19689_c0_g1 | 0.315                 | 0.605              | 0.709                       | 0.662   | 0.663  | 0.782           | 0.663   |
| TRINITY_DN19920_c0_g1 | 0.375                 | 0.205              | 0.268                       | 0.223   | 0.223  | 0.297           | 0.223   |
| TRINITY_DN19971_c4_g2 | 0.341                 | 0.228              | 0.225                       | 0.459   | 0.459  | 0.23            | 0.459   |
| TRINITY_DN19997_c1_g1 | 0.408                 | 0.347              | 0.342                       | 0.559   | 0.559  | 0.755           | 0.559   |
| TRINITY_DN20060_c2_g1 | 0.908                 | 0.529              | 0.958                       | 0.776   | 0.776  | 0.945           | 0.776   |
| TRINITY_DN20247_c5_g3 | 0.991                 | 0.996              | 0.653                       | 0.542   | 0.543  | 0.737           | 0.543   |
| TRINITY_DN20251_c0_g2 | 0.685                 | 0.377              | 0.728                       | 0.548   | 0.548  | 0.878           | 0.548   |
| TRINITY_DN20257_c0_g1 | 0.382                 | 0.155              | 0.324                       | 0.523   | 0.524  | 0.151           | 0.524   |
| TRINITY_DN20346_c0_g4 | 0.21                  | 0.243              | 0.133                       | 0.192   | 0.192  | 0.131           | 0.192   |

Continuación...

|                       |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| TRINITY_DN20389_c0_g1 | 0.657 | 0.61  | 0.212 | 0.55  | 0.55  | 0.286 | 0.55  |
| TRINITY_DN20613_c0_g8 | 0.923 | 0.518 | 0.367 | 0.615 | 0.616 | 0.837 | 0.616 |
| TRINITY_DN20894_c2_g2 | 0.288 | 0.128 | 0.15  | 0.333 | 0.333 | 0.699 | 0.333 |
| TRINITY_DN20901_c0_g3 | 0.339 | 0.265 | 0.598 | 0.972 | 0.972 | 0.752 | 0.972 |
| TRINITY_DN20921_c0_g3 | 0.508 | 0.5   | 0.903 | 0.82  | 0.82  | 0.809 | 0.82  |
| TRINITY_DN20956_c1_g3 | 0.343 | 0.24  | 0.229 | 0.279 | 0.279 | 0.18  | 0.279 |
| TRINITY_DN20971_c0_g4 | 0.611 | 0.712 | 0.414 | 0.368 | 0.369 | 0.335 | 0.369 |
| TRINITY_DN21010_c0_g1 | 0.572 | 0.76  | 0.253 | 0.213 | 0.213 | 0.265 | 0.213 |
| TRINITY_DN21101_c3_g2 | 0.144 | 0.434 | 0.252 | 0.205 | 0.205 | 0.804 | 0.205 |
| TRINITY_DN21122_c5_g4 | 0.594 | 0.085 | 0.494 | 0.49  | 0.49  | 0.471 | 0.49  |
| TRINITY_DN21232_c1_g2 | 0.177 | 0.13  | 0.578 | 0.342 | 0.343 | 0.744 | 0.343 |
| TRINITY_DN21304_c0_g1 | 0.814 | 0.436 | 0.454 | 0.817 | 0.817 | 0.339 | 0.817 |
| TRINITY_DN21377_c6_g1 | 0.628 | 0.4   | 0.506 | 0.407 | 0.408 | 0.567 | 0.408 |
| TRINITY_DN21405_c0_g1 | 0.351 | 0.177 | 0.941 | 0.652 | 0.652 | 0.661 | 0.652 |
| TRINITY_DN21407_c0_g1 | 0.226 | 0.187 | 0.944 | 0.804 | 0.804 | 0.888 | 0.804 |
| TRINITY_DN21421_c1_g1 | 0.166 | 0.301 | 0.184 | 0.06  | 0.06  | 0.174 | 0.06  |
| TRINITY_DN21460_c0_g2 | 0.363 | 0.363 | 0.117 | 0.361 | 0.362 | 0.205 | 0.362 |
| TRINITY_DN21484_c1_g1 | 0.677 | 0.514 | 0.154 | 0.155 | 0.155 | 0.119 | 0.155 |
| TRINITY_DN21524_c0_g9 | 0.117 | 0.325 | 0.417 | 0.278 | 0.279 | 0.234 | 0.279 |
| TRINITY_DN21591_c0_g1 | 0.8   | 0.976 | 0.803 | 0.841 | 0.841 | 0.687 | 0.842 |
| TRINITY_DN21613_c1_g1 | 0.109 | 0.159 | 0.527 | 0.662 | 0.662 | 0.339 | 0.663 |
| TRINITY_DN21660_c0_g1 | 0.807 | 0.909 | 0.308 | 0.291 | 0.292 | 0.61  | 0.292 |
| TRINITY_DN21701_c1_g3 | 0.114 | 0.495 | 0.283 | 0.414 | 0.414 | 0.644 | 0.415 |
| TRINITY_DN21761_c0_g1 | 0.359 | 0.5   | 0.169 | 0.191 | 0.191 | 0.084 | 0.191 |
| TRINITY_DN21805_c0_g1 | 0.285 | 0.343 | 0.706 | 0.728 | 0.729 | 0.635 | 0.729 |
| TRINITY_DN21929_c1_g2 | 0.707 | 0.853 | 0.11  | 0.076 | 0.076 | 0.226 | 0.076 |
| TRINITY_DN21932_c3_g1 | 0.496 | 0.421 | 0.119 | 0.286 | 0.287 | 0.191 | 0.287 |
| TRINITY_DN21995_c0_g1 | 0.594 | 0.557 | 0.796 | 0.707 | 0.707 | 0.662 | 0.707 |
| TRINITY_DN22089_c1_g1 | 0.505 | 0.85  | 0.879 | 0.916 | 0.916 | 0.905 | 0.916 |
| TRINITY_DN22112_c1_g1 | 0.776 | 0.819 | 0.543 | 0.563 | 0.563 | 0.755 | 0.564 |
| TRINITY_DN22140_c0_g1 | 0.869 | 0.784 | 0.348 | 0.605 | 0.605 | 0.737 | 0.605 |
| TRINITY_DN22154_c3_g3 | 0.298 | 0.379 | 0.157 | 0.358 | 0.359 | 0.282 | 0.359 |
| TRINITY_DN22195_c2_g1 | 0.618 | 0.363 | 0.447 | 0.581 | 0.582 | 0.651 | 0.582 |
| TRINITY_DN22212_c0_g1 | 0.332 | 0.573 | 0.471 | 0.562 | 0.563 | 0.205 | 0.563 |
| TRINITY_DN22272_c1_g2 | 0.162 | 0.469 | 0.071 | 0.388 | 0.389 | 0.085 | 0.389 |
| TRINITY_DN22317_c0_g2 | 0.298 | 0.509 | 0.852 | 0.99  | 0.99  | 0.286 | 0.99  |
| TRINITY_DN22375_c0_g2 | 0.926 | 0.444 | 0.905 | 0.968 | 0.968 | 0.707 | 0.968 |
| TRINITY_DN22397_c0_g1 | 0.659 | 0.526 | 0.375 | 0.434 | 0.434 | 0.251 | 0.434 |
| TRINITY_DN22408_c3_g1 | 0.774 | 0.522 | 0.371 | 0.754 | 0.754 | 0.205 | 0.754 |
| TRINITY_DN22408_c7_g1 | 0.488 | 0.789 | 0.135 | 0.414 | 0.414 | 0.111 | 0.414 |
| TRINITY_DN22418_c1_g3 | 0.25  | 0.612 | 0.992 | 0.792 | 0.792 | 0.662 | 0.792 |
| TRINITY_DN22437_c0_g1 | 0.19  | 0.483 | 0.102 | 0.095 | 0.095 | 0.091 | 0.095 |
| TRINITY_DN22441_c0_g1 | 0.703 | 0.853 | 0.744 | 0.862 | 0.863 | 0.744 | 0.863 |
| TRINITY_DN22461_c1_g1 | 0.476 | 0.547 | 0.519 | 0.587 | 0.587 | 0.431 | 0.587 |
| TRINITY_DN22504_c0_g1 | 0.593 | 0.293 | 0.081 | 0.37  | 0.371 | 0.113 | 0.371 |
| TRINITY_DN22644_c0_g1 | 0.144 | 0.194 | 0.189 | 0.317 | 0.318 | 0.343 | 0.318 |
| TRINITY_DN22662_c0_g2 | 0.325 | 0.215 | 0.203 | 0.464 | 0.465 | 0.254 | 0.465 |
| TRINITY_DN22676_c1_g1 | 0.303 | 0.426 | 0.058 | 0.224 | 0.224 | 0.1   | 0.224 |
| TRINITY_DN22680_c0_g7 | 0.64  | 0.745 | 0.089 | 0.376 | 0.376 | 0.151 | 0.376 |
| TRINITY_DN22757_c3_g2 | 0.88  | 0.713 | 0.153 | 0.27  | 0.27  | 0.159 | 0.27  |
| TRINITY_DN22777_c0_g1 | 0.373 | 0.681 | 0.093 | 0.356 | 0.356 | 0.174 | 0.356 |
| TRINITY_DN22777_c0_g3 | 0.361 | 0.452 | 0.13  | 0.437 | 0.438 | 0.342 | 0.438 |
| TRINITY_DN22914_c0_g1 | 0.299 | 0.121 | 0.947 | 0.762 | 0.763 | 0.502 | 0.763 |
| TRINITY_DN22972_c3_g1 | 0.999 | 0.939 | 0.902 | 0.837 | 0.837 | 0.893 | 0.837 |
| TRINITY_DN23005_c2_g1 | 0.468 | 0.427 | 0.063 | 0.326 | 0.326 | 0.059 | 0.327 |
| TRINITY_DN23019_c0_g2 | 0.914 | 0.7   | 0.647 | 0.813 | 0.813 | 0.899 | 0.813 |
| TRINITY_DN23102_c0_g1 | 0.596 | 0.473 | 0.062 | 0.252 | 0.252 | 0.128 | 0.252 |

Continuación...

|                       |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| TRINITY_DN23103_c0_g2 | 0.427 | 0.336 | 0.886 | 0.829 | 0.83  | 0.23  | 0.83  |
| TRINITY_DN23277_c2_g2 | 0.617 | 0.8   | 0.279 | 0.479 | 0.48  | 0.234 | 0.48  |
| TRINITY_DN23283_c1_g2 | 0.823 | 0.595 | 0.279 | 0.331 | 0.331 | 0.407 | 0.331 |
| TRINITY_DN23294_c0_g1 | 0.53  | 0.065 | 0.344 | 0.629 | 0.63  | 0.23  | 0.63  |
| TRINITY_DN23334_c2_g1 | 0.269 | 0.303 | 0.269 | 0.438 | 0.439 | 0.293 | 0.439 |
| TRINITY_DN23355_c3_g4 | 0.671 | 0.18  | 0.453 | 0.594 | 0.594 | 0.503 | 0.594 |
| TRINITY_DN23362_c2_g1 | 0.908 | 0.926 | 0.807 | 0.707 | 0.708 | 0.599 | 0.708 |
| TRINITY_DN23378_c0_g1 | 0.366 | 0.555 | 0.583 | 0.44  | 0.44  | 0.892 | 0.44  |
| TRINITY_DN23398_c1_g1 | 0.155 | 0.265 | 0.234 | 0.424 | 0.425 | 0.853 | 0.425 |
| TRINITY_DN23444_c0_g1 | 1     | 0.965 | 0.342 | 0.535 | 0.536 | 0.202 | 0.536 |
| TRINITY_DN23507_c0_g1 | 0.411 | 0.225 | 0.645 | 0.823 | 0.823 | 0.557 | 0.823 |
| TRINITY_DN23518_c0_g1 | 0.078 | 0.31  | 0.1   | 0.109 | 0.109 | 0.365 | 0.109 |
| TRINITY_DN23558_c5_g2 | 0.37  | 0.24  | 0.403 | 0.558 | 0.558 | 0.645 | 0.558 |
| TRINITY_DN23577_c1_g1 | 0.709 | 0.537 | 0.816 | 0.896 | 0.896 | 0.919 | 0.896 |
| TRINITY_DN23617_c1_g1 | 0.805 | 0.703 | 0.92  | 0.977 | 0.977 | 0.945 | 0.977 |
| TRINITY_DN23622_c2_g1 | 0.824 | 0.692 | 0.475 | 0.527 | 0.527 | 0.251 | 0.527 |
| TRINITY_DN23647_c0_g1 | 0.666 | 0.527 | 0.214 | 0.43  | 0.43  | 0.234 | 0.43  |
| TRINITY_DN23654_c0_g1 | 0.491 | 0.313 | 0.188 | 0.132 | 0.132 | 0.286 | 0.132 |
| TRINITY_DN23657_c1_g1 | 0.665 | 0.085 | 0.173 | 0.122 | 0.121 | 0.189 | 0.121 |
| TRINITY_DN23713_c3_g1 | 0.085 | 0.213 | 0.069 | 0.24  | 0.24  | 0.62  | 0.24  |
| TRINITY_DN23718_c5_g3 | 0.204 | 0.68  | 0.73  | 0.726 | 0.727 | 0.859 | 0.727 |
| TRINITY_DN23828_c1_g2 | 0.912 | 0.956 | 0.286 | 0.333 | 0.333 | 0.61  | 0.333 |
| TRINITY_DN23886_c1_g4 | 0.128 | 0.501 | 0.785 | 0.681 | 0.682 | 0.591 | 0.682 |
| TRINITY_DN23917_c0_g1 | 0.875 | 0.892 | 0.784 | 0.833 | 0.834 | 0.599 | 0.834 |
| TRINITY_DN23940_c1_g1 | 0.471 | 0.853 | 0.514 | 0.367 | 0.368 | 0.639 | 0.368 |
| TRINITY_DN23955_c2_g4 | 0.22  | 0.442 | 0.907 | 0.751 | 0.751 | 0.609 | 0.751 |
| TRINITY_DN23987_c0_g1 | 0.911 | 0.931 | 0.556 | 0.514 | 0.515 | 0.599 | 0.515 |
| TRINITY_DN24062_c2_g2 | 0.954 | 0.915 | 0.664 | 0.713 | 0.713 | 0.706 | 0.713 |
| TRINITY_DN24258_c0_g1 | 0.529 | 0.641 | 0.164 | 0.29  | 0.291 | 0.334 | 0.291 |
| TRINITY_DN24501_c1_g3 | 0.736 | 0.176 | 0.2   | 0.232 | 0.232 | 0.1   | 0.232 |
| TRINITY_DN24539_c3_g3 | 0.975 | 0.86  | 0.611 | 0.557 | 0.558 | 0.803 | 0.558 |
| TRINITY_DN24604_c0_g2 | 0.599 | 0.823 | 0.481 | 0.373 | 0.374 | 0.651 | 0.374 |
| TRINITY_DN24627_c0_g1 | 0.408 | 0.644 | 0.116 | 0.524 | 0.525 | 0.111 | 0.525 |
| TRINITY_DN24695_c1_g1 | 0.398 | 0.724 | 0.471 | 0.726 | 0.726 | 0.609 | 0.726 |
| TRINITY_DN24715_c0_g4 | 0.5   | 0.277 | 0.784 | 0.922 | 0.922 | 0.662 | 0.922 |
| TRINITY_DN24745_c0_g1 | 0.484 | 0.434 | 0.242 | 0.285 | 0.286 | 0.509 | 0.286 |
| TRINITY_DN24752_c0_g3 | 0.921 | 0.721 | 0.161 | 0.607 | 0.607 | 0.144 | 0.608 |
| TRINITY_DN24825_c0_g2 | 0.84  | 0.899 | 0.154 | 0.055 | 0.055 | 0.527 | 0.055 |
| TRINITY_DN24862_c0_g1 | 0.185 | 0.266 | 0.835 | 0.802 | 0.802 | 0.887 | 0.802 |
| TRINITY_DN24890_c1_g2 | 0.993 | 0.993 | 0.538 | 0.407 | 0.408 | 0.322 | 0.408 |
| TRINITY_DN24930_c0_g1 | 0.949 | 0.581 | 0.147 | 0.146 | 0.146 | 0.073 | 0.146 |
| TRINITY_DN24941_c2_g2 | 0.998 | 0.903 | 0.196 | 0.482 | 0.483 | 0.23  | 0.483 |
| TRINITY_DN25092_c1_g4 | 0.621 | 0.193 | 0.219 | 0.423 | 0.424 | 0.234 | 0.424 |
| TRINITY_DN25109_c0_g5 | 0.658 | 0.126 | 0.336 | 0.514 | 0.515 | 0.42  | 0.515 |
| TRINITY_DN25140_c0_g6 | 0.821 | 0.901 | 0.778 | 0.959 | 0.959 | 0.662 | 0.959 |
| TRINITY_DN25142_c0_g1 | 0.802 | 0.289 | 0.983 | 0.851 | 0.852 | 0.59  | 0.852 |
| TRINITY_DN25240_c1_g1 | 0.993 | 0.922 | 0.614 | 0.762 | 0.762 | 0.993 | 0.762 |
| TRINITY_DN25243_c1_g1 | 0.207 | 0.099 | 0.258 | 0.59  | 0.59  | 0.755 | 0.59  |
| TRINITY_DN25267_c0_g4 | 0.261 | 0.375 | 0.725 | 0.572 | 0.572 | 0.266 | 0.572 |
| TRINITY_DN25280_c1_g1 | 0.411 | 0.527 | 0.226 | 0.437 | 0.438 | 0.307 | 0.438 |
| TRINITY_DN25353_c0_g1 | 0.804 | 0.558 | 0.565 | 0.744 | 0.744 | 0.591 | 0.744 |
| TRINITY_DN25429_c1_g2 | 0.665 | 0.843 | 0.221 | 0.415 | 0.416 | 0.339 | 0.416 |
| TRINITY_DN25475_c1_g1 | 0.624 | 0.779 | 0.46  | 0.349 | 0.349 | 0.752 | 0.349 |
| TRINITY_DN25516_c0_g3 | 0.317 | 0.415 | 0.634 | 0.98  | 0.98  | 0.712 | 0.98  |
| TRINITY_DN25540_c1_g1 | 0.101 | 0.52  | 0.092 | 0.332 | 0.333 | 0.23  | 0.333 |

Continuación...

|                       |       |       |       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| TRINITY_DN25540_c1_g5 | 0.15  | 0.081 | 0.374 | 0.49  | 0.491 | 0.962 | 0.491 |
| TRINITY_DN25567_c0_g1 | 0.062 | 0.393 | 0.375 | 0.404 | 0.404 | 0.269 | 0.404 |
| TRINITY_DN25628_c0_g1 | 0.347 | 0.104 | 0.841 | 0.635 | 0.636 | 0.993 | 0.636 |
| TRINITY_DN25642_c0_g3 | 0.174 | 0.321 | 0.964 | 0.71  | 0.711 | 0.962 | 0.711 |
| TRINITY_DN25665_c0_g2 | 0.97  | 0.984 | 0.59  | 0.636 | 0.637 | 0.528 | 0.637 |
| TRINITY_DN25683_c0_g1 | 0.583 | 0.915 | 0.417 | 0.529 | 0.53  | 0.529 | 0.53  |
| TRINITY_DN25725_c0_g3 | 0.162 | 0.171 | 0.231 | 0.471 | 0.471 | 0.205 | 0.471 |
| TRINITY_DN25754_c0_g1 | 0.233 | 0.493 | 0.106 | 0.583 | 0.584 | 0.377 | 0.584 |
| TRINITY_DN25791_c0_g1 | 0.51  | 0.716 | 0.19  | 0.387 | 0.387 | 0.181 | 0.387 |
| TRINITY_DN25804_c0_g2 | 0.352 | 0.817 | 0.071 | 0.333 | 0.333 | 0.19  | 0.333 |
| TRINITY_DN25968_c2_g1 | 0.614 | 0.329 | 0.277 | 0.21  | 0.21  | 0.128 | 0.21  |
| TRINITY_DN26017_c0_g1 | 0.369 | 0.717 | 0.898 | 0.949 | 0.949 | 0.762 | 0.949 |
| TRINITY_DN26044_c1_g1 | 0.538 | 0.28  | 0.498 | 0.768 | 0.769 | 0.893 | 0.769 |
| TRINITY_DN26077_c0_g1 | 0.123 | 0.211 | 0.162 | 0.41  | 0.411 | 0.592 | 0.411 |
| TRINITY_DN26126_c0_g1 | 0.474 | 0.702 | 0.788 | 0.978 | 0.978 | 0.668 | 0.978 |
| TRINITY_DN26190_c0_g1 | 0.985 | 0.933 | 0.678 | 0.861 | 0.862 | 0.662 | 0.862 |
| TRINITY_DN26201_c2_g7 | 0.574 | 0.301 | 0.892 | 0.916 | 0.916 | 0.712 | 0.916 |
| TRINITY_DN26268_c0_g5 | 0.522 | 0.18  | 0.275 | 0.405 | 0.405 | 0.205 | 0.405 |
| TRINITY_DN26292_c0_g1 | 0.544 | 0.833 | 0.905 | 0.988 | 0.988 | 0.712 | 0.988 |
| TRINITY_DN26318_c1_g3 | 0.499 | 0.182 | 0.309 | 0.392 | 0.393 | 0.987 | 0.393 |
| TRINITY_DN26361_c1_g1 | 0.703 | 0.645 | 0.536 | 0.479 | 0.48  | 0.712 | 0.48  |
| TRINITY_DN26370_c2_g2 | 0.598 | 0.69  | 0.941 | 0.798 | 0.798 | 0.96  | 0.798 |
| TRINITY_DN26380_c0_g1 | 0.882 | 0.708 | 0.325 | 0.769 | 0.769 | 0.293 | 0.769 |
| TRINITY_DN26424_c1_g2 | 0.918 | 0.794 | 0.539 | 0.353 | 0.354 | 0.549 | 0.354 |
| TRINITY_DN26463_c2_g3 | 0.455 | 0.205 | 0.737 | 0.353 | 0.355 | 0.431 | 0.535 |
| TRINITY_DN40381_c0_g1 | 0.231 | 0.349 | 0.81  | 0.775 | 0.775 | 0.81  | 0.775 |
| TRINITY_DN4836_c0_g1  | 0.466 | 0.805 | 0.258 | 0.418 | 0.418 | 0.191 | 0.418 |
| TRINITY_DN9642_c0_g1  | 0.599 | 0.578 | 0.096 | 0.237 | 0.237 | 0.251 | 0.237 |
| TRINITY_DN13672_c0_g1 | 0.389 | 0.564 | 0.647 | 0.523 | 0.524 | 0.755 | 0.524 |
| TRINITY_DN18572_c0_g1 | 0.216 | 0.584 | 0.138 | 0.288 | 0.288 | 0.23  | 0.288 |
| TRINITY_DN18802_c0_g1 | 0.201 | 0.165 | 0.845 | 0.866 | 0.867 | 0.878 | 0.867 |
| TRINITY_DN19015_c5_g1 | 0.403 | 0.424 | 0.105 | 0.274 | 0.275 | 0.199 | 0.275 |
| TRINITY_DN19139_c0_g2 | 0.69  | 0.72  | 0.372 | 0.728 | 0.728 | 0.615 | 0.728 |
| TRINITY_DN20247_c5_g3 | 0.991 | 0.996 | 0.653 | 0.542 | 0.543 | 0.737 | 0.543 |
| TRINITY_DN20971_c0_g4 | 0.611 | 0.712 | 0.414 | 0.368 | 0.369 | 0.335 | 0.369 |
| TRINITY_DN21407_c0_g1 | 0.226 | 0.187 | 0.944 | 0.804 | 0.804 | 0.888 | 0.804 |
| TRINITY_DN22317_c0_g2 | 0.298 | 0.509 | 0.852 | 0.99  | 0.99  | 0.286 | 0.99  |
| TRINITY_DN22375_c0_g2 | 0.926 | 0.444 | 0.905 | 0.968 | 0.968 | 0.707 | 0.968 |
| TRINITY_DN23622_c2_g1 | 0.824 | 0.692 | 0.475 | 0.527 | 0.527 | 0.251 | 0.527 |
| TRINITY_DN23886_c1_g4 | 0.128 | 0.501 | 0.785 | 0.681 | 0.682 | 0.591 | 0.682 |
| TRINITY_DN24062_c2_g2 | 0.954 | 0.915 | 0.664 | 0.713 | 0.713 | 0.706 | 0.713 |
| TRINITY_DN25280_c1_g1 | 0.411 | 0.527 | 0.226 | 0.437 | 0.438 | 0.307 | 0.438 |
| TRINITY_DN25628_c0_g1 | 0.347 | 0.104 | 0.841 | 0.635 | 0.636 | 0.993 | 0.636 |
| TRINITY_DN25665_c0_g2 | 0.97  | 0.984 | 0.59  | 0.636 | 0.637 | 0.528 | 0.637 |
| TRINITY_DN25968_c2_g1 | 0.614 | 0.329 | 0.277 | 0.21  | 0.21  | 0.128 | 0.21  |

Con el segundo criterio de selección solo redujo en un 35.02% el número de genes candidatos, por lo que se tomó en cuenta lo establecido por Caracausi *et al.* (2017) para la selección de un gen de referencia ideal. El cual indica, que estos genes deben tener un nivel de expresión medio-alto para una fácil detección. Es así que con el fin de reducir o eliminar cualquier sesgo en la selección de los transcritos, se adicionó un tercer criterio de selección. El cual consistió en seleccionar a transcritos que tuvieran valores de expresión relativa

(FPKM) mayores a 40, considerados como valores medios- altos de expresión (Flegel *et al.*, 2013) y además se utilizó un CV < 0.20 entre los p-valor de las pruebas de homocedasticidad empleadas, con la finalidad de evaluar la estabilidad de los transcritos. Esto permitió seleccionar 16 genes candidatos, ver Tabla 2.

**Tabla 2:** Selección de los genes candidatos por un FPKM (>40) y CV del p.valor de las pruebas de homocedasticidad (<0.20)

| Gene_id               | Promedio de p.valor | FPKM (>40) | CV de p.valor (<0.20) |
|-----------------------|---------------------|------------|-----------------------|
| TRINITY_DN23617_c1_g1 | 0.9592              | 60.8758    | 0.0273                |
| TRINITY_DN26201_c2_g7 | 0.8703              | 49.3167    | 0.1024                |
| TRINITY_DN20921_c0_g3 | 0.8346              | 67.8267    | 0.0463                |
| TRINITY_DN18240_c0_g1 | 0.8250              | 148.5325   | 0.1594                |
| TRINITY_DN40381_c0_g1 | 0.7887              | 43.8500    | 0.0241                |
| TRINITY_DN23955_c2_g4 | 0.7537              | 44.6650    | 0.1396                |
| TRINITY_DN23886_c1_g4 | 0.6840              | 117.2475   | 0.1002                |
| TRINITY_DN24695_c1_g1 | 0.6519              | 61.7917    | 0.1732                |
| TRINITY_DN20247_c5_g3 | 0.6036              | 43.3558    | 0.1472                |
| TRINITY_DN22112_c1_g1 | 0.5974              | 80.3675    | 0.1478                |
| TRINITY_DN13672_c0_g1 | 0.5943              | 125.1933   | 0.1757                |
| TRINITY_DN22195_c2_g1 | 0.5684              | 48.0483    | 0.1306                |
| TRINITY_DN22461_c1_g1 | 0.5423              | 41.4483    | 0.1268                |
| TRINITY_DN25109_c0_g5 | 0.4598              | 120.9183   | 0.1750                |
| TRINITY_DN19920_c0_g1 | 0.2468              | 42.2583    | 0.1382                |
| TRINITY_DN21010_c0_g1 | 0.2312              | 74.1742    | 0.1107                |

#### 4.2 Descripción de los genes de referencia candidatos seleccionados

Tal y como se muestra en la Tabla 2, se seleccionaron 16 genes de referencia candidatos. De los cuales, 3 corresponden a proteínas ribosomales: 40S ribosomal protein S18-like, 60S ribosomal protein L11 y 40S ribosomal protein S27-2-like (Tabla 3). Hsiao *et al.*, (2001) mencionan que los genes de las proteínas ribosomales en su mayoría son considerados genes housekeeping, por lo que podrían ser usados como un estándar de referencia en estudios de expresión génica. Zhou *et al.*, (2010) coinciden con esto, pues de sus 20 genes de referencia candidatos, 13 eran de proteínas ribosomales, sugiriendo que los genes de esta familia pueden ser usados como genes de referencia. En ese sentido, estos genes se han validado como genes de referencia en humanos (Popovici *et al.*, 2009; de Jonge *et al.*; 2007). Por otro lado, Zhou *et al.* (2010) mencionan que la expresión de los genes de proteínas ribosomales presenta variaciones dependiendo del tejido, como es el caso de *RPL3L* y *RPL39L* (Thorrez *et al.*, 2008). Asimismo, Zhou *et al.* (2010) identificaron genes de

proteínas ribosomales con expresión muy estable, como *RPL19* y *RPL29*; mientras que otros, como *RPL9* y *RPL18* presentaron variaciones significativamente. En plantas, se han reportado genes de proteínas ribosomales como genes candidatos de referencia en banana (Chen *et al.*, 2011), café (Cruz *et al.*, 2009; Barsalobres-Cavallari, *et al.*, 2009), sandía (Kong *et al.*, 2014), tomate (Løvdaal & Lillo, 2009), tabaco (Schmidt & Delaney, 2010) y cebada (Faccioli *et al.*, 2007).

Así también, el gen *ERF3A*, eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A-like (tabla 3) es otro de los candidatos. Este gen ha sido seleccionado como un candidato a gen de referencia para peces teleósteos (Li *et al.*, 2020) y en 4 cultivares de *Gossypium hirsutum* durante la inducción a embriogénesis somática (Cao *et al.*, 2019).

Por otro lado, el gen *CESA1* también resultó otro candidato (tabla 3). El estudio de Li *et al.* (2013) sobre los genes cellulose synthase (*CESA*) en algodón reportó que *cesal* presentaba un nivel de expresión constante en todos los tejidos de *Gossypium hirsutum* y *Gossypium barbadense*. Lo que sugiere su posible uso, como gen de referencia.

*OEP24* es otro gen candidato seleccionado (Tabla 3) y es una proteína formadora de poros en la envoltura externa del cloroplasto, como OEP21, OEP16 y OEP37. Las cuales actúan como un canal selectivo para el transporte de diversos metabolitos (Pohlmeyer *et al.*, 1997; Röhl *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2005; Inoue, 2007). Se ha usado *OEP24.1* (Atg45170) como gen housekeeping para normalizar los niveles de expresión de enzimas de la biosíntesis de clorofila (Urbischek *et al.*, 2015). Asimismo, los resultados de Goetze *et al.* (2006) indican que OEP37 es una proteína housekeeping, pues presenta niveles estables en los plastidios de todos los órganos de las plantas.

Así mismo, *ADNT1* gen candidato seleccionado (Tabla 3) es un transportador mitocondrial de nucleótidos de adenina que presenta un nivel amplio de expresión en los órganos y en distintos tejidos de la planta, como raíz, tallo, hojas y flores (Palmieri *et al.*, 2008). Tang *et al.* (2020) indican que es una proteína housekeeping por su actividad de proteína de transporte por membranas.

La *V-ATPasa*, gen candidato presentado en la Tabla 3. El estudio realizado por Zhang *et al.* (2014) indicó que la subunidad E de H<sup>+</sup>-ATPasa de tipo vacuolar podría estar regulado por condiciones abióticas en cebada. Asimismo, Darbani *et al.* (2015) usó la ATP sintasa vacuolar como gen de referencia para normalizar los datos de expresión de genes involucrados en la transferencia de hierro y zinc durante el llenado del grano en cebada

**Tabla 3:** Información de genes de referencia candidatos

| Gene_id                   | Descripción*   | Símbolo       | Puntuación máxima** | Puntuación total ** | % de cobertura** | valor E** | % de identidad** | Accesion***    | Vía de ortología KEGG (a)  |
|---------------------------|--|---------------|---------------------|---------------------|------------------|-----------|------------------|----------------|--|
| TRINITY_DN13672_c0_g1_i4  | PREDICTED: Lupinus angustifolius DNA repair RAD52-like protein 2, chloroplastic (LOC109336406), mRNA   | RAD52-2       | 1264                | 1264                | 94%              | 0         | 92.03%           | XM_019572984.1 |  |
| TRINITY_DN18240_c0_g1_i10 | PREDICTED: Lupinus angustifolius V-type proton ATPase subunit E-like (LOC109348603), mRNA  | ATPeV1E/ATP6E | 1317                | 1317                | 84%              | 0         | 92%              | XM_019589102.1 | lang01100 Metabolic pathways (K02150)  |
| TRINITY_DN19920_c0_g1_i5  | PREDICTED: Lupinus angustifolius probable NAD(P)H dehydrogenase (quinone) FQR1-like 3 (LOC109357530), transcript variant X2, misc_RNA                                | wrbA          | 987                 | 987                 | 90%              | 0         | 95%              | XR_002108871.1 | lang01100 Metabolic pathways (K03809)  |
| TRINITY_DN20247_e5_g3_i3  | PREDICTED: Lupinus angustifolius outer envelope pore protein 24, chloroplastic-like (LOC109358900), mRNA   | OEP24         | 1330                | 1330                | 99%              | 0         | 93%              | XM_019603387.1 |  |
| TRINITY_DN20921_c0_g3_i2  | PREDICTED: Lupinus angustifolius 40S ribosomal protein S18-like (LOC109341549), transcript variant X1, mRNA  | RP-S18e/RPS18 | 1044                | 1044                | 93%              | 0         | 93%              | XM_019579490.1 | lang03010 Ribosome (K02964)  |
| TRINITY_DN21010_c0_g1_i2  | PREDICTED: Lupinus angustifolius 60S ribosomal protein L11 (LOC109352042), mRNA  | RP-L11e/RPL11 | 1221                | 1221                | 85%              | 0         | 94%              | XM_019593821.1 | lang03010 Ribosome (K02868)  |
| TRINITY_DN22112_c1_g1_i2  | PREDICTED: Lupinus angustifolius 40S ribosomal protein S27-2-like (LOC109356678), transcript variant X1, mRNA  | RP-S27e/RPS27 | 715                 | 715                 | 78%              | 0         | 89%              | XM_019600144.1 | lang03010 Ribosome (K02978)  |
| TRINITY_DN22195_c2_g1_i2  | PREDICTED: Lupinus angustifolius aminoacylase-1 (LOC109360836), mRNA   | ACY1          | 2228                | 2228                | 89%              | 0         | 93%              | XM_019605982.1 | lang01100 Metabolic pathways (K14677)  |
| TRINITY_DN22461_c1_g1_i4  | PREDICTED: Lupinus angustifolius probable bifunctional methylthioribulose-1-phosphate dehydratase/enolase-phosphatase E1 (LOC109334518), transcript variant X2, mRNA | ENOPH1        | 2564                | 2564                | 84%              | 0         | 96%              | XM_019570339.1 | lang01100 Metabolic pathways (K16054)  |
| TRINITY_DN23617_c1_g1_i4  | PREDICTED: Lupinus angustifolius omega-amidase, chloroplastic (LOC109327088), mRNA   | NLP3          | 1884                | 1884                | 83%              | 0         | 92%              | XM_019560098.1 | lang01100 Metabolic pathway (K13566)   |
| TRINITY_DN23886_c1_g4_i3  | PREDICTED: Lupinus angustifolius probable disease resistance protein At4g27220 (LOC109348064), transcript variant X6, mRNA   | LOC109348064  | 512                 | 512                 | 100%             | 3.00E-143 | 92%              | XM_019588275.1 |  |
| TRINITY_DN23955_c2_g4_i3  | PREDICTED: Lupinus angustifolius eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A-like (LOC109349707), transcript variant X3, mRNA                  | ERF3/GSPT     | 2708                | 2708                | 70%              | 0         | 96%              | XM_019590625.1 | lang03015 mRNA surveillance pathway (K03267)   |
| TRINITY_DN24695_c1_g1_i2  | PREDICTED: Lupinus angustifolius uncharacterized protein At2g17340-like (LOC109354893), mRNA   | LOC109354893  | 2117                | 2117                | 96%              | 0         | 95%              | XM_019597693.1 |  |
| TRINITY_DN25109_c0_g5_i1  | PREDICTED: Lupinus angustifolius cellulose synthase A catalytic subunit 1 [UDP-forming] (LOC109343728), mRNA   | CESA1         | 686                 | 686                 | 99%              | 0         | 97%              | XM_019582173.1 | lang01003 Glycosyltransferases (K10999)  |
| TRINITY_DN26201_c2_g7_i1  | PREDICTED: Lupinus angustifolius mitochondrial adenine nucleotide transporter ADNT1-like (LOC109333128), mRNA  | ADNT1         | 861                 | 861                 | 98%              | 0         | 89%              | XM_019568420.1 | lang02000 Transporters (K14684)  |
| TRINITY_DN40381_c0_g1_i1  | PREDICTED: Lupinus angustifolius sm-like protein LSM7 (LOC109347943), mRNA   | LSM7          | 562                 | 562                 | 71%              | 4.00E-158 | 90%              | XM_019588074.1 | lang01110 lang03018 lang03040 Biosynthesis of secondary metabolites RNA degradation (K12626) Spliceosome |

\* Función predicha de la proteína según el BLAST de NCBI

\*\* Parámetros de puntuación de alineación para cada secuencia predicha según el BLAST de NCBI

\*\*\*Indicador único de la secuencia predicha según el BLAST de NCBI



*LSM7* es otro de los genes candidatos seleccionados (Tabla 3). En ese sentido Müller y colaboradores (2015) mencionan que el gen que codifica para una proteína homóloga de Sm-like protein *LSM7* es uno de los genes de referencia más adecuados para la condición de infección de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en tomate y pimiento, pues mostró más estabilidad de acuerdo con los métodos de geNorm, NormFinder y BestKeeper.

El gen de sensibilidad a la radiación 52, *RAD52* (Tabla 3) tiene una función esencial en la reparación y recombinación de la rotura de doble hebra del ADN dependiente de homología (Symington, 2002). En el estudio realizado por Samach *et al.* (2011), se evidenció que una de las isoformas del gen *RAD52* de *Arabidopsis* se expresaron en todos sus tejidos. Característica que cumple con uno de los requisitos de gen de referencia, la de expresarse en todas las células de un organismo independientemente del tipo de tejido (Eisenberg y Levanon, 2013).

### **4.3 Validación de los genes de referencia**

Un total de 14 minerales cumplen los requerimientos nutricionales que necesitan las plantas para su óptimo crecimiento y desarrollo. Estos son conocidos como macronutrientes (N, K, Ca, Mg y S) y micronutrientes (Fe, Zn, Mn, Cu, B y Mo) por la concentración presente encontrada en las plantas (Grusak, 2010). Existen diversas soluciones nutritivas que difieren en cuanto a la concentración de estos nutrientes. En ese sentido, la solución nutritiva de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) es una de las soluciones más utilizadas a nivel mundial en investigación (Van Delden *et al.*, 2020). Sin embargo, la Solución Hidropónica La Molina fue usada en los experimentos de ARN-seq de las 12 bibliotecas, de donde se seleccionaron los genes candidatos. Ambas soluciones presentan concentraciones de nutrientes diferentes (Anexo 50) y estas variaciones se vieron reflejadas en la validación de los genes candidatos seleccionados (ver Figuras 2 y 3).

#### **4.3.1 Validación de los genes de referencia en condiciones de solución hidropónica La Molina**

El Tabla 3 muestra la descripción de cada uno de uno de los 16 genes candidatos seleccionados en base a los criterios de selección diagramados en la Figura 1. De estos, solo se evaluó la expresión génica en 10 genes, excluyendo a los que no se pudo diseñar primers adecuados: *wrbA*, *ACY1*, *ENOPH1*, *NPL3*, *LOC109354893* y *LSM7* (Anexo 3)

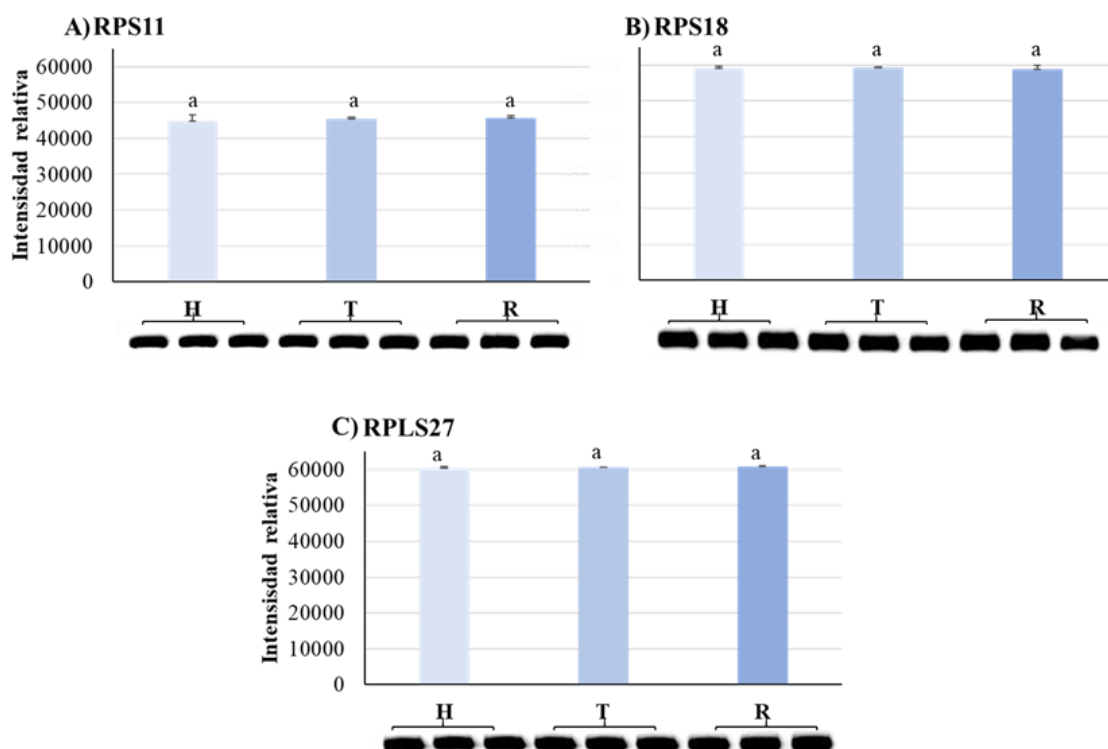
Los 10 genes seleccionados se agruparon en proteínas ribosomales (grupo I) y genes con diferentes funciones (grupo II).

Dentro del grupo I, están las proteínas ribosomales. Las cuales, junto a 4 tipos de ARNr ribosómicos conforman a los ribosomas de los eucariotas, encargadas de la síntesis de proteínas (Byrne, 2009; Zhou *et al.*, 2015) y biogénesis ribosómica (Zhou *et al.*, 2015). Además, muchas proteínas ribosomales están involucradas en otras funciones celulares extraribosómicas (Wool, 1996; Bhavsar *et al.*, 2010), como, por ejemplo, en la tumorigénesis, la señalización inmunitaria y el desarrollo de enfermedades (Zhou *et al.*, 2015). Varios autores han sugerido a las proteínas ribosomales como posibles genes housekeeping (Hsiao *et al.*, 2001). Lo que concuerda con los resultados obtenidos, pues los 3 genes de proteínas ribosomales (RPS11, RPS18 y RPS27) que se presentan en la Figura 2 presentan una expresión relativa constante en hoja, tallo y raíz de *L. mutabilis*, lo que los catalogan como genes de referencia.

Se ha reportado al gen *RPL11*, como un gen de referencia con una alta estabilidad para diferentes etapas de desarrollo y condiciones de temperatura en *Aphis craccivora* (Yang *et al.*, 2015). Sin embargo, la expresión de este gen (RPL11) no fue constante a nivel de hoja joven, hoja madura, vaina de hoja, raíz rizoma, ápice de tallo y 3 estadios del desarrollo de tubérculos en *Cyperus esculentus* (Bai *et al.*, 2021). Lo que difiere de los resultados obtenidos en *Lupinus mutabilis*, ya que presenta una expresión diferencial constante en los tres tejidos (Figura 2A), lo que confirma su uso como gen de referencia, como se reporta para *Aphis craccivora* (Yang *et al.*, 2015).

Por otro lado, *RPS18* (Figura 2B), ha sido validado como gen de referencia para insectos, e.g. *Lipaphis erysimi* (Kalt) (Koramutla *et al.*, 2016), *Apis mellifera* (Jeon *et al.*, 2020), *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Lü *et al.*, 2018), *Delphacodes kuscheli* (Maroniche *et al.*, 2018), *Bradysia odoriphaga* (Shi *et al.*, 2016), *Bactericera cockerelli* (Ibanez *et al.*, 2016), y *Rhopalosiphum padi* (Li *et al.*, 2021). También ha sido reportado en peces, como *Cyprinus carpio* y *Carassius auratus* (Liu *et al.*, 2020). En plantas, se ha utilizado como gen de referencia en *Arabidopsis* (Scholz *et al.*, 2014; Malabarba *et al.*, 2021). Asimismo, ha sido reportado como un gen de referencia estable en plantas sexuales y apomícticas de *Boechera* para los tejidos de hoja, tallo, raíz, flor y tejidos específicos durante el desarrollo del óvulo y la antera (Pellino *et al.*, 2011). En *Lupinus mutabilis*, este gen cumple con la

condición de gen de referencia, pues según la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) no presentaron diferencias significativas a nivel de los tejidos evaluados, ver Figura 2B.



**Figura 2:** Análisis de expresión relativa de genes del grupo I (proteínas ribosomales) a nivel de hoja, tallo y raíz en *Lupinus mutabilis*.

**A)** RPL11, 60S ribosomal protein L11 (TRINITY\_DN21010\_c0\_g1\_i2); tamaño de producto amplificado, 336 pb. **B)** RPS18, 40S ribosomal protein S18-like (TRINITY\_DN20921\_c0\_g3\_i2); tamaño de producto amplificado, 168 pb y **C)** RPS27L, 40S ribosomal protein S27-2-like (TRINITY\_DN22112\_c1\_g1\_i2); tamaño de producto amplificado, 204 pb. Las letras diferentes denotan cambios significativos basados en ANOVA con la prueba Tukey ( $P < 0.05$ ). Cada valor representa la media de 3 repeticiones  $\pm$  error estándar. H: hoja, T: tallo y R: raíz. Condición de solución nutritiva hidropónica La Molina.

Según Chan *et al.* (1993), el gen *RPS27L* (Figura 2C) responde frente a lesiones del ADN. Por otro lado, la investigación de Wong y colaboradores (2013) indica que este gen exhibe un patrón de expresión distintivamente heterogéneo en los tejidos cancerosos y normales en humanos. Algunas investigaciones han determinado una inducción de *RPS27L* dependiente del promotor p53 para múltiples modelos de células cancerosas (He *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2007). Este gen no se ha reportado previamente como gen de referencia; sin embargo, los resultados en *Lupinus mutabilis* muestran un nivel de expresión constante y sin diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) a nivel del hoja, tallo y raíz, ver Figura 2C.

Dentro del grupo II (Figura 3), se encuentra V-ATPasa. La cual, es una bomba que transloca protones del citosol al lumen y está presente en la membrana interna de todas las células eucariotas (Sun-Wada *et al.*, 2003). Torigoe y colaboradores (2002) mencionan que los genes de la V-ATPasa son considerados como genes housekeeping. Lo que concuerda con

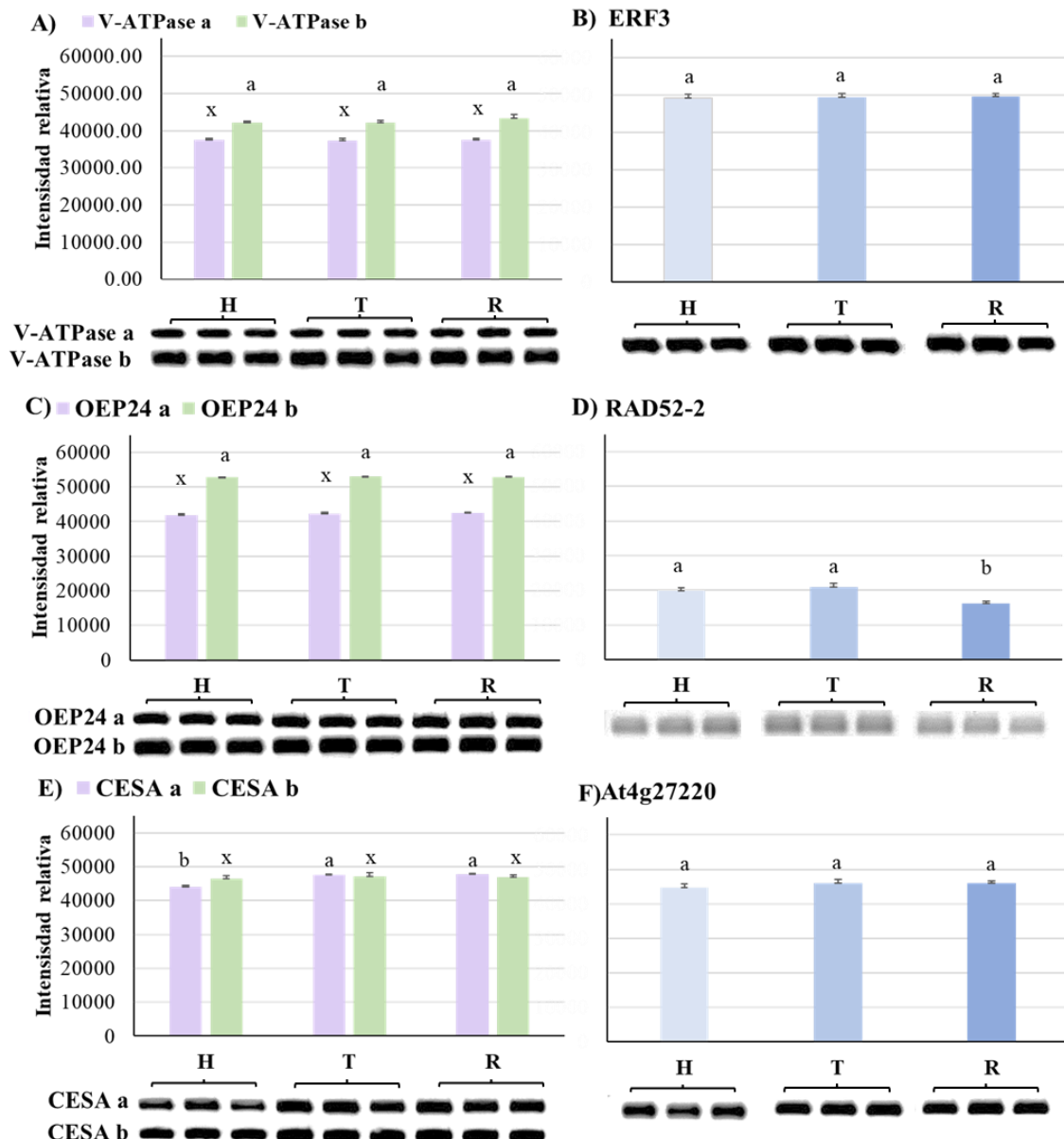
lo reportado por Darbani *et al.* (2015) en cebada, en donde *V-ATPasa* se usó como gen de referencia para normalizar los datos de la expresión de genes involucrados en la transferencia de hierro y zinc durante el llenado del grano. En *Lupinus mutabilis* se evaluó dos transcritos (*V-ATPasa a*, *V-ATPasa b*), encontrándose que no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión para ambos transcritos en los diferentes tejidos evaluados (Figura 3A). Lo que permitiría su uso como gen de referencia.

Otro miembro del grupo II es el gen *ERF3*, el cual participa en la finalización de la traducción como parte del complejo eucariota de liberación (*eRF1-eRF3*)- GTP (Jackson *et al.*, 2012). *ERF3* ha sido reportado como gen candidato de referencia en *G. hirsutum* y *Schizothorax prenanti*; sin embargo, no ha presentado estabilidad en todas las condiciones probadas (Ping *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). En el alga, *Chondrus crispus*, si se ha reportado como un gen de referencia de hasta 18 condiciones (Kowalczyk *et al.*, 2014). Lo que concuerda con los resultados en *L. mutabilis*, ver Figura 3B en donde la expresión relativa resultó constante en hoja, tallo y raíz, sin diferencias significativas entre estas.

La familia de las OEP son proteínas de envoltura externa del cloroplasto (Pohlmeyer *et al.*, 1998). OEP24 es una de las proteínas formadora de los poros y tiene una amplia especificidad de solutos (Pohlmeyer *et al.*, 1998; Röhl *et al.*, 1999). Se ha reportado a *Oep24.1* como gen housekeeping para normalizar los niveles de expresión de enzimas de la biosíntesis de clorofila en hojas de *Arabidopsis thaliana* (Urbischek *et al.*, 2015). Los resultados en *Lupinus mutabilis* para los dos transcritos evaluados (*OEP24 a*, *OEP24 b*) concuerdan con el trabajo de Urbischek *et al.* (2015), además se demostró que este gen es capaz de mantener una expresión constante en tallo y raíz, ver Figura 3C

*RAD52-2* forma parte de un grupo de genes que participan en el proceso de recombinación homóloga, *RAD52* (Symington, 2002). Se sabe, que *RAD52* está altamente conservado en eucariotas y los homólogos en plantas se localizan en el núcleo, mitocondrias o cloroplastos (*RAD52-2*) (Symington, 2002; Samach *et al.*, 2011); sin embargo, no hay muchos estudios en plantas (Nair *et al.*, 2016). Aunque este gen no ha sido previamente reportado como gen de referencia, en el estudio de Samach y colaboradores (2011) se encontró niveles de transcripción similares, al comparar su expresión en hojas caulinares, botones florales, flores abiertas, raíces y brotes de plántulas de 4 días de crecimiento y silicuas de diferentes tamaños en *Arabidopsis thaliana*. Lo cual, concuerda con los resultados obtenidos en *Lupinus*

*mutabilis*, al obtener una expresión relativa constante para hoja, tallo y raíz que lo catalogan como un gen de referencia, ver Figura 3D.



**Figura 3:** Análisis de expresión relativa de genes del grupo II en hoja, tallo y raíz de *Lupinus mutabilis*. **A)** V-ATPASA a - V-ATPASA b, V-type proton ATPase subunit E-like (TRINITY\_DN18240\_c0\_g1\_i10); tamaño de producto amplificado, 152 pb. **B)** ERF3, eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A-like (TRINITY\_DN23955\_c2\_g4\_i3); tamaño de producto amplificado, 312. **C)** OEP24 a - OEP24 b, outer envelope pore protein 24, chloroplastic-like (TRINITY\_DN20247\_c5\_g3\_i3); tamaño de producto amplificado, 428 pb. **D)** RAD52-2, DNA repair RAD52-like protein 2, chloroplastic (TRINITY\_DN13672\_c0\_g1\_i4); tamaño de producto amplificado, 116 pb. **E)** CESA a - CESA b, cellulose synthase A catalytic subunit 1 [UDP-forming] (TRINITY\_DN25109\_c0\_g5\_i1); tamaño de producto amplificado, 209 pb. **F)** At4g27220, probable disease resistance protein At4g27220 (TRINITY\_DN23886\_c1\_g4\_i3); tamaño de producto amplificado, 164 pb. Las letras diferentes denotan cambios significativos basados en ANOVA con la prueba Tukey ( $P < 0.05$ ). Cada valor representa la media de 3 repeticiones  $\pm$  error estándar. H: hoja, T: tallo y R: raíz. Condición de solución nutritiva hidropónica La Molina.

La familia de los genes celulosa sintasa (*CESA*) se encargan de la síntesis de celulosa (Kaur *et al.*, 2016). Se han identificado al menos 10 genes *CESA* en *Arabidopsis*, 12 en *Oryza sativa* (Richmond and Somerville, 2000) y 9 en *Zea mays* (Holland *et al.*, 2000; Dhugga, 2001). Se ha identificado que en *Arabidopsis* una expresión coordinada de genes para su expresión en diferentes tipos de tejidos (Doblin *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003). En cebada, se ha reportado una expresión diferencial para los genes *HvCESA*, encontrándose una expresión abundante para *HvCESA1*, *HvCESA2* y *HvCESA6* en los tejidos del coleóptilo, raíces y hojas en crecimiento, mientras que para *HvCESA4*, *HvCESA7* y *HvCESA8*, la mayor expresión fue en tejidos maduros del tallo y de raíz (Burton *et al.*, 2004). Lo que indicaría que la expresión de los genes *HvCESA* está influenciada por el grado de desarrollo de la planta. Para la evaluación de la expresión del gen *CESA* en plantas jóvenes de *Lupinus mutabilis* se analizaron dos transcritos del mismo gen (Figura 3E). El transcripto *CESA-b* se confirmó como gen de referencia por su expresión relativa constante en hoja, tallo y raíz. Sin embargo, el transcripto *CESA-a* solo presentó una expresión relativa constante para los tejidos de tallo y raíz.

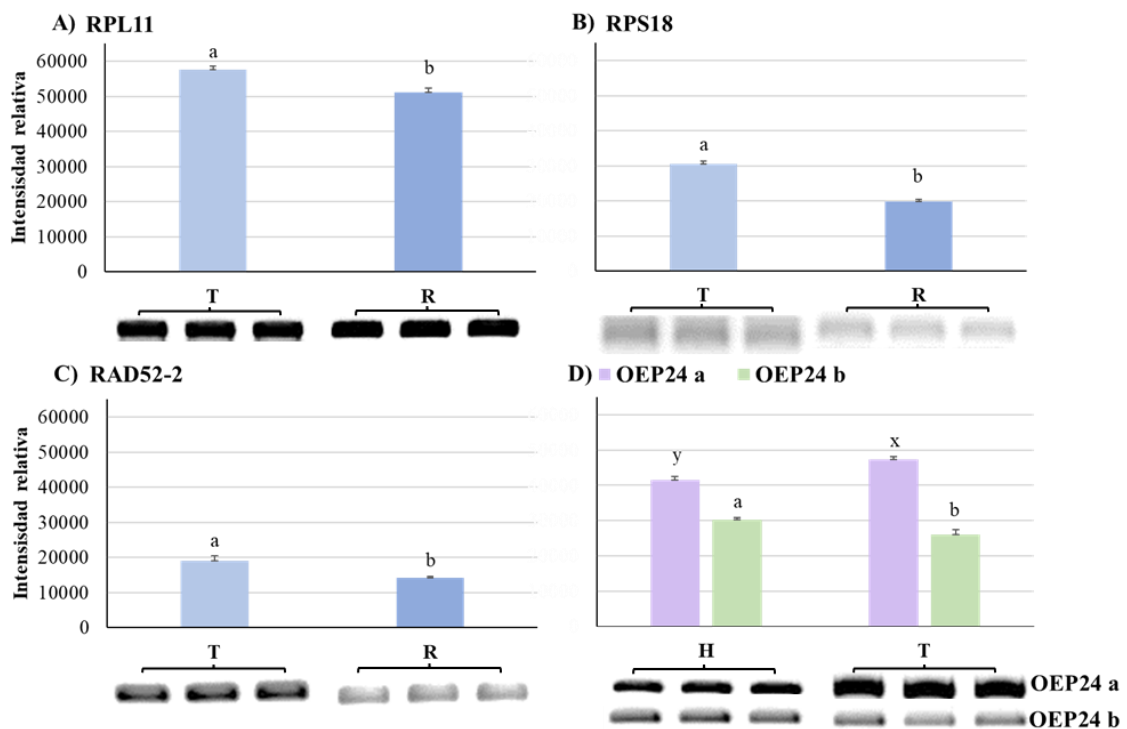
Los genes de resistencia a enfermedades (genes R) forman parte del mecanismo de defensa de las plantas (Mondragón-Palomino *et al.*, 2002). Los que en su mayoría codifican proteínas receptoras intracelulares putativas (Dangl y Jones 2001). Como la familia de los genes *NBS-LRR*, que presentan dominios de unión a nucleótidos (NBS) y repeticiones ricas en leucinas en la región C-terminal (LRR) (Tameling y Takken, 2008; Collier y Moffett, 2009). *AT4G2722*, es un gen *NBS-LRR* de *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2018). Se han reportados ortólogos de este gen en *Gossypium barbadense* (Li *et al.*, 2018) y *Phytophthora parasítica* (Afzal *et al.*, 2019). Se reporta que el ortólogo de este gen en *Lupinus mutabilis* es un gen de referencia a nivel de hoja, tallo y raíz (Figura 3F).

#### 4.3.2 Validación de los genes de referencia en condiciones de solución Murashige y Skoog (MS)

Pese a que se ha reportado variaciones en las concentraciones de sales entre las diferentes soluciones nutritivas, estas diferencias no reflejan un cambio marcado en el rendimiento de las plantas (Hoagland, 1920). Sin embargo; esto si tiene efectos dramáticos en la expresión genética (Swift *et al.*, 2020). Es así, que se procedió a validar los 10 genes candidatos bajo condiciones de la solución MS, observándose un patrón de expresión diferente a lo encontrado en la solución hidropónica la molina. Por tal motivo se agrupó a los genes, en

función de su patrón de expresión repetible en: dos tipos de tejido (Grupo III) y en todos los tejidos (Grupo IV).

Dentro del grupo III, se encuentran los genes de proteínas ribosomales, *RPL11* y *RPS18*. La expresión de estos dos genes no fue constante a nivel de tallo y raíz (Figura 4A, 4B), concordando con los resultados para *RPL11* de Bai y colaboradores (2021), pero opuestos a los resultados obtenidos bajo condiciones de solución La Molina (Figura 2A,2B). Estas diferencias podrían estar relacionados a una variación en los niveles y patrones de expresión por parte de las copias de estos genes (Byrne, 2009). Tal como sucede para los dos genes *RPL11* en *Arabidopsis*, donde uno de los genes presentó altos niveles de expresión en cotiledones, en el meristema apical y radicular y también a nivel del sistema vascular, mientras que la expresión del otro estuvo restringida a la estela de la raíz, desarrollo de anteras y polen (Williams & Sussex, 1995).



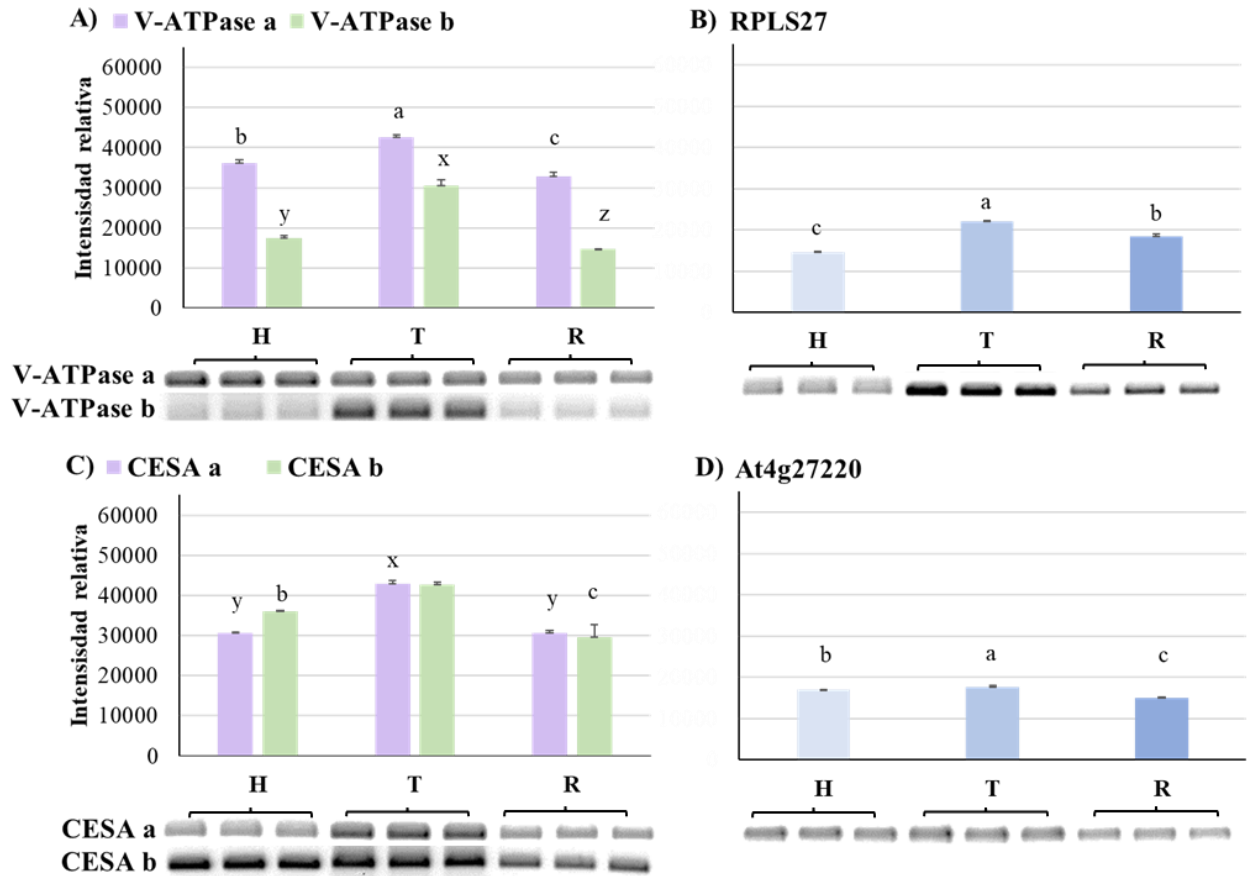
**Figura 4:** Análisis de expresión relativa de genes del grupo III para dos tipos de tejidos en *Lupinus mutabilis*. **A)** *RPL11*, 60S ribosomal protein L11 (TRINITY\_DN21010\_c0\_g1\_i2); tamaño de producto amplificado, 336 pb. **B)** *RPS18*, 40S ribosomal protein S18-like (TRINITY\_DN20921\_c0\_g3\_i2); tamaño de producto amplificado, 168 pb y **C)** *RAD52-2*, DNA repair RAD52-like protein 2, chloroplastic (TRINITY\_DN13672\_c0\_g1\_i4); tamaño de producto amplificado, 116 pb. **D)** *OEP24 a* *OEP24 b*, outer envelope pore protein 24, chloroplastic-like (TRINITY\_DN20247\_c5\_g3\_i3); tamaño de producto amplificado, 428 pb. Las letras diferentes denotan cambios significativos basados en ANOVA con la prueba Tukey ( $P < 0.05$ ). Cada valor representa la media de 3 repeticiones  $\pm$  error estándar. H: hoja, T: tallo y R: raíz. Condición de solución nutritiva Murashige y Skoog.

Otro miembro de este grupo es RAD52-2, el cual presenta una expresión relativa diferente a nivel de tallo y hoja (Figura 4C), lo que difiere de los resultados reportados en la Figura 3D para solución hidropónica La Molina. Estas variaciones también se observaron en OEP24, encontrándose diferencias significativas en la expresión para ambos transcritos, a nivel de hoja y tallo (Figura 4D). Lo que dista los resultados obtenidos en *Lupinus mutabilis* para condiciones de riego con solución La Molina (Figura 3C) y con el trabajo de Urbiscek *et al.* (2015), en *Arabidopsis thaliana*.

En el grupo IV, los siguientes transcritos: a) dos transcritos para V-atpasa (a y b), b) CESA b, c) RPLS27 y d) el ortólogo de At4g27220 para *L. mutabilis* presentaron diferencias significativas en su expresión relativa en los tejidos de hoja, tallo y raíz. Lo que difiere de los resultados bajo la condición de riego con solución La Molina (Figura 5A-D). Sin embargo; solo CESA a presentó una expresión relativa constante en hoja y raíz (Figura 5G). Lo cual, concuerda con lo reportado para la solución hidropónica La Molina (Figura 3E).

Aunque ambas soluciones presentan la misma composición de nutrientes, la concentración de los elementos varía de forma significativa (Anexo 50). Las diferencias observadas en expresión génica podrían deberse a los cambios en los mecanismos moleculares que controlan el ionona en la planta, como ha sido reportado por Swift *et al.*(2020). Lo que se relaciona con lo reportado por Greer *et al.* (2010), sobre los niveles de expresión de los genes de referencia pueden estar influenciados por sus funciones celulares y condiciones experimentales. Lo cual, ha permitido encontrar genes de referencia con cierto grado de especificidad a las condiciones experimentales (Atkinson *et al.*, 2013; Lacroix & Citovsky, 2013; H. Y. Wu *et al.*, 2014; Xin *et al.*, 2013).





**Figura 5:** Análisis de expresión relativa de genes del grupo IV para tres tipos de tejidos en *Lupinus mutabilis*. **A)** V-ATPASA a - V-ATPASA b, V-type proton ATPase subunit E-like (TRINITY\_DN18240\_c0\_g1\_i10); tamaño de producto amplificado, 152 pb. RPL11, 60S ribosomal protein L11 (TRINITY\_DN21010\_c0\_g1\_i2); tamaño de producto amplificado, 336 pb. **B)** RPS27L, 40S ribosomal protein S27-2-like (TRINITY\_DN22112\_c1\_g1\_i2); tamaño de producto amplificado, 204 pb. **C)** CESA a - CESA b, cellulose synthase A catalytic subunit 1 [UDP-forming] (TRINITY\_DN25109\_c0\_g5\_i1); tamaño de producto amplificado, 209 pb. **D)** At4g27220, probable disease resistance protein At4g27220 (TRINITY\_DN23886\_c1\_g4\_i3); tamaño de producto amplificado, 164 pb. Las letras diferentes denotan cambios significativos basados en ANOVA con la prueba Tukey ( $P < 0.05$ ). Cada valor representa la media de 3 repeticiones  $\pm$  error estándar. H: hoja, T: tallo y R: raíz. Condición de solución nutritiva Murashige y Skoog

## V. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones de Solución La Molina, se logró identificar 8 genes de referencia: **RPL11**, 60S ribosomal protein L11; **RPS18**, 40S ribosomal protein S18-like; **RPS27L**, 40S ribosomal protein S27-2-like; **ERF3**, eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A-like; **OEP24**, outer envelope pore protein 24, chloroplastic; **CESA (CESA a)**, cellulose synthase A catalytic subunit 1 [UDP-forming]; el ortólogo de **At4g27220** para tarwi, probable disease resistance protein At4g27220 y **V-ATPasa**, V-type proton ATPase subunit E-like, que muestran un nivel de expresión constante y sin diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) a nivel de hoja, tallo y raíz para *Lupinus mutabilis*.
- Bajo las condiciones de Solución La Molina, el gen **RAD52-2**, DNA repair RAD52-like protein 2, chloroplastic solo muestra un nivel de expresión constante y sin diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) a nivel de hoja y tallo.
- Bajo las condiciones de Solución MS, el transcripto **CESA b**, cellulose synthase A catalytic subunit 1 [UDP-forming] solo muestra un nivel de expresión constante y sin diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) a nivel de hoja y raíz.

## VI. RECOMENDACIONES

- Es crítico tener en cuenta en la identificación de los genes de referencia, las condiciones experimentales para garantizar su repetibilidad.
- El diseño de primers realizados para los genes de referencia también se ajustan a las condiciones que se requieren para realizar qPCR, por lo que se recomiendan su uso para esos fines.
- Evaluar los genes de referencia en diferentes estadios fenológicos de *Lupinus mutabilis*, además de probarlos bajo diferentes condiciones y/o tratamientos, como estrés biótico y abiótico.
- Evaluar su uso en especies de la misma familia y que cuenten con un genoma de referencia, como *Lupinus angustifolius* y *L. albus*.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ainouche, A., & Bayer, R. J. (2000). Genetic evidence supports the new Anatolian lupine accession, *Lupinus anatolicus*, as an Old World “rough-seeded” lupine (section *Scabrispermae*) related to *L. pilosus*. *Folia Geobotanica*, 35(1), 83–95. <https://doi.org/10.1007/BF02803088>
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Angus, J. F. (2001). Soil water extraction by dryland crops, annual pastures, and lucerne in south-eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52(2), 183. <https://doi.org/10.1071/AR00103>
- Atchison, G. W., Nevado, B., Eastwood, R. J., Contreras-Ortiz, N., Reynel, C., Madriñán, S., Filatov, D. A., & Hughes, C. E. (2016). Lost crops of the incas: Origins of domestication of the Andean pulse crop Tarwi, *Lupinus mutabilis*. *American Journal of Botany*, 103(9), 1592–1606. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600171>
- Atkinson, N. J., Lilley, C. J., & Urwin, P. E. (2013). Identification of genes involved in the response of arabidopsis to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, 162(4), 2028–2041. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222372>
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto, R. B., Boatwright, J. S., Borges, L. M., Brown, G. K., Bruneau, A., Candido, E., Cardoso, D., Chung, K. F., Clark, R. P., Conceição, A. D. S., Crisp, M., Cubas, P., Delgado-Salinas, A., Dexter, K. G., ... Zimmerman, E. (2017). A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66(1), 44–77. <https://doi.org/10.12705/661.3>

- Belski, R., Mori, T. A., Puddey, I. B., Sipsas, S., Woodman, R. J., Ackland, T. R., Beilin, L. J., Dove, E. R., Carlyon, N. B., Jayaseena, V., & Hodgson, J. M. (2011). Effects of lupin-enriched foods on body composition and cardiovascular disease risk factors: A 12-month randomized controlled weight loss trial. *International Journal of Obesity*, 35(6), 810–819. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.213>
- Bucher, P. (1999). Regulatory elements and expression profiles. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(3), 400–407. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80054-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80054-2)
- Burton, R. A., Shirley, N. J., King, B. J., Harvey, A. J., & Fincher, G. B. (2004). The CesA Gene Family of Barley. Quantitative Analysis of Transcripts Reveals Two Groups of Co-Expressed Genes. *Plant Physiology*, 134(1), 224–236. <https://doi.org/10.1104/pp.103.032904>
- Bussmann, R. W., & Sharon, D. (2014). Two decades of ethnobotanical research in Southern Ecuador and Northern Peru. *Ethnobiology and Conservation*, 3(2014), 1–50. <https://doi.org/10.15451/ec2014-6-3.2-1-50>
- Caracausi, M., Piovesan, A., Antonaros, F., Strippoli, P., Vitale, L., & Pelleri, M. C. (2017). Systematic identification of human housekeeping genes possibly useful as references in gene expression studies. *Molecular Medicine Reports*, 16(3), 2397–2410. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6944>
- Caradec, J., Sirab, N., Keumeugni, C., Moutereau, S., Chimingqi, M., Matar, C., Revaud, D., Bah, M., Manivet, P., Conti, M., & Loric, S. (2010). Desperate house genes: The dramatic example of hypoxia. *British Journal of Cancer*, 102(6), 1037–1043. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605573>
- Carvajal-Larenas, F. E., Linnemann, A. R., Nout, M. J. R., Koziol, M., & van Boekel, M. A. J. S. (2016). *Lupinus mutabilis*: Composition, Uses, Toxicology, and Debittering. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1454–1487. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772089>
- Chen, L., Zhong, H., Kuang, J., Li, J., Lu, W., & Chen, J. (2011). Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta*, 234(2), 377–390. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1410-3>
- Chirinos-Arias, M. C., Jiménez, J. E., & Vilca-Machaca, L. S. (2015). Analysis of Genetic

- Variability among thirty accessions of Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) using ISSR molecular markers. *Scientia Agropecuaria*, 6(1), 17–30. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.02>
- Coker, J. S., & Davies, E. (2003). Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data. *BioTechniques*, 35(4), 740–748. <https://doi.org/10.2144/03354st04>
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., & Scheible, W. R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(1), 5–17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
- Dávila, J. (1987). Posibilidades Y Potencialidad. *Lupinus Mutabilis: Situación Mundial, Importancia, Diagnosticos*, 72–85.
- Derveaux, S., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4), 227–230. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>
- Dundas, J., & Ling, M. (2012). Reference genes for measuring mRNA expression. *Theory in Biosciences*, 131(4), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s12064-012-0152-5>
- Eastwood, R. J., & Hughes, C. E. (2018). 878. *Lupinus Mutabilis*. *Curtis's Botanical Magazine*, 35(2), 134–148. <https://doi.org/10.1111/curt.12233>
- Entz, M. H., Bullied, W. J., Forster, D. A., Gulden, R., & Vessey, J. K. (2001). Extraction of subsoil nitrogen by alfalfa, alfalfa-wheat, and perennial grass systems. *Agronomy Journal*, 93(3), 495–503. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.933495x>
- Expósito-Rodríguez, M., Borges, A. A., Borges-Pérez, A., & Pérez, J. A. (2008). Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology*, 8(1), 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-131>
- Flores Bendezú, J., Calderón, J., Rojas, B., Alarcón Matutti, E., & Gutiérrez, C. (2015). Desnutrición crónica y anemia en niños menores de 5 años de hogares indígenas del Perú – Análisis de la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar 2013. *Anales de La Facultad de Medicina*, 76(2), 135. <https://doi.org/10.15381/anales.v76i2.11139>
- Foley, R. C., Jimenez-Lopez, J. C., Kamphuis, L. G., Hane, J. K., Melser, S., & Singh, K.

- B. (2015). Analysis of conglutin seed storage proteins across lupin species using transcriptomic, protein and comparative genomic approaches. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0485-6>
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Experimental Hematology*, 30(6), 503–512. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8)
- Greer, S., Honeywell, R., Geletu, M., Arulanandam, R., & Raptis, L. (2010). Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. *Journal of Immunological Methods*, 355(1–2), 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.02.006>
- Gross, R., von Baer, E., Koch, F., Marquard, R., Trugo, L., & Wink, M. (1988). Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) with low-alkaloid content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1(4), 353–361. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(88\)90035-X](https://doi.org/10.1016/0889-1575(88)90035-X)
- Guilengue, N., Alves, S., Talhinhos, P., & Neves-Martins, J. (2020). Genetic and genomic diversity in a tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet) germplasm collection and adaptability to mediterranean climate conditions. *Agronomy*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy10010021>
- Hidalgo Rodríguez, J. E. M. (2021). *TRANSCRIPTOMA DE TARWI (Lupinus mutabilis Sweet) SOMETIDO A ESTRÉS HÍDRICO. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en Mejoramiento Genético de Plantas*. Univerisad Nacional Agraria La Molina.
- Jacobsen, S. E., & Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. *Botanica Economica de Los Andes Centrales- Universidad Mayor de San Andrés*, 458–482.
- Jacobsen, S.-E., & Mujica, A. (2008). Geographical distribution of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Plant Genetic Resources Newsletter*, 155(155).
- Jensen, E. S., Peoples, M. B., Boddey, R. M., Gresshoff, P. M., Henrik, H. N., Alves, B. J. R., & Morrison, M. J. (2012). Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. In *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 32, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s13593-011->

- Joseph, J. T., Poolakkalody, N. J., & Shah, J. M. (2018). Plant reference genes for development and stress response studies. *Journal of Biosciences*, *43*(1), 173–187. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9728-z>
- Ke, L. D., Chen, Z., & Yung, W. K. A. (2000). A reliability test of standard-based quantitative PCR: Exogenous vs endogenous standards. *Molecular and Cellular Probes*, *14*(2), 127–135. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2000.0288>
- Kole, C. (2011). Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: Legume crops and forages. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Legume Crops and Forages*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14387-8>
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, *54*(4), 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Kroc, M., Koczyk, G., Świącicki, W., Kilian, A., & Nelson, M. N. (2014). New evidence of ancestral polyploidy in the Genistoid legume *Lupinus angustifolius* L. (narrow-leaved lupin). *Theoretical and Applied Genetics*, *127*(5), 1237–1249. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2294-y>
- Kudo, T., Sasaki, Y., Terashima, S., Matsuda-Imai, N., Takano, T., Saito, M., Kanno, M., Ozaki, S., Suwabe, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Matsuoka, M., Takayama, S., & Yano, K. (2016). Identification of reference genes for quantitative expression analysis using large-scale RNA-seq data of *Arabidopsis thaliana* and model crop plants. *Genes & Genetic Systems*, *91*(2), 111–125. <https://doi.org/10.1266/ggs.15-00065>
- Kumar, D., Bansal, G., Narang, A., Basak, T., Abbas, T., & Dash, D. (2016). Integrating transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications. *Proteomics*, *16*(19), 2533–2544. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600140>
- Lacroix, B., & Citovsky, V. (2013). A mutation in negative regulator of basal resistance WRKY17 of *Arabidopsis* increases susceptibility to *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *F1000Research*, *2*(0), 33. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-33.v1>
- Lefroy, E. C., Stirzaker, R. J., & Pate, J. S. (2001). The influence of tagasaste (*Chamaecytisus proliferus* Link.) trees on the water balance of an alley cropping



- system on deep sand in south-western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52(2), 235. <https://doi.org/10.1071/AR00035>
- Lima-Cabello, E., Alche, V., Foley, R. C., Andrikopoulos, S., Morahan, G., Singh, K. B., Alche, J. D., & Jimenez-Lopez, J. C. (2017). Narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.)  $\beta$ -conglutin proteins modulate the insulin signaling pathway as potential type 2 diabetes treatment and inflammatory-related disease amelioration. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(5), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600819>
- Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, 165(3), 535–550. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>
- Magni, C., Sessa, F., Accardo, E., Vanoni, M., Morazzoni, P., Scarafoni, A., & Duranti, M. (2004). Conglutin  $\gamma$ , a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(11), 646–650. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2004.06.009>
- Mercado, G. (2018). Los caminos del tarwi y la integración andina : Bolivia , Perú y Ecuador. *Researchgate, December*, 6. <https://doi.org/dx.doi.org/10.15741/revbio.03.03.03>
- Naganowska, B., Wolko, B., Śliwińska, E., & Kaczmarek, Z. (2003). Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Annals of Botany*, 92(3), 349–355. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg145>
- Narsai, R., Ivanova, A., Ng, S., & Whelan, J. (2010). Defining reference genes in *Oryza sativa* using organ, development, biotic and abiotic transcriptome datasets. *BMC Plant Biology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-56>
- Parker, R. M., & Barnes, N. M. (1999). mRNA: detection by in Situ and northern hybridization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 106(12), 247–283. <https://doi.org/10.1385/0-89603-530-1:247>
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6), 509–515. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47>
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., & Nitsche, A. (2004).

- Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.177>
- Ramos Otiniano, C. C. (2021). *REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE YEMAS FLORALES EN TARWI (Lupinus mutabilis Sweet) POR RNA-SEQ. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en Mejoramiento Genético de Plantas.*
- Santos, C. N., Ferreira, R. B., & Teixeira, A. R. (1997). Seed Proteins of *Lupinus mutabilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3821–3825. <https://doi.org/10.1021/jf970075v>
- Smith, P., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., Ogle, S., O'Mara, F., Rice, C., Scholes, B., & Sirotenko, O. (2007). Agriculture In Climate Change 2007: Mitigation. *Cambridge University Press*, 4.
- Strozycki, P. M., Szczurek, A., Lotocka, B., Figlerowicz, M., & Legocki, A. B. (2007). Ferritins and nodulation in *Lupinus luteus*: Iron management in indeterminate type nodules. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), 3145–3153. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm152>
- Sun-Wada, G. H., Wada, Y., & Futai, M. (2003). Vacuolar H<sup>+</sup> Pumping ATPases in Luminal Acidic Organelles and Extracellular Compartments: Common Rotational Mechanism and Diverse Physiological Roles. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 35(4), 347–358. <https://doi.org/10.1023/A:1025780932403>
- Swift, J., Alvarez, J. M., Araus, V., Gutiérrez, R. A., & Coruzzi, G. M. (2020). Nutrient dose-responsive transcriptome changes driven by Michaelis–Menten kinetics underlie plant growth rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(23), 12531–12540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918619117>
- Tapia, M. E. (2015). El Tarwi, Lupino Andino. *Fondo Ítalo Peruano*, 108. <http://fadvamerica.org/wp-content/uploads/2017/04/TARWI-espanol.pdf>
- UNCTAD. (2018). *Peru's BioTrade sales reach new high but challenges to growth remain.* UNCTAD (United Nations Conference on Trade and Development).
- van Haren, R. J. F., & Arnason, P. (2017). *Lupinus mutabilis for Increased Biomass from marginal lands and value for BIOrefineries.* 16.

[https://research.hanze.nl/ws/files/26068177/Libbio\\_A5\\_booklet\\_WEB.pdf](https://research.hanze.nl/ws/files/26068177/Libbio_A5_booklet_WEB.pdf)

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7). <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Wang, M., Wang, Q., & Zhang, B. (2013). Evaluation and selection of reliable reference genes for gene expression under abiotic stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene*, 530(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.084>
- Wang, Zheng, Chen, Y., Fang, H., Shi, H., Chen, K., Zhang, Z., & Tan, X. (2014). Selection of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in *Brassica napus* under various stress conditions. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 289(5), 1023–1035. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0853-1>
- Wang, Zhong, Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics in Western Equatoria State. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57.
- Weis, J., Tan, S., Martin, B., & Wittwer, C. (1992). Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends in Genetics*, 8(8), 263–264. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(92\)90242-V](https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90242-V)
- Wellesley, L., Happer, C., & Froggatt, A. (2015). Changing Climate, Changing Diets Pathways to Lower Meat Consumption. *Chatham House Report, November*, 64. Recuperado de: <http://www.itv.com/news/2015-11-24/taxing-the-sale-of-meat-would-be-less-unpopular-than-many-governments-believe-report-says/>
- Wolko, B., Clements, J. C., Naganowska, B., Nelson, M. N., & Yang, H. (2011). Lupinus. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 153–206). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14387-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14387-8_9)
- Wu, H. Y., Liu, K. H., Wang, Y. C., Wu, J. F., Chiu, W. L., Chen, C. Y., Wu, S. H., Sheen, J., & Lai, E. M. (2014). AGROBEST: An efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Methods*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-19>
- Wu, T., Wang, R., Xu, X., He, X., Sun, B., Zhong, Y., Liang, Z., Luo, S., & Lin, Y. (2014). *Cucumis sativus* L-type lectin receptor kinase (CsLecRK) gene family response to

- Phytophthora melonis, Phytophthora capsici and water immersion in disease resistant and susceptible cucumber cultivars. *Gene*, 549(2), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.07.058>
- Xin, X. F., Nomura, K., Underwood, W., & He, S. Y. (2013). Induction and suppression of PEN3 focal accumulation during Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 infection of arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(8), 861–867. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-12-0262-R>
- Zhang, M., Liu, Y. H., Xu, W., Smith, C. W., Murray, S. C., & Zhang, H. Bin. (2020). Analysis of the genes controlling three quantitative traits in three diverse plant species reveals the molecular basis of quantitative traits. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66271-8>
- Zhou, L., Lim, Q. E., Wan, G., & Too, H. P. (2010). Normalization with genes encoding ribosomal proteins but not GAPDH provides an accurate quantification of gene expressions in neuronal differentiation of PC12 cells. *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-75>
- Zhou, X., Liao, W. J., Liao, J. M., Liao, P., & Lu, H. (2015). Ribosomal proteins: Functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(2), 92–104. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv014>
- Zolla, G., Badri, D. V., Bakker, M. G., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2013). Soil microbiomes vary in their ability to confer drought tolerance to Arabidopsis. In *Applied Soil Ecology* (Vol. 68). <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.03.007>

## **VIII. ANEXOS**

**Anexo 1:** Genes de referencia estables en plantas

| Gen de referencia encontrados | Especie/tratamiento o condición   | Referencia   | Estabilidad   |
|-------------------------------|---|--|---|
| <i>α-Tubulin</i>              | <i>A. thaliana</i> / Deficiencia de sulfato, estrés salino, estrés por sequía, ABA  | Yoshimoto <i>et al.</i> 2002; Liu <i>et al.</i> 2015   | Si  |
| <i>Actin 2</i>                | <i>A. thaliana</i>  | Estrés por deshidratación, estrés por frío, estrés salino, estrés oxidativo.   | Msanne <i>et al.</i> 2011; Egert <i>et al.</i> 2013; Atkinson <i>et al.</i> 2013  |
|                               |   | Estrés biótico- <i>A.tumefaciens</i> , <i>Heterodera schachtii</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Pseudomonas syringae pv.maculicola</i> , <i>P. syringae</i> pv. tomato | Woo-Lee <i>et al.</i> 2009; Lacroix and Citovsky 2014; Wu <i>et al.</i> 2014a; Atkinson <i>et al.</i> 2013; Giri <i>et al.</i> 2017 |
| <i>Actin 3</i>                | <i>A. thaliana</i> / Estrés salino, estrés por sequía, ABA  | Liu <i>et al.</i> 2015   | Si  |
| <i>Actin 2/8 (At3g18780)</i>  | <i>A. thaliana</i> / Estrés salino, estrés por sequía, estrés por frío, manitol.  | Gong <i>et al.</i> 2015  | Si  |
| <i>GAPDH (At1g13440)</i>      |   |  | Si  |
| <i>UBC28</i>                  | <i>A. thaliana</i> / Estrés salino, estrés osmótico, estrés por temperatura, estrés <b>radiomimetic</b> , estrés oxidativo, UV(B y C)<br><b>Zebularine, Trichostatin A, Sodium butyrate</b> | Pecinka <i>et al.</i> 2009   | Si  |
| <i>UBQ5(At3g62250)</i>        | <i>A. thaliana</i> / Estrés por sequía, estrés salino y manitol   | Terry <i>et al.</i> 2015   | Si  |
| <i>Tubulin2(AT5G62690)</i>    | <i>A. thaliana</i> / Sacarosa, NaCl, manitol, paclobutrazol, estrés hormonal  | Yan <i>et al.</i> 2014; Leng <i>et al.</i> 2017  | Si  |
| <i>F-BOX (AT5G15710)</i>      | <i>A. thaliana</i> / Estrés metálico  | Remans <i>et al.</i> 2008  | Si  |
| <i>YLS8 (AT5G08290)</i>       |   |  | Si  |
| <i>SAND (AT2G28390)</i>       |   |  | Si  |
| <i>EF1-α (AT5G60390)</i>      |   |  | Si  |
| <i>PPR (AT5G55840)</i>        |   |  | No  |
| <i>Expressed (AT4G26410)</i>  |   |  | No  |
| <i>UBC (AT5G25760)</i>        |   |  | No  |

## Continuación ...

| Gen de referencia encontrados      | Especie/tratamiento o condición  | Referencia  | Estabilidad                   |
|------------------------------------|--|---|-------------------------------|
| <i>TIP41-like (AT4G34270)</i>      | <i>A. thaliana</i>   | Estrés metalico   | Remans <i>et al.</i> 2008,    |
|                                    |  | <b>Developmental series (79 different tissues, organs, developmental stages, and genotypes)</b> | Czechowski <i>et al.</i> 2005 |
| <i>Actin 1</i>                     | <i>A. thaliana</i> / Estrés biótico - <i>Pseudomonas syringae</i> pv.tomato  | Xin <i>et al.</i> 2013  | Si                            |
| <i>Actin 8</i>                     | <i>A. thaliana</i> / Estrés biótico - <i>A. tumefaciens</i>  | Woo-Lee <i>et al.</i> 2009; Wu <i>et al.</i> 2014a; Kim <i>et al.</i> 2007;                     | Si                            |
| <i>UBC21</i>                       |  | Vaghchhipawala <i>et al.</i> 2012   | Si                            |
| <i>GAPDH</i>                       |  |   | Si                            |
| <i>eEF1-α</i>                      |  |   | Si                            |
| <i>UBQ5</i>                        | <i>A. thaliana</i> / Estrés biótico - <i>B. cinerea</i> ; <i>P. syringae</i> pv. maculicola, <i>P. syringae</i> pv. tomato | Giri <i>et al.</i> 2017   | Si                            |
| <i>Tubulin2</i>                    |  |   | Si                            |
| <i>UBQ10(AT4G05320)</i>            | <i>A. thaliana</i> / Estrés biótico-   |   | Si                            |
| <i>PPR (AT1G62930)</i>             | <i>A. tumefaciens</i>  |   | Si                            |
| <i>18SrRNA (X52320)</i>            |  |   | Si                            |
| <i>25SrRNA(AT2G01010)</i>          |  |   | Si                            |
| <i>GAPDH (AT1G42970)</i>           |  |   | No                            |
| <i>eIF1 (AT5G54760)</i>            |  | Joseph <i>et al.</i> Unpublished  | No                            |
| <i>β-Tubulin 6 (AT5G23860)</i>     |  |   | No                            |
| <i>Expressed (AT4G26410)</i>       |  |   | No                            |
| <i>EF-1α (AT5G60390)</i>           |  |   | No                            |
| <i>UBC (AT4G27960)</i>             |  |   | No                            |
| <i>AP2M(AT5G46630)</i>             |  |   | No                            |
| <i>Actin 2(AT3G18780)</i>          |  |   | No                            |
| <i>β-Tubulin 8 (AT5G23860)</i>     |  |   | No                            |
| <i>Tubulin α-4 (AT1G04820)</i>     |  |   | No                            |
| <i>Tubulin α-5 (AT5G19780)</i>     |  |   | No                            |
| <i>UBC28 (AT1G64230)</i>           |  |   | No                            |
| <i>Unknown protein (AT4G26410)</i> |  |   | No                            |
| <i>SAND (AT2g28390)</i>            | <i>A. thaliana</i> / Estrés biótico - <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Albugo laibachii</i>                              | Belhaj <i>et al.</i> 2016   | Si                            |

Continuación ...

| Gen de referencia encontrados   | Especie/tratamiento o condición   | Referencia   | Estabilidad   |                         |    |
|---------------------------------|---|--|---|-------------------------|----|
| <i>PPC2 (At2g42600)</i>         | <i>A. thaliana</i> / Estrés biótico ( <i>Erysiphe cichoracearum</i> )   | Fauteux <i>et al.</i> 2006                             | Si  |                         |    |
| <i>CACS (AT5G46630)</i>         | <i>A. thaliana</i> / Developmental series (79 different tissues, organs, developmental stages, and genotypes) | Czechowski <i>et al.</i> 2005                          | Si  |                         |    |
| <i>Helicase (At1g58050)</i>     |   |  |   |                         |    |
| <i>Expressed (AT4G26410)</i>    |   |  |   |                         |    |
| <i>Actin 2 (AT3G18780)</i>      |   |  | No  |                         |    |
| <i>Tubulin 6 (At5g12250)</i>    |   |  |   |                         |    |
| <i>Actin 7 (At5g09810)</i>      |   |  |   |                         |    |
| <i>CBP 20 (At5g44200)</i>       |   |  |   |                         |    |
| <i>PP2A (TC21939)</i>           | <i>N. benthamiana</i> /   | <i>et al.</i> 2012                                     | Si  |                         |    |
| <i>F-BOX</i>                    | Estrés abiótico - Tobacco   |  |   |                         |    |
| <i>60S RPL23 (TC19271)</i>      | necrosis virus A, Beet  |  | Si  |                         |    |
| <i>GAPDH (TC21175)</i>          | black scorch virus, Beet necrotic   |  | Si  |                         |    |
| <i>eEF1-α</i>                   | yellow vein virus, Barley stripe mosaic virus and Potato virus X  |  | No  |                         |    |
| <i>eEF1-α</i>                   | <i>N. benthamiana</i> .   | Estrés biótico - <i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato | Catinot <i>et al.</i> 2008  |                         |    |
| <i>β-Actin</i>                  |   |  |   |                         |    |
|                                 | <i>UVC irradiation</i>  |  |   |                         |    |
| <i>PP2A (X97913)</i>            | <i>N. benthamiana</i> / Deshidratación  | Catinot <i>et al.</i> 2008                             | Si  |                         |    |
| <i>Actin (X69885)</i>           | <i>N. tabacum</i> /Hojas, raíz,tallo,antera,carpelos  | Schmidt and Delaney 2010                               | Si  |                         |    |
| <i>α-Tubulin (AJ421411)</i>     |   |  | Si  |                         |    |
| <i>β-Tubulin (U91564)</i>       |   |  | Si  |                         |    |
| <i>EF-1a</i>                    |   |  | Si  |                         |    |
| <i>Zn finger (XM_009612124)</i> | <i>N. tabacum</i> ./Hojas,tallo,raíz y flores   | Guo <i>et al.</i> 2016                                 | No  |                         |    |
| <i>NADH-DH</i>                  |   |  | Si  |                         |    |
| <i>CPN60-2</i>                  |   |  | Si  |                         |    |
| <i>Type III sec</i>             |   |  | Si  |                         |    |
| <i>Hypothetical protein</i>     |   |  | No  |                         |    |
| <i>GDH</i>                      |   |  | No  |                         |    |
| <i>Zn finger (gi 158189353)</i> |   |  | No  |                         |    |
| <i>eEF1-α (AK061464)</i>        |   |  | No  |                         |    |
| <i>UBQ5 (AK061988)</i>          |   |  | <i>O. sativa</i> ./Tratamiento con hormonas, estrés salino, estrés por sequía | Jain <i>et al.</i> 2006 | Si |
| <i>25srRNA (AK119809)</i>       |   |  |   |                         | Si |
| <i>18SrRNA (AK059783)</i>       |   |  |   |                         | Si |
| <i>UBC (AK059694)</i>           | Si  |  |   |                         |    |
| <i>Actin 2 (AK100267)</i>       | Si  |  |   |                         |    |
| <i>β-tubulin (AK072502)</i>     | No  |  |   |                         |    |
| <i>GAPDH (AK064960)</i>         | No  |  |   |                         |    |
| <i>UBQ10 (AK101547)</i>         | No  |  |   |                         |    |
| <i>Actin</i>                    | No  |  |   |                         |    |



Continuación ...

| Gen de referencia encontrados    | Especie/tratamiento o condición   | Referencia   | Estabilidad |
|----------------------------------|---|--|-------------|
| <i>Actin</i><br><i>α-Tubulin</i> | <i>O. sativa</i><br>NaCl, ABA,<br>JA,SA,<br>Probenazole<br>Estrés biótico -<br><i>Pyricularia</i><br><i>grisea</i>  | Hashimoto <i>et al.</i><br>2004  | Si          |
| <i>UBQ1</i>                      | <i>O. sativa</i> ./ NaCl, ABA, JA,SA,<br>Probenazole  | Hashimoto <i>et al.</i><br>2004  | Si          |
| <i>UBQ1</i><br><i>Actin</i>      | <i>O. sativa</i><br>Temperature,<br>salinity, ABA,<br>BTH,<br>defense<br>signaling<br>compounds,<br>Estrés biótico -<br><i>Magnaporthe</i><br><i>oryzae</i> | Ueno <i>et al.</i><br>2015, Chen <i>et</i><br><i>al.</i> 2006<br>Ueno <i>et al.</i> 2015 | Si          |
| <i>eEF1-α</i>                    | <i>O. sativa</i> ./ Seedling, different   | Jain <i>et al.</i> 2006  | Si          |
| <i>UBQ5</i>                      | stages of shoot, root, leaf, rachis,  |  | Si          |
| <i>eIF-4a (AK073620)</i>         | inflorescence, flower and seeds   |  | Si          |
| <i>UBQ10</i>                     |   |  | Si          |
| <i>18SrRNA</i>                   |   |  | Si          |
| <i>β-tubulin</i>                 |   |  | Si          |
| <i>UBQ3b (CV091027)</i>          |   |  | No          |
| <i>UBC28 (CF811189)</i>          | <i>Vaccinium corymbosum</i> ./  | Vashisth and   | Si          |
| <i>RH8 (DR067965)</i>            | Mature fruit, immature fruit,   | Klima  | Si          |
| <i>CACSa (DR067098)</i>          | leaf,   | 2011   | Si          |
| <i>EF-1α (CV090683)</i>          | stem, flower bud, flower, fruit   |  | Si          |
| <i>UBQ3a (CV091371)</i>          | abscission zone, branch   |  | No          |
| <i>Actin7(CF811156)</i>          | abscission  |  | No          |
| <i>RHFP (CV090795)</i>           | zone  |  | No          |
| <i>β-tubulin (CV090295)</i>      |   |  | No          |
| <i>GAPDH (CV091251)</i>          |   |  | No          |
| <i>PP2A (DR067299)</i>           |   |  | No          |
| <i>CACsb (CV091378)</i>          |   |  | No          |
| <i>Metallothionein</i>           |   |  | No          |
| <i>GAPDH</i>                     | <i>V. corymbosum</i> ./ Tratamiento<br>con aluminio, tratamiento con<br>frío  | Blancheteau <i>et</i><br><i>al.</i><br>2011; Naik <i>et al.</i> ,<br>2007                | Si          |
| <i>Actin</i>                     | <i>V. corymbosum</i> ./ Tratamiento<br>con hormona  | Zhang <i>et al.</i><br>2016  | Si          |
| <i>UBC28</i>                     | <i>V. corymbosum</i> / Heat,<br>dehydration, salt   | Chen <i>et al.</i> 2017  | Si          |
| <i>HIS3 (AF024716)</i>           | <i>Gossypium. hirsutum</i> ./ Estrés  | Li <i>et al.</i> 2016  | Si          |
| <i>UBQ7 (DQ116441)</i>           | salino/ hojas   |  | Si          |
| <i>CYP1(GQ292530)</i>            |   |  | Si          |

Continuación ...

| Gen de referencia encontrados   | Especie/tratamiento o condición   | Referencia                         | Estabilidad |
|---------------------------------|---|------------------------------------|-------------|
| <i>α-Tubulin 10</i>             | <i>G. hirsutum</i> / Estrés salino/en raíz  |                                    | Si          |
| <i>UBQ7</i>                     | <i>G. hirsutum</i> / Estrés salino, estrés por sequía/ hojas, raíz  |                                    | Si          |
| <i>GAPDH</i>                    |   |                                    | Si          |
| <i>EF-1α 8,</i>                 |   |                                    | Si          |
| <i>α- Tubulin 10</i>            |   | Wang et al.                        | Si          |
| <i>HIS3</i>                     | <i>G. hirsutum</i> / Estrés por sequía/ hojas   | 2013                               | Si          |
| <i>UBQ1(EU604080)</i>           |   |                                    | Si          |
| <i>EF-1α 8 (DQ174257)</i>       |   |                                    | Si          |
| <i>Actin14 (AY305733)</i>       | <i>G. hirsutum</i> / Estrés por sequía, salinidad   |                                    | No          |
| <i>eIF5 (CO492947)</i>          |   |                                    | No          |
| <i>CYP1</i>                     |   |                                    | No          |
| <i>Actin 7</i>                  | <i>G. hirsutum</i> / Estrés por sequía, por frío, salino, alcalino y ABA  | Zhu et al. 2013; Liang et al. 2016 | Si          |
| <i>Actin</i>                    | <i>G. hirsutum</i> / Senescencia de la hoja   | Lin et al. 2015                    | Si          |
| <i>Actin1</i>                   | <i>G. hirsutum</i> / Tratamiento con hormona, estrés salino, estrés por sequía, tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , tratamiento con frío y <b>wounding</b> , senescencia de la hoja | Evans et al. 2016                  |             |
| <i>UBQ</i>                      | <i>G. hirsutum</i> / <b>wounding, salt, drought</b>   | Dongdong et al. 2016               | Si          |
| <i>eEF1-α</i>                   | <i>G. hirsutum</i> / Estrés por frío, por sequía, salino  | Meng et al. 2009                   | Si          |
| <i>Actin 4</i>                  | <i>G. hirsutum</i> /Estrés biótico-   | Huang et al.                       | Si          |
| <i>PP2A1</i>                    | <i>Helicoverpa armigera</i>   | 2015                               | Si          |
| <i>UBQ</i>                      | <i>G. hirsutum</i> / Estrés abiótico – <i>Aphis gossypii</i> (afido) y <i>Bemisia tabacci</i> ( <b>whiteflies</b> )   | Dubey et al. 2013                  | Si          |
| <i>60S (Glyma17g05270)</i>      | <i>Glycine max</i> / Deshidratación, estrés salino, estrés por frío, ABA/ Raíz, meristemo apical  | Le et al. 2012                     | Si          |
| <i>F-BOX (Glyma12g05510)</i>    |   |                                    | Si          |
| <i>eEF1- β (Glyma02g44460)</i>  |   |                                    | Si          |
| <i>ABC(Glyma12g02310)</i>       |   |                                    | Si          |
| <i>IDE (AW310136)</i>           |   |                                    | Si          |
| <i>Tubulin α(Glyma05g29000)</i> |   |                                    | No          |
| <i>UBQ (Glyma13g17830)</i>      |   |                                    | No          |
| <i>CDPK (Glyma10g38460)</i>     |   |                                    | No          |
| <i>CYP2 (Glyma12g02790)</i>     |   |                                    | Si          |
| <i>ABC</i>                      |   |                                    | Si          |

Continuación ...

| Gen de referencia encontrados  | Especie/tratamiento o condición  | Referencia                   | Estabilidad |
|--------------------------------|--|------------------------------|-------------|
| <i>eEF1-β</i>                  | <i>G. max</i> / Deshidratación, estrés salino, estrés por frío, ABA/ Raíz                          |                              | Si          |
| <i>60S(Glyma18g52780)</i>      |  |                              | Si          |
| <i>Actin11 (Glyma18g52780)</i> | <i>G. max</i> / Deshidratación, estrés salino, estrés por frío, ABA/ meristemo apical              |                              | Si          |
| <i>F-BOX</i>                   |  |                              | Si          |
| <i>IDE</i>                     |  |                              | Si          |
| <i>β-Actin</i>                 | <i>G. max</i> / Estrés por deshidratación  | Moreira <i>et al.</i> 2011   | No          |
| <i>18SrRNA</i>                 |  |                              | No          |
| <i>Lectin</i>                  |  |                              | No          |
| <i>β-Tubulin</i>               | <i>G. max</i> / Tratamiento por frío, ABA, deshidratación, sal                                     | Cheng <i>et al.</i> 2009     | Si          |
| <i>F-BOX</i>                   | <i>G. max</i> /Estrés por deshidratación   | Rodrigues <i>et al.</i> 2010 | Si          |
| <i>Actin</i>                   |  |                              | Si          |
| <i>α-Tubulin</i>               |  |                              | Si          |
| <i>Actin</i>                   | <i>G. max</i> /Estrés biótico- <i>Fusarium oxysporum</i>   | Lanubile <i>et al.</i> 2015  | Si          |
| <i>UBQ3</i>                    | <i>G. max</i> /Estrés biótico- <i>Phakopsora pachyrhizi</i>  | Tremblay <i>et al.</i> 2011  | Si          |
| <i>miR156a(MIMAT0001686)</i>   |  | Rodrigues <i>et al.</i> 2010 | Si          |
| <i>miR156b(MIMAT0001692)</i>   |  |                              | Si          |
| <i>miR1520d(MIMAT0007379)</i>  |  |                              | Si          |
| <i>miR167c (MIMAT0007355)</i>  |  |                              | No          |
| <i>miR171b (MIMAT0007363)</i>  |  |                              | No          |
| <i>miR156b</i>                 | <i>G. max</i> / 3 genotipos/ raíz y hojas  |                              | Si          |
| <i>miR1520d</i>                |  |                              | No          |
| <i>α-Tubulin (CA801144)</i>    |  |                              | No          |
| <i>CDPK (AW396185)</i>         |  |                              | No          |
| <i>F-BOX (CD397253)</i>        |  |                              | No          |
| <i>miR396a (MIMAT0001687)</i>  |  |                              | No          |
| <i>eEF1-α (TC203954)</i>       | <i>G. max</i> / Diferentes tejidos, estados de desarrollo, cultivares, tratamientos de fotoperiodo | Jian <i>et al.</i> 2008      | Si          |
| <i>CYP2 (TC224926)</i>         |  |                              | Si          |
| <i>Actin11 (TC204137)</i>      |  |                              | Si          |
| <i>UBQ10 (TC203625)</i>        |  |                              | Si          |
| <i>GAPDH (TC224599)</i>        |  |                              | Si          |
| <i>β-Tubulin (TC203804)</i>    |  |                              | No          |

Continuación ...

| Gen de referencia encontrados | Especie/tratamiento o condición   | Referencia                  | Estabilidad  |                         |    |
|-------------------------------|---|-----------------------------|--|-------------------------|----|
| <i>eEF1-α</i> (EF581011.1)    | <i>Saccharum Sp.</i> / Tratamiento con ABA, MeJA y SA   | Ling <i>et al.</i> 2014     | Si   |                         |    |
| <i>GAPDH</i> (CA254672)       |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>CUL</i> (C574093.1)        |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>TIPS-4</i> (CA228782.1)    |   |                             | No   |                         |    |
| <i>UBQ</i> (CA262530.1)       |   |                             | No   |                         |    |
| <i>β-Tubulin</i> (CA222437)   |   |                             | No   |                         |    |
| <i>CAC</i> (CA203604.1)       | <i>Saccharum Sp.</i> / Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , NaCl, PEG, CuCl <sub>2</sub> y CdCl <sub>2</sub> |                             | Si   |                         |    |
| <i>CUL</i>                    |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>APRT</i> (CA089592.1)      |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>TIPS-4I</i>                |   |                             | No   |                         |    |
| <i>β-Actin</i> (CA148161)     |   |                             | No   |                         |    |
| <i>18SrRNA</i> (SCFRRE06)     |   |                             | No   |                         |    |
| <i>GAPDH</i>                  |   |                             | No   |                         |    |
| <i>CUL</i>                    |   |                             | No   |                         |    |
| <i>eEF1-α</i>                 |   |                             | No   |                         |    |
| <i>β-Tubulin</i>              |   |                             | No   |                         |    |
| <i>TIPS-4I</i>                |   |                             | No   |                         |    |
| <i>UBQ</i>                    | No  |                             |  |                         |    |
| <i>APRT</i>                   | <i>Saccharum Sp.</i> / Estrés por sequía  |                             | No   |                         |    |
| <i>β-Actin</i>                |   |                             | No   |                         |    |
| <i>eEF1-α</i>                 | <i>Saccharum Sp.</i> / Estrés por sequía, estrés salino   | Guo <i>et al.</i> 2014      | Si   |                         |    |
| <i>GAPDH</i>                  |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>eIF-4α</i>                 |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>TIPS-4I</i>                |   |                             | No   |                         |    |
| <i>18SrRNA</i>                |   |                             | No   |                         |    |
| <i>PRR</i>                    |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>CAC</i>                    |   |                             | <i>Saccharum Sp.</i> / Leaf, leaf sheath, stem epidermis, stem pith and bud from different cultivars | Ling <i>et al.</i> 2014 | Si |
| <i>CUL</i>                    |   |                             |  |                         | Si |
| <i>UBQ</i>                    | No  |                             |  |                         |    |
| <i>β-Actin,</i>               | No  |                             |  |                         |    |
| <i>PRR</i>                    | No  |                             |  |                         |    |
| <i>25S rRNA</i> (CA171131)    | <i>Saccharum Sp.</i> / Iimature leaf roll, lamina from fully expanded leaf, stem, internodes, roots                     | Iskandar <i>et al.</i> 2004 | No   |                         |    |
| <i>GAPDH</i>                  |   |                             | No   |                         |    |
| <i>β-Actin,</i>               |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>β-Tubulin</i>              |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>Actin,</i>                 | <i>Daucus carota</i> / Estrés por sequía, estrés salino, tratamiento hormonal, tratamiento con frío y calor             | Tian <i>et al.</i> 2015     | Si   |                         |    |
| <i>eIF-4α</i>                 |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>GAPDH</i>                  |   |                             | Si   |                         |    |
| <i>SAND</i>                   |   |                             | No   |                         |    |
| <i>PP2A</i>                   |   |                             | No   |                         |    |
| <i>UBQ</i>                    |   |                             | Si   |                         |    |

Continuación ...

| Gen de referencia encontrados    | Especie/tratamiento o condición   | Referencia   | Estabilidad |
|----------------------------------|---|--|-------------|
| <i>EF-1α</i>                     | <i>Daucus carota</i> / Estrés por   |  | Si          |
| <i>TIP41</i>                     | sequía, estrés salino, tratamiento  |  | No          |
| <i>eIF-4α</i>                    | con frío y calor  |  | No          |
| <i>Actin</i>                     | <i>Daucus carota</i> Estrés por   | Perrin <i>et al.</i> 2017; Boedo <i>et al.</i> 2008                    | Si          |
| <i>β-Tubulin</i>                 | Estrés abiótico-<br><i>Alternaria dauci</i>   |  | Si          |
| <i>GAPDH</i>                     | <i>Daucus carota</i> / Estrés abiótico-<br><i>Alternaria dauci</i>  |  | Si          |
| <i>GAPDH</i>                     | <i>Actinidia delicosa</i> / Estrés  | Coker and Davies 2003  | Si          |
| <i>PP2A</i>                      | abiótico- <i>Pseudomonas syringae</i><br>pv. <i>actinidiae</i>  |  | Si          |
| <i>β-Tubulin</i>                 |   |  | No          |
| <i>7s-globulin</i>               |   |  | No          |
| <i>Actin</i>                     | <i>Actinidia delicosa</i> /Tratamientos con luz, tratamiento hormonal, estrés por calor, estrés por anegamiento, tratamiento con alta concentración de CO <sub>2</sub> , poscosecha y pérdida de agua | Li <i>et al.</i> 2013a; Li <i>et al.</i> 2013b; Yin <i>et al.</i> 2012 | Si          |
| <i>VATP16(XM_00226908 6.1)</i>   |   |  | Si          |
| <i>60S RPL18(XM_002270599.1)</i> | <i>Vitis vinifera</i> / Estrés biótico-<br><i>Plasmopara viticola</i> , <i>Botrytis cinérea</i> / fruto   |  | Si          |
| <i>UBE2(XM_002275879)</i>        |   |  | No          |
| <i>18S rRNA(GQ849399)</i>        |   |  | No          |
| <i>VPS54 (XM_002272141.1)</i>    |   | Gamm <i>et al.</i> 2011  | No          |
| <i>UQCC (XM_002264785.1)</i>     |   |  | No          |
| <i>VATP16(XM_00226908 6.1)</i>   |   |  | Si          |
| <i>60S RPL18</i>                 | <i>Vitis vinifera</i> / Estrés biótico-<br><i>Plasmopara viticola</i> , <i>Botrytis cinérea</i> / hojas   |  | Si          |
| <i>UQCC</i>                      |   |  | Si          |
| <i>18S rRNA,</i>                 |   |  | No          |
| <i>UBE2</i>                      |   |  | No          |
| <i>39S RP (XM_002285709.1)</i>   |   |  | No          |
| <i>Actin</i>                     | <i>Vitis vinifera</i> / Estrés salino y estrés osmótico   | Ma <i>et al.</i> 2015  | Si          |
| <i>AIG1(XM_002281960)</i>        |   |  | Si          |

Continuación ...

| Gen de referencia encontrados              | Especie/tratamiento o condición                                       | Referencia  | Estabilidad   |
|--|---|---|---|
| <b>TCPB(XM_002285876)</b>                  | <i>Vitis vinifera</i> / Durante la antesis, cuajado y bayas de 6–8 mm | González-Agüero <i>et al.</i> 2013  | Si  |
| <b>Actin1</b>                              | <i>Vitis vinifera</i> / Fruto en diferentes estadios                  | Wang <i>et al.</i> 2012   | Si  |
| <b>Actin</b>                               | <i>Vitis vinifera</i> / Fruto   | Pilati <i>et al.</i> 2007   | Si  |
| <b>GAPDH (SGN-U347734)</b>                 | <i>Coffea arabica</i> / Estrés biótico-                               | Barsalobres-  | Si  |
| <b>14-3-3(SGN-U356404)</b>                 | <i>Hemileia vastatrix</i>   | Cavallari <i>et al.</i> 2009  | Si  |
| <b>60SRPL7(SGN-U351477)</b>                |   |   | No  |
| <b>ADH (SGN-U350348)</b>                   |   |   | No  |
| <b>UBQ (SGN-U347154)</b>                   |   |   | No  |
| <b>Actin 7</b>                             |   |   | No  |
| <b>GAPDH</b>                               | <i>Coffea arabica</i> / En diferentes órganos                         |   | Si  |
| <b>14-3-3</b>                              |   |   | Si  |
| <b>60S RPL7</b>                            |   |   | Si  |
| <b>ADH</b>                                 |   |   | No  |
| <b>UBQ,</b>                                |   |   | No  |
| <b>Actin 7</b>                             |   |   | No  |
| <b>CYP (AF126551)</b>                      | <i>Solanum tuberosum</i> / Estrés salino                              | Nicot <i>et al.</i> 2005  | Si  |
| <b>18SrRNA (X67238)</b>                    | <i>Solanum tuberosum</i> / Estrés salino, estrés por sequía           |   | Si  |
| <b>eEF1-<math>\alpha</math> (AB061263)</b> |   |   | Si  |
| <b>RPL2 (39816659)</b>                     | <i>Solanum tuberosum</i> /Estrés por frío                             |   | Si  |
| <b>Actin (X55749)</b>                      |   |   | Si  |
| <b><math>\beta</math>-Tubulin (609267)</b> | <i>Solanum tuberosum</i> / Estrés por frío, estrés salino             |   | Si  |
| <b>eEF1-<math>\alpha</math></b>            | <i>Solanum tuberosum</i>  | Estrés por deshidratación, estrés por intensidad de luz<br>Tizón tardío<br>Estrés biótico- <i>Fusarium solani</i> | Szalonek <i>et al.</i> 2015<br>Nicot <i>et al.</i> 2005<br>Charfeddine <i>et al.</i> 2016 |
| <b>18SrRNA</b>                             | <i>Solanum tuberosum</i> / Tizón tardío                               | Nicot <i>et al.</i> 2005  | Si  |
| <b><math>\beta</math>-Tubulin</b>          |   |   | Si  |
| <b>Actin</b>                               |   |   | No  |
| <b>CYP (AY942800)</b>                      | <i>Cucumis sativus</i> / Diferente fuente de nitrógeno/ Raíz          | Warzybok and  | Si  |
| <b>TIP41(GW881871)</b>                     |   |   | Si  |

Continuación ...

| Gen de referencia encontrados       | Especie/tratamiento o condición   | Referencia              | Estabilidad |
|-------------------------------------|---|-------------------------|-------------|
|                                     |   | Migocka 2013            |             |
| <i>Expressed protein (GW881873)</i> | <i>Cucumis s.</i> /Diferente fuente de nitrógeno/Tallo  |                         | Si          |
| <i>CACS (GW881874)</i>              |   |                         | Si          |
| <i>EF-1α (EF446145)</i>             | <i>Cucumis s.</i> /Diferente fuente de nitrógeno/ Hoja  |                         | Si          |
| <i>Actin (AB010922)</i>             |   |                         | Si          |
| <i>Expressed protein TIP41</i>      | <i>Solanum t.</i> /Diferente fuente de nitrógeno/ En todos los órganos                                  |                         | Si          |
| <i>CYP</i>                          |   |                         | Si          |
| <i>YSL8</i>                         |   |                         | No          |
| <i>TIP41</i>                        | <i>S. tuberosum</i> / Nitrogen deprivation,   |                         | No          |
| <i>UBQ (AF104391)</i>               | varying nitrate availability/ Raíz  |                         | Si          |
| <i>Actin</i>                        | <i>S. tuberosum</i> / privación de nitrógeno, disponibilidad variable de nitrato/ Tallo                 |                         | Si          |
| <i>F-box(GW881870)</i>              |   |                         |             |
| <i>EF-1α</i>                        | <i>S. tuberosum</i> / privación de nitrógeno, disponibilidad variable de nitrato / Hoja                 |                         | Si          |
|                                     |   |                         |             |
| <i>TIP41</i>                        | <i>S. tuberosum</i> / privación de nitrógeno, disponibilidad variable de nitrato / En todos los órganos |                         | No          |
| <i>CACS</i>                         |   |                         | Si          |
| <i>CYP</i>                          |   |                         | No          |
| <i>PDF2</i>                         |   |                         | No          |
| <i>UBQ</i>                          | <i>S. tuberosum</i> / Tratamiento con hormonas ,sal, frio, wounding                                     | Yang <i>et al.</i> 2012 | Si          |
| <i>Actin</i>                        | <i>S. tuberosum</i> / Estrés fotooxidativo  | Li <i>et al.</i> 2013b  | Si          |
| <i>CACS, F-box, TIP41</i>           | <i>S. tuberosum</i> / Estrés por sequía, salino, tratamiento con ABA                                    | Gan <i>et al.</i> 2017  | Si          |
| <i>EF-1α</i>                        | <i>S. tuberosum</i> / tratamiento con calor, frío, hormonal, estrés por deshidratación                  | Wang <i>et al.</i> 2015 | Si          |
| <i>UBQ</i>                          | <i>S. tuberosum</i> / Estrés biótico- <i>Phytophthora melonis, P. capsici</i>                           | Wu <i>et al.</i> 2014b  | Si          |
| <i>Actin</i>                        | <i>S. tuberosum</i> / Estrés biótico- <i>Fusarium oxysporum</i>   | Zhou and Wu 2009        | Si          |
| <i>EF-1α</i>                        | <i>S. tuberosum</i> / Estrés biótico- <i>Pseudoperonospora cubensis</i>                                 | Wang <i>et al.</i> 2015 | Si          |
| <i>CAC (SGN-U314153)</i>            |   |                         | Si          |

Continuación ...

Continuación ...

| Gen de referencia encontrados  | Especie/tratamiento o condición   | Referencia              | Estabilidad |
|--|---|-------------------------|-------------|
| <b>TIP41(SGN-U321250)</b>  |   |                         | Si          |
| <b>Expressed</b>   |   |                         | Si          |
| <b>(SGN-U346908)</b>   | <i>Solanum lycopersicum</i> / Primary root, mature root, cotyledons, leaf samples,  | Expósito-               | Si          |
| <b>SAND(SGN-U316474)</b>   | inflorescence, seeds and pericarp   | rodríguez <i>et al.</i> | No          |
| <b>eEF1-<math>\alpha</math> (X53043)</b>   | at  | 2008                    | No          |
| <b><math>\alpha</math>-tubulin(AC122540)</b>   | different developmental stages  |                         | No          |
| <b>GAPDH (U97257)</b>  |   |                         | No          |
| <b>DnaJ-like (TC124053)</b>  | <i>S. lycopersicum</i> /Hojas, raíz,  | Coker and               | Si          |
| <b>TCTP (TC115845)</b>   | fruto y flores  | Davies 2003             | Si          |
| <b><math>\alpha</math>-tubulin (TC115716)</b>  |   |                         | Si          |
| <b>CYP (TC115937)</b>  |   |                         | Si          |
| <b>GAPDH (TC115908)</b>  |   |                         | Si          |
| <b>Catalase (TC115865)</b>   |   |                         | Si          |
| <b>Cys protease (TC124125)</b>   |   |                         | Si          |
| <b>UDP glucose PTG</b>   |   |                         | Si          |
| <b>Chaperonin-60 <math>\beta</math></b>  |   |                         | Si          |
| <b>Actin (TC194780)</b>  | <i>S. lycopersicum</i> /Estrés por  | Løvdal and Lillo        | Si          |
| <b><math>\beta</math>-tubulin (DQ205342)</b>   | nitrógeno, frío, luz  | 2009                    | Si          |
| <b>RPL2 (X64562)</b>   |   |                         | Si          |
| <b>PP2A (AY325817)</b>   |   |                         | Si          |
| <b>GAPDH</b>   |   |                         | No          |
| <b>PGK (TC203809)</b>  |   |                         | No          |
| <b>eEF1-<math>\alpha</math> (X14449)</b>   |   |                         | No          |
| <b>GAPDH (U93208)</b>  | <i>Solanum l.</i> /Estrés abiótico por  | Mascia <i>et al.</i>    | Si          |
| <b>Actin (BT013707)</b>  | virus   | 2010                    | Si          |
| <b>Uridylate kinase</b>  |   |                         | Si          |
| <b>UBQ 3 (X58253)</b>  |   |                         | Si          |
| <b>18S rRNA (X51576)</b>   |   |                         | No          |
| <b>eEF1-<math>\alpha</math> (X53043)</b>   |   |                         | No          |
| <b>PTP<sup>Sec23A, 26S</sup> proteasome, AAA<sup>superfamily</sup>, ARF, RNase L inhibitor, Hypothetical</b> | <i>Triticum aestivum</i> / Root, shoot, stem, leaves, spike, floral organs and caryopses at different developmental stages, temperature stress A1 | Paolacci <i>et al.</i>  | Si          |
| <b>UQCR Fe-S</b>   |   |                         | Si          |
| <b>Histone, RP,<math>\beta</math>-Tubulin, Znfinger, Actin, A20-like</b>                                     |   |                         | No          |



Continuación ...

| Gen de referencia encontrados                               | Especie/tratamiento o condición   | Referencia  | Estabilidad |
|---|---|---|-------------|
| <i>Actin</i>  | <i>Triticum aestivum</i> / Estrés salino, tratamiento por calor, tratamiento por frío, estrés por sequía, tratamiento con ABA | Goyal <i>et al.</i> 2016; Qin <i>et al.</i> 2008; Zhu <i>et al.</i> 2014; Dong <i>et al.</i> 2012 | No          |
| <i><math>\alpha</math>-tubulin</i>                          | <i>Triticum aestivum</i> / tratamiento con hormonas, sal, calor   | Han <i>et al.</i> 2012  | No          |
| <i>5SrRNA, APTI</i>   | <i>Triticum aestivum</i> / estrés por sequía, calor, sal  | Pandey <i>et al.</i> 2014   | No          |
| <i>eEF1-<math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-Tubulin</i> | <i>Triticum aestivum</i> / Estrés biótico- <i>Blumeria graminis f. sp. Tritici</i>  | Tayeh <i>et al.</i> 2014  | Si          |
| <i>Actin</i>  | <i>Triticum aestivum</i> /Estrés biótico- <i>Rhizoctonia cerealis</i>   | Zhu <i>et al.</i> 2014  | Si          |

## Anexo 2: Análisis de las 5 pruebas de homocedasticidad (\*media)

| Gene_id               | Pruebas de normalidad |                    | Pruebas de homocedasticidad |          |            |               |         |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------------|----------|------------|---------------|---------|
|                       | Shapiro-Wilk          | Kolmogorov-Smirnov | Levene(*)                   | Barlett  | F-test     | ligner-Kligne | Hartley |
| TRINITY_DN10129_c0_g1 | 0.2473                | 0.2051             | 0.1965                      | 0.05463  | 0.0542544  | 0.3351        | 0.05425 |
| TRINITY_DN10491_c0_g1 | 0.4894                | 0.493              | 0.04878                     | 0.3282   | 0.328705   | 0.0498        | 0.3287  |
| TRINITY_DN10551_c0_g1 | 0.4629                | 0.6677             | 0.006738                    | 0.07976  | 0.0794666  | 0.03565       | 0.07946 |
| TRINITY_DN12076_c0_g1 | 0.8106                | 0.8661             | 0.9567                      | 0.7957   | 0.796094   | 0.9885        | 0.7961  |
| TRINITY_DN12238_c0_g2 | 0.842                 | 0.4767             | 0.1861                      | 0.02729  | 0.0268814  | 0.09087       | 0.02688 |
| TRINITY_DN12386_c0_g1 | 0.4275                | 0.7203             | 0.1537                      | 0.5463   | 0.547008   | 0.1278        | 0.547   |
| TRINITY_DN12694_c0_g1 | 0.8616                | 0.5409             | 0.3571                      | 0.642    | 0.642588   | 0.2926        | 0.6426  |
| TRINITY_DN13672_c0_g1 | 0.3889                | 0.5643             | 0.6471                      | 0.5228   | 0.523513   | 0.7546        | 0.5235  |
| TRINITY_DN13980_c0_g1 | 0.253                 | 0.5657             | 0.6759                      | 0.4068   | 0.407402   | 0.8765        | 0.4074  |
| TRINITY_DN15103_c0_g1 | 0.2952                | 0.3825             | 0.01062                     | 0.2479   | 0.248248   | 0.01349       | 0.2482  |
| TRINITY_DN15552_c0_g1 | 0.4289                | 0.6181             | 0.5505                      | 0.7152   | 0.71575    | 0.1739        | 0.7157  |
| TRINITY_DN15665_c0_g1 | 0.1346                | 0.1324             | 0.02662                     | 0.03164  | 0.0312213  | 0.0273        | 0.03122 |
| TRINITY_DN15806_c0_g1 | 0.01525               | 0.06721            | 0.0007311                   | 0.04116  | 0.0407514  | 0.00588       | 0.04075 |
| TRINITY_DN16045_c0_g1 | 0.6001                | 0.6679             | 0.113                       | 0.04009  | 0.039684   | 0.1739        | 0.03968 |
| TRINITY_DN16344_c0_g1 | 0.09102               | 0.02819            | 0.06661                     | 0.1398   | 0.139798   | 0.06569       | 0.1398  |
| TRINITY_DN16357_c0_g1 | 0.9206                | 0.828              | 0.8187                      | 0.6327   | 0.633343   | 0.8596        | 0.6333  |
| TRINITY_DN16764_c0_g1 | 0.8811                | 0.8811             | 0.4283                      | 0.4372   | 0.437854   | 0.3387        | 0.4378  |
| TRINITY_DN17114_c0_g1 | 0.1947                | 0.1232             | 0.2879                      | 0.6614   | 0.662004   | 0.4945        | 0.662   |
| TRINITY_DN17322_c0_g3 | 0.4662                | 0.6234             | 0.4152                      | 0.679    | 0.679545   | 0.782         | 0.6795  |
| TRINITY_DN17555_c0_g1 | 0.04445               | 0.1156             | 0.001402                    | 0.02202  | 0.0216157  | 0.01354       | 0.02162 |
| TRINITY_DN17590_c0_g1 | 0.4218                | 0.8051             | 0.07237                     | 0.2264   | 0.226708   | 0.2538        | 0.2267  |
| TRINITY_DN17652_c0_g1 | 0.05136               | 0.04757            | 0.000285                    | 0.1041   | 0.103913   | 0.005841      | 0.1039  |
| TRINITY_DN17776_c0_g1 | 0.2833                | 0.3227             | 0.03417                     | 0.2366   | 0.236909   | 0.04991       | 0.2369  |
| TRINITY_DN17806_c0_g1 | 0.1807                | 0.03193            | 0.0003393                   | 0.1297   | 0.129649   | 0.005881      | 0.1296  |
| TRINITY_DN18221_c0_g1 | 0.001227              | 0.001701           | 4.10E-07                    | 0.003965 | 0.00375975 | 0.005923      | 0.00376 |

Continuación...

|                       |          |          |            |          |            |          |          |
|-----------------------|----------|----------|------------|----------|------------|----------|----------|
| TRINITY_DN18240_c0_g1 | 0.3778   | 0.5784   | 0.7017     | 0.9203   | 0.920507   | 0.6619   | 0.9205   |
| TRINITY_DN18362_c0_g1 | 0.2699   | 0.1038   | 0.01846    | 0.006659 | 0.00639298 | 0.005882 | 0.006393 |
| TRINITY_DN18572_c0_g1 | 0.2155   | 0.584    | 0.1382     | 0.288    | 0.28843    | 0.23     | 0.2884   |
| TRINITY_DN18595_c0_g1 | 0.5702   | 0.6579   | 0.005237   | 0.1465   | 0.146446   | 0.0072   | 0.1464   |
| TRINITY_DN18747_c0_g2 | 0.2476   | 0.5738   | 0.07003    | 0.07211  | 0.0717934  | 0.8544   | 0.07179  |
| TRINITY_DN18802_c0_g1 | 0.2014   | 0.1654   | 0.845      | 0.8663   | 0.866623   | 0.8775   | 0.8666   |
| TRINITY_DN18893_c0_g2 | 0.5405   | 0.2013   | 0.9556     | 0.8448   | 0.845119   | 0.7526   | 0.8451   |
| TRINITY_DN18903_c0_g1 | 0.4433   | 0.5027   | 0.05222    | 0.142    | 0.142003   | 0.4348   | 0.142    |
| TRINITY_DN18909_c0_g1 | 0.9967   | 0.9104   | 0.7045     | 0.8324   | 0.832743   | 0.5567   | 0.8327   |
| TRINITY_DN18947_c0_g2 | 0.09081  | 0.435    | 0.04271    | 0.1325   | 0.132461   | 0.3642   | 0.1325   |
| TRINITY_DN19015_c5_g1 | 0.4029   | 0.424    | 0.1048     | 0.2741   | 0.274541   | 0.1993   | 0.2745   |
| TRINITY_DN19121_c0_g1 | 0.4853   | 0.5038   | 0.1582     | 0.2133   | 0.213563   | 0.1003   | 0.2136   |
| TRINITY_DN19139_c0_g2 | 0.6903   | 0.72     | 0.3718     | 0.7277   | 0.728218   | 0.6154   | 0.7282   |
| TRINITY_DN19209_c0_g2 | 0.3273   | 0.7648   | 0.4918     | 0.6491   | 0.649738   | 0.7065   | 0.6497   |
| TRINITY_DN19266_c0_g2 | 0.3114   | 0.01596  | 0.2158     | 0.6117   | 0.612303   | 0.3212   | 0.6123   |
| TRINITY_DN19543_c1_g1 | 0.4832   | 0.4637   | 0.2354     | 0.3874   | 0.387974   | 0.3212   | 0.388    |
| TRINITY_DN19576_c0_g2 | 0.5413   | 0.9336   | 0.08869    | 0.2826   | 0.282993   | 0.96     | 0.2827   |
| TRINITY_DN19583_c1_g1 | 0.1101   | 0.4406   | 0.3225     | 0.6958   | 0.696341   | 0.2542   | 0.6963   |
| TRINITY_DN19583_c4_g1 | 0.001332 | 0.001483 | 0.003894   | 0.009028 | 0.00872377 | 0.361    | 0.008724 |
| TRINITY_DN19598_c0_g1 | 0.1113   | 0.1082   | 0.9698     | 0.9398   | 0.939956   | 0.686    | 0.9399   |
| TRINITY_DN19603_c0_g1 | 0.5661   | 0.8709   | 0.6742     | 0.749    | 0.749441   | 0.5993   | 0.7494   |
| TRINITY_DN19630_c0_g1 | 0.3903   | 0.3806   | 0.08096    | 0.09068  | 0.0412693  | 0.1999   | 0.04127  |
| TRINITY_DN19689_c0_g1 | 0.3153   | 0.6046   | 0.7092     | 0.6622   | 0.662795   | 0.7824   | 0.6628   |
| TRINITY_DN19765_c0_g2 | 0.2646   | 0.2825   | 0.00004094 | 0.001557 | 0.00143844 | 0.005882 | 0.001438 |
| TRINITY_DN19920_c0_g1 | 0.3754   | 0.2046   | 0.2677     | 0.2229   | 0.223189   | 0.2971   | 0.2232   |
| TRINITY_DN19959_c0_g1 | 0.9415   | 0.772    | 0.02505    | 0.05865  | 0.0582824  | 0.04149  | 0.05828  |
| TRINITY_DN19971_c4_g2 | 0.3407   | 0.2276   | 0.2247     | 0.4588   | 0.459428   | 0.2296   | 0.4594   |
| TRINITY_DN19997_c1_g1 | 0.4084   | 0.3467   | 0.3418     | 0.5586   | 0.559314   | 0.7546   | 0.5593   |
| TRINITY_DN20060_c2_g1 | 0.9083   | 0.5293   | 0.9578     | 0.7759   | 0.776357   | 0.9448   | 0.7763   |
| TRINITY_DN20062_c0_g1 | 0.5554   | 0.8922   | 0.0002898  | 0.07575  | 0.0754393  | 0.005882 | 0.07544  |
| TRINITY_DN20246_c0_g3 | 0.07616  | 0.02552  | 0.0003869  | 0.001729 | 0.00160218 | 0.005923 | 0.001602 |
| TRINITY_DN20247_c5_g3 | 0.991    | 0.9961   | 0.6531     | 0.542    | 0.542715   | 0.7374   | 0.5427   |
| TRINITY_DN20251_c0_g2 | 0.6852   | 0.3774   | 0.7284     | 0.5476   | 0.548233   | 0.878    | 0.5482   |
| TRINITY_DN20257_c0_g1 | 0.3823   | 0.1554   | 0.3244     | 0.523    | 0.523681   | 0.151    | 0.5237   |
| TRINITY_DN20346_c0_g4 | 0.2097   | 0.2431   | 0.133      | 0.1917   | 0.191895   | 0.1307   | 0.1919   |
| TRINITY_DN20389_c0_g1 | 0.6569   | 0.61     | 0.2115     | 0.5495   | 0.550202   | 0.286    | 0.5502   |
| TRINITY_DN20613_c0_g8 | 0.9234   | 0.5178   | 0.3666     | 0.615    | 0.61564    | 0.8368   | 0.6156   |
| TRINITY_DN20828_c5_g1 | 0.08029  | 0.0195   | 0.003106   | 0.1493   | 0.149289   | 0.02139  | 0.1493   |
| TRINITY_DN20894_c2_g2 | 0.2884   | 0.1276   | 0.1498     | 0.3327   | 0.333208   | 0.6988   | 0.3332   |
| TRINITY_DN20901_c0_g3 | 0.3391   | 0.2646   | 0.5982     | 0.9723   | 0.97238    | 0.7523   | 0.9724   |
| TRINITY_DN20921_c0_g3 | 0.5083   | 0.4996   | 0.9032     | 0.8199   | 0.820265   | 0.8094   | 0.8202   |
| TRINITY_DN20956_c1_g3 | 0.3426   | 0.2404   | 0.2287     | 0.2786   | 0.279014   | 0.1803   | 0.279    |
| TRINITY_DN20960_c0_g2 | 0.0579   | 0.05321  | 0.0003265  | 0.004341 | 0.00412583 | 0.005882 | 0.004126 |
| TRINITY_DN20971_c0_g4 | 0.6112   | 0.7117   | 0.4139     | 0.3682   | 0.368843   | 0.3351   | 0.3688   |
| TRINITY_DN21010_c0_g1 | 0.5715   | 0.7602   | 0.2528     | 0.2126   | 0.212871   | 0.2649   | 0.2129   |
| TRINITY_DN21025_c3_g2 | 0.5535   | 0.6652   | 0.03492    | 0.1205   | 0.120422   | 0.02717  | 0.1204   |
| TRINITY_DN21101_c3_g2 | 0.1441   | 0.4335   | 0.2521     | 0.2047   | 0.204929   | 0.8038   | 0.2049   |
| TRINITY_DN21122_c5_g4 | 0.5944   | 0.08492  | 0.4942     | 0.4897   | 0.490431   | 0.4708   | 0.4904   |
| TRINITY_DN21138_c2_g4 | 0.1863   | 0.06108  | 0.005919   | 0.08798  | 0.0877238  | 0.02139  | 0.08772  |
| TRINITY_DN21213_c0_g1 | 0.01369  | 0.05109  | 0.2678     | 0.4285   | 0.429169   | 0.1      | 0.4292   |
| TRINITY_DN21232_c1_g2 | 0.1766   | 0.13     | 0.5778     | 0.3422   | 0.342706   | 0.7443   | 0.3427   |
| TRINITY_DN21304_c0_g1 | 0.8139   | 0.4355   | 0.4536     | 0.8166   | 0.816946   | 0.3391   | 0.8169   |
| TRINITY_DN21377_c6_g1 | 0.6275   | 0.4004   | 0.5061     | 0.4069   | 0.407502   | 0.5671   | 0.4075   |
| TRINITY_DN21405_c0_g1 | 0.3506   | 0.1774   | 0.9406     | 0.6518   | 0.652431   | 0.6609   | 0.6524   |
| TRINITY_DN21407_c0_g1 | 0.2256   | 0.1868   | 0.9437     | 0.8037   | 0.804067   | 0.8884   | 0.804    |
| TRINITY_DN21421_c1_g1 | 0.1661   | 0.3014   | 0.1844     | 0.05996  | 0.0595949  | 0.1737   | 0.05959  |
| TRINITY_DN21460_c0_g2 | 0.363    | 0.3631   | 0.117      | 0.3612   | 0.361753   | 0.2049   | 0.3617   |
| TRINITY_DN21484_c1_g1 | 0.6768   | 0.5135   | 0.1539     | 0.155    | 0.154971   | 0.119    | 0.155    |
| TRINITY_DN21524_c0_g9 | 0.1172   | 0.3253   | 0.4172     | 0.2784   | 0.278835   | 0.2343   | 0.2788   |
| TRINITY_DN21542_c1_g2 | 0.416    | 0.6158   | 3.45E-07   | 0.001517 | 0.00140068 | 0.005841 | 0.001401 |
| TRINITY_DN21561_c1_g3 | 0.03388  | 0.2848   | 0.04205    | 0.009638 | 0.00932536 | 0.2504   | 0.009325 |
| TRINITY_DN21591_c0_g1 | 0.8002   | 0.9761   | 0.8031     | 0.8412   | 0.841487   | 0.6865   | 0.8415   |
| TRINITY_DN21613_c1_g1 | 0.1085   | 0.1587   | 0.5274     | 0.6619   | 0.662484   | 0.3393   | 0.6625   |
| TRINITY_DN21622_c1_g1 | 0.02947  | 0.03487  | 0.01149    | 0.02367  | 0.023266   | 0.01347  | 0.02327  |
| TRINITY_DN21634_c0_g1 | 0.2169   | 0.1264   | 0.0007244  | 0.06227  | 0.061916   | 0.01347  | 0.06191  |
| TRINITY_DN21660_c0_g1 | 0.8065   | 0.9089   | 0.3075     | 0.2911   | 0.291511   | 0.61     | 0.2915   |
| TRINITY_DN21701_c1_g3 | 0.1144   | 0.4954   | 0.2829     | 0.4138   | 0.414469   | 0.6444   | 0.4145   |
| TRINITY_DN21761_c0_g1 | 0.3586   | 0.5002   | 0.1693     | 0.1905   | 0.190687   | 0.08403  | 0.1907   |
| TRINITY_DN21801_c0_g2 | 0.03879  | 0.1277   | 0.001077   | 0.04643  | 0.0460357  | 0.02717  | 0.04603  |
| TRINITY_DN21805_c0_g1 | 0.2848   | 0.3431   | 0.7055     | 0.7284   | 0.728944   | 0.635    | 0.7289   |
| TRINITY_DN21863_c3_g3 | 0.05559  | 0.2478   | 0.02474    | 0.04046  | 0.0400519  | 0.05871  | 0.04005  |
| TRINITY_DN21929_c1_g2 | 0.7071   | 0.8534   | 0.1102     | 0.0764   | 0.0760986  | 0.2258   | 0.0761   |

Continuación...

|                       |          |          |            |          |            |          |          |
|-----------------------|----------|----------|------------|----------|------------|----------|----------|
| TRINITY_DN21932_c3_g1 | 0.4959   | 0.4213   | 0.1193     | 0.2863   | 0.286767   | 0.1906   | 0.2868   |
| TRINITY_DN21995_c0_g1 | 0.5938   | 0.5574   | 0.7958     | 0.7065   | 0.707056   | 0.6624   | 0.707    |
| TRINITY_DN22057_c0_g2 | 0.9956   | 0.9629   | 0.003568   | 0.04571  | 0.0453105  | 0.0136   | 0.04531  |
| TRINITY_DN22089_c1_g1 | 0.5046   | 0.8499   | 0.8786     | 0.9155   | 0.915736   | 0.9049   | 0.9157   |
| TRINITY_DN22112_c1_g1 | 0.7762   | 0.8188   | 0.5427     | 0.5628   | 0.563482   | 0.7546   | 0.5635   |
| TRINITY_DN22140_c0_g1 | 0.8686   | 0.7843   | 0.3483     | 0.6046   | 0.605297   | 0.7374   | 0.6053   |
| TRINITY_DN22154_c3_g3 | 0.2983   | 0.3787   | 0.1567     | 0.3579   | 0.358526   | 0.2819   | 0.3585   |
| TRINITY_DN22195_c2_g1 | 0.6177   | 0.3627   | 0.447      | 0.581    | 0.581636   | 0.6508   | 0.5816   |
| TRINITY_DN22212_c0_g1 | 0.3315   | 0.5726   | 0.4706     | 0.5619   | 0.562555   | 0.2053   | 0.5625   |
| TRINITY_DN22272_c1_g2 | 0.1623   | 0.4692   | 0.07057    | 0.3884   | 0.388971   | 0.08494  | 0.389    |
| TRINITY_DN22317_c0_g2 | 0.2982   | 0.5089   | 0.8516     | 0.9896   | 0.989617   | 0.286    | 0.9896   |
| TRINITY_DN22326_c0_g1 | 0.01812  | 0.04197  | 0.6616     | 0.311    | 0.311501   | 0.5567   | 0.3115   |
| TRINITY_DN22338_c3_g6 | 0.1556   | 0.3059   | 0.0577     | 0.115    | 0.114842   | 0.0355   | 0.1148   |
| TRINITY_DN22342_c3_g1 | 0.1491   | 0.5256   | 0.01235    | 0.02167  | 0.0212674  | 0.005882 | 0.02127  |
| TRINITY_DN22375_c0_g2 | 0.9255   | 0.4444   | 0.905      | 0.968    | 0.968115   | 0.7065   | 0.9681   |
| TRINITY_DN22397_c0_g1 | 0.6592   | 0.5259   | 0.3753     | 0.4336   | 0.434297   | 0.2505   | 0.4343   |
| TRINITY_DN22406_c1_g3 | 0.03264  | 0.08442  | 0.01734    | 0.5398   | 0.540515   | 0.06501  | 0.5405   |
| TRINITY_DN22408_c3_g1 | 0.7736   | 0.5216   | 0.3707     | 0.7536   | 0.754041   | 0.205    | 0.754    |
| TRINITY_DN22408_c7_g1 | 0.4879   | 0.7886   | 0.1352     | 0.4136   | 0.414222   | 0.1112   | 0.4142   |
| TRINITY_DN22417_c0_g1 | 0.1193   | 0.2539   | 0.01024    | 0.3002   | 0.30063    | 0.06467  | 0.3006   |
| TRINITY_DN22418_c1_g3 | 0.2498   | 0.6121   | 0.9915     | 0.7917   | 0.792071   | 0.6619   | 0.7921   |
| TRINITY_DN22437_c0_g1 | 0.1904   | 0.483    | 0.1019     | 0.0952   | 0.0949648  | 0.09115  | 0.09496  |
| TRINITY_DN22441_c0_g1 | 0.7031   | 0.8534   | 0.7443     | 0.8623   | 0.862599   | 0.744    | 0.8626   |
| TRINITY_DN22461_c1_g1 | 0.4755   | 0.547    | 0.5189     | 0.5866   | 0.587277   | 0.4312   | 0.5873   |
| TRINITY_DN22470_c0_g2 | 0.1467   | 0.465    | 0.01809    | 0.147    | 0.146936   | 0.04991  | 0.1469   |
| TRINITY_DN22503_c0_g2 | 0.05337  | 0.1306   | 0.04061    | 0.4776   | 0.478322   | 0.1314   | 0.4783   |
| TRINITY_DN22504_c0_g1 | 0.5933   | 0.2932   | 0.08061    | 0.3701   | 0.370715   | 0.1133   | 0.3707   |
| TRINITY_DN22644_c0_g1 | 0.1441   | 0.1939   | 0.1893     | 0.3174   | 0.31793    | 0.3427   | 0.3179   |
| TRINITY_DN22662_c0_g2 | 0.325    | 0.2154   | 0.2031     | 0.4639   | 0.464567   | 0.2543   | 0.4646   |
| TRINITY_DN22676_c1_g1 | 0.3033   | 0.4257   | 0.05783    | 0.2241   | 0.224414   | 0.09987  | 0.2244   |
| TRINITY_DN22676_c2_g5 | 0.2324   | 0.4376   | 0.08893    | 0.03223  | 0.0318149  | 0.08376  | 0.03181  |
| TRINITY_DN22678_c3_g1 | 0.02561  | 0.008625 | 0.003628   | 0.002052 | 0.00191166 | 0.005841 | 0.001912 |
| TRINITY_DN22680_c0_g7 | 0.6396   | 0.7451   | 0.08883    | 0.3756   | 0.376251   | 0.151    | 0.3762   |
| TRINITY_DN22683_c0_g1 | 0.8554   | 0.9236   | 0.0009311  | 0.009442 | 0.00913209 | 0.005923 | 0.009132 |
| TRINITY_DN22715_c1_g1 | 0.3116   | 0.2864   | 0.0251     | 0.1694   | 0.169457   | 0.03565  | 0.1695   |
| TRINITY_DN22757_c3_g2 | 0.8796   | 0.7131   | 0.1531     | 0.2699   | 0.270303   | 0.1586   | 0.2703   |
| TRINITY_DN22777_c0_g1 | 0.3732   | 0.6806   | 0.09261    | 0.3555   | 0.356083   | 0.1741   | 0.3561   |
| TRINITY_DN22777_c0_g3 | 0.3613   | 0.4522   | 0.1299     | 0.4371   | 0.437729   | 0.3423   | 0.4377   |
| TRINITY_DN22833_c0_g1 | 0.8946   | 0.972    | 0.00002992 | 0.006294 | 0.00603507 | 0.005881 | 0.00603  |
| TRINITY_DN22869_c2_g1 | 0.3196   | 0.2302   | 0.03062    | 0.08591  | 0.0856462  | 0.1188   | 0.08564  |
| TRINITY_DN22914_c0_g1 | 0.299    | 0.121    | 0.947      | 0.7622   | 0.762683   | 0.5021   | 0.7627   |
| TRINITY_DN22972_c3_g1 | 0.9988   | 0.9392   | 0.9017     | 0.8365   | 0.836887   | 0.8927   | 0.8369   |
| TRINITY_DN23005_c2_g1 | 0.4675   | 0.4274   | 0.06263    | 0.3259   | 0.326461   | 0.05892  | 0.3265   |
| TRINITY_DN23019_c0_g2 | 0.9135   | 0.7003   | 0.6472     | 0.8126   | 0.812966   | 0.8987   | 0.8129   |
| TRINITY_DN23027_c0_g2 | 0.1727   | 0.3873   | 0.005909   | 0.2202   | 0.220426   | 0.06501  | 0.2204   |
| TRINITY_DN23082_c1_g3 | 0.5626   | 0.7228   | 0.01933    | 0.1286   | 0.128474   | 0.02142  | 0.1285   |
| TRINITY_DN23102_c0_g1 | 0.5962   | 0.4726   | 0.06237    | 0.2516   | 0.251971   | 0.1282   | 0.252    |
| TRINITY_DN23103_c0_g2 | 0.4274   | 0.3364   | 0.8855     | 0.8293   | 0.829622   | 0.2296   | 0.8296   |
| TRINITY_DN23129_c1_g1 | 0.0506   | 0.146    | 0.02606    | 0.01462  | 0.0142562  | 0.04159  | 0.01426  |
| TRINITY_DN23250_c0_g1 | 0.4746   | 0.6413   | 0.02976    | 0.1966   | 0.196822   | 0.05892  | 0.1968   |
| TRINITY_DN23277_c2_g2 | 0.6165   | 0.7999   | 0.2787     | 0.4791   | 0.479825   | 0.2343   | 0.4798   |
| TRINITY_DN23283_c1_g2 | 0.8225   | 0.5953   | 0.2789     | 0.3308   | 0.331304   | 0.4065   | 0.3313   |
| TRINITY_DN23294_c0_g1 | 0.5301   | 0.06466  | 0.3443     | 0.6291   | 0.62975    | 0.2296   | 0.6297   |
| TRINITY_DN23334_c2_g1 | 0.2685   | 0.3028   | 0.2691     | 0.4383   | 0.439008   | 0.2926   | 0.439    |
| TRINITY_DN23355_c3_g4 | 0.6714   | 0.1795   | 0.4533     | 0.5938   | 0.594445   | 0.5025   | 0.5944   |
| TRINITY_DN23362_c2_g1 | 0.9081   | 0.9259   | 0.8065     | 0.7074   | 0.70791    | 0.5988   | 0.7079   |
| TRINITY_DN23378_c0_g1 | 0.3656   | 0.5548   | 0.5834     | 0.4397   | 0.440352   | 0.8924   | 0.4403   |
| TRINITY_DN23381_c0_g1 | 0.06846  | 0.05048  | 0.001802   | 0.1278   | 0.127675   | 0.01354  | 0.1277   |
| TRINITY_DN23398_c1_g1 | 0.1547   | 0.2647   | 0.2339     | 0.4239   | 0.42455    | 0.8527   | 0.4245   |
| TRINITY_DN23399_c0_g1 | 0.005418 | 0.003873 | 0.09473    | 0.003057 | 0.00287972 | 0.5094   | 0.00288  |
| TRINITY_DN23444_c0_g1 | 0.9995   | 0.9651   | 0.3424     | 0.5352   | 0.535865   | 0.2021   | 0.5359   |
| TRINITY_DN23507_c0_g1 | 0.4112   | 0.2246   | 0.6449     | 0.8226   | 0.822973   | 0.5567   | 0.823    |
| TRINITY_DN23512_c2_g1 | 0.06225  | 0.4002   | 0.005743   | 0.1208   | 0.120653   | 0.02142  | 0.1207   |
| TRINITY_DN23518_c0_g1 | 0.07784  | 0.3103   | 0.09974    | 0.1091   | 0.108962   | 0.3647   | 0.109    |
| TRINITY_DN23533_c0_g2 | 0.5106   | 0.5448   | 0.0002267  | 0.1031   | 0.102921   | 0.3647   | 0.1029   |
| TRINITY_DN23558_c5_g2 | 0.3696   | 0.2396   | 0.4032     | 0.5577   | 0.558357   | 0.6445   | 0.5583   |
| TRINITY_DN23565_c3_g2 | 0.493    | 0.473    | 0.031      | 0.3897   | 0.390372   | 0.0649   | 0.3904   |
| TRINITY_DN23577_c1_g1 | 0.709    | 0.5374   | 0.8163     | 0.896    | 0.896205   | 0.9192   | 0.8962   |
| TRINITY_DN23617_c1_g1 | 0.8048   | 0.7029   | 0.9196     | 0.9772   | 0.977224   | 0.945    | 0.9772   |
| TRINITY_DN23622_c2_g1 | 0.8239   | 0.6915   | 0.4754     | 0.5266   | 0.527296   | 0.2508   | 0.5273   |
| TRINITY_DN23647_c0_g1 | 0.6656   | 0.5273   | 0.2136     | 0.4298   | 0.430424   | 0.2343   | 0.4304   |
| TRINITY_DN23654_c0_g1 | 0.4906   | 0.3125   | 0.1879     | 0.1319   | 0.131806   | 0.286    | 0.1318   |

Continuación...

|                                |          |          |            |          |            |          |          |
|--------------------------------|----------|----------|------------|----------|------------|----------|----------|
| TRINITY_DN23657_c1_g1          | 0.6651   | 0.08489  | 0.1728     | 0.1215   | 0.121374   | 0.189    | 0.1214   |
| TRINITY_DN23713_c3_g1          | 0.08489  | 0.213    | 0.0687     | 0.2401   | 0.24044    | 0.6196   | 0.2404   |
| TRINITY_DN23718_c5_g3          | 0.2042   | 0.6804   | 0.7295     | 0.7264   | 0.726902   | 0.8593   | 0.7269   |
| TRINITY_DN23803_c0_g6          | 0.07167  | 0.1266   | 0.003065   | 0.01605  | 0.0156739  | 0.005882 | 0.01567  |
| TRINITY_DN23828_c1_g2          | 0.9116   | 0.9564   | 0.2855     | 0.3325   | 0.333047   | 0.6095   | 0.333    |
| TRINITY_DN23886_c1_g4          | 0.1277   | 0.5009   | 0.7845     | 0.6812   | 0.681755   | 0.5909   | 0.6817   |
| TRINITY_DN23917_c0_g1          | 0.8746   | 0.8922   | 0.7836     | 0.8334   | 0.833771   | 0.5988   | 0.8338   |
| TRINITY_DN23940_c1_g1          | 0.4712   | 0.8529   | 0.5138     | 0.3674   | 0.368003   | 0.6385   | 0.368    |
| TRINITY_DN23955_c2_g4          | 0.2204   | 0.442    | 0.9066     | 0.7506   | 0.751065   | 0.6093   | 0.751    |
| TRINITY_DN23987_c0_g1          | 0.9111   | 0.9307   | 0.5561     | 0.5139   | 0.514562   | 0.5993   | 0.5146   |
| TRINITY_DN23990_c0_g6          | 0.3568   | 0.3448   | 0.003165   | 0.1407   | 0.140634   | 0.02142  | 0.1406   |
| TRINITY_DN24021_c0_g1          | 0.2587   | 0.3088   | 0.002373   | 0.1427   | 0.142666   | 0.02149  | 0.1427   |
| TRINITY_DN24043_c0_g1          | 0.03438  | 0.1765   | 0.00008882 | 0.03553  | 0.0351175  | 0.005881 | 0.03512  |
| TRINITY_DN24062_c2_g2          | 0.9538   | 0.9152   | 0.6635     | 0.7128   | 0.713299   | 0.7055   | 0.7133   |
| TRINITY_DN24065_c1_g6          | 0.01313  | 0.06336  | 3.514E-06  | 0.009034 | 0.00873    | 0.005923 | 0.00873  |
| TRINITY_DN24151_c0_g1          | 0.9515   | 0.7859   | 0.2571     | 0.03994  | 0.0395271  | 0.3986   | 0.03953  |
| TRINITY_DN24230_c0_g3          | 0.217    | 0.4977   | 0.001624   | 0.1037   | 0.103533   | 0.0136   | 0.1035   |
| TRINITY_DN24237_c2_g2          | 0.1588   | 0.1847   | 0.02274    | 0.2272   | 0.22744    | 0.06569  | 0.2274   |
| TRINITY_DN24258_c0_g1          | 0.5287   | 0.6412   | 0.1639     | 0.2902   | 0.290649   | 0.3344   | 0.2906   |
| TRINITY_DN24437_c1_g1          | 0.203    | 0.1231   | 0.0001248  | 0.1589   | 0.158911   | 0.005923 | 0.1589   |
| TRINITY_DN24441_c1_g1          | 0.9992   | 0.9302   | 0.0423     | 0.06907  | 0.0687326  | 0.1002   | 0.06873  |
| TRINITY_DN24501_c1_g3          | 0.736    | 0.176    | 0.1996     | 0.2319   | 0.232154   | 0.1      | 0.2321   |
| TRINITY_DN24539_c3_g3          | 0.975    | 0.8598   | 0.611      | 0.557    | 0.557718   | 0.8033   | 0.5577   |
| TRINITY_DN24583_c4_g1          | 0.01753  | 0.02775  | 0.0003438  | 0.03146  | 0.0310479  | 0.0136   | 0.03105  |
| TRINITY_DN24604_c0_g2          | 0.5989   | 0.8227   | 0.4808     | 0.3731   | 0.373738   | 0.6508   | 0.3737   |
| TRINITY_DN24608_c0_g2          | 0.01654  | 0.02629  | 0.00002931 | 0.006273 | 0.00601393 | 0.005923 | 0.006014 |
| TRINITY_DN24627_c0_g1          | 0.408    | 0.6437   | 0.116      | 0.524    | 0.524667   | 0.1109   | 0.5247   |
| TRINITY_DN24674_c2_g1          | 0.09359  | 0.05728  | 0.006437   | 0.08906  | 0.0888083  | 0.01352  | 0.08881  |
| TRINITY_DN24682_c0_g1          | 0.9831   | 0.8851   | 0.0006226  | 0.00994  | 0.00962354 | 0.005841 | 0.009623 |
| TRINITY_DN24695_c1_g1          | 0.3979   | 0.7241   | 0.4713     | 0.7259   | 0.726435   | 0.6093   | 0.7264   |
| TRINITY_DN24715_c0_g4          | 0.4996   | 0.2765   | 0.784      | 0.922    | 0.922138   | 0.6619   | 0.9221   |
| TRINITY_DN24745_c0_g1          | 0.4837   | 0.4342   | 0.2419     | 0.2854   | 0.285795   | 0.5094   | 0.2858   |
| TRINITY_DN24752_c0_g3          | 0.921    | 0.7213   | 0.1607     | 0.6068   | 0.607497   | 0.1437   | 0.6075   |
| TRINITY_DN24825_c0_g2          | 0.8404   | 0.8985   | 0.1543     | 0.05512  | 0.0547409  | 0.5274   | 0.05474  |
| TRINITY_DN24846_c0_g1          | 0.2618   | 0.05606  | 0.1982     | 0.04829  | 0.0478994  | 0.2825   | 0.0479   |
| TRINITY_DN24862_c0_g1          | 0.1845   | 0.2655   | 0.8348     | 0.8016   | 0.802043   | 0.8866   | 0.802    |
| TRINITY_DN24887_c0_g1          | 0.0117   | 0.01828  | 0.6946     | 0.8062   | 0.806558   | 0.8096   | 0.8065   |
| TRINITY_DN24890_c1_g2          | 0.9933   | 0.9928   | 0.5381     | 0.4071   | 0.407773   | 0.3216   | 0.4078   |
| TRINITY_DN24905_c0_g1          | 0.3708   | 0.182    | 0.02458    | 0.1715   | 0.171548   | 0.05871  | 0.1715   |
| TRINITY_DN24930_c0_g1          | 0.9487   | 0.5807   | 0.1473     | 0.1464   | 0.146425   | 0.07297  | 0.1464   |
| TRINITY_DN24941_c2_g2          | 0.9983   | 0.9029   | 0.1957     | 0.482    | 0.48265    | 0.2296   | 0.4826   |
| TRINITY_DN25074_c1_g1          | 0.1537   | 0.1088   | 0.0007027  | 0.05198  | 0.0515986  | 0.01354  | 0.0516   |
| TRINITY_DN25082_c0_g2          | 0.04452  | 0.04527  | 0.01566    | 0.07384  | 0.0735257  | 0.4445   | 0.07352  |
| TRINITY_DN25092_c1_g4          | 0.6212   | 0.1925   | 0.2186     | 0.4229   | 0.423562   | 0.2342   | 0.4236   |
| TRINITY_DN25100_c0_g1          | 0.1463   | 0.526    | 0.02306    | 0.07407  | 0.073759   | 0.4822   | 0.07376  |
| TRINITY_DN25109_c0_g5          | 0.6583   | 0.1256   | 0.336      | 0.514    | 0.514663   | 0.4197   | 0.5147   |
| TRINITY_DN25140_c0_g6          | 0.8208   | 0.9009   | 0.7779     | 0.9589   | 0.958989   | 0.6615   | 0.959    |
| TRINITY_DN25142_c0_g1          | 0.8022   | 0.2892   | 0.9834     | 0.8513   | 0.851657   | 0.5895   | 0.8516   |
| TRINITY_DN25176_c0_g1          | 0.391    | 0.1103   | 0.02582    | 0.2287   | 0.228943   | 0.1002   | 0.2289   |
| TRINITY_DN25240_c1_g1          | 0.9927   | 0.922    | 0.6136     | 0.762    | 0.762432   | 0.9928   | 0.7624   |
| TRINITY_DN25243_c1_g1          | 0.2073   | 0.09869  | 0.2575     | 0.5896   | 0.590281   | 0.7552   | 0.5903   |
| TRINITY_DN25267_c0_g4          | 0.2605   | 0.3747   | 0.7245     | 0.5717   | 0.572409   | 0.2658   | 0.5724   |
| TRINITY_DN25280_c1_g1          | 0.4111   | 0.5269   | 0.2264     | 0.4372   | 0.437828   | 0.3069   | 0.4378   |
| TRINITY_DN25325_c0_g2          | 0.1948   | 0.5133   | 0.01263    | 0.2657   | 0.266116   | 0.02738  | 0.2661   |
| TRINITY_DN25353_c0_g1          | 0.8035   | 0.5582   | 0.5646     | 0.7439   | 0.744415   | 0.5912   | 0.7444   |
| TRINITY_DN25356_c1_g2          | 0.5808   | 0.5723   | 0.006438   | 0.1408   | 0.14075    | 0.02139  | 0.1407   |
| TRINITY_DN25429_c1_g2          | 0.6651   | 0.8431   | 0.2209     | 0.4151   | 0.415743   | 0.3391   | 0.4157   |
| TRINITY_DN25475_c1_g1          | 0.6238   | 0.7785   | 0.4603     | 0.3487   | 0.34928    | 0.7524   | 0.3493   |
| TRINITY_DN25516_c0_g3          | 0.3171   | 0.4151   | 0.634      | 0.9797   | 0.979743   | 0.7123   | 0.9797   |
| TRINITY_DN25540_c1_g1          | 0.1007   | 0.5203   | 0.09202    | 0.3322   | 0.332748   | 0.2301   | 0.3327   |
| TRINITY_DN25540_c1_g5          | 0.1501   | 0.0813   | 0.3739     | 0.4904   | 0.491063   | 0.962    | 0.4911   |
| TRINITY_DN25543_c1_g1          | 0.008729 | 0.001846 | 0.0237     | 0.1492   | 0.149191   | 0.03559  | 0.1492   |
| TRINITY_DN25567_c0_g1          | 0.06155  | 0.3928   | 0.3749     | 0.4035   | 0.404094   | 0.2688   | 0.4041   |
| TRINITY_DN25586_c0_g3          | 0.5041   | 0.318    | 0.001775   | 0.003699 | 0.00350096 | 0.005882 | 0.003501 |
| TRINITY_DN25628_c0_g1          | 0.3468   | 0.1037   | 0.8409     | 0.6353   | 0.635956   | 0.9929   | 0.6359   |
| TRINITY_DN25642_c0_g3          | 0.174    | 0.3212   | 0.9644     | 0.7103   | 0.710879   | 0.9617   | 0.7109   |
| TRINITY_DN25662_c2_g1          | 0.9893   | 0.5769   | 0.001487   | 0.004063 | 0.00385472 | 0.005828 | 0.003855 |
| TRINITY_DN25665_c0_g2          | 0.9704   | 0.9837   | 0.5899     | 0.6361   | 0.636695   | 0.5278   | 0.6367   |
| TRINITY_DN25683_c0_g1          | 0.5831   | 0.9151   | 0.4171     | 0.529    | 0.529647   | 0.5285   | 0.5296   |
| TRINITY_DN25725_c0_g3          | 0.1624   | 0.1708   | 0.2314     | 0.4706   | 0.471245   | 0.2049   | 0.4712   |
| TRINITY_DN25754_c0_g1_promedio | 0.2326   | 0.4925   | 0.1055     | 0.583    | 0.584097   | 0.3773   | 0.5837   |

Continuación...

|                       |          |          |            |          |            |          |          |
|-----------------------|----------|----------|------------|----------|------------|----------|----------|
| TRINITY_DN25791_c0_g1 | 0.5097   | 0.7163   | 0.1901     | 0.3867   | 0.387346   | 0.1808   | 0.3873   |
| TRINITY_DN25804_c0_g2 | 0.352    | 0.8174   | 0.07117    | 0.3325   | 0.333073   | 0.1902   | 0.3331   |
| TRINITY_DN25884_c1_g2 | 0.2986   | 0.2474   | 0.0002182  | 0.03347  | 0.0330557  | 0.005923 | 0.03305  |
| TRINITY_DN25966_c2_g1 | 0.1149   | 0.08084  | 0.008297   | 0.2102   | 0.210454   | 0.0273   | 0.2104   |
| TRINITY_DN25968_c2_g1 | 0.6143   | 0.3289   | 0.2774     | 0.2098   | 0.210028   | 0.1283   | 0.21     |
| TRINITY_DN26017_c0_g1 | 0.3685   | 0.7174   | 0.898      | 0.9493   | 0.949407   | 0.7618   | 0.9494   |
| TRINITY_DN26044_c1_g1 | 0.5375   | 0.28     | 0.4976     | 0.7682   | 0.768624   | 0.893    | 0.7686   |
| TRINITY_DN26077_c0_g1 | 0.1227   | 0.2107   | 0.162      | 0.4104   | 0.411078   | 0.5924   | 0.4111   |
| TRINITY_DN26091_c2_g1 | 0.06891  | 0.3165   | 0.005151   | 0.04765  | 0.0472511  | 0.02149  | 0.04725  |
| TRINITY_DN26117_c0_g1 | 0.2025   | 0.6016   | 0.01413    | 0.08032  | 0.0800303  | 0.04142  | 0.08003  |
| TRINITY_DN26126_c0_g1 | 0.4735   | 0.7017   | 0.7878     | 0.9779   | 0.977934   | 0.6676   | 0.9779   |
| TRINITY_DN26172_c4_g3 | 0.08503  | 0.4258   | 0.00664    | 0.2169   | 0.217103   | 0.03565  | 0.2171   |
| TRINITY_DN26181_c3_g2 | 0.1813   | 0.6301   | 0.0163     | 0.03105  | 0.0306314  | 0.01883  | 0.03063  |
| TRINITY_DN26190_c0_g1 | 0.9851   | 0.933    | 0.6779     | 0.8613   | 0.861605   | 0.6619   | 0.8616   |
| TRINITY_DN26201_c2_g7 | 0.574    | 0.301    | 0.8915     | 0.9159   | 0.916085   | 0.712    | 0.9161   |
| TRINITY_DN26220_c0_g1 | 0.09172  | 0.003019 | 0.01102    | 0.09182  | 0.091572   | 0.02131  | 0.09157  |
| TRINITY_DN26268_c0_g5 | 0.5218   | 0.1796   | 0.2748     | 0.4046   | 0.405266   | 0.2049   | 0.4053   |
| TRINITY_DN26292_c0_g1 | 0.5439   | 0.8331   | 0.9053     | 0.9884   | 0.988419   | 0.712    | 0.9884   |
| TRINITY_DN26318_c1_g3 | 0.499    | 0.1817   | 0.309      | 0.392    | 0.3926     | 0.9866   | 0.3926   |
| TRINITY_DN26361_c1_g1 | 0.7027   | 0.6454   | 0.5359     | 0.4793   | 0.479958   | 0.712    | 0.4799   |
| TRINITY_DN26370_c2_g2 | 0.5982   | 0.69     | 0.9409     | 0.7975   | 0.79791    | 0.96     | 0.7979   |
| TRINITY_DN26380_c0_g1 | 0.8822   | 0.7082   | 0.325      | 0.7688   | 0.769286   | 0.293    | 0.7693   |
| TRINITY_DN26424_c1_g1 | 0.9857   | 0.9536   | 0.028      | 0.06589  | 0.0655482  | 0.4824   | 0.06555  |
| TRINITY_DN26424_c1_g2 | 0.9179   | 0.7943   | 0.5385     | 0.3533   | 0.353894   | 0.5492   | 0.3539   |
| TRINITY_DN26463_c2_g3 | 0.4546   | 0.2053   | 0.7367     | 0.3533   | 0.534848   | 0.4307   | 0.5348   |
| TRINITY_DN26467_c0_g1 | 0.111    | 0.1765   | 0.02445    | 0.1076   | 0.107447   | 0.02738  | 0.1074   |
| TRINITY_DN26541_c0_g2 | 0.2117   | 0.2317   | 0.000986   | 0.0366   | 0.0361849  | 0.005841 | 0.03618  |
| TRINITY_DN40381_c0_g1 | 0.2313   | 0.3486   | 0.8095     | 0.7746   | 0.775031   | 0.8096   | 0.775    |
| TRINITY_DN4836_c0_g1  | 0.4657   | 0.8047   | 0.2582     | 0.4177   | 0.418397   | 0.1906   | 0.4184   |
| TRINITY_DN9642_c0_g1  | 0.5992   | 0.57842  | 0.09592    | 0.2369   | 0.237214   | 0.2505   | 0.2372   |
| TRINITY_DN12238_c0_g2 | 0.842    | 0.4767   | 0.1861     | 0.02729  | 0.0268814  | 0.09087  | 0.02688  |
| TRINITY_DN13672_c0_g1 | 0.3889   | 0.5643   | 0.6471     | 0.5228   | 0.523513   | 0.7546   | 0.5235   |
| TRINITY_DN15665_c0_g1 | 0.1346   | 0.1324   | 0.02662    | 0.03164  | 0.0312213  | 0.0273   | 0.03122  |
| TRINITY_DN16045_c0_g1 | 0.6001   | 0.6679   | 0.113      | 0.04009  | 0.039684   | 0.1739   | 0.03968  |
| TRINITY_DN18572_c0_g1 | 0.2155   | 0.584    | 0.1382     | 0.288    | 0.28843    | 0.23     | 0.2884   |
| TRINITY_DN18802_c0_g1 | 0.2014   | 0.1654   | 0.845      | 0.8663   | 0.866623   | 0.8775   | 0.8666   |
| TRINITY_DN19015_c5_g1 | 0.4029   | 0.424    | 0.1048     | 0.2741   | 0.274541   | 0.1993   | 0.2745   |
| TRINITY_DN19139_c0_g2 | 0.6903   | 0.72     | 0.3718     | 0.7277   | 0.728218   | 0.6154   | 0.7282   |
| TRINITY_DN20247_c5_g3 | 0.991    | 0.9961   | 0.6531     | 0.542    | 0.542715   | 0.7374   | 0.5427   |
| TRINITY_DN20971_c0_g4 | 0.6112   | 0.7117   | 0.4139     | 0.3682   | 0.368843   | 0.3351   | 0.3688   |
| TRINITY_DN21407_c0_g1 | 0.2256   | 0.1868   | 0.9437     | 0.8037   | 0.804067   | 0.8884   | 0.804    |
| TRINITY_DN21634_c0_g1 | 0.2169   | 0.1264   | 0.0007244  | 0.06227  | 0.061916   | 0.01347  | 0.06191  |
| TRINITY_DN22317_c0_g2 | 0.2982   | 0.5089   | 0.8516     | 0.9896   | 0.989617   | 0.286    | 0.9896   |
| TRINITY_DN22375_c0_g2 | 0.9255   | 0.4444   | 0.905      | 0.968    | 0.968115   | 0.7065   | 0.9681   |
| TRINITY_DN23565_c3_g2 | 0.493    | 0.473    | 0.031      | 0.3897   | 0.390372   | 0.0649   | 0.3904   |
| TRINITY_DN23622_c2_g1 | 0.8239   | 0.6915   | 0.4754     | 0.5266   | 0.527296   | 0.2508   | 0.5273   |
| TRINITY_DN23886_c1_g4 | 0.1277   | 0.5009   | 0.7845     | 0.6812   | 0.681755   | 0.5909   | 0.6817   |
| TRINITY_DN24062_c2_g2 | 0.9538   | 0.9152   | 0.6635     | 0.7128   | 0.713299   | 0.7055   | 0.7133   |
| TRINITY_DN24237_c2_g2 | 0.1588   | 0.1847   | 0.02274    | 0.2272   | 0.22744    | 0.06569  | 0.2274   |
| TRINITY_DN25082_c0_g2 | 0.04452  | 0.04527  | 0.01566    | 0.07384  | 0.0735257  | 0.4445   | 0.07352  |
| TRINITY_DN25280_c1_g1 | 0.4111   | 0.5269   | 0.2264     | 0.4372   | 0.437828   | 0.3069   | 0.4378   |
| TRINITY_DN25628_c0_g1 | 0.3468   | 0.1037   | 0.8409     | 0.6353   | 0.635956   | 0.9929   | 0.6359   |
| TRINITY_DN25665_c0_g2 | 0.9704   | 0.9837   | 0.5899     | 0.6361   | 0.636695   | 0.5278   | 0.6367   |
| TRINITY_DN25968_c2_g1 | 0.6143   | 0.3289   | 0.2774     | 0.2098   | 0.210028   | 0.1283   | 0.21     |
| TRINITY_DN25754_c0_g1 | 0.04747  | 0.1929   | 0.03301    | 0.0837   | 0.0834182  | 0.06592  | 0.08342  |
| TRINITY_DN25754_c0_g1 | 0.0118   | 0.07476  | 0.00004282 | 0.006959 | 0.00668722 | 0.005841 | 0.006687 |
| TRINITY_DN25754_c0_g1 | 0.007698 | 0.001441 | 0.0002854  | 0.00449  | 0.0042705  | 0.005881 | 0.00427  |

**Anexo 3:** Secuencia de primers para los genes candidatos de referencia

| Gene name     | Forward primer (5'-3')  | Gene Reverse primer (5'-3') | Tm (°C) | Amplicon expected size (pb) |
|---------------|-------------------------|-----------------------------|---------|-----------------------------|
| ATPeVIE/ATP6E | AGCGGTTAAGAGAGACTAAAGGT | GTTTCAACCAACTGCAACTTCTC     | 64.1    | 243                         |
|               | GATAGTGGGAAAGCGGTTAAGAG | TGCTGGATTGCTTAGAGACATC      | 62.2    | 152                         |
| RP-S18e/RPS18 | GAGAGACTCAACACGAAGGGTAT | CTCAGCTTCATATCGAGTGCATT     | 62.2    | 458                         |
|               | GAACAAGAGAGCTGGTGAATTGA | CTCAGCTTCATATCGAGTGCATT     | 64.1    | 168                         |
| RP-L11e/RPL11 | TGGTATCCAGGAGCATATCGATT | CAGTCAAACGCCTCAAATACAGA     | 64.1    | 336                         |
|               | AGTCTTAACCCTAGCCGCATATA | ACGAACAGTGTACCTTGCTTTAG     | 59.9    | 270                         |
| RP-S27e/RPS27 | TAAGTTGTAAGGCTCTGCAGTTG | GGAACCAGTTTTGCCTATCACAT     | 62.2    | 141                         |
|               | GAAACTGCCAAACTGTGTATGTC | CAACTGCAGAGCCTTACAACCTTA    | 64.1    | 204                         |
| ENOPH1        | TTTGGGAGATGGAGCAGATAAGA | ATGACTCCATTCCTAAGCCTCAT     | 59.9    | 371                         |
| ERF3/GSPT     | CTACAGTGCAGTGGTCAAAGAA  | GTACAGTACCCGATTCCACTTTG     | 62.2    | 312                         |
| OEP24         | ACACAGTTAAGGTTGCAGAGAAG | GGAAGCAAACCTACACCTCAAAGT    | 62.2    | 428                         |
|               | GTCTAAGAAGCTGTGGGACTTTG | CATGTGGTCTCTGCTACTAAGTTT    | 62.2    | 201                         |
| LOC109348064  | TAGCTTCCAATTCCTTTCCCAAG | ACACGAGTTTAGTCTTTCCATGTC    | 62.2    | 164                         |
|               | GTGGTGCCTAGAAAGTTGTATTG | AAAGACATGATTTAGGCCTCGAC     | 59.9    | 209                         |
| RAD52-2       | ACTCGTCCTTTAGCTGAGATTCT | TTAGCATGATACCAGGGGATTGA     | 62.2    | 116                         |
|               | GGGTTTGTGAGAAGAAGAAGGAG | AGAATCTCAGCTAAAGGACGAGT     | 62.2    | 176                         |
| CESA1         | TCATCTTTTCGCTGTGTTCCAAG | TACCCAACAGACCCTTCAAGAAT     | 62.2    | 302                         |
|               | ATCCGATGAAGATGGGGACTTTA | TCAAGAATGGGTATAGATGGGCA     | 62.2    | 209                         |

**Anexo 4:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPL11 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq  | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------|----|---------|---------|---------|--------|
| TRAT                | 2  | 1288441 | 644220  | 0.519   | 0.62   |
| RESIDUALS           | 6  | 7453371 | 1242229 |         |        |
| CV %                |    |         | 2.3     |         |        |

**Anexo 5:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPS18 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq  | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------|----|---------|---------|---------|--------|
| TRAT                | 2  | 243851  | 121925  | 0.236   | 0.797  |
| RESIDUALS           | 6  | 3096483 | 516081  |         |        |
| CV%                 |    |         | 1.9     |         |        |

**Anexo 6:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPS27L ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------|----|--------|---------|---------|--------|
| TRAT                | 2  | 283589 | 141794  | 1.115   | 0.388  |
| RESIDUALS           | 6  | 763183 | 127197  |         |        |
| CV%                 |    |        | 0.6     |         |        |

**Anexo 7:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia V-ATPasa a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq  | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------|----|---------|---------|---------|--------|
| TRAT                | 2  | 99822   | 49911   | 0.206   | 0.819  |
| RESIDUALS           | 6  | 1453412 | 242235  |         |        |
| CV %                |    |         | 1.8     |         |        |

**Anexo 8:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia V-ATPasa b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq  | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------|----|---------|---------|---------|--------|
| TRAT                | 2  | 2606829 | 1303414 | 3.085   | 0.12   |
| RESIDUALS           | 6  | 2535107 | 422518  |         |        |
| CV%                 |    |         | 1.9     |         |        |

**Anexo 9:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia ERF3 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq  | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------|----|---------|---------|---------|--------|
| TRAT                | 2  | 274481  | 137240  | 0.723   | 0.523  |
| RESIDUALS           | 6  | 1139655 | 189943  |         |        |
| CV%                 |    |         | 0.34    |         |        |

**Anexo 10:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia OEP24 a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------|----|--------|---------|---------|--------|
| TRAT                | 2  | 47.34  | 23.67   | 1.77    | 0.249  |
| RESIDUAL            | 6  | 80.19  | 13.36   |         |        |
| CV%                 |    |        | 1.9     |         |        |

**Anexo 11:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia OEP24 b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | d.f. | s.s.    | m.s.   | v.r. | F pr. |
|---------------------|------|---------|--------|------|-------|
| TRAT                | 2    | 1502.77 | 751.38 | 9.89 | 0.013 |
| RESIDUAL            | 6    | 456.05  | 76.01  |      |       |
| CV%                 |      |         | 4.9    |      |       |

**Anexo 12:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RAD52 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq   | Mean Sq  | F value | Pr(>F)  |
|---------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| TRAT                | 2  | 37826106 | 18913053 | 11.52   | 0.00882 |
| RESIDUALS           | 6  | 9848630  | 1641438  |         |         |
| CV%                 |    |          | 12.8     |         |         |

**Anexo 13:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia CESA1 a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq  | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------|----|---------|---------|---------|--------|
| TRAT                | 2  | 3038900 | 1519450 | 1.73    | 0.255  |
| RESIDUALS           | 6  | 5270107 | 878351  |         |        |
| CV%                 |    |         | 0.6     |         |        |

**Anexo 14:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia CESA1 b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq   | Mean Sq  | F value | Pr(>F)  |
|---------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| TRAT                | 2  | 26848222 | 13424111 | 16.49   | 0.00365 |
| RESIDUALS           | 6  | 4885409  | 814235   |         |         |
| CV%                 |    |          | 0.4      |         |         |

**Anexo 15:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia Atg45170 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------|----|--------|---------|---------|--------|
| TRAT                | 2  | 79603  | 39801   | 3.475   | 0.0995 |
| RESIDUALS           | 6  | 68725  | 11454   |         |        |
| CV%                 |    |        | 0.3     |         |        |

**Anexo 16:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPL11 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------|----|--------|---------|---------|--------|
| TRAT                |    |        | 144     |         | 0.388  |
| RESIDUALS           |    |        | 1277    |         |        |
| CV%                 |    |        | 5.2     |         |        |

de solución MS



**Anexo 17:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPS18 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq   | Mean Sq  | F value | Pr(>F)  |
|---------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| TRAT                | 1  | 35152922 | 35152922 | 47.57   | 0.00232 |
| RESIDUALS           | 4  | 2955637  | 738909   |         |         |
| CV%                 |    |          | 26.7     |         |         |

**Anexo 18:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RAD52 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq    | Mean Sq   | F value | Pr(>F)   |
|---------------------|----|-----------|-----------|---------|----------|
| TRAT                | 1  | 172431204 | 172431204 | 168.6   | 0.000203 |
| RESIDUALS           | 4  | 4091707   | 1022927   |         |          |
| CV%                 |    |           | 7.2       |         |          |

**Anexo 19:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia OEP24 a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq   | Mean Sq  | F value | Pr(>F)  |
|---------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| TRAT                | 1  | 26514628 | 26514628 | 23.85   | 0.00814 |
| RESIDUALS           | 4  | 4447557  | 1111889  |         |         |
| CV%                 |    |          | 6.9      |         |         |

**Anexo 20:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia OEP24 b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq   | Mean Sq  | F value | Pr(>F)  |
|---------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| TRAT                | 1  | 26514628 | 26514628 | 23.85   | 0.00814 |
| RESIDUALS           | 4  | 4447557  | 1111889  |         |         |
| CV %                |    |          | 12.4     |         |         |

**Anexo 21:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia V-ATPasa a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| SOURCE OF VARIATION | Df | Sum Sq    | Mean Sq  | F value | Pr(>F)   |
|---------------------|----|-----------|----------|---------|----------|
| TRAT                | 2  | 150773114 | 75386557 | 109.9   | 1.88E-05 |
| RESIDUALS           | 6  | 4115996   | 685999   |         |          |
| CV %                |    |           | 11.8     |         |          |

**Anexo 22:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia V-ATPasa b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| <b>SOURCE OF VARIATION</b> | <b>Df</b> | <b>Sum Sq</b> | <b>Mean Sq</b> | <b>F value</b> | <b>Pr(&gt;F)</b> |
|----------------------------|-----------|---------------|----------------|----------------|------------------|
| <b>TRAT</b>                | 2         | 559569624     | 279784812      | 316.2          | 8.31E-07         |
| <b>RESIDUALS</b>           | 6         | 5309739       | 884957         |                |                  |
| <b>CV%</b>                 |           |               | 35.1           |                |                  |

**Anexo 23:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia RPS27L ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| <b>SOURCE OF VARIATION</b> | <b>Df</b> | <b>Sum Sq</b> | <b>Mean Sq</b> | <b>F value</b> | <b>Pr(&gt;F)</b> |
|----------------------------|-----------|---------------|----------------|----------------|------------------|
| <b>TRAT</b>                | 2         | 87728983      | 43864491       | 231.9          | 2.08E-06         |
| <b>RESIDUALS</b>           | 6         | 1134883       | 189147         |                |                  |
| <b>CV%</b>                 |           |               | 18.1           |                |                  |

**Anexo 24:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia CESA1 a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| <b>SOURCE OF VARIATION</b> | <b>Df</b> | <b>Sum Sq</b> | <b>Mean Sq</b> | <b>F value</b> | <b>Pr(&gt;F)</b> |
|----------------------------|-----------|---------------|----------------|----------------|------------------|
| <b>TRAT</b>                | 2         | 299195057     | 149597528      | 513.4          | 1.96E-07         |
| <b>RESIDUALS</b>           | 6         | 1748444       | 291407         |                |                  |
| <b>CV%</b>                 |           |               | 17.6           |                |                  |

**Anexo 25:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia CESA1 b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| <b>SOURCE OF VARIATION</b> | <b>Df</b> | <b>Sum Sq</b> | <b>Mean Sq</b> | <b>F value</b> | <b>Pr(&gt;F)</b> |
|----------------------------|-----------|---------------|----------------|----------------|------------------|
| <b>TRAT</b>                | 2         | 26848222      | 13424111       | 16.49          | 0.00365          |
| <b>RESIDUALS</b>           | 6         | 4885409       | 814235         |                |                  |
| <b>CV%</b>                 |           |               | 16.5           |                |                  |

**Anexo 26:** Análisis de variancia para el gen candidato a referencia Atg45170 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**ANALYSIS OF VARIANCE**

| <b>SOURCE OF VARIATION</b> | <b>Df</b> | <b>Sum Sq</b> | <b>Mean Sq</b> | <b>F value</b> | <b>Pr(&gt;F)</b> |
|----------------------------|-----------|---------------|----------------|----------------|------------------|
| <b>TRAT</b>                | 2         | 12196674      | 6098337        | 114.9          | 1.65E-05         |
| <b>RESIDUALS</b>           | 6         | 318564        | 53094          |                |                  |
| <b>CV%</b>                 |           |               | 7.6            |                |                  |

**Anexo 27:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPL11 ( $\alpha= 0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 44844.33 | a |
| T    | 45456.67 | a |
| R    | 45753    | a |

**Anexo 28:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPS18 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 59110.33 | a |
| T    | 59241    | a |
| R    | 58845.33 | a |

**Anexo 29:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPS27L ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 60345.33 | a |
| T    | 60671    | a |
| R    | 60757.67 | a |

**Anexo 30:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia V-ATPasa a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 37500.67 | a |
| T    | 37280.67 | a |
| R    | 37507.33 | a |

**Anexo 31:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia V-ATPasa b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

|   | Mean     |   |
|---|----------|---|
| H | 42198.33 | a |
| T | 42198.33 | a |
| R | 43423.67 | a |

**Anexo 32:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia ERF3 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 49269.00 | a |
| T    | 49396.33 | a |
| R    | 49686.33 | a |

**Anexo 33:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia OEP24 a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 41819.33 | a |
| T    | 42331.33 | a |
| R    | 42461.00 | a |

**Anexo 34:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia OEP24 b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 52796.67 | a |
| T    | 53023.00 | a |
| R    | 52947.00 | a |

**Anexo 35:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RAD52 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 19836.67 | a |
| T    | 20995.67 | a |
| R    | 16184.67 | b |

**Anexo 36:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia CESA1- a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean      |   |
|------|-----------|---|
| H    | 44003.667 | b |
| T    | 47482.667 | a |
| R    | 47828.000 | a |

**Anexo 37:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia CESA1- b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 46585.67 | a |
| T    | 47053.00 | a |
| R    | 46826.33 | a |

**Anexo 38:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia Atg45170 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución La Molina

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 44812.00 | a |
| T    | 46090.00 | a |
| R    | 45993.67 | a |

**Anexo 39:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPL11 ( $\alpha= 0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| T    | 57691.00 | a |
| R    | 51159.67 | b |

**Anexo 40:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPS18 ( $\alpha= 0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| T    | 19095.33 | a |
| R    | 14254.33 | b |

**Anexo 41:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RAD52-2 ( $\alpha= 0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| T    | 19095.33 | a |
| R    | 14254.33 | b |

**Anexo 42:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia OEP24 a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean       |   |
|------|------------|---|
| H    | 41574.6667 | b |
| T    | 47425.3333 | a |

**Anexo 43:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia OEP24 b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 30222.67 | a |
| T    | 26018.33 | b |

**Anexo 44:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia V-ATPasa a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 36230.67 | b |
| T    | 42663.67 | a |
| R    | 32787.67 | c |

**Anexo 45:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia V-ATPasa b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 17487.33 | b |
| T    | 30449.33 | a |
| R    | 14676.33 | c |

**Anexo 46:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia RPS27L ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 14487.67 | c |
| T    | 22134.00 | a |
| R    | 18432.00 | b |

**Anexo 47:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia CESA1- a ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean       |   |
|------|------------|---|
| H    | 30580.3333 | b |
| T    | 42863.6667 | a |
| R    | 30685.6667 | b |

**Anexo 48:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia CESA1- b ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 35942.67 | b |
| T    | 42756.00 | a |
| R    | 29539.33 | c |

**Anexo 49:** Prueba Tukey para la expresión del gen candidato a referencia Atg45170 ( $\alpha=0.05$ ) bajo condiciones de solución MS

**TUKEY'S 95% CONFIDENCE INTERVALS**

| TRAT | Mean     |   |
|------|----------|---|
| H    | 16952.67 | b |
| T    | 17723.67 | a |
| R    | 14960.67 | c |

**Anexo 50:** Tabla de composición y concentración de las soluciones La Molina y Murashige y Skoog (MSP01)

| Elemento | PA (g/mol) | La Molina (ppm) | MSP01 (ppm) |
|----------|------------|-----------------|-------------|
| K        | 39.0983    | 210             | 775.20      |
| N        | 14.0067    | 190             | 840.69      |
| Ca       | 40.078     | 150             | 119.97      |
| S        | 32.065     | 70              | 55.51       |
| Mg       | 24.305     | 45              | 36.49       |
| P        | 30.973762  | 35              | 15.90       |
| Fe       | 55.845     | 1               | 5.58        |
| Mn       | 54.938044  | 0.5             | 5.49        |
| B        | 10.811     | 0.5             | 1.08        |
| Zn       | 65.37      | 0.15            | 1.95        |
| Cu       | 63.546     | 0.1             | 0.01        |
| Mo       | 95.95      | 0.05            | 0.12        |
| Co       | 58.933     |                 | 2.36        |
| Na       | 22.990     |                 | 0.01        |
| Cl       | 35.453     |                 | 106.13      |
| I        | 126.904    |                 | 0.63        |

P.A: Peso atómico