

**UNIVERSIDAD NACIONAL
“SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO”
FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL**



**CÓDIGOS DE BARRA DE ADN COMO HERRAMIENTA EN LA
IDENTIFICACIÓN DE FLORA SILVESTRE ALTOANDINA
AMENAZADA EN LA QUEBRADA ULTA DEL PARQUE
NACIONAL HUASCARÁN, ANCASH - 2018**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AMBIENTAL

Tesista: Br. GINA PAOLA ALFARO LÓPEZ

Asesor: Dr. PERCY EDUARDO OLIVERA GONZALES

HUARAZ, ANCASH, PERÚ

2021

**FORMATO DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN,
CONDUCTENTES A OPTAR TÍTULOS PROFESIONALES Y GRADOS ACADÉMICOS EN EL
REPOSITORIO INSTITUCIONAL.**

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres: ALFARO LÓPEZ GINA PAOLA

Código de alumno: 00.0333.7.AB Teléfono: 998684091

Correo electrónico: galfarol@unasam.edu.pe DNI o Extranjería: 41918328

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Tipo de trabajo de investigación:

- Tesis Trabajo de Suficiencia Profesional
 Trabajo Académico Trabajo de Investigación
 Tesinas (presentadas antes de la publicación de la Nueva Ley Universitaria 30220 – 2014)

3. Título Profesional o Grado obtenido:

INGENIERA AMBIENTAL

4. Título del trabajo de investigación:

CÓDIGOS DE BARRA DE ADN COMO HERRAMIENTA EN LA IDENTIFICACIÓN DE FLORA SILVESTRE ALTOANDINO
AMENAZADA DE LA QUEBRADA ULTA DEL PARQUE NACIONAL HUASCARÁN, ANCHAS-2018

5. Facultad de: CIENCIAS DEL AMBIENTE

6. Escuela, Carrera o Programa: INENIERÍA AMBIENTAL

7. Asesor:

Apellidos y nombres OLIVERA GONZALES PERCY Correo electrónico: POLIVERAG@UNASAM.EDU.PE

Teléfono: 945122293 N° de DNI o Extranjería: 31651043 ORCID: 0000-0002-8263-5901

8. Tipo de acceso al Documento

- Acceso público* al contenido completo.
 Acceso restringido** al contenido completo

Si el autor eligió el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Santiago Antúnez de Mayolo una licencia no exclusiva, para que se pueda hacer arreglos de forma en la obra y difundirlo en el Repositorio Institucional, respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso de que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

SE ESTÁ PREPARANDO PARA PUBLICACIÓN

10. Originalidad del archivo digital

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad, como parte del proceso **conducente a** obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.


Firma del autor

11. Otorgamiento de una licencia **CREATIVE COMMONS**

Para las investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica.



El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Institucional, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12° del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI "Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Recolector Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA".

12. Para ser llenado por la Dirección del Repositorio Institucional

Fecha de recepción del documento por el Repositorio Institucional:

Firma:

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

**** Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO**
FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE
Av. Centenario N° 200 – Teléfono (043)-640020-anexo 1103
HUARAZ - ÁNCASH - PERÚ



"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

ACTA DE SUSTENTACIÓN Y DEFENSA DE TESIS

Los Miembros del Jurado en pleno que suscriben, reunidos en la fecha, en el Virtual - Plataforma Microsoft Teams de la FCAM-UNASAM, de conformidad a la normatividad vigente conducen el Acto Académico de Sustentación y Defensa de Tesis "CÓDIGOS DE BARRA DE ADN COMO HERRAMIENTA EN LA IDENTIFICACIÓN DE FLORA SILVESTRE ALTOANDINA AMENAZADA EN LA QUEBRADA ULTA DEL PARQUE NACIONAL HUASCARÁN, ANCASH-2018" que presenta ALFARO LÓPEZ GINA PAOLA para optar el Título Profesional de Ingeniero Ambiental.

En seguida, después de haber atendido la exposición oral y escuchada las respuestas a las preguntas y observaciones formuladas, lo declaramos:

APROBADA CON DISTINCIÓN

Con el calificativo de: *Diecisiete*.... (17)

En consecuencia, ALFARO LÓPEZ GINA PAOLA queda expedito para que el Consejo de Facultad de la Facultad de Ciencias del Ambiente de la Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo" apruebe el otorgamiento de su **Título Profesional de Ingeniero Ambiental** de conformidad al Art. 113 numeral 113.9 del Reglamento General de la UNASAM (Resolución de Consejo Universitario N° 399-2015-UNASAM), el Art. 48° del Reglamento General de Grados y Títulos de la UNASAM (Resolución de Consejo Universitario - Rector N° 761-2017-UNASAM) y el Art. 160° del Reglamento de Gestión de la Programación, Ejecución y Control de las Actividades Académicas (Resolución de Consejo Universitario - Rector N° 232-2017-UNASAM).

Huaraz, 18 de marzo de 2021

Dr. Heraclio Fernando Castillo Picon
Presidente
Jurado de sustentación

Blga. Rosario Adriana Polo Salazar
Primer miembro
Jurado de sustentación

Ing. Ciro Walter Fernández Rosales
Segundo miembro
Jurado de sustentación

Dr. Percy Eduardo Olivera Gonzales
Asesor de tesista



DEDICATORIA

A mis padres, por su sacrificio y esfuerzo en darme una carrera profesional, brindándome su amor y comprensión.

A mi hijo, Pedro Adrián, por ser la razón de mi superación día con día.

Gina Paola Alfaro López

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por su inmenso amor y protección cada día de mi vida y por haber puesto en mi camino a personas extraordinarias que han mejorado mi existencia.

Agradezco a mis padres, Pedro y Nelly, quienes han apostado y confiado en mí, motivándome constantemente en alcanzar mis metas hasta lograr cada una de ellas y por recordarme diariamente que se debe pensar en grande y que uno se debe superar a sí mismo diariamente.

Agradezco a mi asesor, el Dr. Percy Olivera Gonzales, por aceptarme como su tesista y brindarme su tiempo y dedicación en el proceso de ejecución de mi tesis, además de enseñarme sus habilidades y conocimientos en el campo de la investigación.

Agradezco a la Dra. Carmen del Rosario Tamariz Angeles, por haberme apoyado en el proceso de reconocimiento de especies de mi proyecto de investigación, además de su interés y paciencia en mí aprendizaje, dispuesta a absolver cualquier duda en todo momento.

Agradezco a mis hermanas, Catalina, Yuly, Karla y a mi hermano Rabí, por haber estado conmigo en aquellos momentos difíciles brindándome todo el apoyo moral y económico, además de amar a mi hijo en todo momento.

Agradezco a la Universidad Santiago Antúnez de Mayolo por haberme permitido formarme en ella, asimismo, a la Facultad Ciencias del Ambiente, Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, por haberme brindado docentes de calidad y humanidad como el Mg. Alfredo Reyes Nolasco.

Agradezco al Centro de Investigación de la Biodiversidad y Recursos Genéticos de Ancash de la Facultad de Ciencias – UNASAM, donde desarrollé mi trabajo de investigación, encontrando grandes profesionales como la MSc. Miguelina Santillán y la MSc. Flormila Vicuña; y amigos como Albertito, Gabi y Edson; a todos ellos muchas gracias por su amistad brindada, apoyo y disposición a cualquier cosa que necesitara del laboratorio.

Agradezco a mis grandes amigos, Kathy, Barinia, y Loyer, por su gran amistad que año a año me han brindado; demostrándome que un verdadero amigo no solo está en los buenos momentos, sino en todo instante que uno lo necesita.

Agradezco al Vicerrectorado de Investigación que a través del Instituto de Investigación me otorgó la subvención de tesis de pre-grado.

Agradezco al Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas del Parque Nacional Huascarán por los permisos de ingreso y colecta que me otorgó.

RESUMEN

En las diversas evaluaciones ambientales para definir impactos sobre el ecosistema requieren la identificación taxonómica de las especies vegetales que en él habitan. La identificación tradicional requiere plantas adultas que no siempre es posible encontrar durante las colectas. En este sentido, el objetivo de este trabajo de investigación fue utilizar los códigos de barra de ADN como herramienta para identificar especies altoandinas amenazadas en la quebrada Ulta (Carhuaz, Ancash, Perú). Primero, se prepararon 13 especies referenciales correspondientes a los géneros *Perezia*, *Gentianella* y *Polylepis*, considerando especies vulnerables y especies emparentadas. Para la preparación de los códigos de barra de ADN se usaron los marcadores *rbcL*, *ITS2* y *matK*. En segundo lugar, se realizó la colecta de la vegetación en la quebrada Ulta por cuadrantes, colectándose algunas muestras parecidas a especies vulnerables carentes de flores para su comparación a nivel molecular con las muestras de referencia. Se encontró que los marcadores *rbcL* diferencian las familias en todas las especies, mientras que el marcador *ITS2* diferencia especies de los géneros *Perezia* y *Gentianella* evaluados, pero para el género *Polylepis* este marcador es polimórfico, el marcador *matK* genera una ligera diferenciación en las especies evaluadas. La evaluación de la vegetación de la quebrada Ulta mostró que las familias con mayor densidad fueron las Asteráceas (60.2%), Bromeliácea (15.2%) y Poaceae (10.1%). Usando los códigos de barra de las especies de referencia se identificó la presencia de *G. weberbaueri*, una especie endémica; *Perezia coerulescens* o *P. pinnatifida*, consideradas como vulnerables, y especies del género *Polylepis*, logrando diferenciar *P. racemosa* y *P. sericea*. Los resultados obtenidos indican que la herramienta de códigos de barra de ADN puede ser utilizado para identificar especies siempre y cuando no presenten alto polimorfismo debido a la hibridación; pudiendo contribuir en las evaluaciones ambientales.

Palabras clave: Códigos de barra de ADN, plantas amenazadas, plantas altoandinas, *Perezia*, *Gentianella*, *Polylepis*

ABSTRACT

Environmental assessments to define impacts on the ecosystem require taxonomic identification of the plant species that inhabit it. Traditional identification requires adult plants that are not always possible to find when collections are made. Then, objective of this research was the identification of threatened high Andean species from the Quebrada Ulta using the DNA barcode. First, it was prepared referential registry of 13 species including species of *Perezia*, *Gentianella* and *Polylepis* considering vulnerable and close species. To prepare barcodes of the reference species rbcL, ITS2, and matK regions were used. In the second part, Ulta vegetation were evaluated by quadrants where samples seemed to endangered species were collected. It was found that the rbcL markers differentiate the families in all the species, the ITS2 marker differentiates species in the genera *Perezia* and *Gentianella* evaluated, but for the genus *Polylepis* this marker is polymorphic, the matK marker generates a slight differentiation in the species evaluated. The evaluation of the vegetation of Ulta quebrada showed that the families in greater proportion were Asteraceae (60.2%), Bromeliaceae (15.2%) and Poaceae (10.1%). Using the barcodes of the reference species, it was identified the presence of *G. weberbaueri*, an endemic species, *Perezia coerulescens* or *Perezia pinnatifida*, both are vulnerable, and species of the genus *Polylepis*: *P. racemosa* and *P. sericea*. The results obtained indicate that the DNA barcode tool can be used to identify species, especially those do not present high polymorphism due to hybridization; being able to contribute to environmental evaluations.

Keywords: DNA bar codes, endangered species, High Andean species, *Perezia*, *Gentianella*, *Polylepis*

INDICE

Contenido	Página
FORMATO DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INDICE.....	ix
LISTA DE TABLAS	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
SIGLAS.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. Objetivos.....	18
1.1.1. Objetivo general	18
1.1.2. Objetivo específico	18
1.2. Hipótesis.....	19
1.3. Variables.....	19
1.3.1. Variable Independiente.....	19
1.3.2. Variable Independiente.....	19
II. MARCO TEÓRICO	20
2.1. Antecedentes.....	20
2.2. Bases teóricas	21
2.2.1. Técnicas de identificación de especies utilizando el método tradicional basado en caracteres morfológicos.	21
2.2.2. Técnicas de análisis en sistemática molecular	22
2.2.3. Códigos de barra de ADN, como herramienta en la identificación de especies	23
2.2.4. Regiones moleculares oficiales para plantas terrestres	27
2.2.4.1. Gen ribulosa fosfato carboxilasa subunidad grande (rbcL)	27

2.2.4.2. Región MatK	27
2.2.4.3. Región ITS	28
2.2.5. Técnica molecular para la identificación de especies utilizando código de barras.....	28
2.2.5.1. Extracción del ADN	28
2.2.5.2. Amplificación del fragmento del Gen Marcador Mediante PCR.	28
2.2.5.3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	29
2.2.5.4. Secuenciamiento y edición de las secuencias.....	29
2.2.6. Flora silvestre altoandina.....	30
2.2.7. Categorías de amenaza de flora silvestre en el Perú, según el decreto supremo 043-2006-AG	31
2.2.8. Especies altoandinas amenazadas en estudio, según el Decreto Supremo 043-2006-AG.....	32
2.2.8.1. Género <i>Perezia</i> (Mariano Lagasca).....	32
2.2.8.2. Género <i>Gentianella</i> (Conrad Moench).....	33
2.2.8.3. Género <i>Polylepis</i> (Jorge Hieronymus).....	34
2.2.9. Importancia de las especies altoandinas amenazadas en estudio.....	35
2.2.10. Parque Nacional Huascarán	36
2.3. Definición de términos básicos.....	38
III. MARCO METODOLÓGICO	40
3.1. Tipo de Investigación	40
3.2. Diseño de Investigación.....	40
3.3. Métodos o técnicas	40
3.4. Población y muestra	41
3.4.1. Población	41
3.4.2. Muestra.	41
3.5. Procesamiento y elaboración de los códigos de barra de ADN	42
3.5.1. Preparación del herbario e identificación taxonómica morfológica de las especies de referencia.	42
3.5.2. Análisis genético de las muestras de referencia para obtener los códigos de barra de ADN.	44
3.5.2.1. Extracción del ADN vegetal de las muestras de referencia.....	44
3.5.2.2. Amplificación de las regiones ITS2, rbcL, matK	44

3.5.2.3. Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético.....	45
3.5.3. Muestreo y colecta de las especies amenazadas de la quebrada Ulta.....	45
3.5.3.1. Área de estudio.....	45
3.5.3.2. Muestreo y Colecta.....	48
3.5.3.3. Identificación de las muestras amenazadas colectadas de la quebrada Ulta utilizando como herramienta los códigos de barra de ADN de referencia.....	49
IV. RESULTADOS	51
4.1. Preparación del registro referencial de las especies de flora altoandina amenazadas de la quebrada Ulta	51
4.2. Análisis taxonómico molecular de las especies de referencia amenazadas y obtención de las secuencias de los códigos de barras de ADN.....	51
4.3. Análisis Filogenético Molecular de la región rbcL, para los 3 géneros pertenecientes a las familias: Gentianaceae, Asteraceae, Rosaceae	54
4.4. Análisis filogenético molecular de las muestras de referencia por cada género utilizando las regiones matK e ITS.....	55
4.4.1. Análisis filogenético de especies del género <i>Gentianella</i> utilizando la región ITS.....	55
4.4.2. Análisis filogenético de especies del género <i>Gentianella</i> utilizando la región matK	57
4.4.3. Análisis filogenético de especies del género <i>Perezia</i> utilizando la región ITS.....	58
4.4.4. Análisis filogenético de especies del género <i>Perezia</i> utilizando la región matK.....	59
4.4.5. Análisis filogenético de especies del género <i>Polylepis</i> utilizando la región ITS.....	60
4.4.6. Análisis filogenético de especies del género <i>Polylepis</i> utilizando la región matK	61
4.5. Evaluación del muestreo de especies colectadas de la quebrada Ulta	63
4.6. Identificación taxonómica molecular de especies morfológicamente parecidas de la quebrada Ulta.	67
4.6.1. Identificación taxonómica molecular de la <i>Gentianella sp.</i> usando la región ITS.....	67
4.6.2. Identificación taxonómica molecular de <i>Perezia sp.</i> usando la región matK.....	68
4.6.3. Identificación taxonómica molecular de <i>Polylepis</i> usando la región matK	69

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	71
VI. CONCLUSIONES.....	74
VII. RECOMENDACIONES.....	76
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
IX.ANEXOS.....	93
Anexo 1.....	93
Anexo 2.....	105
Anexo 3.....	112
Anexo 4.....	117

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de marcadores moleculares	23
Tabla 2. Categorización de especies	35
Tabla 3. Superficies de la reserva de Biosfera del Huascarán.....	37
Tabla 4. Métodos y técnicas de identificación empleando los Códigos de barra de A. 40	
Tabla 5. Especies amenazadas en estudio	42
Tabla 6. Información de colecta de las muestras de referencia	43
Tabla 7. Componentes para las reacciones de amplificación	44
Tabla 8. Especies utilizadas para la elaboración de los códigos de barra de ADN.....	51
Tabla 9. Registros de las especies evaluadas en Genbank y Boldsystem.....	53
Tabla 10. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético de la región rbcl.....	54
Tabla 11. Especies extraídas del Genbank para la construcción del Árbol filogenético.	56
Tabla 12. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético	58
Tabla 13. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético	59
Tabla 14. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético	60
Tabla 15. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético.	61
Tabla 16. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético	62
Tabla 17. Especies colectadas por cuadrante en la Quebrada Ulta	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la brecha de códigos de barras de ADN inferidos	26
Figura 2. Mapa de Ubicación Geográfica de la Quebrada Uta.....	47
Figura 3. Muestreo por cuadrantes y aleatorio simple.....	49
Figura 4. Gel de electroforesis de los productos de PCR de la región ITS2.....	52
Figura 5. Gel de electroforesis de los productos de PCR de la región rbc1 de las muestras de <i>Gentianella</i>	52
Figura 6. Árbol filogenético molecular de la región rbc1 de las 3 familias.....	55
Figura 7. Árbol filogenético molecular de la región ITS del género <i>Gentianella</i>	56
Figura 8. Árbol filogenético del género <i>Gentianaella</i> utilizando la región MatK	57
Figura 9. Árbol filogenético del género <i>Perezia</i> utilizando la región ITS.....	58
Figura 10. Árbol filogenético del género <i>Perezia</i> utilizando la región MatK.....	59
Figura 11. Árbol filogenético del género <i>Polylepis</i> utilizando la región ITS	61
Figura 12. Árbol filogenético del género <i>Polylepis</i> utilizando la región MatK.....	62
Figura 13. Mapa de coordenadas de los puntos de colecta	64
Figura 14. Porcentaje de especies colectadas por familia	67
Figura 15. Árbol filogenético de las muestras parecidas a <i>Gentianella sp.</i> , utilizando la región ITS2	68
Figura 16. Árbol filogenético de las muestras parecidas al género <i>Perezia</i> utilizando la región MatK	69
Figura 17. Árbol filogenético de muestras parecidas a <i>Polylepis sp.</i> , utilizando la región MatK	70

SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BLAST	algoritmo de alineamiento de secuencias de ADN
CBOL	Consortio para el Código de Barras de la Vida
COX1	Citocromo C Oxidasa Subunidad 1
ITS	Espaciadores Transcritos Internos
ORF	Marco De Lectura Abierta
OTU	Unidad taxonómica operativa
rbcL	Enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa
matk	Gen plastidial de la maturasa-K
pb	pares de bases
UICN	La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
UNASAM	Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo

I. INTRODUCCIÓN

La pérdida y degradación de hábitats son la causa más importante de la extinción de especies en flora y fauna (Sala y otros, 2000). Considerando el número potencial de especies que aún queda por descubrir y el rápido deterioro ambiental que se evidencia en todo el planeta, es muy probable que una proporción considerable de especies se encuentren bajo algún grado de amenaza (Mora y otros, 2011). Lo que afecta gravemente a la salud humana y la sostenibilidad de nuestro planeta (Díaz, 2006).

El Perú, es un país muy rico en diversidad biológica, con un estimado de 19000 especies de angiospermas, gimnospermas y helechos (aproximadamente el 20% de la flora de Sudamérica), reconocido como uno de los principales centros de origen de plantas alimenticias en el mundo (Pautrat, 2002). Sin embargo, cerca del 50% de las especies amenazadas o potencialmente amenazadas (es decir, aquellas en la categoría de Casi Amenazado, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, se encuentran fuera de áreas naturales protegidas por el Estado (Aguilar y otros, 2010). Generando serios problemas para su conservación, siendo necesario implementar una estrategia adecuada para su protección, manejo y uso racional (Viñas y otros, 2005).

Amaral (2004), manifiesta que el primer paso crucial en la conservación y gestión de las especies amenazadas es la correcta identificación.

Actualmente las técnicas de identificación de especies se han basado en caracteres morfológicos distintos, quedando cortos al realizar encuestas eficientes y estandarizadas, debido, principalmente, a la plasticidad fenotípica y especies estrechamente relacionadas con la apariencia muy similar en las etapas juveniles generando bases de datos de especies defectuosos con errores (Daan, 2001). Por otra parte, la identificación morfológica depende en gran medida de los conocimientos taxonómicos, que a menudo es deficiente o en rápido declive (Hopkins, 2004).

Debido a estas limitaciones para una correcta identificación de especies, en el año 2003, el Dr. Paul Hebert y su grupo de investigación de la Universidad de Guelph en Canadá, presentan su proyecto códigos de barras de ADN, que constituye una herramienta diseñada para identificar de forma rápida y precisa las especies a partir de una secuencia corta y estándar de ADN. Estableciendo en el caso de animales el

uso de un fragmento de la secuencia del gen mitocondrial citocromo C oxidasa (COI); mientras que, para el caso de las plantas se enfocaron en el genoma nuclear y plastídico, y en el 2009 el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL) aprobó a las regiones plastídicas matK y rbcL como códigos de barra para las plantas (CBOL Plant Working Group, 2009).

La implementación de códigos de barras de ADN ha generado grandes expectativas a nivel mundial, ya que facilita el levantamiento de la información de la biodiversidad, determina especies crípticas y ha sido de gran utilidad en estudios ecológicos, donde la identificación de material biológico en estados juveniles es un impedimento en cuanto a la caracterización y composición florística de un bosque en estudio (Kress y otros, 2010). Por otro lado, el uso de la técnica de códigos de barra de ADN es de gran utilidad para la identificación de especies pertenecientes a taxones difícilmente diagnosticables sobre la base de morfología, como también para grupos de organismos cuyos problemas taxonómicos fundamentales han sido resueltos convenientemente por los especialistas (Coissac y otros, 2016). Se estima que esta técnica contribuirá a actualizar las colecciones biológicas y acelerará el inventario de la biodiversidad, siempre de manera precisa y en menor tiempo (Newmaster y otros, 2006).

Los estudios e investigaciones de la línea base de la biodiversidad del Parque Nacional Huascarán, reconoce 901 especies de flora descrita distribuidas en 114 familias y 274 géneros, y que por causas que son multifactoriales, desde fenómenos naturales, problemas globales, hasta factores antropogénicos podríamos resaltar que estos podrían poner en riesgo la biodiversidad (Plan maestro, 2010). La quebrada Ulta forma parte de las cadenas de montañas y glaciares del Parque Nacional Huascarán donde encontramos gran parte de la flora descrita y que han sido catalogadas como especies amenazadas según el Decreto Supremo 043-2006-AG.

Por tal motivo se realizó esta investigación con la finalidad de encontrar una herramienta que nos permita identificar especies altoandinas amenazadas difíciles de reconocer en campo a través de sus caracteres morfológicos. Planteándonos el siguiente problema de investigación: ¿Es posible identificar especies de flora silvestre altoandina amenazadas utilizando como herramienta los códigos de barra de ADN en la quebrada Ulta del Parque Nacional Huascarán?

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Identificar especies de flora silvestre altoandina amenazadas utilizando como herramienta los códigos de barras de ADN en la quebrada Ulta, del Parque Nacional Huascarán, Ancash – 2018.

1.1.2. Objetivo específico

- Elaborar el registro referencial de algunas especies de flora altoandina amenazadas de la quebrada Ulta, del Parque Nacional Huascarán, Ancash – 2018. Seleccionadas para el presente trabajo.
- Elaborar el código de barra de ADN referencial de algunas especies de flora altoandina amenazadas de la quebrada Ulta, del Parque Nacional Huascarán, Ancash – 2018. Seleccionadas para el presente trabajo.
- Identificar la zona de muestreo de las especies altoandina amenazadas de la quebrada Ulta, del Parque Nacional Huascarán, Ancash – 2018.
- Efectuar la colecta de ejemplares de las especies altoandina amenazadas de la quebrada Ulta, del Parque Nacional Huascarán, Ancash – 2018.
- Efectuar la identificación taxonómica de las especies altoandina amenazadas de la quebrada Ulta, del Parque Nacional Huascarán, Ancash - 2018, utilizando como herramienta los códigos de barras de ADN.
- Evaluar la utilidad de aplicación de la tecnología del código de barras de ADN como herramienta en el monitoreo ambiental.

1.2. Hipótesis

El código de barras de ADN como herramienta permite identificar especies de flora silvestre altoandina amenazadas de la quebrada Ulta del Parque Nacional Huascarán, Ancash – 2018.

1.3. Variables

1.3.1. Variable Independiente

- Especies de flora Silvestre altoandinas amenazadas.

Las plantas altoandinas son especies que presentan caracteres morfoanatómicos que reflejan la adaptación a ambientes andino-xeromórficos como: hojas con estivaciones revoluta, cutícula y paredes celulares engrosadas, densa pubescencia, hojas hipostomáticas con abundantes estomas, mesófilo isobilateral en empalizada, espacios intercelulares y con haces vasculares de tipo colateral (Tamariz y Flores, 1999).

1.3.2. Variable Independiente

- Código de Barra de ADN

Secuencia corta de ADN, de una localidad uniforme del genoma, usada para identificar especies (Barcode of life, 2017).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En marzo del 2014 el Ministerio del Ambiente promueve "El Taller Nacional de Códigos de Barras de ADN", con lo cual el Perú inicia su participación en el proyecto internacional en conjunto con Canadá: "Código de barras de ADN para apoyar la conservación de la biodiversidad, aprovechamiento sostenible y el comercio". («Proyecto de cooperación con Canadá sobre códigos de barra de ADN», 2014).

Una de las primeras investigaciones utilizando la herramienta códigos de barra de ADN en plantas fue realizado por González y otros (2009), quienes elaboraron un inventario de todos los árboles a lo largo de dos hectáreas en un bosque tropical de la Guayana Francesa, evaluando ocho marcadores moleculares, con el fin de examinar si los códigos de barra de ADN contribuían a aumentar la calidad y minimizar los tiempos en la identificación de especies para los estudios de biodiversidad en bosques tropicales. Los resultados mostraron que las regiones ITS y matK presentaron dificultades en la secuenciación, y que ninguno de los marcadores logró una tasa de identificación en las plantas mayor al 70%; sin embargo, concluyeron que la región ITS podría ser un código de barras de ADN útil para la identificación de especies estrechamente relacionadas en las familias Sapotaceae y Lauraceae.

Asimismo, Kress y otros (2010), utilizaron datos de matK, rbcL y trnH-psbA como herramienta para la construcción de una filogenia en una comunidad de 300 árboles tropicales en Puerto Rico. Los resultados mostraron que la combinación de los tres marcadores moleculares permitió la diferenciación del 95% de las especies y el 96% de las familias, evidenciando así que los códigos de barra de ADN son una herramienta útil para explorar la evolución de las diferentes comunidades.

De igual forma, Baraloto y otros (2012), evaluaron la utilidad de los rasgos funcionales y las relaciones filogenéticas en la predicción de los procesos de construcción de algunas comunidades de especies arbóreas que ocurren en la selva tropical de la Guayana Francesa como es el caso de *Micropholis*, utilizando 17 rasgos funcionales y datos moleculares de dos marcadores del cloroplasto (matK y rbcL). Los resultados mostraron que en promedio las

especies se relacionan en mayor medida por sus rasgos funcionales, es decir, confirman que los cambios en el medio ambiente son la respuesta predominante en la construcción de las comunidades ricas en especies, y no su similitud filogenética.

Por otro lado, Vivas y otros (2014), evaluaron la capacidad de los códigos de barra de ADN en la identificación de especies de Sapotaceae, quienes incluyeron ocho géneros de la familia y cuatro especies de *Micropholis*, demostrando que ITS resultó ser la mejor opción de código de barras para facilitar la identificación de especies en esta familia.

Finalmente, Jaén y otros (2010), examinaron la posible existencia de especies crípticas para la morfología y, en su caso, para valorar la necesidad de ampliar el conocimiento taxonómico de los grupos afectados. Los resultados que obtuvieron fueron que, entre las poblaciones co-específicas examinadas, se encontraron tres posibles casos de especies crípticas: las poblaciones de *Gallium scabrum* L. de Tenerife y La Gomera. Las secuencias rbcL obtenidas mostraron un notable grado de complejidad y polimorfismo, que hace posible hipotetizar la existencia de especies crípticas en varias islas.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Técnicas de identificación de especies utilizando el método tradicional basado en caracteres morfológicos.

Tal y como menciona Hebert y otros (2003), la identificación tradicional de especies ha sido realizada con base en caracteres morfológicos tales como tamaño, forma, color, consistencia, cantidad y tipos, tanto de hojas como de flores, frutos, corteza y semillas, entre otros. Sin embargo, la identificación basada en este tipo de caracteres, aunque es de gran utilidad, presenta cuatro limitaciones significativas que se deben considerar. En primera instancia, se presenta una limitación en cuanto a la plasticidad fenotípica y la variabilidad genética en los caracteres empleados para la identificación de especies (Paz y otros, 2011), es decir, los genotipos tienen la habilidad de producir diferentes fenotipos en respuesta a las diversas condiciones ambientales que se presenten. La plasticidad fenotípica es uno de los medios por los cuales las plantas pueden ajustar o modificar su

morfología y fisiología con el fin de adaptarse a la heterogeneidad ambiental (Palacio y otros, 2007). Por consiguiente, estos tipos de variabilidad pueden llevar a identificaciones incorrectas. Por otro lado, se pasa por alto los taxones morfológicamente crípticos que son comunes en muchos grupos (Hebert y otros, 2003). Estos taxones, al ser inconspicuos o “invisibles” quedan por fuera en los inventarios biológicos, generando subestimaciones en la biodiversidad. En tercer lugar, las claves morfológicas establecidas son eficaces tan sólo para un estado específico de la vida o desarrollo del individuo, es decir, algunos caracteres morfológicos se presentan en el individuo en determinado estado de desarrollo por lo que una clave sería tan sólo útil para ese momento de crecimiento. Finalmente, el uso de las claves requiere de un alto nivel de conocimientos con el fin último de no incurrir en diagnósticos erróneos (Chase y Fay, 2009).

2.2.2. Técnicas de análisis en sistemática molecular

En los últimos veinte años han surgido una serie de cambios importantes dentro de los avances en las ciencias biológicas, permitiendo resolver una serie de problemas a través de la aplicación de técnicas moleculares del ADN (Lanteri y otros, 2002). La aplicación de este tipo de técnicas asociadas con los conocimientos filogenéticos ha tenido gran impacto en las clasificaciones biológicas, interpretación de procesos evolutivos, estudio de vías de dispersión (filogeografía) y la estimación de edades geológicas mediante relojes moleculares (Avice, 1994).

Según Astorga (2008), los marcadores moleculares corresponden a una amplia gama de herramientas para análisis directos e indirectos del ADN, las cuales han sido desarrolladas en las últimas décadas, tales como el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), el polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), los microsatélites, la secuenciación, el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) y marcadores de secuencias expresadas (EST). La aplicación de estas herramientas ha llegado a ser muy amplia y la adecuada elección de alguno de estos métodos moleculares está dada por el tipo de

problemática a resolver. La Figura 1, muestra los tipos de marcadores moleculares

Tabla 1. Tipos de marcadores moleculares

Marcadores moleculares	1. Marcadores basados en la hibridación del ADN	RFLP - restriction fragment length polymorphisms: (polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de ADN).
		Los minisatélites o VNTR - variable number of tandem repeats: (número variable de repeticiones en tándem).
	2. Marcadores basados en la amplificación del ADN mediante la reacción de PCR - polymerase chain reaction: (Reacción en cadena de la polimerasa de ADN)	RAPDs - random amplified polymorphic DNAs: (fragmentos polimórficos de ADN amplificados aleatoriamente).
		DAF - DNA amplification fingerprinting y AP-PCR -arbitrary primer PCR: (primers arbitrarios en PCR).
		SSR -simple sequence repeats: (microsatélites)
3. Marcadores mixtos:	AFLPs -amplified fragment length polymorphisms	

Fuente: Carrera y otros, (2004).

2.2.3. Códigos de barra de ADN, como herramienta en la identificación de especies

Según Daan (2001), todos los esfuerzos de conservación para salvar la biodiversidad dependen esencialmente de monitoreo biológico para la obtención de datos precisos sobre la distribución de especies y tamaño de población en una escala de tiempo ecológica y política relevante, de esta forma el monitoreo de especies se ha basado tradicionalmente en la identificación física, por ejemplo, encuestas visuales y recuento de los individuos en el campo utilizando caracteres morfológicos distintos. Sin embargo, en algunos casos, estas técnicas quedan realmente cortas al realizar encuestas eficientes y estandarizadas, debido, por ejemplo, a la plasticidad fenotípica y especies estrechamente relacionadas con la apariencia muy similar en las etapas juveniles, por lo tanto, hay ejemplos de bases de datos de especies defectuosos con errores.

Por otra parte, la identificación morfológica depende en gran medida de los conocimientos taxonómicos, que a menudo es deficiente o en rápido declive (Hopkins, 2004). Todas estas limitaciones del monitoreo tradicional de la biodiversidad han creado una demanda de enfoques alternativos, mediante la recuperación de ADN a partir de

muestras ambientales, de este modo tiene el potencial de combatir muchos de estos retos asociados con el monitoreo de la biodiversidad (Baird, 2014).

Es por ello, que los códigos de barra de ADN proveerán una base de datos científica referencial que facilitará la correcta identificación de las especies, su fluctuación poblacional y distribución geográfica a diferentes escalas de análisis espacio-temporal, así mismo permitirá determinar la dinámica de procesos ecológicos y evolutivos derivados del Calentamiento Global que están provocando la disminución poblacional y extinción de especies pudiendo medir el avance o retroceso de especies invasivas, principalmente en ambientes insulares. Es decir, permitirá realizar un análisis espacio-temporal del impacto de factores estocásticos y antrópicos sobre la diversidad biológica y ecológica a diferentes niveles de organización. Esta información se torna crucial en la elaboración de planes de manejo y programas de investigación para la conservación de la diversidad biológica (Altamirano y Yáñez, 2016).

Entonces, ¿Que son los códigos de barra de ADN?, pues es una herramienta que surge en el año 2003 en la Universidad de Guelph, en Ontario, Canadá, por iniciativa del Dr. Paul Herbert, como una técnica diseñada para identificar de forma rápida y precisa las especies a partir de una secuencia corta y estándar de ADN (Lanteri, 2007). La idea de utilizar secuencias de ADN específicas para la identificación rápida de especímenes no es fundamentalmente nueva (Moritz y Cicero, 2004). Lo innovador del Código de Barras de ADN es que propone usar información dentro de una misma región genética, en todos los taxones y con condiciones de secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas; además, el protocolo destaca la necesidad de relacionar esta información con ejemplares “vouchers” depositados en museos (Lanteri, 2007).

Asimismo, la iniciativa del Código de Barras de ADN propone una alternativa para explorar la diversidad biológica, porque el análisis de uno o varias regiones (secuencias) de exactamente la misma sección en cada genoma puede ser utilizada como un identificador único, un “código de barras”, que sea utilizada como una etiqueta para cada

especie y permita identificarlo, de tal manera tener la posibilidad de realizar un inventario de la biodiversidad (Vernooy y otros, 2010). En un inicio la concepción de código de barras fue aplicada en especies del reino Animal empleando marcadores mitocondriales, no obstante, su aplicación fue extendida hacia otros reinos como el Plantae y el Fungi (Casiraghi y otros, 2010). En el reino Plantae, la búsqueda de un código de barras se enfocó en el genoma nuclear y plastídico, aprobándose en el 2009 las regiones matK y rbcL, como regiones universales barcode para plantas, ambas regiones son menores a 800 pares de bases, siendo ampliamente utilizadas en estudios de filogenia, por tanto, son una importante base de referencia y poseen un poder discriminatorio aproximadamente en un 72% (CBOL PWG y otros, 2009). Para que una región del genoma pueda ser utilizada como código de barras de ADN es necesario que esta permita distinguir entre variación interespecífica (entre especies cercanamente relacionadas) y variación intraespecífica (dentro de la misma especie). De lo anterior, se genera el concepto de -barcoding gap-, que es la diferencia que existe entre la variación interespecífica e intraespecífica. Cuanto mayor sea la diferencia entre estas la discriminación específica será más acertada (Meyer y Paulay, 2005). La Figura 1 muestra la brecha de códigos de barra de ADN.

Además, en la validación son indispensables los métodos de agrupamiento (Neighbor-joining) y de reconstrucción filogenética (Máxima verosimilitud e inferencia bayesiana), de tal manera que se puedan evaluar monofilias específicas obtenidas con datos de esta naturaleza (Solano y otros, 2013). Los proponentes de los códigos de barras moleculares propusieron que una divergencia nucleotídica entre secuencias superior al 2 % indica la posible presencia de especies distintas (Lanteri, 2007).

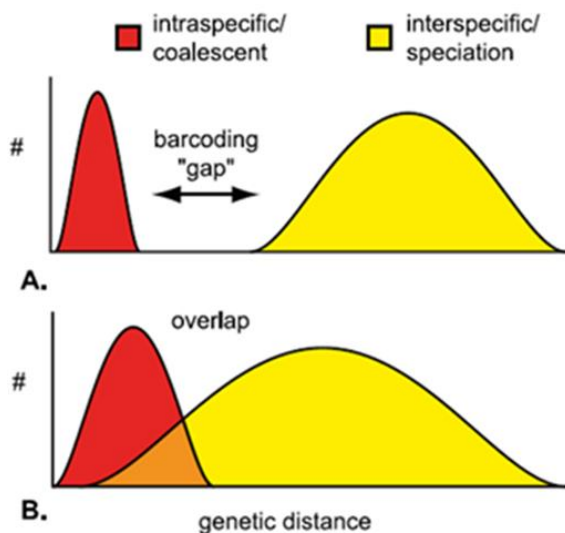


Figura 1. Esquema de la brecha de códigos de barras de ADN inferidos (Meyer y Paulay, 2005)

Nota: La distribución de la variación intraespecífica se muestra en rojo, y divergencia interespecífica en amarillo. (A) mundo ideal para el código de barras, con distribuciones discretas y sin solapamiento. (B) Una versión alternativa del mundo con superposición significativa y sin espacio (Meyer y Paulay, 2005)

En el 2007, Ratnasingham y Hebert, formalizan el sistema de identificación y delimitación de especies mediante código de barras, como The Barcode of Life Data System (BOLD), la cual es una plataforma bioinformática que brinda ayuda en la adquisición, almacenamiento, análisis y publicación de registros de códigos de barras de ADN. Además, presta servicios como repositorio de los datos de los especímenes (taxonómicos, moleculares, geográficos); gestiona, lleva el control de calidad y es un vehículo de comunicación entre científicos.

Por tanto, la información recopilada a partir de códigos de barra de ADN puede usarse más allá de los estudios taxonómicos, como la ecología (evaluación rápida de la biodiversidad y análisis de cadena alimenticia), biología de la conservación (monitoreo de especies protegidas), bioseguridad (identificación de especie de plaga invasora), medicina (identificación de patógenos medicamente importantes y sus vectores) y farmacología (identificación de compuestos activos) (Fiser y Buzan, 2013).

2.2.4. Regiones moleculares oficiales para plantas terrestres

El CBOL Plant Working Group (2009), seleccionó el código de barras de ADN universal para plantas terrestres la región codificante de los genes *rbcL* y *matK* del cloroplasto. Recientemente se ha propuesto al gen nuclear ITS ya que ha demostrado ser capaz de discriminar entre especies en varios grupos de plantas (Group China.Plant.BOL y otros, 2011).

2.2.4.1. Gen ribulosa fosfato carboxilasa subunidad grande (*rbcL*)

El gen *rbcL* es el mejor caracterizado de todos los que configuran el ADN cloroplástico y su secuencia de ADN es la mejor conocida y la primera que se secuenció en plantas. Además de ser en la actualidad el gen más comúnmente utilizado en los análisis filogenéticos de plantas (Chase y otros, 1993). De hecho, existen en GenBank más de 10.000 secuencias disponibles de este gen, que codifica para la subunidad grande de la enzima RuBisCo (el aceptor de carbono más importante en todos los eucariotas fotosintéticos y en las cianobacterias). Su elección como “código de barras” se debe a que, está presente en casi todos los representantes del reino vegetal, no presenta prácticamente problemas de alineamiento y, dispone de muchas copias en cada célula, ya que forma parte del genoma del cloroplasto (CBOL Plant Working Group, 2009).

2.2.4.2. Región MatK

El gen *matK*, previamente conocido como ORF (por open reading frame), es un gen plastidial de la maturasa-K (que ayuda al ARN del intrón a plegarse en una estructura catalíticamente activa) que se halla en el intrón que separa las regiones codificantes del gen *trnK* (Sugita y otros, 1985). Tiene una tasa de mutación más alta que *rbcL* (Johnson y Soltis, 1994).

2.2.4.3. Región ITS

Ha sido considerada como una fuente muy útil de caracteres para estudios filogenéticos en angiospermas (Baldwin y otros 1995), dado que los ITS se encuentran altamente representados en el genoma, se pueden amplificar con cantidades pequeñas de ADN y las secuencias altamente conservadas dentro de la mayoría de los genes del nrADN son muy útiles en el diseño de oligonucleótidos ("primers") "universales", lo que facilita la amplificación de los ITS mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Liston, 1992). Los espaciadores internos transcritos (ITS) son la parte más variable de la región de los ITS, la región de los ITS comprende el ITS2, la subunidad 5.8S y el ITS1, debido a que se encuentran flanqueando a la subunidad 5.8S, que es más conservada y se posibilita la alineación no ambigua de esta región (Baldwin y otros, 1995).

2.2.5. Técnica molecular para la identificación de especies utilizando código de barras.

2.2.5.1. Extracción del ADN

La extracción del ADN es necesaria en multitud de aplicaciones de la biología molecular. Existe un gran número de kits comerciales. Se ha demostrado que la sensibilidad de detección de la PCR es diferente para diferentes kits de ADN (Yoshikawa y otros, 2011).

2.2.5.2. Amplificación del fragmento del Gen Marcador Mediante PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) es una tecnología que consiste en amplificar in vitro fragmentos específicos de ADN, con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un organismo. La PCR consiste en tres pasos esenciales: desnaturalización del ADN, alineamiento y

extensión. Estos pasos (ciclo) se repiten las veces que sea necesario, para obtener de manera exponencial el fragmento de interés (en 30 a 40 ciclos se acumula alrededor de 106 a 108 moléculas) a partir de la muestra de ADN (Dale y von-Schantz, 2007)

2.2.5.3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones, (Fierro y otros, 2001).

2.2.5.4. Secuenciamiento y edición de las secuencias

Las secuencias de nucleótidos obtenidos se editan con el programa CodonCode Aligner v. 5.0 (CodonCode Corporation, www.codoncode.com). Este programa permite ensamblar las secuencias directa e inversa de cada muestra y editarlas para obtener una secuencia consenso definitivo. Las secuencias consenso así obtenidas, se comparan con las existentes en la base de datos del Barcode of Life Database (BOLD) (Ratnasingham y Hebert, 2007) y del GenBank® (Benson y otros, 2005) cargándolas en su sistema de identificación en formato FASTA a través del programa BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool (Madden, 2002). Los árboles filogenéticos se elaboran con el programa MEGA7, software que proporciona herramientas para explorar, descubrir y analizar secuencias de ADN y proteínas desde una perspectiva evolutiva (Kumar y otros, 2016), siguiendo el método NeighborJoining (Saitou y Nei, 1987) y

validándose con el Test Bootstrap para 500 réplicas (Felsenstein, 1985).

2.2.6. Flora silvestre altoandina

La región altoandina es una región con un nivel elevado de biodiversidad y de endemismos, cuya flora presenta características adaptativas muy especiales a condiciones climáticas extremas, de su hábitat (Pavlich y otros, 1977).

Molina y otros (2005), mencionan que estas condiciones implican grandes fluctuaciones de temperatura, alta radiación, vientos fuertes y baja humedad atmosférica; factores que disminuyen la tasa de fotosíntesis, limitando la adquisición de recursos para las plantas. También se caracterizan por las bajas temperaturas del aire y el corto período favorable para el establecimiento de plántulas. De modo que las adaptaciones que presentan las especies de flora están en relación con la economía del agua y la protección contra las bajas temperaturas nocturnas. Así las plantas orientan sus adaptaciones para protegerse del frío y evitar la excesiva transpiración. Estas adaptaciones se expresan en sus caracteres morfo-histológicos, los tallos rastreros o basales no tienen almidón como material de reserva, probablemente éste se almacena de otra forma (Ramos, 2012). Sin embargo, éstos le permiten tener una reproducción vegetativa, ventaja adaptativa para las plantas altoandinas debido a la dificultad del establecimiento y sobrevivencia de las semillas bajo sus condiciones de vida (Smith, 1988).

Según Tamariz y Flores (1999), el estudio anatómico de plantas altoandinas demuestra que las especies presentan caracteres morfoanatómicos que reflejan la adaptación a ambientes andino-xeromórficos (son aquellas zonas andinas que están sujeto a condiciones de escasa humedad y alta radiación), tal como: hojas con estivaciones revoluta, cutícula y paredes celulares engrosadas, densa pubescencia, hojas hipostomáticas con abundantes estomas, mesófilo isobilateral en empalizada, espacios intercelulares y con haces vasculares de tipo colateral.

2.2.7. Categorías de amenaza de flora silvestre en el Perú, según el decreto supremo 043-2006-AG

El Decreto Supremo N° 043-2006-AG publicado en el Diario el Peruano (2006), considera que, la Lista Roja de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre elaborada por la Unión Mundial para la Conservación - IUCN, es el inventario más completo del estado de conservación de las especies de animales y plantas a nivel mundial, que por su fuerte base científica es reconocida internacionalmente. Asimismo, utiliza un conjunto de criterios relevantes para todas las especies y todas las regiones del mundo, para evaluar el riesgo de extinción de miles de especies y subespecies; que, la elaboración de la clasificación oficial de especies amenazadas de flora silvestre en el Perú es el resultado de un proceso abierto y participativo a nivel nacional, que tiene como base los criterios y categorías de la IUCN, dentro de la cual se encuentran las principales categorías de amenaza:

Peligro Crítico (CR), cuando la mejor evidencia disponible acerca de un taxón indica una reducción de sus poblaciones, su distribución geográfica se encuentra limitada (menos de 100 km²), el tamaño de su población es menos de 250 individuos maduros y el análisis cuantitativo muestra que la probabilidad de extinción en estado silvestre es por lo menos el 50% dentro de 10 años o tres generaciones.

En Peligro (EN), cuando la mejor evidencia disponible acerca de un taxón indica que existe una reducción de sus poblaciones, su distribución geográfica se encuentra limitada (menos de 5 000 km²), el tamaño de la población estimada en menos de 2 500 individuos maduros y el análisis cuantitativo muestra que la probabilidad de extinción en estado silvestre es de por lo menos el 20% en 20 años o cinco generaciones.

Vulnerable (VU) cuando la mejor evidencia disponible acerca de un taxón indica que existe una reducción de sus poblaciones, su distribución geográfica se encuentra limitada (menos de 20 000 km²), el tamaño de la población estimada es menos de 10 000 individuos y el análisis cuantitativo muestra que la probabilidad de extinción en estado silvestre es de por lo menos 10% dentro de 100 años.

Casi Amenazado (NT) cuando ha sido evaluado según los criterios y no satisface, actualmente, los criterios para En Peligro Crítico, En Peligro o Vulnerable; pero está próximo a satisfacer dichos criterios, o posiblemente los satisfaga, en un futuro cercano.

2.2.8. Especies altoandinas amenazadas en estudio, según el Decreto Supremo 043-2006-AG

2.2.8.1. Género *Perezia* (Mariano Lagasca)

Perezia coerulescens (Weed.) es una planta medicinal altoandina conocida como, «contrahierba» «sutuma» y «chinavaleriana» (Mostacero y otros, 1996). Está considerada como especie vulnerable según el decreto supremo N° 043-2006-AG, (El Peruano, 2006), forma parte de la familia de las asteráceas, se distribuye desde el Perú, Bolivia hasta Argentina y es utilizada contra la aerofagia, como sedante, antigripal y sudorífico (Gibaja, 1998).

Su morfología externa de las *P. coerulescens* (Weed.), es una planta rizomatoza acaule de 5 – 7 cm. de alto. Presenta numerosas hojas basales arrosetadas de 3 – 7 cm de largo y 0,5 – 1,5 cm de ancho, pinnadas con lóbulos redondeados y mucronados. Limbo oblongo espatulado y bordes ciliados. Vaina desarrollada. Inflorescencia compuesta por un tallo florífero corto, con uno o dos capítulos isomórficos terminales 2 – 3 cm de largo, cubiertos por brácteas externas de apariencia escariosa. Flores bilabiadas, hermafroditas, blancas o violáceas (Olivera, 2008).

Perezia pinnatifida (Bonpl.), conocida como “valeriana”, “china valeriana”, “sacha margarita”, “sotuma” y “sutuma”. Está considerada como especie vulnerable según el decreto supremo N° 043-2006-AG (El Peruano, 2006); y es una hierba acaule, que habita en laderas rocosas, pastizales y pajonales de los Andes y punas del Perú entre los 3300 y 5000 m de altitud. Su distribución se extiende hasta el noroeste de Argentina y norte de Chile (Cano y otros, 2011). En medicina

tradicional las raíces y rizomas son utilizadas, por sus efectos sedantes, diuréticos y diaforéticos, por lo que, muchas plantas herbáceas andinas de esta especie son colectadas de su estado silvestre con sus raíces y flores para ser comercializada en los mercados o ferias populares, de tal modo que su alta demanda la coloca en riesgo de sobreexplotación (De la Cruz y otros. 2007).

2.2.8.2. Género *Gentianella* (Conrad Moench)

La familia Gentianaceae (Juss) es reconocida en el Perú por presentar alrededor de 15 géneros y aproximadamente 170 especies (Ulloa y otros, 2004). Es una hierba endémica bianual que crece en pajonales con suelos ligeramente húmedos, son plantas solitarias, monocárpicas, con inflorescencia de aspecto piramidal y flores pendulares de color rojo oscuro. Crecen entre 4400 a 4950 m. (Ramos, 2012).

Según Castillo y otros, (2006), reconocen 103 especies endémicas en siete géneros, los géneros con mayor número de especies endémicas son *Gentianella* y *Macrocarpaea* y describe a *Gentianella thyrsoides* (Hook.), *G. weberbaueri* (Gilg) y *G. tristicha*, de la siguiente manera:

Gentianella thyrsoides (Hook.) Está considerada como especie vulnerable según el decreto supremo N° 043-2006-AG (El Peruano, 2006). Nombre común: Japalan shacoj. Hierba perenne conocida de varias localidades en el norte y centro del país, en las cuencas del Mantaro, Marañón y Santa. El ejemplar tipo fue recolectado en el siglo XIX en una localidad hoy parte del Santuario Nacional Huailay.

Gentianella weberbaueri (Gilg) Fabris con nombre común: "pukashagapa". Especie endémica de Perú, sólo conocida en el departamento de Ancash. Es una planta herbácea bianual, con numerosas flores muy vistosas rojizas,

conocida en varias localidades de Chacas-Asunción (Brako y otros, 1993).

Gentianella tristicha (Gilg) J. Pringle. Nombre común: Desconocido. Hierba terrestre, conocida de algo más de cinco localidades, habitando pajonales paramunos y matorrales de puna. Ha sido recolectada en las partes altas de las cuencas del Santa y del Marañón. Sus poblaciones podrían estar afectadas por incendios intencionales.

2.2.8.3. Género *Polylepis* (Jorge Hieronymus)

Simpson y otros (1979), expresan que las especies del género *Polylepis* únicamente se distribuyen a lo largo de los Andes tropicales y subtropicales de Sudamérica, abarcando desde Venezuela hasta el norte de Argentina y Chile; asimismo el rango altitudinal en el que se encuentra el género *Polylepis* oscila mayormente entre los 3 000 y 4 800 msnm (Kessler, 2006). Por encima y por debajo de este rango disminuye la presencia del género. Actualmente se distribuyen a lo largo de Sudamérica de la siguiente manera: 4 especies en Argentina, 13 en Bolivia (4 endémicas), 2 en Colombia (1 endémica), 3 en Chile, 7 en Ecuador (2 endémicas), 15 en Perú (3 endémicas) y 1 en Venezuela.

Según el Mapa Forestal del Perú (INRENA y Ministerio de Agricultura (1995), los bosques del género *Polylepis* ocupan una superficie de 937 km² (93 700 hectáreas) que representa el 0.07% de la superficie total del Perú y alrededor del 2% de la cobertura potencial del género (Fjeldsa y Kessler, 1996), estos bosques se encuentran distribuidos en 15 de los 24 departamentos que conforman el país (Mendoza y Cano, 2011). De las 15 especies de *Polylepis* distribuidas en Perú, 5 especies se encuentran amenazadas en diferentes categorías según el Decreto Supremo N°043-2006-AG. Tal como se puede apreciar en la Tabla 2.

Tabla 2. Categorización de especies

Especie	Categoría	Símbolo
<i>Polylepis incana</i> Kunt	Peligro crítico	CR
<i>Polylepis racemosa</i> Ruiz y Pav	Peligro crítico	CR
<i>Polylepis sericea</i> Wed	Vulnerable	VU
<i>Polylepis weberbaueri</i> Pilg	Vulnerable	VU

Fuente: Decreto Supremo N°043-2006-AG

2.2.9. Importancia de las especies altoandinas amenazadas en estudio

Los bosques de *Polylepis*, así como las plantas herbáceas cumplen un rol muy importante en el proceso de conservación de la diversidad biológica tales como:

Captación de Carbono, los bosques del género *Polylepis* contribuyen al secuestro de CO₂, al almacenar carbono en sus árboles y en su suelo orgánico, es así que una hectárea de *Polylepis* fija aproximadamente 0.88 toneladas de carbono por hectárea al año (Mansilla, 2001). Económica y ecológicamente es de suma importancia, ya que tanto la conservación como la reforestación de los bosques, incrementaría gradualmente la captación de carbono, pudiendo ser un ingreso para las comunidades mediante el pago de servicios ambientales por parte de terceros (emisores de CO₂) (Mansilla, 2001).

Captación de Agua y Protección de Cuencas, a pesar de que la superficie actual de los bosques no es considerable, algunos de estos se encuentran en los valles glaciares, como los bosques ubicados en el departamento de Ancash (especialmente Parque Nacional Huascarán), donde sí constituyen una franja continua y densa que cumple funciones importantes en la conservación del agua, suelo y protección de cuencas (Arévalo y Recharte, 2003). En estas zonas los bosques son muy húmedos y cerrados, creando un microclima ideal para el crecimiento de briofitos (hepáticas, antocerotas y musgos), los cuáles cumplen un rol de vital importancia en la captación lluvia y agua atmosférica (Glime, 2007). Así mismo, tanto la corteza como las raíces de los árboles

permiten la retención de humedad y la filtración del agua por el suelo poroso hacia capas más profundas, respectivamente. De esta manera se ayuda a la alimentación de puquios y ojos de agua que se encuentran en zonas más bajas al bosque (TMI, 2009).

Refugios de Biodiversidad, la diversidad de plantas que crecen en el sotobosque varía significativamente, por lo que consiste en varias especies de helechos, musgos, orquídeas, árboles, arbustos, herbáceas y gramíneas (Arévalo y Recharte, 2003), considerándose una fuente importante de germoplasma y recursos para la población que vive cerca de ellos (Arévalo y Recharte, 2003). También los bosques de polylepis albergan entre 35 y 45 especies diferentes de aves (Fjeldså y Kessler, 1996).

Plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cerca de un 80% de personas utilizan plantas como medicina tradicional y también son parte de la medicina moderna; así mismo se ha calculado que aproximadamente un cuarto de las drogas prescritas contiene extractos de plantas o principios activos obtenidos de las plantas o sintetizados a partir del conocimiento de las mismas (UICN y otros.,1993). Las plantas son la fuente tradicional de muchos productos químicos utilizados como productos farmacéuticos. Los fitoquímicos más valiosos son productos del metabolismo secundario de las plantas (Tripathi, 2003).

2.2.10. Parque Nacional Huascarán

El Parque Nacional Huascarán fue establecido el 1 de julio 1975, en el departamento de Ancash, con el fin de proteger la flora y fauna silvestre existente en él, y las bellezas paisajísticas y escénicas que contiene, así como un sistema de cuencas que alberga (Huamaní, 1998). Fue declarada por la UNESCO, como Reserva de Biosfera en marzo de 1977; y el 14 de diciembre de 1985 fue declarado como Patrimonio Natural de la Humanidad. Posee una superficie de 1,155.800 ha., conformada por la zona núcleo, amortiguamiento y transición, tal como se puede apreciar en la Tabla 3. Tiene como fin 3 funciones básicas que se complementan y se esfuerzan entre sí, las cuales son:

función de conservación, función de desarrollo y función de apoyo logístico para la investigación y la educación (SERNAP, 2010)

Tabla 3. Superficies de la reserva de Biosfera del Huascarán

Zonas	Hectáreas	% Respecto al área de la región Ancash
Núcleo (PNH)	340, 000	10%
Zona de amortiguamiento	170, 200	5%
Zona de Transición	645, 600	18%
Total	1 155, 800	32%

Fuente: SERNANP, (2009)

Además, el Parque Nacional Huascarán, presenta 11 zonas de vida que crean un espectro de microclimas que permiten la presencia de una gran diversidad biológica, que depende de la ubicación latitudinal, altitud y humedad (SERNANP, 2010).

El Parque Nacional Huascarán posee gran parte de especies endémicas y angiospermas del Perú, sin embargo, las investigaciones que se han publicado no han podido reportar la biodiversidad total que existe en esta zona, además la rápida degradación de los ecosistemas debido al marcado efecto antropogénico han hecho que muchas de estas especies se encuentren en peligro de extinción de acuerdo al decreto supremo 043-2006-AG (Peruano,2006)

El plan maestro (2003-2007), identifica 74 lugares donde se realiza frecuentemente quema de pastos, 58 lugares donde se produce la tala indiscriminada de bosques, 53 lugares con apertura de terrenos para actividades agrícolas, 10 lugares que presentan pérdida de la cobertura vegetal y 19 lugares con asentamiento humano de 5 a más familias. La quebrada Ulta se encuentra en la zona núcleo del Parque Nacional Huascarán y es una de las áreas donde la quema es usual al igual que la tala indiscriminada de bosques y perdida de cobertura vegetal, lo cual impiden la regeneración y extensión de bosques de *Polylepis* (Plan Maestro 2010). Generando una rápida degradación de los ecosistemas y afectando a aquellas especies asociadas que juegan

un papel muy importante en el mantenimiento del equilibrio ecosistémico de la quebrada Ulta.

2.3. Definición de términos básicos

- Genbank: es una base de datos electrónica mantenida por el “National Center for Biotechnology Information” de los Estados Unidos de América; contiene más de un billón de secuencias anotadas y con referencia cruzada con otras bases de datos. Los científicos pueden enviar sus secuencias de ADN al Genbank gratuitamente a través de su web (Hars, 2003).
- Barcode of Life Data Systems (BOLDSYSTEM): es un repositorio de búsqueda para registros de códigos de barras, que almacena datos e imágenes de muestras, así como secuencias y archivos de rastreo. Barcode of Life Data Systems (BOLDSYSTEM, 2020).
- Consortium for the Barcode of Life (CBOL): es una iniciativa internacional dedicada a apoyar el desarrollo de códigos de barras de ADN como un estándar global para la identificación de especies. (CBOL,2009).
- NeighborJoining: Método propuesto en 1987 por Saitou y Masatoshi Nei, que produce la unión de los OTU's más cercanos (vecinos) tratando de minimizar la longitud total del árbol (Becerra, 2020)
- Clado: Grupo monofilético de organismos; agrupación que incluye la forma ancestral y todos sus descendientes (Hars, 2003).
- Especies crípticas: Dos o más especies distintas que no son distinguibles morfológicamente; son especies “ocultas” debido a que llevan el mismo nombre científico—hasta el momento en que son identificadas como entidades diferentes (Bickford y otros, 2007).
- Especies hermanas o taxa hermanos: Dos taxa que son derivados del mismo ancestro común inmediato y por lo tanto comparten muchas características. Asimismo, en inglés se utiliza el término Sibling species para referirse a especies crípticas que son hermanas—es decir dos especies que son recíprocamente los parientes más cercanos pero que, taxonómicamente, no han sido distinguidas una de la otra (Bickford y otros, 2007).

- Filogenia: Se refiere a la historia de linajes de organismos conforme estos cambian a través del tiempo; la filogenia puede estar basada en cambios genéticos, morfológicos u otros aspectos biológicos de los taxa estudiados (Hars, 2003).
- Gen: Unidad básica hereditaria, transmitida por un ancestro a sus descendientes; secuencia de nucleótidos heredados como una unidad; un gen puede tener una o más formas alternativas, denominadas alelos (Avice J, 2000).
- Monofilético (ver también Clado): Se refiere al agrupamiento de organismos que comparten un ancestro común, es decir incluye la forma ancestral y todos sus descendientes (Avice J, 2000).
- Taxón (pl. Taxa): Grupo formado por una o más poblaciones de organismos considerados como una entidad diferente a otras entidades dentro del mismo nivel de organización biológica (especie, género, familia, etc.); agrupamiento de organismos reconocido por los taxónomos como una unidad independiente (Avice J, 2000).
- Secuenciación del ADN: consiste en determinar en qué orden se disponen los cuatro nucleótidos (A, T, C y G) que componen la molécula (Sanger, 1988).
- Diversidad Biológica: que representa a la diversidad de la vida en todos sus niveles incluyendo la diversidad de genes, especies y ecosistemas (Stork, 1993).
- Poliploide: La poliploidía es la duplicación de juegos completos de cromosomas básicos y puede ser o no un proceso complementario a la hibridación. (Flores y otros, 2020).

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de Investigación

- Descriptiva: Este tipo de investigación ha permitido describir la situación real de las plantas altoandinas amenazadas en la quebrada Ulta, en base a un análisis taxonómico y molecular, utilizando como herramienta los códigos de barra de ADN

3.2. Diseño de Investigación

- Se empleó un diseño del tipo descriptivo simple, dado que el objeto de estudio fueron obtener los códigos de barras de las plantas altoandinas contenidas amenazadas.

3.3. Métodos o técnicas

Se identificó especies amenazadas empleando la técnica códigos de barra de ADN, tal como se puede apreciar en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4. Métodos y técnicas de identificación empleando los Códigos de barra de ADN

ETAPAS	TÉCNICAS
Elaboración del registro referencial de las especies de flora altoandina amenazadas de la quebrada Ulta,	<ul style="list-style-type: none">• Análisis de documentos• Identificación morfológica tradicional de las muestras de referencia, validado por el Dr. Percy Olivera Gonzales.• Herborización de las muestras de referencia.
Elaboración de los códigos de barra de ADN referencial de algunas especies altoandinas amenazadas de la quebrada Ulta	<ul style="list-style-type: none">• Aplicación de las diferentes técnicas de biología molecular para obtener el material vegetal, como los protocolos de extracción, amplificación• Aplicación de las técnicas computacionales para el manejo y análisis de las secuencias obtenidas por biología molecular. Tales como programa MEGA7 (Tamura y otros, 2011) usando la metodología del Neighbor-

ETAPAS	TÉCNICAS
	Joining con 1000 Bootstraps, y el programa Kimura 2-parámetros.
Identificación de la zona de muestreo y colecta de especies amenazadas	<ul style="list-style-type: none"> • Se identificó áreas representativas como: accesibilidad, presión antrópica
Colecta de ejemplares de las especies altoandina amenazadas de la quebrada Ulta.	<ul style="list-style-type: none"> • Se usó la metodología por cuadrantes y aleatorio simple
Se efectuó la identificación taxonómica molecular de las especies altoandina amenazadas de la quebrada Ulta utilizando los códigos de barra de ADN.	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicación de las diferentes técnicas de biología molecular para obtener el material vegetal, como los protocolos de extracción, amplificación • Aplicación de las técnicas computacionales para el manejo y análisis de las secuencias obtenidas por biología molecular. Tales como programa MEGA7 (Tamura y otros, 2011) usando la metodología del Neighbor-Joining con 1000 Bootstraps, y el programa Kimura 2-parámetros.

3.4. Población y muestra

3.4.1. Población

Plantas altoandinas amenazadas de la quebrada Ulta, del Parque Nacional Huascarán, de acuerdo al decreto supremo N° 043-2006-AG.

3.4.2. Muestra

Especies amenazadas del género *Gentianella*, *Perezia*, y *Polylepis*, de acuerdo al decreto supremo N° 043-2006-AG., tales como: *Gentianella weberbaueri* (endémica), *Gentianella thyrsoides* (Vu), *Perezia coerulescens* (Vu), *Perezia pinnatifida* (Vu), *Polylepis incana* (CR), *Polylepis racemosa* (CR), *Polylepis weberbaueri* (Vu) y *Polylepis sericea* (Vu).

3.5. Procesamiento y elaboración de los códigos de barra de ADN

3.5.1. Preparación del herbario e identificación taxonómica morfológica de las especies de referencia.

El registro referencial se realizó mediante la identificación morfológica tradicional de aquellas especies amenazadas en estudio de acuerdo al Decreto Supremo N° 043-2006-AG., tal como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Especies amenazadas en estudio

Especies	Condición
<i>Gentianella weberbaueri</i> (Gilg)	Endémica
<i>Gentianella thyrsoides</i> (Hook.)	Vulnerable
<i>Perezia coerulescens</i> (Weed.)	Vulnerable
<i>Perezia pinnatifida</i> (Bonpl.)	Vulnerable
<i>Polylepis incana</i> Kunth	Crítico
<i>Polylepis racemosa</i> (Ruiz y Pavon)	Crítico
<i>Polylepis sericea</i> (Wedd)	Vulnerable
<i>Polylepis weberbaueri</i> (Ruiz y Pavon)	Vulnerable

Fuente: DS-043-2006-AG

De igual modo se colectó 5 especies emparentadas que tienen similar hábitat, que provienen de plantas herborizadas de anteriores trabajos del herbario David Smith de la UNASAM, autenticados por el Biólogo el Dr. Percy Olivera Gonzales.

La colecta de muestras de referencia se realizó en diferentes lugares, tal como se aprecia en la Tabla 6.

Tabla 6. Información de colecta de las muestras de referencia

Código de herbario	Nombre científico	Fecha de colecta	País	Departamento	Zona	Sector	Sitio exacto	Latitud	Longitud	Elevación (msnm)
UNASAM-HDS-132	<i>Perezia coerulescens</i>	10/11/2015	Perú	Ancash	Huaraz	Market	Comprada en el mercado Chaywa, Huaraz	-9.53591	-77.53303	3036
UNASAM-HDS-133	<i>Perezia multiflora</i>	10/11/2015	Perú	Ancash	Huaraz	Market	Comprada en el mercado Chaywa, Huaraz	-9.53591	-77.53303	3036
UNASAM-HDS-134	<i>Perezia pinnatifida</i>	10/11/2015	Perú	Ancash	Huaraz	Market	Comprada en el mercado Chaywa, Huaraz	-9.53591	-77.53303	3036
UNASAM-HDS-135	<i>Gentianella weberbaueri</i>	10/11/2015	Perú	Ancash	Parque Nacional Huascarán	Quebrada Ulta	Punta olímpica	-9.1299267	-77.516638	4860
UNASAM-HDS-136	<i>Gentianella tristicha</i>	10/11/2015	Perú	Ancash	Parque Nacional Huascarán	Laguna Sulla	Punta olímpica Conchucos	-9.137283	-77.496420	4435
UNASAM-HDS-137	<i>Gentianella thyrsoides</i>	10/11/2015	Perú	Ancash	Huaraz	Market	La muestra fue comprada en el mercado Chaywa.	-9.53591	-77.53303	3036
UNASAM-HDS-138	<i>Gentianella sp.</i>	26/07/2014	Perú	Ancash	Parque Nacional Huascarán	Quebrada Churup	Camino a Churup	-9.499600	-77.449837	3829
UNASAM-HDS-139	<i>Gentianella sp.</i>	26/07/2014	Perú	Ancash	Parque Nacional Huascarán	Quebrada Churup	Camino a Churup	-9.499601	-77.449838	3830
UNASAM-HDS-140	<i>Gentianella sp.</i>	26/07/2014	Perú	Ancash	Parque Nacional Huascarán	Quebrada Churup	Camino a Pitec	-9.500383	-77.451614	3800
UNASAM-HDS-141	<i>Polylepis incana</i>	05/04/2019	Perú	Ancash	Parque Nacional Huascarán	Quebrada Quilcayhuanca	Vivero	-9.499237	-77.418001	3826
UNASAM-HDS-142	<i>Polylepis sericea</i>	05/04/2019	Perú	Ancash	Parque Nacional Huascarán	Quebrada Quilcayhuanca	Vivero	-9.499237	-77.418001	3826
UNASAM-HDS-143	<i>Polylepis weberbaueri</i>	05/04/2019	Perú	Ancash	Parque Nacional Huascarán	Quebrada Quilcayhuanca	Vivero	-9.499237	-77.418001	3826
UNASAM-HDS-144	<i>Polylepis racemosa</i>	05/04/2019	Perú	Ancash	Parque Nacional Huascarán	Quebrada Quilcayhuanca	Vivero	-9.499237	-77.418001	3826

3.5.2. Análisis genético de las muestras de referencia para obtener los códigos de barra de ADN.

3.5.2.1. Extracción del ADN vegetal de las muestras de referencia

La extracción de ADN de las muestras se realizó a partir de las hojas frescas o deshidratadas en sílice y se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo del fabricante especificado en el Kit AxyPrep Multi source Genomic Miniprep (Axigen).

3.5.2.2. Amplificación de las regiones ITS2, rbcL, matK

La amplificación de las regiones rbcL, matK e ITS, se realizaron mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de acuerdo a la metodología descrita por Tamariz y otros, (2014).

Las reacciones de amplificación se prepararon para un volumen de 30µl y los componentes de la PCR, tales como tampón 10X, nucleótidos, BSA y cebadores fueron preparados de tal forma que completen el volumen requerido para la premezcla de reacciones de amplificación, tal como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Componentes para las reacciones de amplificación

Master Mix	
Producto	1 x de 30 µl
H ₂ O	20.25
Buffer 10x	3
Dntp (2mM)	3
Forwad (10µm)	0.3
Reverse (10µm)	0.3
Dream Taq (5µm)	0.15
DNA (1ng/ µl)	3
Vol. Total	30

El programa básico definido en el termociclador fue: desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, 20 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos, y elongación final de 72°C por 5 minutos.

3.5.2.3. Alineamiento de las secuencias y análisis filogenético

Los productos de la PCR que mostraron únicas bandas al ser revelados en bromuro de etidio en gel de agarosa al 1 %, fueron las que se enviaron a MACROGEN en Corea para su secuenciación.

Obtenidas las secuencias se realizó una búsqueda en la base de datos del GENBANK, con la finalidad de comprobar que las secuencias obtenidas eran similares o iguales a otras de la misma especie o género, además de asegurarnos que correspondan a la región correcta según los datos y de esta forma obtener nuestras secuencias consenso para su posterior alineamiento.

El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el programa CLUSTALX version 2.0 (Larkin y otros, 2007). Por último, el árbol filogenético se elaboró con el programa MEGA7 (Tamura y otros, 2011) usando la metodología del Neighbor- Joining con 1000 Bootstraps, y el programa Kimura 2-parámetros.

3.5.3. Muestreo y colecta de las especies amenazadas de la quebrada Ulta

3.5.3.1. Área de estudio

La quebrada Ulta, se encuentra en la cara occidental de la Cordillera Blanca del Parque Nacional Huascarán, en el Distrito de Shilla, Provincia de Carhuaz, Departamento de Áncash y pertenece a la microcuenca del Río Buin proveniente de la Cuenca Alta del Río Santa. El punto más bajo de colecta está a una elevación de 3847 m.s.n.m., con

latitud -9.500383, longitud -77.451614 y el punto más alto se encuentra a una elevación de 4860 m.s.n.m., con latitud -9.1299267, longitud – 77.516638. La Figura 2, muestra el mapa de ubicación del área de estudio.

Posee dos tipos de zona de vida, Paramo pluvial andino tropical y Nival tropical (ONERN,1976). Geológicamente comprende dos tipos de zona, fluvioglacial y coluvial (Plan Maestro, 2010-2015).

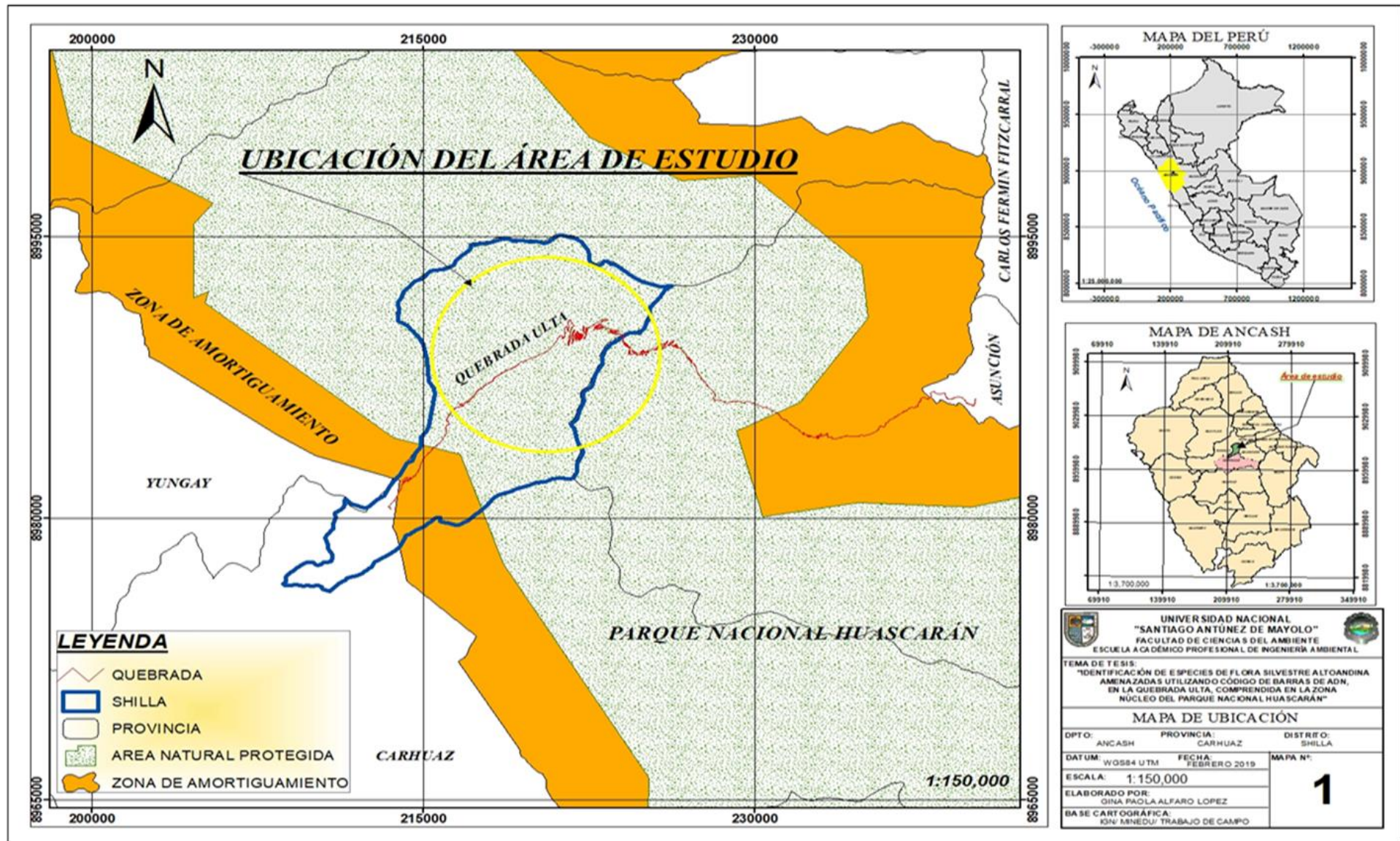


Figura 2. Mapa de Ubicación Geográfica de la Quebrada Ulta

3.5.3.2. Muestreo y Colecta

Se hizo dos salidas de campo con la finalidad de tener un mejor reconocimiento en cuanto al acceso, pendiente y mayor vegetación, realizándose extensos recorridos y tomando las coordenadas, para tener mayor precisión al momento de realizar el muestro y colecta de los ejemplares de las especies en amenaza y asociadas a ellas.

La colecta y muestreo de ejemplares se realizó el mes de abril del 2019, empleando la metodología por cuadrantes, el cual consiste en colocar un cuadrado sobre la vegetación, para determinar la densidad, cobertura y frecuencia de las plantas, además de ser una de las formas más comunes y homogéneas de muestreos de vegetación, porque tiene menos impacto de borde en comparación con la metodología por transectos (Mostacedo, 2000).

Se colectaron ejemplares de manera tradicional, es decir en base a sus caracteres morfológicos, como flores, frutos y partes vegetativas, se colectó también a aquellas especies que presentaron similitudes parecidas y que posiblemente era una especie en amenaza según estudio, pero que no se pudo identificar, porque no presentó características morfológicas a la vista.

Cada ejemplar colectado fue prensado para su secado y posterior herborización y de aquellas especies que no se pudo reconocer se extrajo una muestra representativa y se colocó en una bolsa con contenido de sílice, anotando sus datos de colecta, para su posterior reconocimiento utilizando como herramienta los Códigos de barra de ADN.

Para el muestreo de plantas herbáceas, se utilizó un cordel de hilo separados por 1m., luego se ubicó un área de 25 m² y se dividió en cuadrantes de 1m. x 1m., en seguida se escogió al azar tres cuadrantes y se colectó las posibles especies amenazadas y asociadas a ellas. La Figura

3, muestra la colecta de ejemplares mediante el método por cuadrantes y aleatorio simple



Figura 3. Muestreo por cuadrantes y aleatorio simple.

Para el muestreo de plantas arbóreas, se utilizó un cordel de hilo separados por 5m., luego se ubicó un área de 625 m² y se dividió en cuadrantes de 5m. x 5m., en seguida se escogió al azar tres cuadrantes y se colectó las posibles especies amenazadas y asociadas a ellas.

3.5.3.3. Identificación de las muestras amenazadas colectadas de la quebrada Uta utilizando como herramienta los códigos de barra de ADN de referencia

Aquellas especies que no se pudieron identificar en campo y presentaron igual similitud morfológicamente, se les preparo su código de barra de ADN para compararlas con los códigos de barra de ADN de referencia depositados en el BOLDSYSTEM.

Se hizo la extracción y amplificación usando un marcador molecular y se envió a secuenciar (MACROGEN Corea). Posterior a ello se hizo el análisis bioinformático para obtener las secuencias consenso, de tal forma que se pudo hacer la discriminación y comparación con los códigos de

barra de ADN de referencias depositadas en el BOLDSYSTEM (www.boldsystems.org/) y GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con la finalidad de verificar que nuestra secuencia consenso corresponda posiblemente a las muestras colectadas.

A partir de las secuencias que presentaron mayor porcentaje de similitud con secuencias en GenBank mediante el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y las muestras de referencia preparadas en éste trabajo se elaboraron los árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA 7, siguiendo el método Neighbor-Joining y el modelo de sustitución parámetros de Kimura (K2P) (Kimura, 1980).

IV. RESULTADOS

4.1. Preparación del registro referencial de las especies de flora altoandina amenazadas de la quebrada Uta

Se prepararon las muestras de referencia para las 8 especies en amenaza y 5 especies emparentadas que tienen similar hábitat, tal como se aprecia en la Tabla 8. Éstas fueron herborizadas y depositadas en el Herbario David Smith de la UNASAM, para su posterior elaboración de sus códigos de barra de ADN de referencia.

Tabla 8. Especies utilizadas para la elaboración de los códigos de barra de ADN

Especies	Condición	Especie emparentada
<i>Gentianella weberbaueri</i>	Endémica	<i>Gentianella sp.45</i>
<i>Gentianella thyrsoidea</i>	Vulnerable	<i>Gentianella sp. 50</i>
<i>Perezia coerulescens</i>	Vulnerable	<i>Gentianella sp.55</i>
<i>Perezia pinnatifida</i>	Vulnerable	<i>Gentianella tristicha</i>
<i>Polylepis incana</i>	Crítico	<i>Perezia multiflora</i>
<i>Polylepis racemosa</i>	Crítico	
<i>Polylepis sericea</i>	Vulnerable	
<i>Polylepis</i>	Vulnerable	

4.2. Análisis taxonómico molecular de las especies de referencia amenazadas y obtención de las secuencias de los códigos de barras de ADN

No todas las especies tuvieron éxito en la amplificación. La Figura 4 muestra las bandas inespecíficas y con barrido de la región ITS de las especies del género *Polylepis* al ser revelado en gel de agarosa. Pero cuando se realizó el secuenciamiento *P. incana*, mostró una lectura con abundante ruido, que no pudo ser utilizada para la elaboración de su código de barra ITS2.

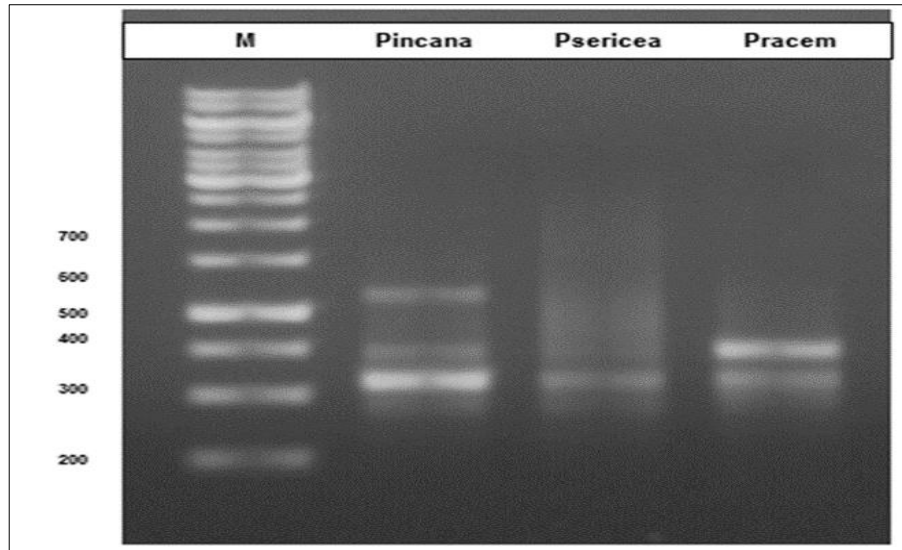


Figura 4. Gel de electroforesis de los productos de PCR de la región ITS2

Nota: Bandas dobles e inespecíficas con barrido de las muestras de las especies del género *Polylepis*, debido al exceso de ADN o temperatura baja.

A diferencia de los *Polylepis*, las especies de *Gentianella* y *Perezia* mostraron bandas nítidas y definidas para todos los marcadores usados en este trabajo, característica principal de una buena amplificación, porque no existen bandas duplicadas o barridas. La Figura 5 muestra el gel de electroforesis obtenido con el marcador *rbcl*, con el tamaño aproximado de 600 pb. que corresponde a esta región.

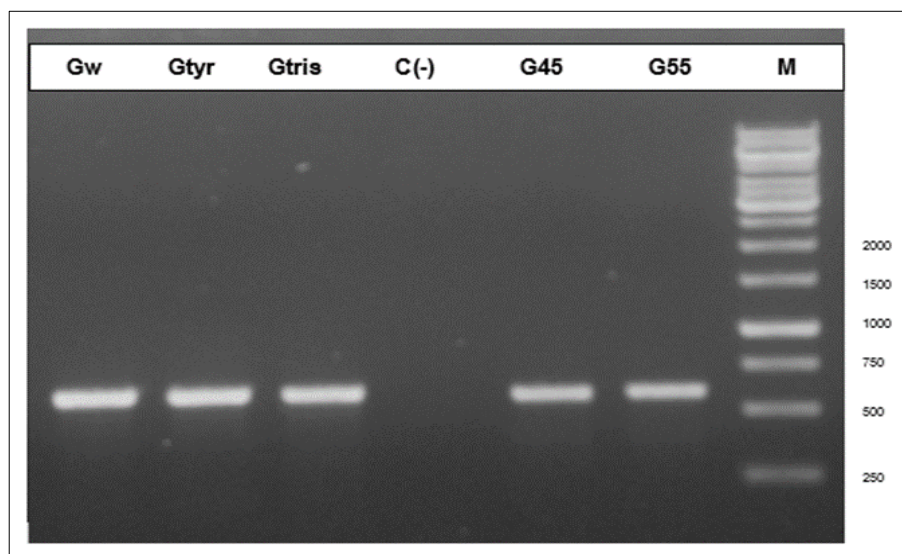


Figura 5. Gel de electroforesis de los productos de PCR de la región *rbcl* de las muestras de *Gentianella*

Nota: C. (-) es el control negativo, M es el marcador de tamaño en pb (pares de bases). Aquí se observa que la amplificación es correcta; ya que las bandas son nítidas, bien definidas, no muestran barridos y el tamaño aproximado de 600 pb., que corresponde a la región rbcL.

Posterior a ello, se prepararon los códigos de barra de DN de las regiones rbcL, matK e ITS2. El anexo 1 muestran la información taxonómica y las secuencias que fueron incorporadas a la plataforma Boldsystem (www.boldsystems.org/) para el registro de la información taxonómica y las secuencias de las regiones de ADN secuenciados.

Así mismo, se realizó el análisis filogenético usando el programa MEGA v.7 (Tamura y otros, 2011), el cual posee algoritmos para realizar las estimaciones de distancia y construcción de árboles filogenéticos; se utilizaron secuencias de la misma especie y género de ADN almacenadas en las plataformas virtuales: Boldsystem (www.boldsystems.org/) y GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

De acuerdo a la búsqueda realizada se encontró que las especies evaluadas no contaban o tenían escasos registros en las plataformas virtuales, lo cual dificultó la elaboración de los árboles filogenéticos. Para el caso del género *Gentianella* los registros que se encontraron para la especie *Gentianella thyrsoides* (Vu) fueron escasos o son otras regiones a las utilizadas en este trabajo. La Tabla 9 muestra el registro de las especies evaluadas en el Genbank y Boldsystem

Tabla 9. Registros de las especies evaluadas en Genbank y Boldsystem

BOLDSYSTEM	GENBANK
<i>Perezia coerulescens</i> ITS2	<i>Perezia pinnatifida</i> voucher Moreira & Luebert, maturase K (matK)
<i>Perezia pinnatifida</i> ITS2	<i>Perezia pinnatifida</i> voucher GH:Hutchison, ITS1, ITS2
<i>Perezia multiflora</i> ITS2	<i>Perezia multiflora</i> sonchifolia voucher Bonifacino, ITS1, ITS2
<i>Gentianella thyrsoides</i> ITS2	voucher GH: M. Madison, ITS1, ITS2
<i>Polylepis sericea</i> ITS2	<i>Polylepis racemosa</i> subsp. triacontandra isolate ITS1, ITS2
	<i>Polylepis sericea</i> , ITS1, ITS2

4.3. Análisis Filogenético Molecular de la región rbcL, para los 3 géneros pertenecientes a las familias: Gentianacea, Asteracea, Rosacea

Para el caso de la región rbcL se preparó un único árbol filogenético. La figura 8 muestra todas las especies evaluadas, adicionando las secuencias obtenidas de Boldsystem y/o Genbank que se muestran en la Tabla 9.

Se observa que el árbol define tres familias correspondientes a las familias de las especies evaluadas. También se observa que este marcador no diferencia a las especies del mismo género

Tabla 10. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético de la región rbcL

Familia	Especie	Número de Acceso de Genbank
Asteraceae	<i>Perezia carthamoides</i>	EU841130
	<i>Perezia carthamoides</i>	EU841130
	<i>Perezia recuvata</i>	KM192098
	<i>Perezia pedicularidifolia</i>	EU841131
Gentianaceae	<i>Swertia chirayita</i>	KJ667624
	<i>Gentianella amarella</i>	KX679011
Rosaceae	<i>Prunus persica</i>	JF943749
	<i>Prunus mume</i>	JF43748
Cucurbitacea	<i>Citrillus lanatus</i> S.S Renner	DQ535745
	<i>Pinus Ponderosa</i>	KCI156882

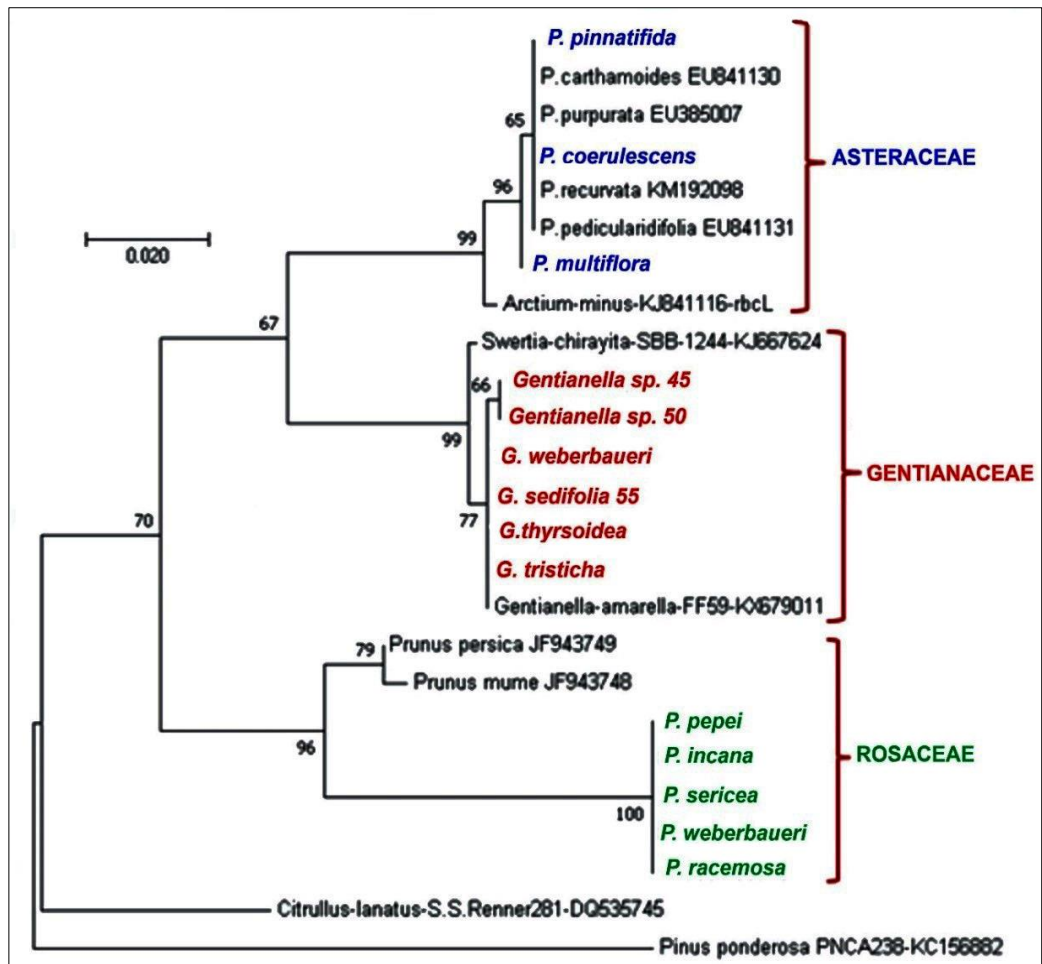


Figura 6. Árbol filogenético molecular de la región rbcL de las 3 familias

Nota: La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980). Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (1530.20). El porcentaje de árboles en el que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque Maximum Composite Likelihood (MCL) y luego seleccionando la topología con un valor de verosimilitud log superior. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 503 posiciones en el conjunto de datos final. Se realizaron análisis evolutivos en MEGA7 (Kumar y otros, 2016).

4.4. Análisis filogenético molecular de las muestras de referencia por cada género utilizando las regiones matK e ITS

4.4.1. Análisis filogenético de especies del género *Gentianella* utilizando la región ITS

La Figura 7, muestra el árbol filogenético de las *Gentianellas* evaluadas usando el marcador ITS2, se observa que la especie *G. weberbaueri*, que es una especie vulnerable y endémica de nuestro

país muestra cierto grado de diferenciación con las demás especies evaluadas. También, se ha observado que en las plataformas virtuales, en términos generales para las plantas, existen mayor número de registros para la región ITS, comparado con la región matK. La tabla 11 muestra las especies extraídas de la plataforma virtual para complementar el árbol filogenético.

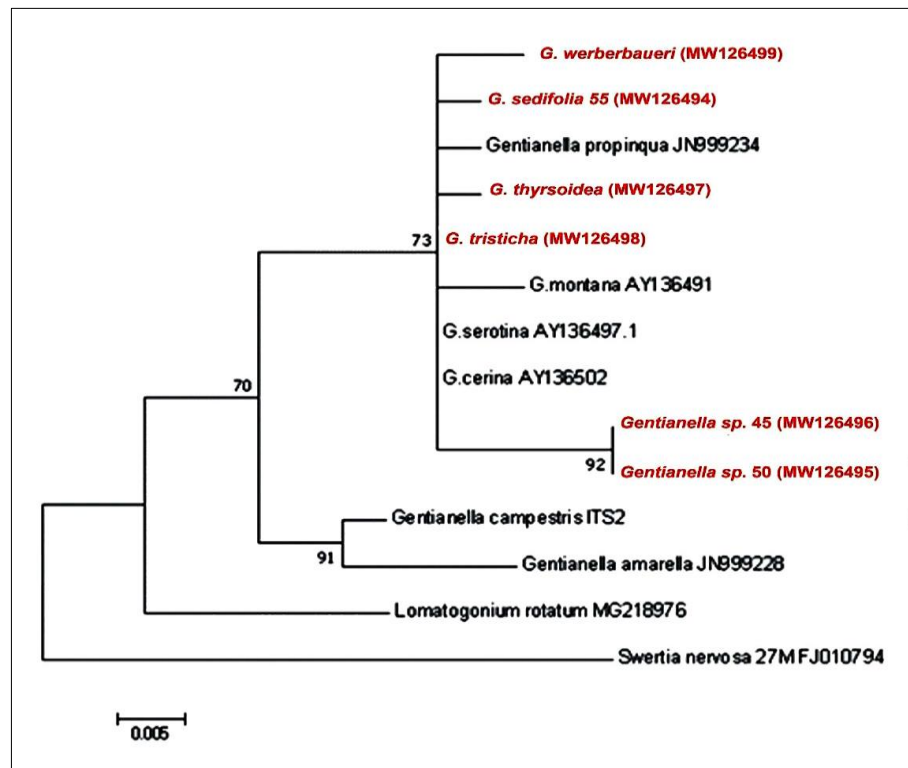


Figura 7. Árbol filogenético molecular de la región ITS del género *Gentianella*

Nota: Se muestra el número de sustituciones de bases por sitio a partir del promedio de todos los pares de secuencias. Las estimaciones de error estándar se obtuvieron mediante un procedimiento de arranque (1000 réplicas). Los análisis se realizaron utilizando el modelo de máxima probabilidad compuesta. El análisis involucró 14 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 313 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7.

Tabla 11. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético

Familia	Especie	Número de Acceso de Genbank
Gentianaceae	<i>Gentianella propinqua</i>	JN999234
	<i>G. montana</i>	AY36491
	<i>G. serotina</i>	AY136497
	<i>Gentianella amarella</i>	JN999228
	<i>G. cerina</i>	AY136502

4.4.2. Análisis filogenético de especies del género *Gentianella* utilizando la región matK

En la Figura 10, se muestra el árbol filogenético con el marcador matK, donde la diferencia entre *Gentianella weberbaueri* y *Gentianella tristicha* es muy ligera. Así mismo, de acuerdo al análisis de divergencia evolutiva realizada con el MEGA7, se encontró que la media de divergencia del marcador ITS2 (0.028) es mayor que con el matK (0.01), lo cual nos indica que el marcador ITS2 podría tener mayor resolución de identificación. La Tabla 11 se muestra las especies extraídas de la plataforma virtual para complementar el árbol filogenético.

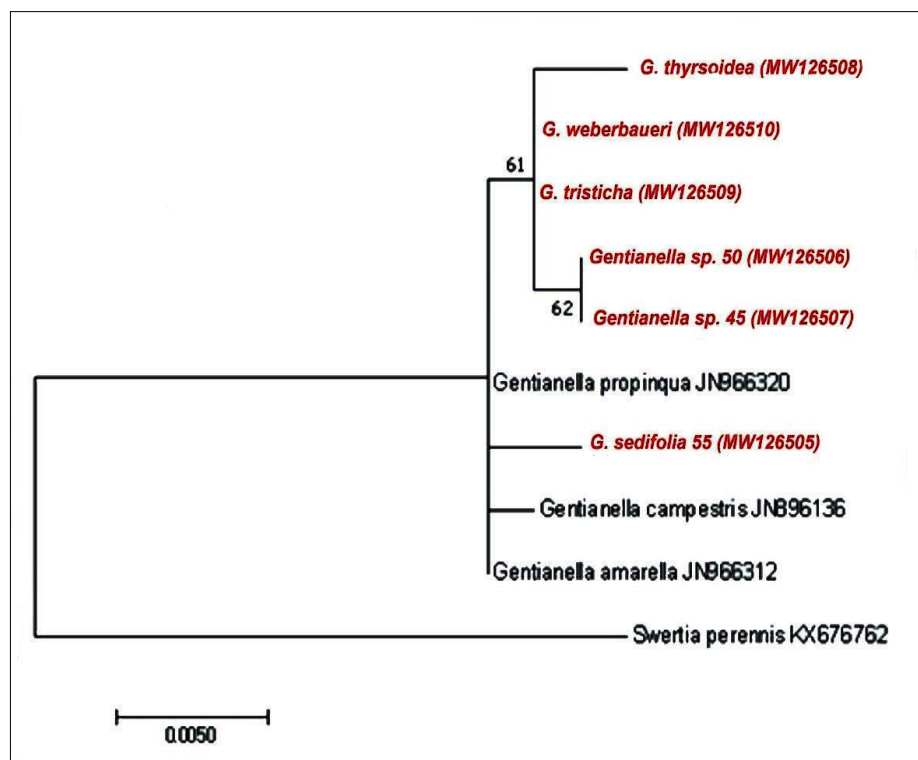


Figura 8. Árbol filogenético del género *Gentianella* utilizando la región matK

Nota: Se muestra el número de sustituciones de bases por sitio a partir del promedio de todos los pares de secuencias. La estimación de error estándar se obtuvo mediante un procedimiento de arranque (1000 repeticiones). Los análisis se realizaron utilizando el modelo de máxima verosimilitud compuesta. El análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 655 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA7.

Tabla 12. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético

Familia	Especie	Número de Acceso de Genbank
Gentianaceae	<i>Gantianella propinqua</i>	JN966320
	<i>Gantianella campestris</i>	JN896136
	<i>Gantianella amarella</i>	JN966312
	<i>Swetia perennis</i>	KX676762

4.4.3. Análisis filogenético de especies del género *Perezia* utilizando la región ITS

La figura 9, muestra el árbol filogenético de las especies del género *Perezia*, donde se puede observar que se han formado grupos o clados, de tal forma, que las especies de referencia se diferencian entre ellas. La Tabla 13 se muestra las especies extraídas de la plataforma virtual para complementar el árbol filogenético.

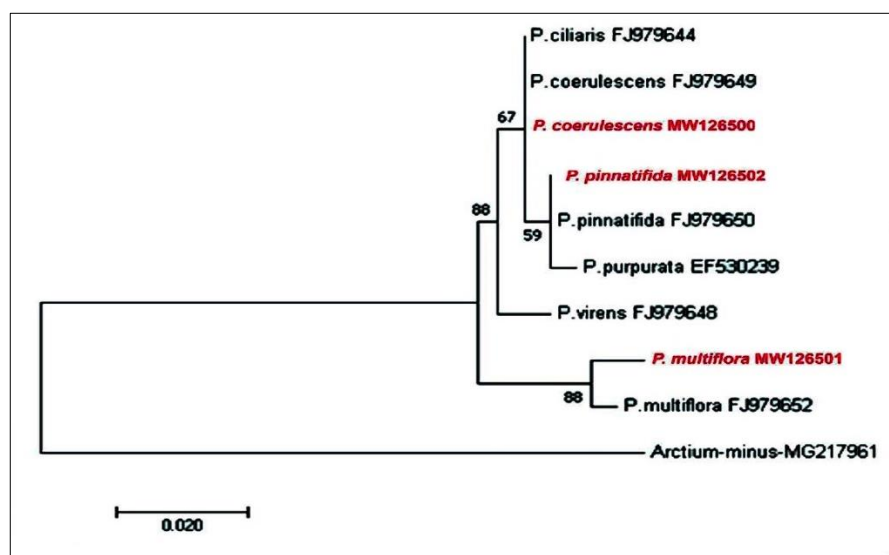


Figura 9. Árbol filogenético del género *Perezia* utilizando la región ITS

Nota: La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud basada en el modelo Kimura de 2 parámetros. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-568.25). El porcentaje de árboles en el que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. La veracidad compuesta máxima (MCL) y luego seleccionando la topología con un valor de verosimilitud log superior. Vecino-Únete y BioNJ a una matriz de distancias por pares. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían

lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 252 posiciones en el conjunto de datos finales. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA7

Tabla 13. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético

Familia	Especie	Número de Acceso de Genbank
Asteraceae	<i>P. ciliaris</i>	FJ979644
	<i>P. coerulescens</i>	FJ979649
	<i>P. pinnatifida</i>	FJ979650
	<i>P. purpurata</i>	EF530239
	<i>P. multiflora</i>	FJ979652

4.4.4. Análisis filogenético de especies del género *Perezia* utilizando la región matK

La figura 12, muestra el árbol filogenético de las especies del género *Perezia* donde se puede observar que las especies de referencia *P. pinnatifida* y *P. coerulescens*, se encuentran dentro de un mismo grupo, lo cual nos indicaría que guardan cierto grado de similitud. La Tabla 13 se muestra las especies extraídas de la plataforma virtual para complementar el árbol filogenético.

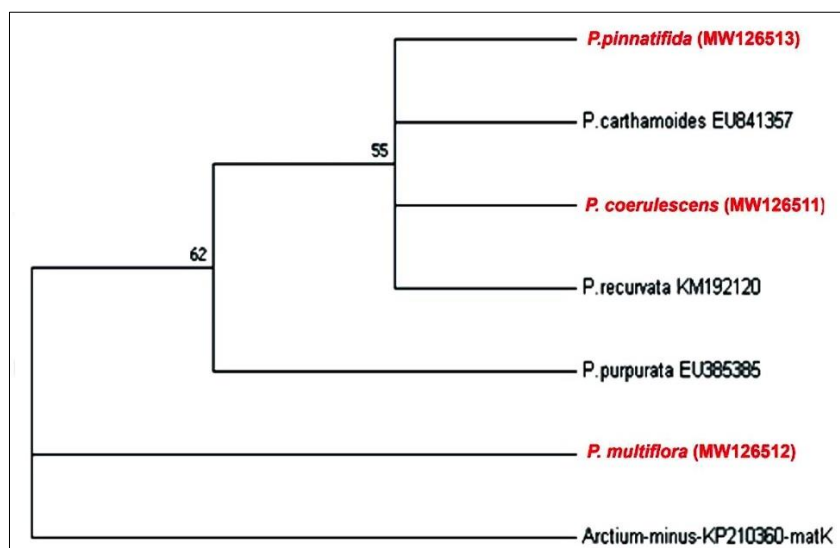


Figura 10. Árbol filogenético del género *Perezia* utilizando la región matK

Nota: Se muestra el número de sustituciones de bases por sitio entre secuencias. Los análisis se realizaron utilizando el modelo de dos parámetros de Kimura. El análisis involucró 7 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones

que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 775 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7.

Tabla 14. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético

Familia	Especie	Número de Acceso de Genbank
Asteraceae	<i>P. cartamoides</i>	EU841357
	<i>P. recurvata</i>	KM922120
	<i>P. purpurata</i>	EU385385
	<i>Arctium-minus</i>	KP210360

4.4.5. Análisis filogenético de especies del género *Polylepis* utilizando la región ITS

El género *Polylepis* es un grupo con muchas hibridaciones, lo que se evidencia en la figura 4 del ítem 4.2, del apartado anterior, donde se observan bandas inespecíficas y con barrido en la región ITS. En este sentido, el secuenciamiento de algunas bandas no necesariamente podrían corresponder a la especie en evaluación tal como se observa en la Figura 11, donde se aprecia que respecto al ITS las especies son polifiléticas y el marcador ITS no sería el más recomendable para estas especies. La Tabla 15 muestra las especies extraídas de la plataforma virtual para complementar el árbol filogenético.

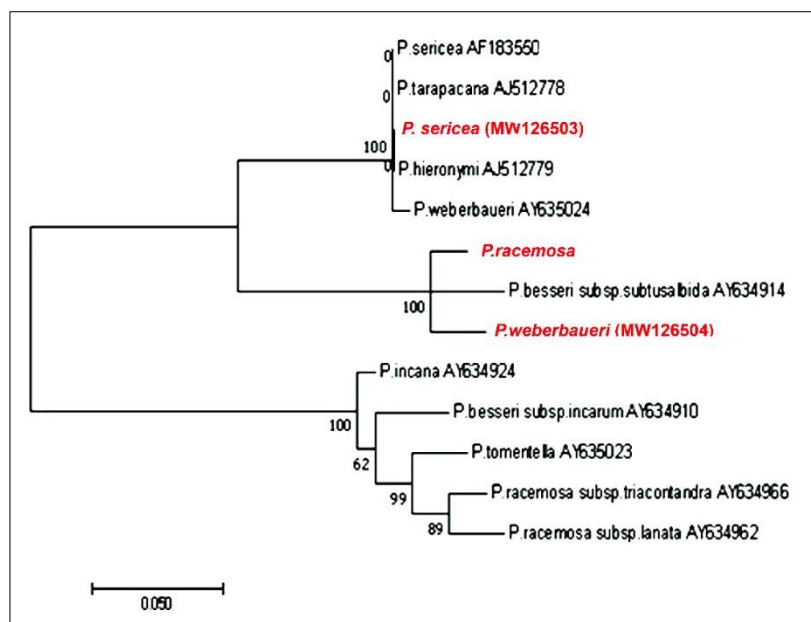


Figura 11. Árbol filogenético de especies del género *Polylepis* utilizando la región ITS

Nota: Árbol filogenético de *Polylepis* usando el gen ITS. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Kimura de 2 parámetros. El análisis involucró 13 secuencias de nucleótidos.

Tabla 15. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético

Familia	Especie	Número de Accesoión de Genbank
Rosaceae	<i>Polylepis sericea</i>	AF183550
	<i>Polylepis tarapacana</i>	AJ512778
	<i>Polylepis hieronymi</i>	AJ512779
	<i>Polylepis weberbaueri</i>	AY635024
	<i>Polylepis besseri</i>	AY634914
	<i>Polylepis incana</i>	AY634924
	<i>Polylepis sub sp. incarum</i>	AY634910
	<i>Polylepis tormentella</i>	AY635023
	<i>Polylepis racemosa triacondantra</i>	AY634966
	<i>Polylepis racemosa lanata</i>	AY34962

4.4.6. Análisis filogenético de especies del género *Polylepis* utilizando la región matK

La figura 12, muestra el árbol filogenético del género *Polylepis*, donde se puede observar que se han formado dos grupos o clados, con

el grupo externo (*Prunus sp.*). Por otro lado, no se han encontrado secuencias del marcador matK de especies del género *Polylepis*. En la rama de *Polylepis sp.*, se observa un grado de diferenciación para las especies *P. weberbaueri* y *P. incana*, la diferencias entre *P. racemosa* y *P. sericea* es muy baja y su identificación podría ser imprecisa, pero puede dar una orientación. La Tabla 16 muestra las especies extraídas de la plataforma virtual para complementar el árbol filogenético.

Tabla 16. Especies extraídas del Genbank para la construcción del árbol filogenético

Familia	Especie	Número de Acceso de Genbank
	<i>Prunus persica</i>	JF955823
Asteraceas	<i>Prunus mume</i>	JF955822

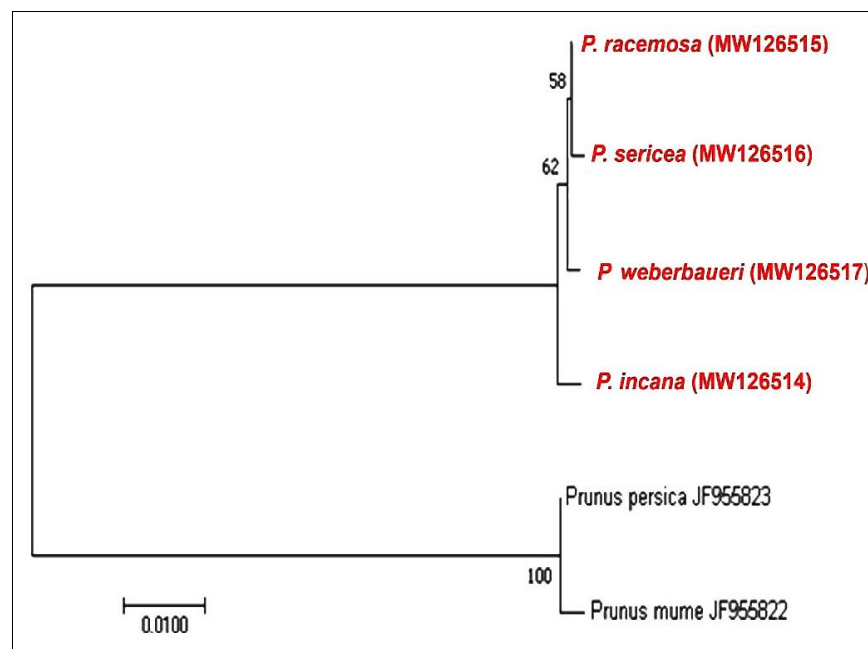


Figura 12. Árbol filogenético de especies del género *Polylepis* utilizando la región matK.

Nota: Árbol filogenético de *Polylepis* usando matK La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Kimura de 2 parámetros. El análisis involucró 6 secuencias de nucleótidos.

4.5. Evaluación del muestreo de especies colectadas de la quebrada Ulta

Uno de los aspectos importantes que se consideró al momento del muestreo y colecta de las especies fueron principalmente, la presión antrópica, sobrepastoreo, extracción de *Polylepis* para leña y extracción de plantas herbáceas (plantas medicinales); debido a que en la quebrada Ulta, el bosque de *Polylepis* está afectado por la tala, las quemas frecuentes en la base del valle y en la parte alta de la quebrada (Alfaro Lozaro y otros, 2011). Además de la degradación causada por el paso continuo de ganado vacuno, el cual ha eliminado la cobertura herbácea del bosque, al punto de no haber casi regeneración (Shoobridge, 2005). Todos estos aspectos han puesto en riesgo muchas de estas especies a tal punto de ponerlas en amenaza.

La figura 13, muestra los puntos de colecta de las especies en amenaza y asociadas a ellas, de igual forma la Tabla 17 muestra las especies colectadas por cuadrante.

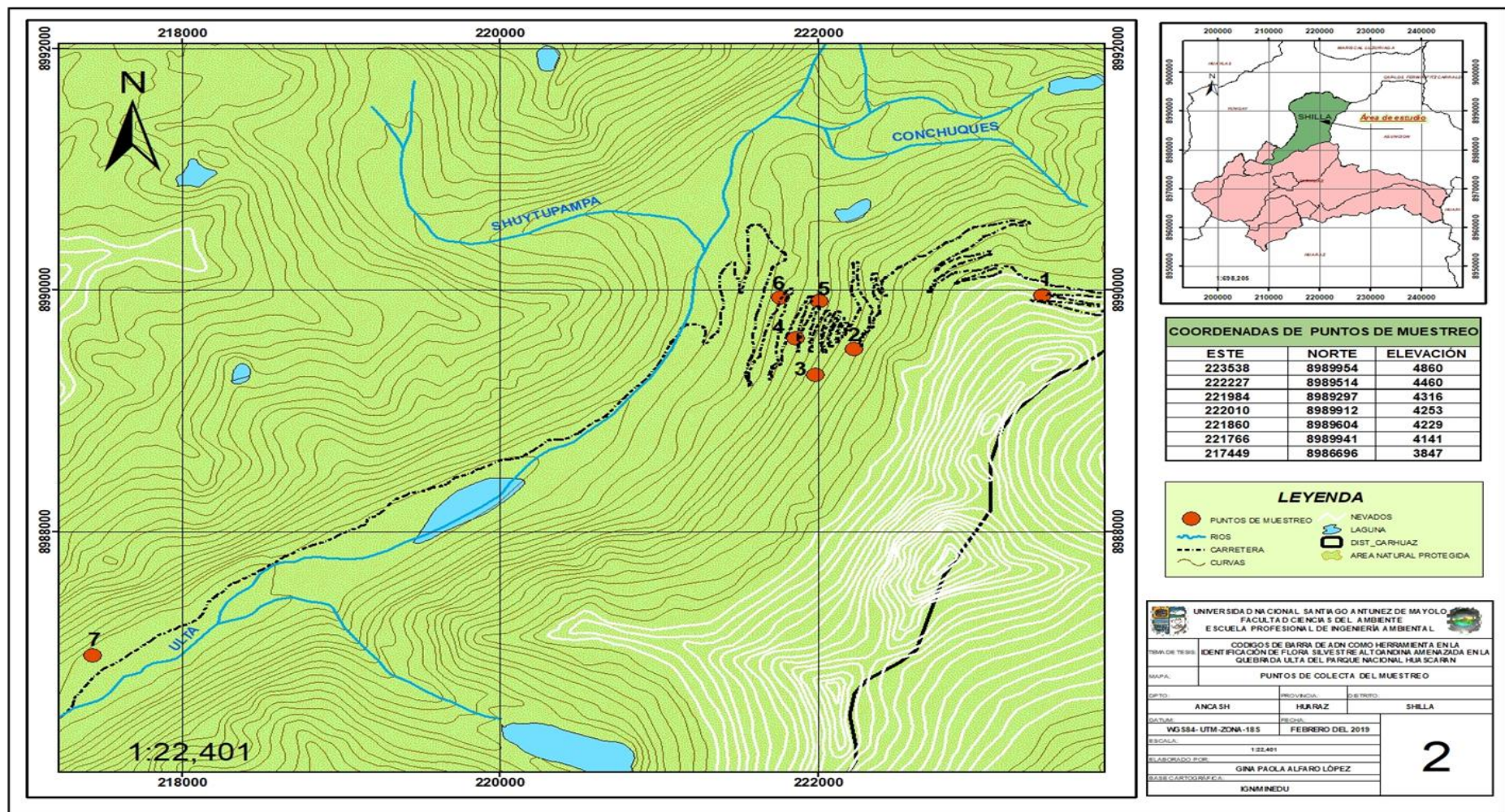


Figura 13. Mapa de coordenadas de los puntos de colecta

Tabla 17. Especies colectadas por cuadrante en la Quebrada Ulta

Cuadrante	Familia	Especie	Densidad
I	Asteráceas	<i>Perezia</i>	28
SUB C I-22	Gentianaceae	<i>Gentianella</i>	2
	Valerianaceae.	<i>Stangea erikae</i>	19
I	Asteráceas	<i>Perezia</i>	22
SUB C I-7	Gentianaceae	<i>Gentianella</i>	2
	Asteraceae	<i>Belloa longifolia</i>	42
	Orobanchaceae	<i>Bartsia sp</i>	9
I	Asteráceas	<i>Perezia</i>	4
SUB C I-10	Gentianaceae	<i>Gentianella</i>	3
	Orobanchaceae	<i>Bartsia sp</i>	4
	Asteráceas	<i>Belloa longifolia</i>	20
II	Rosacea	<i>Polylepis reticulata</i>	1
SUB C II-20	Asteraceae	<i>Senecio klatii</i>	176
	Asteraceae	<i>Senecio</i>	46
II	Rosacea	<i>Polylepis reticulata</i>	5
SUB C II-15	Poaceae	<i>Poaceas</i>	56
	Asteraceae	<i>Senecio klatii</i>	Aprox 506
	Asteraceae	<i>Senecio</i>	53
	Asteráceas.	<i>Werneria</i>	126
	II	Rosacea	<i>Polylepis reticulata</i>
SUB C II-11	Poaceae	<i>Poaceas</i>	142
	Polygonaceae	<i>Muehlenbeckia</i>	8
	Asteraceae	<i>Senecio klatii</i>	50
	III	Rosacea	<i>Polylepis reticulata</i>
SUB C III-1	Asteraceae	<i>Senecio</i>	45% de la
	Rosacea	<i>Hesperomeles</i>	3
	Asteraceae	<i>Gynoxys</i>	10
	Caryophyllaceae	<i>Drymaria sp</i>	15
	III	Rosacea	<i>Polylepis reticulata</i>
SUB C III-11	Alstroemeriaceae	<i>Bomarea sp</i>	9
	Asteraceae	<i>Gynoxys</i>	20
III	Rosacea	<i>Polylepis reticulata</i>	3
SUB C III-22	Asteraceae	<i>Senecio</i>	16
	Asteraceae	<i>Gynoxys</i>	15
	Rosacea	<i>Polylepis sericea</i>	3

Cuadrante	Familia	Especie	Densidad
IV SUB C-I	Crassulaceae	<i>Villadia imbricata</i>	11
	Poaceae	<i>Cortadeira sp</i>	10
	Caryophyllaceae	<i>Drymaria sp</i>	15
	Rosacea	<i>Polylepis sericea</i>	1
	Gentianaceae	<i>Halenia umbellata</i>	3
	Berberidaceae	<i>Berberis lutea</i>	2
	Alstroemeriaceae	<i>Bomarea sp</i>	16
IV SUB C IV-14	Fabaceae	<i>Lupinus</i>	1
	Caryophyllaceae	<i>Drymaria sp</i>	9
	Gentianaceae	<i>Halenia umbellata</i>	7
	Rosacea	<i>Polylepis sericea</i>	2
	Fabaceae	<i>Lupinus</i>	7
V SUB C V-1	Berberidaceae	<i>Berberis lutea</i>	1
	Asteraceae	<i>Ageratina</i>	21
	Piperaceae	<i>Peperomia</i>	20
	Asteraceae	<i>Gynoxis</i>	3
	Rosacea	<i>Polylepis sericea</i>	1
VI SUB VI - 1	Asteraceae	<i>Bidens andicola</i>	3
	Asteraceae	<i>Ageratina</i>	6
	Bromeliaceae	<i>Puya angusta</i>	3 grupos
	Piperaceae	<i>Peperonia</i>	35
	Cactaceae	<i>Opuntia floccosa</i>	3
	Asteraceae	<i>Bidens andicola</i>	5
	Oxalidaceae	<i>Oxalis sp</i>	3
VII SUB C VII- 3	Orchidaceae	<i>Orquídea</i>	16
	Berberidaceae	<i>Berberis lutea</i>	18
	Crassulaceae	<i>Villadia imbricata</i>	15
	Oxalidaceae	<i>Oxalis sp</i>	9
	Poaceae	<i>Cortaderia sp</i>	4
	Asteraceae	<i>Stevia sp</i>	24
	Asteraceae	<i>Bidens andicola</i>	2
Crassulaceae	<i>Solanum sp</i>	2	
Cactaceae	<i>Opuntia floccosa</i>	6	

La figura 14, muestra las familias predominantes por cuadrante, presentando de esta forma la familia de las asteráceas mayor abundancia con un 60.2%; seguido de Bromeliaceae que representa un 15% y con un 10.1% la familia de la Poaceae.

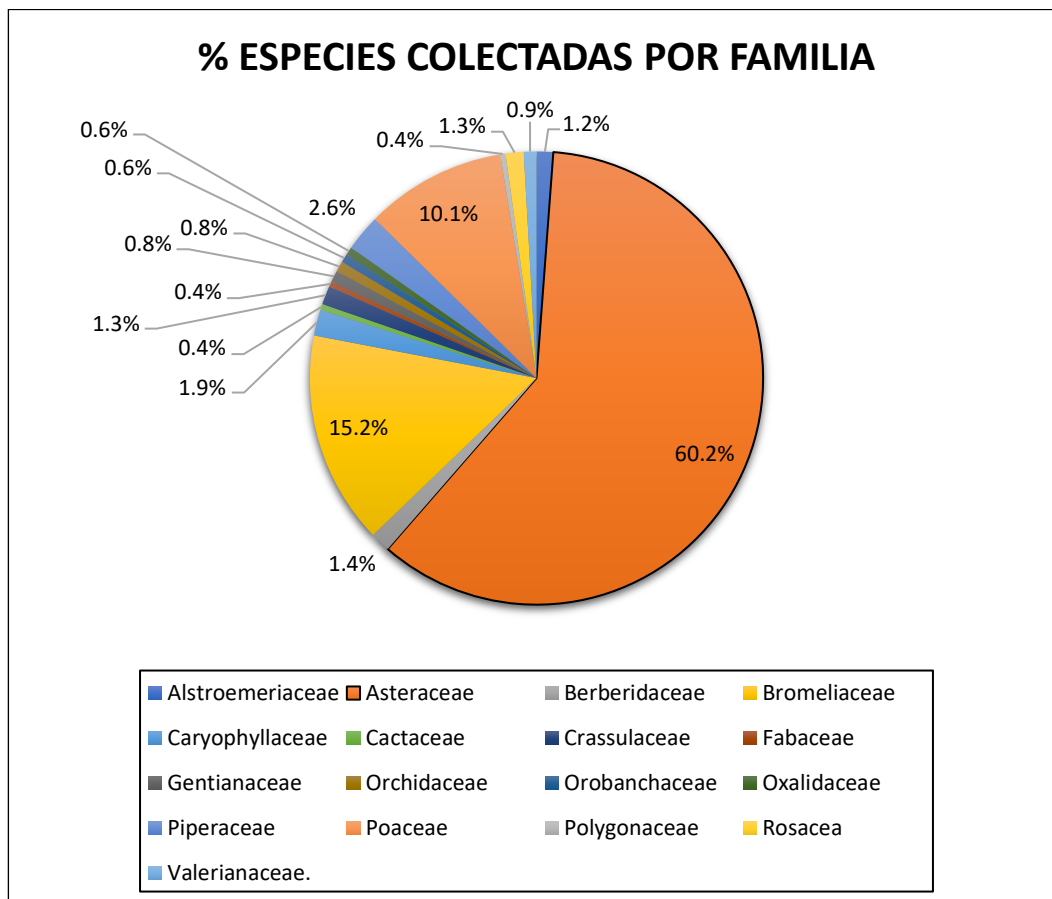


Figura 14. Porcentaje de especies colectadas por familia

Nota: especies colectadas por cuadrante y durante el muestreo

4.6. Identificación taxonómica molecular de especies morfológicamente parecidas de la quebrada Ulta.

4.6.1. Identificación taxonómica molecular de la *Gentianella sp.* usando la región ITS.

La figura 15, muestra el árbol filogenético construido con los códigos de barra de ADN de referencia, especies extraídas del Genbank y los códigos de barra de ADN de aquellas especies que no se pudieron identificar en campo, debido a sus características morfológicas similares. Observamos que el marcador ITS fue el que mejor discriminó

aquellas especies estrechamente relacionadas del género *Gentianella*. Por tanto, el clado formado por la especie referencial *Gentianella weberbaueri* coincide con las especies 3g y 2g colectadas en el muestreo de la quebrada Ulta perteneciente al cuadrante I y que no se pudo identificar en campo.

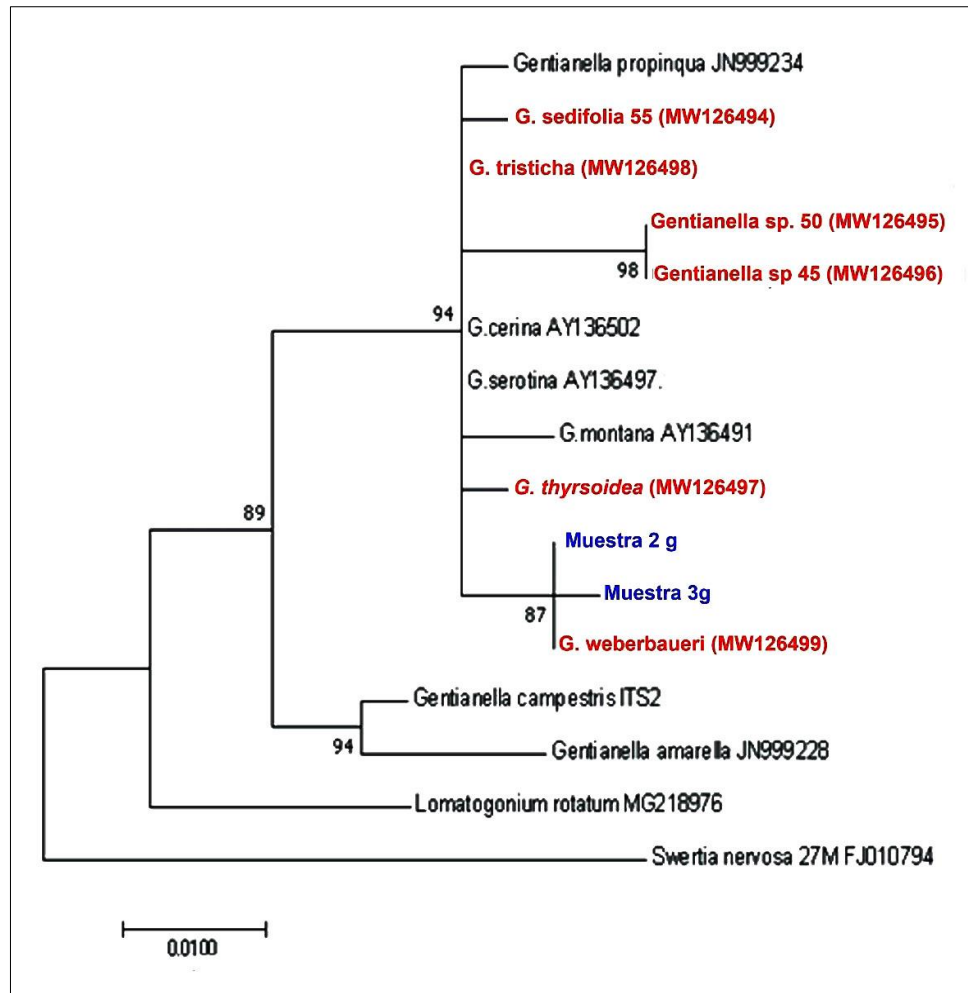


Figura 15. Árbol filogenético de las muestras parecidas a *Gentianella* sp., utilizando la región ITS2

Nota: La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Kimura de 2 parámetros. El análisis involucró 16 secuencias de nucleótidos.

4.6.2. Identificación taxonómica molecular de *Perezia* sp. usando la región matK

La figura 16, muestra el árbol filogenético elaborado en base a los códigos de barra de referencia, códigos extraídos del Genbank y los códigos de ADN de aquellas especies que no se pudieron identificar en

campo, debido a sus características morfológicas similares. Por tanto, la *Perezia coerulescens*, coinciden con la especie 5g y la *Perezia pinnatifida* coincide con la especie 6g, pertenecientes al cuadrante I, sub cuadrante 7 y 10 respectivamente.

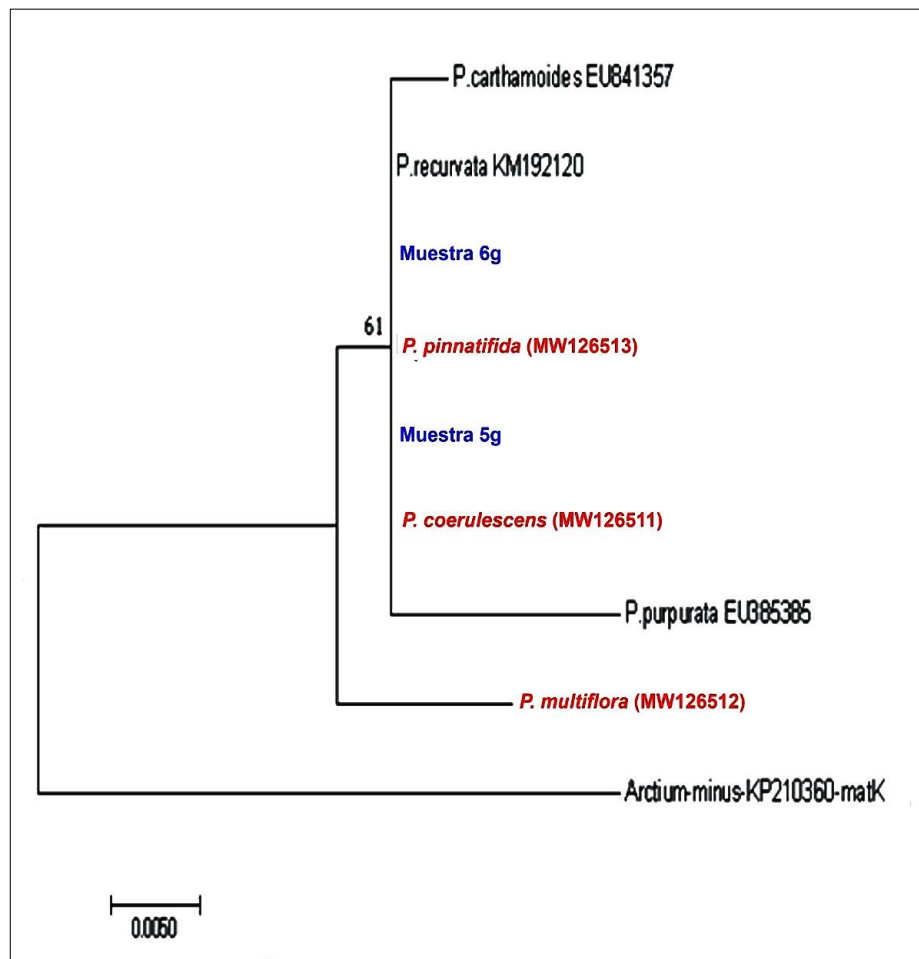


Figura 16. Árbol filogenético de las muestras parecidas al género *Perezia* utilizando la región matK

Nota: La historia evolutiva infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Kimura de 2 parámetros. El análisis involucró 9 secuencias de nucleótidos.

4.6.3. Identificación taxonómica molecular de *Polylepis* usando la región matK

La figura 17, muestra el árbol filogenético elaborado en base a los códigos de barra de referencia, códigos extraídos del Genbank y los códigos de ADN. Utilizando como marcador molecular la región MatK, para hacer una aproximación taxonómica molecular de aquellas especies que no se pudieron identificar en campo, debido a sus

características morfológicas similares. Por tanto, las muestras 8g y 4g colectadas del cuadrante III, sub cuadrante I, pertenece a la misma especie dentro del género *Polylepis*. La muestra 1g corresponde a *Polylepis racemosa* y la muestra 7g es una muestra perteneciente al género *Polylepis*.

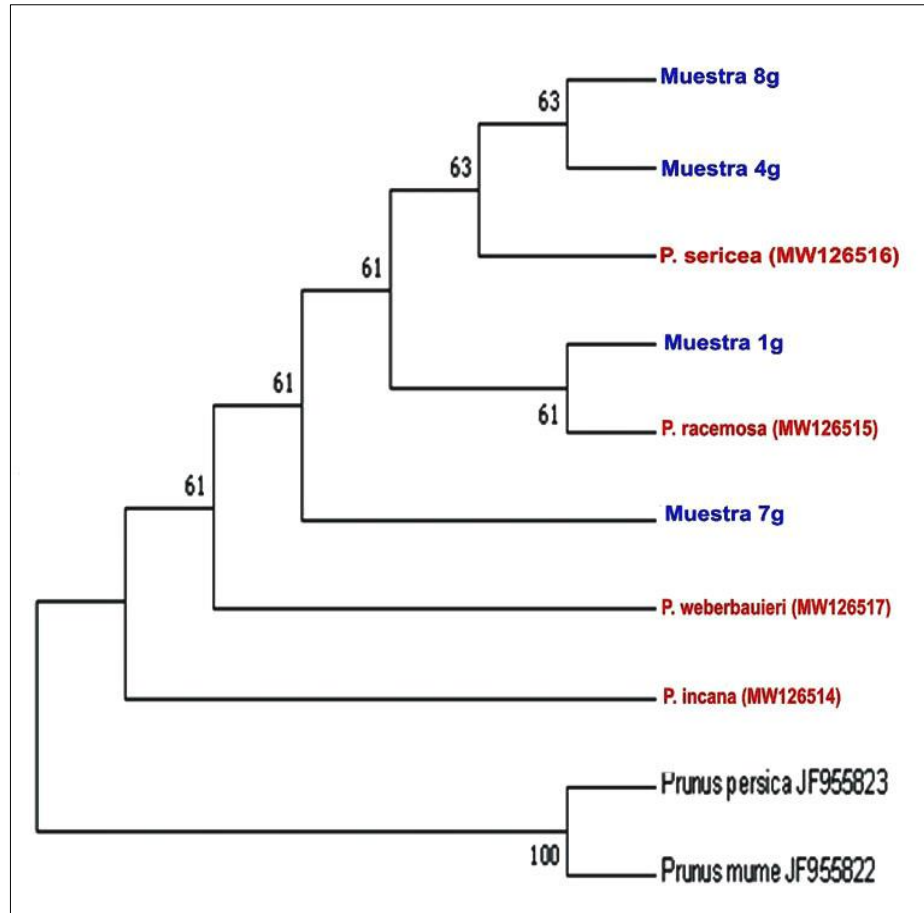


Figura 17. Árbol filogenético de muestras parecidas a *Polylepis sp.*, utilizando la región matK

Nota: La historia evolutiva infirió utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Kimura de 2 parámetros. El análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las especies del género *Gentianella* y *Perezia* son especies utilizadas como plantas medicinales, encontrándose de manera silvestre y comercializada en las ferias de mercados del Callejón de Huaylas a un precio módico, por lo que son extraídas de su hábitat natural sin ningún control. Los bosques de *Polylepis* de la quebrada Ulta, según el Plan Maestro del Parque Nacional Huascarán (2003-2007), se encuentran amenazados por los incendios y el sobrepastoreo; razón por la cual son catalogadas, como especies en estado crítico y vulnerable según el Decreto Supremo N° 043-2006-AG. Por todos estos acontecimientos negativos y con el objetivo de mejorar la situación de conservación, se escogieron estas especies como referencia para la elaboración de los códigos de barra de ADN.

La identificación de especies a partir de códigos de barras de ADN requiere de una gran base de datos de referencia que permita asignar secuencias de procedencia desconocida a secuencias de organismos previamente descritos con una alta probabilidad de acierto (Hajibabaei y otros, 2006). Es por ello, los códigos de barra de ADN referencial son la base fundamental para la construcción de la filogenia de las especies, porque generan una biblioteca de secuencias de códigos con las cuales podremos comparar similitudes o identificar especies nuevas de forma confiable.

Las regiones plastídicas *matK* y *rbcl* son regiones barcode para las plantas aprobadas por el CBOLD en el 2009, pero algunos estudios han mostrado que estos marcadores, aun combinados, no presentan una variación suficiente para diferenciar especies cercanas en algunas familias de angiospermas por lo cual se ha propuesto la utilización de otros marcadores como la región transgénica *psbA-trnH*, el intron *trnL* y la región nuclear ITS para estos casos (Kress y otros, 2005)

Por lo cual, el análisis filogenético molecular de la región *rbcl* de las especies de referencia, no discrimina especies estrechamente relacionadas, lo cual concuerda con las investigaciones de Ka-Lok Wong (2013), donde se compararon los poderes discriminatorios de siete regiones de ADN para la autenticación genética de medicamentos estrechamente relacionados de la especie *Gentiana* y sus adulterantes y la región *rbcl* tuvo un poder de discriminación bajo, lo que no permitió diferenciar entre especies. De igual forma, Palmer y otros (1986), muestran

importantes limitaciones para resolver relaciones filogenéticas entre géneros y taxones estrechamente relacionados especialmente a nivel genérico o superior usando rbcL.

Es por ello, que los resultados obtenidos del análisis filogenético de la región rbcL, pudo discriminar a nivel de género, agrupando a las especies de referencia en estudio en familias; sin embargo, no logró diferenciar entre especies. Demostrando de esta forma el bajo poder discriminatorio que posee esta región con especies estrechamente relacionadas de este estudio.

De acuerdo al análisis filogenético molecular del género *Gentianella* y *Perezia* utilizando la región ITS se ha logrado discriminar algunas especies que son estrechamente relacionadas y cuya identificación taxonómica tradicional tiene dificultades en la por ser plantas medicinales comercializadas procesadas o semi-procesadas, además poseen similitudes morfológicas que impide su completa caracterización genética y química dificultando el control de calidad de los fito-medicamentos y el aprovechamiento racional y sustentable de los recursos genéticos. (Paz y otros, 2011). El análisis de las muestras de referencia del género *Perezia* usando la región ITS2 discrimina especies estrechamente relacionadas, lo cual se corrobora con el estudio realizado por María Apodaca y otros (2015), quien considera a las Perezias como un grupo monofilético (tienen un mismo antepasado común) donde consideran a *P. coerulescens* como el taxón hermano de *P. pinnatifida*.

La región matK, según investigaciones en angiospermas, son regiones que tienen mayor poder de discriminación en casos taxonómicamente conflictivos; sin embargo, no discrimina especies estrechamente relacionadas (Jaen y otros, 2010). En el análisis de Perezias con matK, también se evidenció la alta similitud entre las *Perezia pinnatifida* y *P. coerulescens*; tal como María Apodaca y otros (2015) las reconoce como especies hermanas.

La región ITS es una región que discrimina gran parte de flora angiosperma; sin embargo, las especies del género de *Polylepis* analizados usando el marcador ITS demostraron que este género presenta muchas hibridaciones evidenciándose numerosas bandas inespecíficas en el gel de electroforesis de los productos del PCR de esta región. Estos resultados concuerdan con Kerr (2004), quien al realizar el análisis filogenético en la región ITS obtuvo resultados desconcertantes atribuidos a la hibridación entre especies, demostrando que los *Polylepis* son de

una evolución poliploide al analizar la región trnL/F, y que la poli-ploidización antigua hace difícil la detección de los reordenamientos del genoma que pueden borrar las similitudes entre cromosomas homólogos, indicando la dificultad para delimitar algunas especies por la plasticidad fenotípica, la hibridación y la falta de diferenciación genética (Kerr, 2003). Este poli-ploidismo favorece a aquellas especies ya sea plantas o animales a colonizar hábitats extremos y perturbados y son especialmente comunes en latitudes altas y elevaciones altas (Bell, 1982)

La flora andina es evolutivamente joven, es decir existe una especiación reciente de estos linajes, lo cual dificulta el reconocimiento y discriminación entre especies estrechamente relacionadas, pero juega un rol importante, puesto que, a través del tiempo se han ido adaptando y adoptando caracteres para afrontar condiciones climáticas extremas propias de las zonas andinas, por tanto, tienen más posibilidades de sobrevivir. Es por ello la importancia de identificarlas y registrarlas con el fin de establecer estrategias de conservación.

Por otro lado, la dificultad de identificación y discriminación radica en el bajo poder discriminatorio al utilizar individualmente una región, por lo que se recomienda la combinación y uso de otros marcadores moleculares que mejoren el análisis desde su extracción, amplificación y por último obtener las secuencias códigos de barra que discrimine e identifique a nivel de especies, obteniendo mejores resultados para nuestra flora local.

Los resultados obtenidos nos demuestran que nuestra flora local no tiene registro de procedencia, dado que en la actualidad ya existen registros de información genética especialmente de estos marcadores taxonómicos. Lo cual se evidencia al no tener registros de información en el Genbank y Bold system (carácter taxonómico). Hecho que ha dificultado el proceso de identificación al no tener especies con las que se puedan comparar y discriminar para obtener mejores resultados.

Por último, la importancia de este trabajo es haber utilizado una herramienta nueva con la cual se ha podido identificar algunas especies de nuestra flora local que se encuentran amenazadas, para lo cual solo se ha utilizado un fragmento de la planta. Además de haberse generado una base de datos de referencia lo que va a permitir mayor confiabilidad de resultados en posteriores investigaciones.

VI. Conclusiones

- Se elaboró el registro referencial de 8 especies altoandinas, 7 amenazadas y una especie endémica: *Gentianella weberbaueri* (Gilg), *Gentianella thyrsoidea* (Hook.), *Perezia coerulescens* (Weed.), *Perezia pinnatifida* (Bonpl.), *Polylepis incana* Kunth, *Polylepis racemosa* (Ruiz y Pavon), *Polylepis weberbaueri* (Ruiz y Pavon), *Polylepis serícea* (Wedd). Así como de especies emparentadas: *Gentianella* sp.45, *Gentianella* sp. 50, *Gentianella* sp.55, *Gentianella tristicha*, *Perezia multiflora*. Todas estas especies fueron introducidas al herbario David Smith de la UNASAM, asimismo considerando su identificación taxonómica morfológica se registraron en la plataforma virtual del SISTEMA DE DATOS DE LA VIDA (BOLD SYSTEM).
- Se elaboró el código de barras de ADN referencial de 13 especies, entre ellas 8 especies amenazadas (*Gentianella weberbaueri* (Gilg) (endémica), *Gentianella thyrsoidea* (Hook.) (vu), *Perezia coerulescens* (Weed.) (vu), *Perezia pinnatifida* (Bonpl.) (vu), *Polylepis incana* Kunth (CR), *Polylepis racemosa* (Ruiz y Pavon) (CR), *Polylepis weberbaueri* (Ruiz y Pavon) (Vu), *Polylepis serícea* (Wedd) (Vu)); y 5 especies emparentadas de similar hábitat. (*Gentianella* sp.45, *Gentianella* sp. 50, *Gentianella* sp.55, *Gentianella tristicha*, *Perezia multiflora*). Construyéndose arboles filogenéticos con las regiones rbcL, ITS2, y matK; demostrando que, la región rbcL logra demarcar las familias y a nivel de especie la región ITS2 es la más apropiada para reconocer especies del género *Gentianella* y *Perezia*, mientras que para las especies del género *Polylepis* el marcador matK puede ser utilizado.
- Se identificaron las zonas de muestreo, cuya selección obedece a razones de accesibilidad, mayor presión antrópica, cercanía a carretera, sobrepastoreo y extracción indiscriminada de especies.
- Se hizo la colecta y muestreo de especies de la zona seleccionada encontrándose 60.2% muestras pertenecientes a la familia Asteraceae seguido de Bromeliaceae que representa un 15% y con un 10.1% la familia de la Poaceae asociados a *Gentianella*, *Perezia* y *Polylepis*.
- Los códigos de barra de ADN han permitido la identificación de aquellas especies amenazadas consideradas en el estudio y que no pudieron ser reconocidas morfológicamente en campo, encontrándose que las muestras 3g y 2g

corresponden a *G. weberbaueri*, 5g y 6g que corresponden a *Perezia coerulescens* o *P. pinnatifida*, 1g que corresponde a *Polylepis racemosa*, 4g y 8g que son la misma especie del género *Polylepis* y por último la muestra 7g que es una especie del género *Polylepis*.

- La herramienta de los códigos de barra de ADN ha demostrado ser de gran utilidad al identificar especies altoandinas amenazadas en la quebrada Ulta, permitiendo fortalecer la elaboración de las líneas bases de los estudios de impacto ambiental, proyectos de conservación y recuperación mediante monitoreos ambientales.

VII. Recomendaciones

- Es necesario que se investiguen otras regiones cloroplásticas y nuclear que permitan discriminar especies estrechamente relacionadas e híbridas
- Continuar con la elaboración de muestras referenciales de códigos de barra de ADN de la flora de la quebrada Uta.
- Desarrollar temas de investigación que involucren la identificación taxonómica molecular de códigos de barra de ADN para aquellas especies potencialmente de nuevas e híbridas.
- Realizar los códigos de barra de ADN, para aquellas especies que se encuentran en amenaza, así determinar el estado actual de sus poblaciones y estado de conservación de sus hábitats.

VIII. Referencias bibliográficas

- Aguilar C., C. Ramírez, D. Rivera, K. Siu-Ting, J. Suárez, y C. Torres. (2010). Anfibios andinos del Perú fuera de Áreas Naturales Protegidas: amenazas y estado de conservación. *Revista Peruana de Biología* 17: 5–28.
- Alfaro Lozaro, L., Pastor Rozas, M., Fano Sáenz, J., Arenas Aspilcueta, M., Valencia Padilla, R., Valverde Valverde, S., ... Gonzáles Paz, O. (2011). Parque Nacional Huascarán, Plan Maestro 2010-2015. Lima, Perú: SERNANP.
- Altamirano-Benavides, M., & Yáñez M., P. (2016). EL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN(barcoding): UNA HERRAMIENTA PARA LA INVESTIGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA EN EL ECUADOR. *La Granja. Ciencias de la Vida*, 14.
- Amaral W, Kjaer ED, Yanchuk A, Graudal L. Research needs (2004) In: FAO, FLD, IPGRI, editors. *Forest Genetic Resources: Conservation and management*. 1. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute. p. 37–48
- Arévalo R. y Recharte J. 2003. Bosques de montaña: Ecosistemas relictos. In J Recharte, J; Arévalo, R; Glave M. eds. *Islas del cielo*. Huaraz, PE. p. 11-19.
- Astorga, M. P. (2008). Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En A. Lovatelli, A. Farías & I. Uriarte (Eds.). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. (pp. 277 – 287). Puerto Montt, Chile: Taller Técnico Regional de la FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i0444s.pdf#page=293>.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Boston, Estados Unidos: Springer US.
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge, MS.

- Baker, C. S., Cipriano, F., & Palumbi, S. R. (1996). Molecular Genetic Identification of Whale and Dolphin Products from Commercial Markets in Korea and Japan. *Molecular ecology*, 5, 671- 685.
- Baldwin BG (1993), Phylogenetic analysis of *Viburnum* based on ribosomal DNA sequences from the internal transcribed spacer regions. *American Journal of Botany* 80, 146.
- Baldwin BG (1995), Sanderson MJ, Potter JM, Wojcienchowski MF, Camobll CS y Donoghue MJ. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 247-77.
- Baraloto, C., Hardy, O., Timothy, C., Dexter, K., Cruaud, C., Dunning, L., Gonzalez, M-A., Molino, J-F., Sabatier, D., Savolainen, V. y Chave, J. (2012). Using functional traits and phylogenetic trees to examine the assembly of tropical tree communities. *Journal of Ecology*, 100, 690-701.
- Barcode of life. (2017). What Is DNA Barcoding? Obtenido de <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding>
- Barcode of Life Data Systems (2020). Obtenido de <https://www.boldsystems.org/index.php/database>
- Becerra, A. (23 de octubre de 2020). Obtenido de <https://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem/docs/filogenias-CCG-7.pdf>
- Bell, G. 1982. *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality*. University of California Press, Berkeley.
- Bickford D., D.J. Lohman, N.S. Sodhi, P.K.L. Ng, R. Meier, K. Winker, K.K. Ingram y I. Das. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22(3): 148-155.
- Brako, L. y J. Zarucchi. (1993) *Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms in Peru*. *Mongr. Missouri Bot. Gard.* 45
- Benson, D. A., Karsch-mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 33 (Database Issue), D34–D38. <http://doi.org/10.1093/nar/gki063>

- Cabido M. & A. Acosta. (1985). Estudio Fitosociológico en bosque de *Polylepis australis* Bitter: ("Tabaquillo") en las sierras de Córdoba. Argentina. Documents phytosociologiques. N.S. Vol. IX: 365-400.
- Cabrera A. L. Ecología vegetal de la puna (1968). En: Colloquium Geographicum. C. Troll, H.Hahn, W. Kuls, W. Lauer (Eds.). Geo-Ecología de las Regiones Montañosas de las Américas Tropicales. Vol. 9: 91-116.
- Cano A., A. Delgado, W. Mendoza et al. (2011). Flora y vegetación de suelos crioturbados y hábitats asociados en los alrededores del abra Apacheta, Ayacucho - Huancavelica (Perú). Revis-ta peruana biologia 18(2): 169 – 178. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v17i1.56>
- Casiraghi M, Labra M, Ferri E, Galimberti A y De Mattia F. (2010) DNA barcoding: theoretical aspects and practical applications. In: Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems. 269-273 pp
- Castillo S, Salinas, León, Sánchez (2006). Gentianaceae endémicas del Perú. Perú Biológico 17
- CBOL Plant Working Group & Janzen, D. (2009). A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(31), 12794-12797.
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, y otros (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene rbcL. Annals of the Missouri Botanical Garden 80, 528-580.
- Chase, M. W., y Fay, M. F. (2009). Barcoding of Plants and Fungi. Science, 325, 682-683.
- Chen S, Yao H, Han J, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin Y, Leon C: Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PLoS One 2010, 5:e8613. doi:101371/journalone0008613.
- Clegg MT, Zurawski G (1991) Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. En: Soltis DE, et al. (eds.) Molecular systematics of plants. Chapman & Hall, New York, pp. 1–13.

- Coissac, E., Hollingsworth, P., Lavergne, S. y Taberlet, P. (2016). From barcodes to genome: extending the concept of DNA barcoding. *Molecular ecology*, 25, 1423-1428.
- Cräutlein M., H. Korpelainen, M. Pietiläinen y J. Rikkinen. (2011). DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and Conservation* 20(2): 373–389.
- Daan. «N. Daan. (2001) The IBTS database: a plea for quality control ICES CM. » 1-5.
- Dale WJ y von-Schantz M. (2007). From genes to genomes concepts and applications of DNA technology. 2nd ed. John Wiley y Son Ltd. England
- De la Cruz H., G. Vilcapoma & P. Zevallos. (2007). Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 284–294. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.018>
- Divakar, P., Leavitt, S., Molina, M., Del-Prado, R., Lumbsch, T. & Crespo, A. (2016). A DNA barcoding approach for identification of hidden diversity in Parmeliaceae (Ascomycota): *Parmelia sensu stricto* as a case study. Frézal L. & R. Leblois. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 8(5): 727–736. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 180, 21-29.
- Donoghue MJ, Baldwin BG (1993) Phylogenetic analysis of *Viburnum* based on ribosomal DNA sequences from the internal transcribed spacer regions. *American Journal of Botany* 80, 146.
- El peruano: Diario Oficial. (2006), 13 de julio. Normas Legales: Aprueban categorización de Especies amenazadas de flora silvestre, Decreto Supremo N° 043-2006-AG. Empresa Peruana de Servicios Editoriales S.A. domingo 17 de setiembre. pp. 323527 - 323539.
- Essau Katherine. Anatomía Vegetal Meristemas, células y tejidos de las plantas: su estructura, función y desarrollo. Omega, Tercera edición. (2008), Pp 179-250.

- Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS, y otros (2009) Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular Ecology Resources* 9, (Suppl. 1), 130–139.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39: 783-791.
- Fierro F., S. Gutiérrez, J. Casqueiro y J. F. Martín. 2001. Karyotyping of fungi by Pulsed Field Gel Electrophoresis. Págs. 105-125 En: S.G. Pandalai (ed.), *Recent Research Developments in Genetics*, vol. 1. Research Signpost, Trivandrum, India.
- Fiser, Z y e. Buzan. 2013. 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. *J Appl Genetics*. 11pp.
- Floy, Hebert. (2002). *Molecular Barcodes for Soil Nematode Identification*. *Mol Ecol*.
- Frézal L y Leblois R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 727736. Frisvad, JC. 1994. Classification of organisms by secondary metabolites. *In: The identification and characterization of pest organisms*. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 303321pp
- Gaut BS, Muse SV, Clark W, et al. (1992) Relative substitution at the rbcL locus in monocotyledonous plants. *Journal of Molecular Evolution* 35, 292–303.
- Gabriel Flores Franco, Karla Vega Flores, Rigardo Aguirre López y Susana Valencia Ávalos. (20 de OCTUBRE de 2020). *Revista de Cultura Científica*. Obtenido de <https://www.revistacienciasunam.com/es/202-revistas/revista-ciencias-120-121/1999-hibridaci%C3%B3n-y-poliploid%C3%ADa-en-plantas.html>
- Gernandt, D., Salazar, G., Vergara, F., Arias, S., Sosa V., García, A., Reyes, J. Cabrera, L. & P. Rosas. (2011). Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México. (Informe final SNIB-CONABIO, proyecto N°. GE021). México D. F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Instituto de Ecología, A.C. 33 p.

- Gibaja, S. (1998). Pigmentos naturales quinónicos. Fondo Editorial UNMSM. Lima – Perú.
- Glesener, R. R., and D. Tilman. 1978. Sexuality and the components of environmental uncertainty: clues from geographic parthenogenesis in terrestrial animals. *American Naturalist* 112:659-673.
- Glime, JM (2007) Ecología de briófitas. Volumen 1. Ecología fisiológica. Universidad Tecnológica de Michigan y la Asociación Internacional de Briólogos, Houghton. <http://www.bryocol.mtu.edu>
- González, J. A. (2009). El conocimiento sistemático de la biodiversidad y el impedimento taxonómico. *Evolución*, 4, 19-32.
- González, M. A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S.A., Pétronelli, P., Riéra, B., Roger, A., Thébaud, C. & Chave, J. (2009). Identification of Amazonian Trees With DNA Barcodes. *Plos One*, 4(10): e7843.
- Group China.Plant.BOL., Li De.-Zhu., Gao, L.-M., Li, H.-T., Wang, H., Ge, X.-J., Liu J.-Q., Chen, Z.-D., Zhou, S.-L., Chen, S.-L., Yang, J.-B., Fu, C.-X., Zeng, C.-X., Yan, H.-F., Zhu, Y.-J., Sun, Y.-S., Chen, S.-Y., Zhao, L., Wang, K., Yang T. & Duan, G.-W. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 19641-19646.
- Hajibabaei, M., D. H. Jansen, J. M. Burns, W. Hallwachs Y P. D. N. Hebert. 2006. DNA barcoding distinguishes species of tropical Lepidoptera. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 968-971.
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(1512), 313-21.
- Hebert, P., Ratnasingham S., & deWaard, J. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society Lond. B*, 270, 96-99.
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. Choosing and using a plant DNA barcode. *PlosOne* (2011),6, nº5

- Hopkins, Freckleton. (2004). Biodiversity Monitoring and Conservation: Bridging the Gap Between Global Commitment. 13.
- HUAMANÍ W. 1998. Diagnóstico Ambiental Preliminar del Parque Nacional Huascarán- Actividad Minera y Actividad Turística – Desechos Sólidos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima -Perú.
- Parque Nacional Huascarán. (2011). Reporte de evaluación del Parque Nacional Huascarán. Huaraz.
- Proyecto de cooperación con Canadá sobre códigos de barra de ADN. (2014). Recuperado 12 de junio de 2020, de PeBol website: <https://pebol.org/proyecto/proyecto-pebol/>
- Ivanova NV, de Waard JR, Hajibabaei M, Hebert P. Protocols for High-Volumen DNA Barcode Analysis. DNA Working Group. Consortium for the Barcode of Life
- Jaen R, Á. M.-B.-G.-C. (2010). Discover scientific knowledge at ResearchGate, and make your research visibl. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/265375939>. LA Flora Endémica Del Parque Nacional De Garajonay Bajo La Perspectiva Molecular Las Secuencias De Adn Como Herramienta En La Identificación Taxonómica.
- Johnson LA, Schultz JL, Soltis DE, Soltis PS (1996) Monophyly and generic relationships of Polemoniaceae based on matK sequences. American Journal of Botany 83, 1207-1224.
- Johnson LA, Soltis DE (1994) MatK DNA sequences and phylogenetic reconstruction Saxifragaceae s. str. Systematic Botany 19, 143–156
- Johnson LA, Soltis DE (1995) Phylogenetic inference usingmatK sequences. Annals of the Missouri Botanical Garden 82, 149-175
- Ka-Lok Wong, P. P.-H. (2013). Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal Gentiana species and their adulterants. CHINESSE MEDICINE, 13.

- Katinas L. (2012). Revisión del género *Perezia* (Compositae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 47 (1-2): 159-261.
- Kerr, M. S. (2003). A phylogenetic and biogeographic analysis of *Sanguisorbeae* (Rosaceae) with emphasis on the pleistocene radiation of the high Andean genus *Polylepis*. Ph.D. thesis. College Park, MD: University of Maryland.
- Kessler M. (1995). *Polylepis* Walder Bolivians: Taxa Okologie, Verbreitung and Geschichte. *Dissertationes Botanicae* 246. J. Cramer. Berlin, Stuttgart. 303 pp.
- Kessler M. (2006). Bosques de *Polylepis*. *Botánica Económica de los Andes Centrales*.1 (1): 110-120.
- Kress, W., Erickson, D., Swenson, N., Thompson, J., Uriarte, M., & Zimmerman, J. (2010). Advances in the Use of DNA Barcodes to Build a Community Phylogeny for Tropical Trees in a Puerto Rican Forest Dynamics Plot. *Plos One*, 5.
- Kajtoch, W. H. (2015). A three-marker DNA barcoding approach for ecological studies of xerothermic plants and herbivorous insects from central Europe. *BOTANICA JOURNAL* , 16.]
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kim KJ, Jansen RK, Wallace RS, et al. (1992) Phylogenetic implications of *rbcl* sequence variation in the Asteraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79, 428-445.
- Kress W.J., K.J. Wurdack, E. Zimmer, L. Weigt, & D.H. Janzen. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8369–74. doi:10.1073/pnas.0503123102.
- Kress, W., Erickson, D., Swenson, N., Thompson, J., Uriarte, M., & Zimmerman, J. (2010). Advances in the Use of DNA Barcodes to Build a Community

Phylogeny for Tropical Trees in a Puerto Rican Forest Dynamics Plot. Plos One, 5.

Kress WJ, Wurdack JK, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen (2005). DH: Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proc Natl Acad Sci USA, 102:8369–8374.

Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33:1870-1874.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018). Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35:1547-1549.

Lanteri, A. (2007). Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. Revista de la Sociedad Entomológica, 66, 15-25.

Lanteri, A. A., Loiácono, M. S., & Margaría, C. B. (2002). Aportes de la biología molecular a la conservación de los insectos. En C. Costa, S. Vanin, J. Lobo, & A. Melic, *Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática - Pribes 2002* (págs. 207-220). Zaragoza, España: Sociedad Entomológica Aragonesa.

Lanteri, A. 2007. Código de Barras de ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. Rev. Soc. Entomol. Argent. 66 (3-4): 15–25.

Liston A. (1992). Variation in the chloroplast genes rpoCl and rpoC2 of the genus Astragalus (Fabaceae): Evidence from restriction site mapping of a PCR-amplified fragment. Ame J Bot; 79:953-961.

Lynch, M. 1984. Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. Quarterly Review of Biology 59:257-290.

López-Álvarez, D., M. L. López-Herranz, A. (2012), method to discriminate between the model plant *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). PLoS ONE 7(12): e51058.

- Madden, T. (2002). The BLAST Sequence Analysis Tool. [Updated 2003 Aug 13]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. *The NCBI Handbook* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>
- Mansilla H. 2001. "Aspectos económicos del secuestro de carbono en especies nativas: Caso bosque de "Queuña Qocha", Ollantaytambo, Cusco, Perú". Eds Glave; Pizarro. Lima, PE, INRENA. Consultado 27 oct. 2010. Disponible en <http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/bitstream/123456789/852/3/BVC10000698.pdf>
- María Apodaca, j. V. (2015). Andean Origin and Diversification of the Genus *Perezia*, an Ancient Lineage of Asteraceae. Researchgate, 39.
- Melgarejo, M. E. (01 de NOVIEMBRE de 2019). *CYBERTESIS UNMSM*. Obtenido de CYBERTESIS UNMSM: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/9392>
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology*, 3(12), e422.
- Mendoza W y Cano A. (2011). Diversidad del género *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) en los Andes peruanos. *Rev. Peru. Biol.* 18(2): 197-200
- Mendoza W. (2005). Especie nueva de *Polylepis* (Rosaceae) de la cordillera Vilcabamba (Cusco, Perú). *Rev. Peru. Biol.* 12(1): 103-106.
- Mendoza W. (2010). Taxonomía y distribución de las especies peruanas de *Polylepis* Ruiz & Pav. (Rosaceae, Magnoliopsida). Tesis de Magister. UNMSM. Lima-Perú. 125 pp.
- Molina Montenegro M. A., Ernesto I. B., Patricia I. y Lohengrin A. C. (2005). Intercambio Gaseoso en Dos Especies de Plantas Alto andinas de Chile Central: efecto de la Asociación a plantas en Cojín. *Ecología Austral*. Vol. 15: 49-58.
- Moon, B. C., Kim, W. J. Ji, Y., Lee, Y. M., Kang, Y. M. & Choi, G. (2016). Molecular identification of the traditional herbal medicines, *Arisaematis Rhizoma* and

Pinelliae Tuber, and common adulterants via universal DNA barcode sequences. *Genetics and Molecular Research*, 15 (1), 2-14.

Montesinos D. B. (2012). Lista anotada de nuevas adiciones para la flora andina de Moquegua, Perú. *Rev. peru. biol.* 19(3): 307–316. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v19i3.1045>

Mora C., D.P. Tittensor, S. Adl, A.G.B. Simpson y B. Worm. (2011). How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biology* 9(8): e1001127.

Moritz, C. y C. Cicero. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PloS. Biol.* 2: 1529–1531.

Mostacero, J., F. Mejía y F. Pelaez. 1996. *Fitogeografía del norte del Perú*. Edit. CONCYTEC. Lima – Perú.

Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., & Ragupathy, S. (2006). DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. *Canadian Journal of Botany*, 84, 335-341

Orjeda, G1. Alban, J2; Rojas, R1; Pignataro, D1; Morales, V2; Agapito, D2; Rubio, K1; Cachay, J1 ; Bueno, C1. (2010). Hacia la identificación de un adecuado código de barra de ADN para plantas medicinales de importancia productiva y comercial del Perú I: Identificación de especies de la familia Rubiaceae y Piperaceae. *Libro de Resúmenes XIX Reunión Científica ICBAR, At Lima. Perú.*

ONER. (1976). *Mapa Ecologico del Perú , Guía explicativa . LIMA .*

Pautrat L. (2002). *Manual de identificación de especies peruanas de flora y fauna silvestre susceptibles al comercio ilegal módulo II: identificación de especies de fauna silvestre y productos derivados comercializados comúnmente.*

Palacio-López, K., y Rodríguez-López, N. (2007). Phenotypic Plasticity in *Lippia alba* (Verbenaceae) in Response to Water Availability in Two Light Environments. *Acta Biológica Colombiana*, 12, 187-198.

- Palmer JD (1986) Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. En: Plant Molecular Biology: Methods in Enzymology. Academic Press, New York, pp. 168-186.
- Pavlich, Magdalena y Oscar Tovar. Ecomorfología de Algunas Plantas de la Puna del Perú Central; Separata de archivos de Biología andina. 1977, Vol. 7.
- Paz, A., González, M., y Crawford, A. (2011). Código de barras de la vida: Introducción y perspectiva. Acta Biológica Colombiana, 16, 161-176.
- Percy Olivera Gonzales, (2008). Morfo – anatomía de *Perezia coerulescens* Wedd. (Asteraceae). Arnaldoa, 7.
- Plan Maestro del Parque Nacional Huascarán (2010). Zona de amortiguamiento del parque Nacional Huascarán (2010-2015). SERNA 63.
- Plan Maestro del Parque Nacional Huascarán 2003 – 2007. Intendencia de Áreas Naturales Protegidas. Instituto Nacional de Recursos Naturales INRENA. Enero 2003. Pág. 27.
- Quija-Lamina P., M.C. Segovia-Salcedo; M. Jadán & K. Proaño. (2010). Estandarización de la metodología para el conteo cromosómico en especies del género *Polylepis* en el Ecuador. Revista Ecuatoriana de Medicina
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364.
- Ramos, B. E. (2012). Descripción Morfohistológica de 3 especies de plantas altoandinas de Chacas, Asunción, Ancash, Perú. Lima.
- Roe, A. D., & Sperling, F. A. (2007). Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 325-345.
- Romoleroux K. (1996). Rosaceae. Pp 71-89 in Harling G. y L. Anderson (eds.) Flora of Ecuador 56. Göteborg University. 151 pp.

- Sala, O.E., Chapin III, F.S., Armesto, J.J., Berlow, R., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D., Mooney, H.A., Oesterheld, M, Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, (2000). M. and. Global Biodiversity scenarios for the year.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74(12): 5463-5467
- S. Diaz, F.S. Chaplin III, D. Tilman. (2006) Biodiversity too threatens human well-being
- Simpson B. 1979. A revisión of the genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbae). *Smithsonian Contributions to Botany*. 43:1-61.
- Simpson B. 1979. A revision of the genus *Polylepis*. Smithsonian institution press (en línea). Washington, US. Consultado 23 ago. 2010. Disponible en sipddr.si.edu/dspace/bitstream/10088/7018/1/scb-0043.pdf
- Smith, Alan. P. y Young, Truman P. Tropical alpine plant ecology. *Rev. Ecol. Syst.* (1988). 22:177-191.
- Shoobridge, D. (2005). Perfil de Área Protegida - Perú: Parque Nacional Huascarán (69pp). ParksWatch.
- Soltis DE, Morgan DR, Grable A, et al. (1993) Molecular systematics of Saxifragaceae sensu stricto. *American Journal of Botany* 80, 1056-1081.
- Solano, J., Wolff, M., & Castro, L. (2013). Identificación molecular de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(2), 281-290.
- Stebbins, G. L. (1950). Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York.
- Stork, N. E. (1993). How many species are there? *Biodiversity and Conservation*, 2: 215- 232.
- Susy Castillo, Norma Salinas, Blanca León, Isidoro Sánchez. (2006). Gentianaceae endémicas del Perú. *Perú Biológico*, 17.

- Smith M., Fisher, B., y Hebert, P. (2005). DNA Barcoding for Effective Biodiversity Assessment of a Hyperdiverse Arthropod Group: The Ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, 360, 1825-1834.
- Saitou N. & M. Nei. (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- SENASA. (01 de noviembre de 2018). *SENASA Contigo*. Obtenido de <http://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/senasa-implementa-nuevas-tecnologias-agrosanitarias/>
- SERNAP, Plan maestro del 2010-2015. PNH (Parque Nacional Huascarán, PE). Huaraz, Ancash, Perú
- Stebbins, G. L. 1950. *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- Sugita M, Shinozaki K, Sugiura M (1985) Tobacco chloroplast tRNA (UUU) gene contains a 2.5-kilobase-pair intron: An open reading frame and a conserved boundary sequence in the intron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(11), 3557–3561.
- Tamariz Angeles Carmen del Rosario (2014). *Diversidad de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas aisladas de fuentes termales del Callejon de Huaylas*. (Tesis doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Tamariz C. y Flores, M. Estudio Anatómico de Plantas Altoandinas. Adaptaciones Morfoanatómicas de *Senecio subletectens* Cuatrecasas. *Arnaldoa*. 1999, Vol. 6(1) 75-85.
- Tamura K Peterson D Peterson N, Stecher G, Nei M y Kumar S. 2011 MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molec. Biol. Evol.* 28:2731-9
- Tobón C. *Los bosques andinos y el agua*. Quito-Ecuador: La caracola; 2009.

- Tripathi, L. T. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11.
- Ulloa, C.; J. Zarucchi y B. León. (2004). Diez años de adiciones a la flora del Perú: 1993—2003. *Arnaldoa*, Ed. Especial 7—242.
- UICN-OMS-WWF.1993. Directrices sobre conservación de plantas medicinales. Organización Mundial de Salud (OMS). Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza de los Recursos Naturales. (UICN). y Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF), Gland, Suiza 4p.
- UNITED NATIONS EDUCATIONAL, SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION (UNESCO). 1974. Informe del Grupo Especial sobre Criterios y Orientaciones para Seleccionar y Establecer Reservas de la Biosfera. International Coordinating Council of the MAB Programme. 3rd sesión. Washington – Estados Unidos.
- Valdez EM y Kahl G. (2005). Huellas de AND en genomas de plantas, teoría y protocolos de laboratorio. MundiPrensa México. DF, México.
- Vernooy R, Haribabu E, Muller MR, Vogel JH y Hebert PDN. (2010). Barcoding Life to Conserve Biological Diversity: Beyond the Taxonomic Imperative. *PLoS Biology* 8(7): e1000417.
- Valentini A., F. Pompanon y P. Taberlet. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24(2): 110–7.
- Vernooy R, Haribabu E, Muller M, Vogel J and Hebert P. 2010. Barcoding life to conserve biological diversity: beyond the taxonomic imperative. *PLoS Biology* 8: e1000417.
- Viñas, P; Gallardo, Z; Zelada, W. (2005). Evaluación rápida de la fauna del Bosque de Mijal Chalaco – Piura. Informe Final
- Vivas, C., Souza R., Alves-Araújo, A., Alves, M., Mariano-Neto, E., Van den Berg, C. & Amato, F. (2014). DNA barcoding in Atlantic Forest plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification? *Genetics and Molecular Biology*, 37(4), 662-670.
- Yallico E. 1992. Distribución de *Polylepis* en el sur de Puno. In Proyecto Árbol Andino. Puno, PE. 134 p.

Yoshikawa H, Dogruman-AI F, Dogruman-Ai F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, y otros (2011). Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocystis subtypes from fecal samples. *Parasitol Res*; 109:1045-50

IX. Anexos

Anexo 1

Secuencias e información taxonómica de las especies de referencia

Taxonomy

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Asterales
Family: Asteraceae
Subfamily:
Genus: Perezia
Species: *Perezia coerulescens*

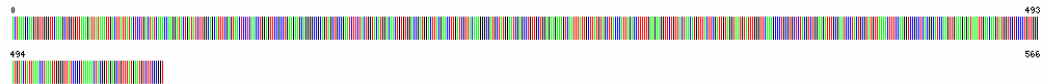


Specimen Details

Sample ID: UNASAM-HDS-132
Process ID: HDSCT001-18
Project: HDSCT
Institution Storing: Universidad Nacional Santiago Antunez De Mayolo
Field ID:
Museum ID: UNASAM-HDS-132
Collection Code:
Reference Link:
Note: Herbarium

rbcL

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

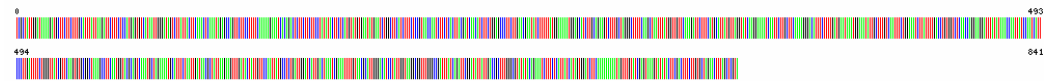
ACTAAAGCAAGTGTGGTTCAAAGCTGGTGTAAAGATTAAATGACTTATTACTCTGACTATCAACCAAGGATCTGATATCTGGCAGCATTTCGAGTAACTCTCAACCTGGAGTTCGCCCTGAAGAAGCAGGGCCGAGTAGCTGCCGAATCTTACTTGGTACATGGACAACCTGTGGACCGATGGA
 CTTACGAACTTGTATGCTTACAAAGGGCGATGCTATGGAATCGAGCCGTGCTGGAGAAGAAAGTCAATTTATGCTTATGAGCTTACCCTATGAGCCCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAAGCATGTTTACTTGGATTGAGTAAATGTTATGGGTTCAAAAGCCCTGGCTGCTACGCTCGGAAGATTGCGAATC
 CCTACTGCTGATGTTAAACTTTCAAGGCTCCGCCACGGCTCAAGTGAAGAGATAAATGAACAAGTATGGTGTCCCTGTTGGGATGACTATTAACCTAAATGGGGTTATCCGCTAAAACCTACGGTAGAGCTGTTATGAATGTCTTGGCGGT

Amino Acid Sequence

TKASVFGKAGKDKLYTYPDVQTKDIDILAAFRVTPQPPPEEAGAAVAESSTGTWTVWDTGLNDRYKRCYIEPIVEEESQIIVAYPLDLFEESGVTNFTSVGNVGFKALRALREDLRIPYAVKTFQPPHGIQVERDKLNKYRPLLGCTIKPKLGLSANKHYGRAVVECLRG

matK

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

TGCGTATTGGATAAAGAGCTCTCTCTTGGATTAAAGATTCTTCTCCATGAGTGCATAATGGGATAGTCTTACTACTCAAACTCAATAGAGCCAGTCTTCTTTCAAAAAGAAATCACAGACTCTTCTCTCTATACTCTCATGTATGTGAATGAATCTGGCTCATCTTTCTCGTAACCA
 ATCTCTCAGTACGATCAACATCTCTGGAGCCCTCTTGAACGAATCTTTTATGGAAAATGGAGCATCTGCGAAGTCTTTCGAGGCTTTCAAGCTAATTTATGGTGTTCAGAGATTCTTTCATGGATTATGTTAGGATCAAGGAAAATCAATCTGCTGCAAAAGGACATCTTTTGTGATGA
 ATGGAAAATGCTTTGTCAATTTCTGAAAATCTATTTTGGCTGTGGTCTCABCCAGGAAGGATTTATATAACCAATTCCAATCATTCCCTGATTTCTGGGTTATCGTCAAGTGTGGGCTAAAGCCCTCAATGGTACCGCAAGTCAATGCTAGAAAATGATTCTTAATTGATAACGCTATTAAAGAGTTGA
 TACTATTGTTCAAAATATGCTCTGATTGGATCAATGACTAAATGAAAATTTGATACCGCATGGACATCTATTGGTAAGCGGTTTGGGCGATTATCAGATTGGATATTGACCGCTTTGGGCGTATACAGAAATCTTCTCATATCATAGTGGATCTTCAAAAAAATAGTTGTATCGAGTAAAGTA
 TATACTTCGACTTTCTGTGAGAACTTAACTGCTGA

Amino Acid Sequence

RYWIKDASSLHLRFFLHECHNMDLSTSNRASSFSKRNRHFFLYTSHVCEYESGFI LRNQSHLRSTSSGALLERISFYGKMEHLAEVFAFAFQANLWLFKDSFPHVRYVQGSILASGKTFLLMNNKYCFVNFJKSVYDLGQPRIZVNLQSNHSLDFLGVRSVRLKPSHVRSQHLENALIDNATKXFD
 TIVRIMPLIGSLTKSKFCNALGHPDGGKAVADLSDSDIIRFGRVYRNLSHYHSGSKXNLYRVKYLRLSCARTLARK

ITS2

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

TGCAGAAATCCCGTAAACCATGAGTTTGAAGCGAAGTTGGCCCGAAGCCATCCCGCTGAGGGACAGCTGCTCCCTGGGCGCACGATCGGTCGCCCTCACTCACAGCTGTGGAAGTGGGGGCGAAATGGCCCTCCGTCGCATGTGTGGATGGCCCAAAAAGGAGTCCCTCTGTCGGACGACGACTAGT
 GGGTGTGTCAAGACCTCGGTTCTGTGTGCTGTGATGCAAGGAGTAGTACTCTTA-GACCCTGTGTGTGTTTT

Figura A. Código de barras de ADN e Información taxonómica de la *Perezia coerulescens*.

Nota: La figura muestra los códigos de barras y secuencias de los nucleótidos de los genes de las regiones: rbcL, ITS, matK.

Taxonomy

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Asterales
Family: Asteraceae
Subfamily:
Genus: Perezia
Species: *Perezia multiflora*



Specimen Details

Sample ID: UNASAM-HDS-133
Process ID: HDSCT002-18
Project: HDSCT
Institution Storing: Universidad Nacional Santiago Antunez De Mayolo
Field ID:
Museum ID: UNASAM-HDS-133
Collection Code:
Reference Link:
Note: Herbarium

rbcl

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

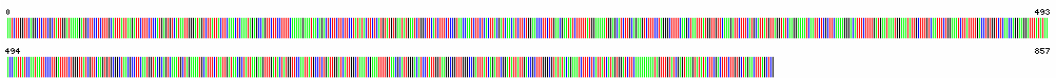
```
ACTAAGCAAGTGTGGGTTCAAAGCTGGTGTAAAGATTAAATGACTTATTATACCTCTGACTACTCAAAACAAGGATAGTACTCTTGGCAGCATTTCGAGTAACTCTCAACCTGGAGTCCGCCCTGAAGAAGCAGGGGCCGCAAGTGGCCTTCTACTGGTACATGGCAACTGTGTGGACCGATGGA  
CTTACGAGCCCTTGATCGTTACAAAGGGCCGATGCTATGGAAATCGAGCCCTGCTGGAGAAGAAAGTCAATTTATGCTTATGAGCTTACCCATTAGACCTTTTGAAGAAGTCTGTTACTAACATGTTACTCTGATTGAGGTAAGTATTGGGTTCAAAGCCCTCGCTGCTCTACGCTGGAAAGATTGGCAATC  
CCACTCGGATGATGAATAAATTTCCAAAGTCCGCCACGGCATTCAAAGTGAAGGATAAATGAACAAGTATGCTCCCTGTTGGGATGACTATTAAACCTAAATGGGGTTATCCGCTAAAACACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATGTCTCCGG
```

Amino Acid Sequence

```
TKASVFGKGVKDKVLYTYPVQTKDITLAAFRVTPQVPPPEEAGAAVAESSGTWTTVWDGLTSLDRYGRGCVGIEPVAGEESQFIYVAVPLDLFEESVTNWFSTIVQNVGFKALRALRLLEDLRIPYAVKTFQPPHGIQVERDKLNKVGRLIIGCTIKPKLGLSAKNYGRAVYECLRX
```

matK

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

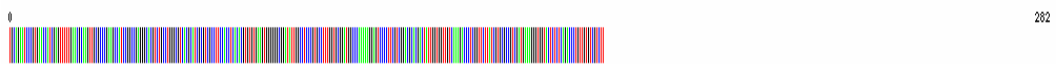
```
AATCTTGGTTCAGGCTCTCGCTATTGGATAAAGATGCTTCTCTTGGATTATTAAGTCTTCTCCATGAGTGTATAAATGGGATAGTCTTATTACTTCAAACTCAAATAGAGCAGTCTCTCTTTCAAAGAAATAACAGACTCTTCTTCCATATACTTCTCATGTATGTGAATGAATCGGCTT  
CATCTTCTCCGTAACCAATCTTCTCACTACGATCAACATCTCTGGAAACCTCTTGAACGAATATCTTTTATGGAAAATAGGACATCTGCAAGAATCTTCCAGGGCTTTTCAAGCTAAATTTATGGTGTTCAAAGATTCTTTCATGATTATGTTAGGTATCAAGGAAAATCAATCTCGCTCAAAGGGAC  
ATTTCTTTTATGAAATGATGGAAATATTTGCTTTGTCBAATTTCTGGAAATCTATTGGACCTGGTCTCAACGAGGAAGATTTATTAACCAATATCAATATTTCCCTTGGGTTATCGTTCAAGTGTGCGCTTAAGCCCTCAATGGTACGAGTCAATGCTAGAAAATGCATTTCTAATGATATA  
CGCTATTAAAGATTTGATACATAGTCCCAATATCCCTGATGGATCTGGCTAAATGAAATTTTGTAAAGCTATTGGACATCTATTGGTAAAGGGGTTTGGGCGATTTATGACCTTTGGGCGTATATACAGAAATTTCTCATATCATAGTGATCTTCAAAGAAAATAG  
TTTGATCGAGTAAAGTATATCTCGACTTCTGTGTGAGAACTTAGCTCG
```

Amino Acid Sequence

```
TLVQALRYNKDASLSHLRFFLHECHMDSLITSNSNRASSFSKRNNLFFFVLYSHVCYVESGFFLRNQSLSRSTSGTLLRSTFYGKMEHLAEVFPRAFQANLWLFKDSFPHVRYGQKSLASKGTFLLPNWKKYCFVFNKSYFDLWSQPRIVYINLSNLSLDFYRSSVRLTFSHVRSQLENAFLLDN  
AKKFDTHVPIHPLIGSLAKSKFCNALGHPGKAVADLSDSDIDRFGRIVNLSHVHSGSSKNSLYRVKYLRLRSCLARTLAX
```

ITS2

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

```
TGCAGATCCCGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGGCCCGAAGCCATCCGGCCGAGGGCACGCTCGCTGGGCTCACGACATCGGCTGCCCTCACCTCACACGTGTGTGAAGTGGGGGGCGGATATTGGCCCTCCGTCGCTTTGGTGGCGATGGCCCAAAGAGATCCCTCTGTCGGACCGACGACTATT  
GGTGGTGTCAAAGACCCCTCGTCTTATCGTGGCCGCTGATGAAGGGTGTACTCTCTCAGACCCCTGTTGTGCTGCTT
```

Figura B. Código de barras de ADN e información taxonómica de la especie *Perezia multiflora*.

Nota: La figura muestra los códigos de barras y secuencias de los nucleótidos de los genes de las regiones: rbcl, ITS, matK.

Taxonomy

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Gentianales
Family: Gentianaceae
Subfamily:
Genus: *Gentianella*
Species: *Gentianella weberbaueri*

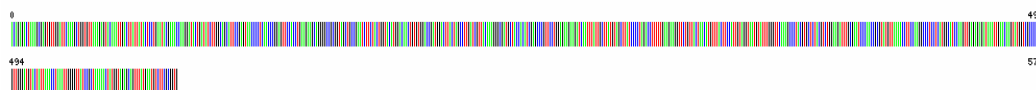


Specimen Details

Sample ID: UNASAM-HDS-135
Process ID: HDSC004-18
Project: HDSCT
Institution Storing: Universidad Nacional Santiago Antunez De Mayolo
Field ID:
Museum ID: UNASAM-HDS-135
Collection Code:
Reference Link:
Note: Herbarium

rbcl

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

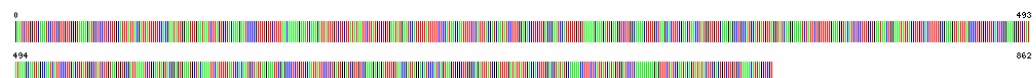
ACAGAGACTAAGGGAGTGTGGATTCAAGCTGGTGTAAAGAGTACAATGACTTATTACTCCTGAATACGAACCAAGGACTGATATCTGGCAGCATTCCGAATAACCCCTCAACCCGGAGTTCCACTGAAGAAGCAGGGCCGCGGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGTGGACC
GATGGACTTACTAGCTTGTATGCTTACAAAGGGGATGCTACCACTCGAGCCGCTCTGGAGAAAGATCAATTTATGCTTATAGCTATCCCTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAAGCATGTTTACTTCCATTGTAGTAAATGATTTGGTTCAAGGCCCTACGTCTACGTCTGGAAATTTGG
CGAATCCCAAGCCGGTATGTTAAAGCTTCAAGGCCCTCATGGCTCAAGCTGAGAGATAAATGAACAAGTATGGTCCGCCCTTGGGATGACTATAAACCCTAAATGGGGTTATCCGCTAAAACCTATGTAGAGCAGTTTATGAATGCTTCCGGGTG

Amino Acid Sequence

TETKASVGFKAQKEYKLYTYPREYKTDLILAAFRVTPQPPVPEEAGAAVAEESGTHTVWTDGLTSLDRYKRCVHEPVPGEEDQFVAVYPLDLFEEGVTNMTSIVQNVGFKALRALRELDRIPTAYVKTFQGPPIHQIQRDRLNKYGRPLLGLTIKPKLGLSAKNYGRAVVECLRGK

matK

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

GAATCTTGGTCAAAATCCTTGGTGGGTAAGAGTCTCTCTTGGATTAACGATATTTTCCAGATATGGAAATTTGAATACTTAGTGCTACAAGAAATCCCGTTTGTCTTAAACAAAAGAAATCAAGGATTAATGTTCTCTATATATCTTCTGTGTGAATGAATCAATTTTGA
TTTTCTCCATAAATTCATTTACGATATCTCTTGGAGCTCTTGGAGCACTTTTGTAAAAGAAAGATGAAGGCTTGGCAAACTTTGCTAAGCCTTCCGAACCTATGTTGTTCAAGAGCTCCCATGCTATTTAGGTATCAAGGAAATCTATTCTGTTTGAAG
GTACATCTCTTGTGAATAAGCGAAATATTACCTTGTCACTTTTGGAAAGTATTAGCCCTGTGCTTCACTCGGAAGGGTCTATATAAAGCAATTAGCCCAATCTCCCTGACTTTATGGGCTATCTTAAAGTGTGGGATTAAGATCGCAATGATACGGAAGTAAATGCTACAAAATCAATTTAATCC
ACAATGCTATTAAAGAAATCGAGCCCTGTTTCAATTTCTCTGATGGATGTTGTGAAAGAGAGATTTGTAAACGATTAAGACATCCCATGATAGTGGCTGGGCGAGTTATCGGATTTGATATTATGAACCTTTGGAGTATATGCAAAAACCTTCTCATTATCATGTGGATCCAAAAA
AGAGTTCTATGAATAACAGTATACTTGGACTGTCTTGTGTAAGCAATTAAGCTGT

Amino Acid Sequence

ILVQILRWKDPKSLHLRLFFHEYVNLNLSATKNPRFVLLTKRNQRLFVFLVNSVYCEYSFIFLHNPVSHLRISFGDLLERHFVCKRKEGLGKFAKHRTNLMFLKPEAHVRYVQKSLFLKGTSPLLNNMXYLVTFCESYLALCFHSERVYKQLANHSIDFNHLYVSLKATVREHMQNSFLH
NAIKKFPSPVPIPLTGLSLKRFNRLQHPISKSAHADLSDFDIIDHFRICXKLNHSHYSGSKKSFYRIZQLRLSCKTLAR

ITS2

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

TGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTGAACGCAAGTGGCCGCAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCCTGGGCTCACGCATCGCTCGCCCCC- AACCTGTGTGTTCACTCTACGGTGAAGTGAAGGGGGGGAAGAACTGGTCTCCGCTGTTGGCCGGGCTGGCCATAATGCGAGTCCCTTGAGACGGG
CCGACGACCAAGTGGTGGTATGCTCAACTAAGGTGCTGTCGGCGACCGCCGTGAAATAGGAGACTCCCGACCTGTGACGACCGTGGTACGACCTGGTACGACCG

Figura C. Código de barras de ADN e información taxonómica de la especie

Gentianella weberbaueri

Nota: La figura muestra los códigos de barras y secuencias de los nucleótidos de los genes de las regiones: rbcl, ITS, matK.

Taxonomy

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Gentianales
Family: Gentianaceae
Subfamily:
Genus: *Gentianella*
Species: *Gentianella thyrsoidea*

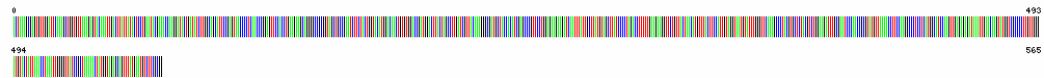
Specimen Details

Sample ID: UNASAM-HDS-137
Process ID: HDSCT006-18
Project: HDSCT
Institution Storing: Universidad Nacional Santiago Antunez De Mayolo
Field ID:
Museum ID: UNASAM-HDS-137
Collection Code:
Reference Link:
Note: Herbarium



rbcl

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

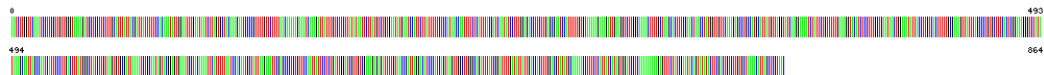
ACTAAAGCGAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGAGTACAAATTGACTTATTATACCTCTGAATACGAACCAAGGATCTGATCTTGGCAGCATTCCGAGTAAACCTCAACCCGGAGTCCACCTGAAGAAGCAGGGCCGGTAGCTGCCGAATCTTACTGGTACATGGACAATGTGTGGACCGATGGA
CTTACTAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTACACATCGAGCCGCTTCCCTGGAGAAGAGATCAATTTATGCTATGACTTATCCCCAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAAGCATGTTTACTCCATTGATGGTAAATGATTTGGTCCAAAGCCCTACGTGCTACGTCTGGAAAGATTTCGCAATC
CCACCCGATGATGTTAAAGCCTTCCAAAGCCCTCCATCGCATCCAGTTGGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCCGCCCTTGTGGGATGACTATAAACCCTAAATGGGGTTATCCCTGAAAACCTATGTTAGAGCAGTTTATGAATGATCTCCGGCG

Amino Acid Sequence

TKASVFGKGVKEYLTYYPFEYKDTDLAARFVTPQVPPPEEAGAAVAESSTGTTWTWTDGLTSLDRYKGRVHIEPVGEEDQFTAVVYPLDLFEESVYVNFSTVGNVFGFKALRALRLIEDLRIPYAVYKTFQPPHGIQVERDLKINYGRPLLGCTXPKLGLSANKYGRAVVEYLRX

matK

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

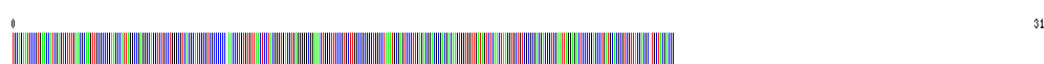
AATCTGGTCAAATCCTGGTGTGGTAAAGAGTGCCTCTTGGCATTATTACGATTATTTCCACAAATATGGAAATGAATAATCTAGTGTACAAAGATCCCGGTTGTCTTTAAACAAAAGAAATCAAAGATTATTGTCTTTATAAATCTTATGTCTGTGAATATGAATCATTCTTAT
TTTTCTCCATAACCAATTTTCTCATTACGATCAATATCCTTGGAGACCTCTTGAAGCAATCATTFTGTGTAAGAAAGAGATGAAGGTCTGGCAAAACCTTTGCTAAGACCTTGGACTAACCTATGGTGTTCAAAGAGCCTGCCATGCATATGTTAGGTATCAAGGAAATCTATTCTGTTTTGAAGG
TACATCTCCTTTGCTGAAATACTGGAAATATTACCTGTCACTTTTGGGAAAGTATTAGCCCTGTGCTTCACTCGAAAGGGTCTATATAAGCAATTAGCAATCAATCTTGGACTTATGGGCTATCTTGAAGTGTGGGATTAAGATCTGCAATAGTACGGAGTGAATGCTACAAAATCATTATTAATCCA
CAATGCTATFAAGAAATTCGAGCCCTCTGCTCAATTTCTCTGATTGGATGCTGTGCGAAGAGAGATTTTGTAACCCATTAGGACATCCATCACTAAGTGGCTGGCCAGATTATCGGATTTGATATTATTGACCACTTTGGACGATATGCAAAAACCTTCTCATTATCATAGTGGATCTCAAAAAA
GAGTTTCTCGAATACAGTATATACTCGACTCTTGTGCTAAACATTAGCTGTAAC

Amino Acid Sequence

ILVQLRQVWDAPSLHLRLFFHYNNLNNLNNKPRFVLLTKRNQRLFVFLVNSVVEYESLIFLHNFQSHLRISIFGDLLERHIFCVRRKIEGLKTFKHFHRLNLWLFKPAHVVYRVQKSLFLKLGTSPLLNNKYVYTFCEYSLALCFHISERVYXQLNHLDFMGLVLSVRLKSAIVRSEPLNQSFLIH
NAIXKFFPVPZIFLIGSLSKERFNLRLGHPESKLAWDLDFDZIDHFGRIKCNLSDHSHGSSKXKSFVRIQVLRKSCAKTLARN

ITS2

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

TGCAGAACTCCCTGAACCATCGAGTCTTGAACGCAAGTTCGCCCCGAAAGCCATTAGCCCGAGGGCACGCTCCCTGGGCTCACGCATCGGTCGCCCCCTCAACCTGTGTGTTAACTCTACGGGTGACGTGAGGGGGGGGAAACTGGCTCCCGTCTGGCCGGCTGGCTCAATGCGAGTCCGTGAGACGGGA
CGCGAGCAGACAGTGGTGGTATGATCTCAACTAAGGTGCTGTGCGCGCAGCACCCTCGAATTAGGAGACTCCCGACCTGATGACACGGCTGTACGACGC-TGCTACGACCG

Figura E. Código de barras de ADN e información taxonómica de la especie *Gentianella tristicha*

Nota: La figura muestra los códigos de barras y secuencias de los nucleótidos de los genes de las regiones: rbcl, ITS, matK

Taxonomy

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Gentianales
Family: Gentianaceae
Subfamily:
Genus: *Gentianella*
Species: *Gentianella sp.*

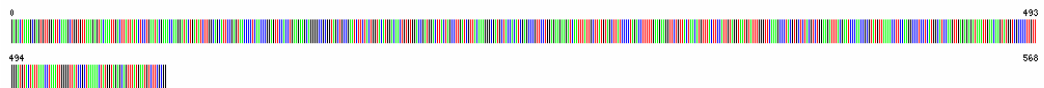


Specimen Details

Sample ID: UNASAM-HDS-138
Process ID: HDSCT007-18
Project: HDSCT
Institution Storing: Universidad Nacional Santiago Antunez De Mayolo
Field ID:
Museum ID: UNASAM-HDS-138
Collection Code:
Reference Link:
Note: Herbarium

rbcl

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

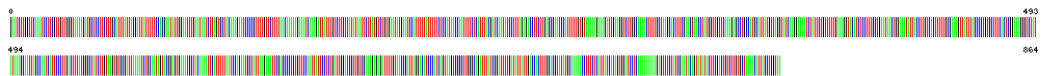
GAGACTAAAGCGAGTGTGGATTCAAAGCTGGTTAAAGAGTACAATGACTTATTATACTCTGAATACGAAACCAGGGATACTGATATCTGGGAGCATTCCGAGTAACCCCTCAACCCGGAGTCCACCTGAAGAGAGCAGGGGCGCGGGTACGTCGGAACTTCTACTGGTACATGGACAACGTGTGGACGGATGGACTTACTAGCCCAATTTCTCATTAGCGATCAATATCCCTTAGAGACTCTTGGAGCACTATTTGTGTAAAGAGAGATGGAGGTCTGGCAAACTTTGGCAAGCACTTGGAACTATGGTGTTCBAAGAGCCCTGCAATGATATTTAGGTATCAAGGAAATCTATTCTGTTTTGAAAGATCCCAACCCGGTATGTTAAACCTTCAAGGCCCTCTCATGGCATCAAGTTGAGAGAGATAAATGACCAAGTATGGTCCGCCCTGTTGGGATGACTATTAAACCTAAATGGGGTATCCGCTAAAACTATGGTAGAGCAGTTTATGAATGCTCTCCGGG

Amino Acid Sequence

ETKASVGFKAGKVEKLYTPEYETKDTDLAARVTRPQVPPPEEAGAAVAEESSTGHTWVTGDLTSLDRYGRVYIEPVPGEEDQFJAVVAVPLDLFEEGGVTFNFTSIVGNVGFKALRALREDLRPTAVYVKTQPPHGIQVERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVVECLRX

matK

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

GAACTCTGGTTCAATCCCTCTGTTGGGTAAAGATGCTCTCTCTTGGCATTATTACGATATTTCCACGAATATTGGAAATGAAATCTAGTGTACAAAGAACTCCCGTTTGTCTTTAAACAAAAGAAATCAAGATATTATTGCTCTTATATAATCTTATGCTGTGAATGAATCATTTTTATTTTTCTCATTAGCAATTTCTCATTAGCGATCAATATCCCTTAGAGACTCTTGGAGCACTATTTGTGTAAAGAGAGATGGAGGTCTGGCAAACTTTGGCAAGCACTTGGAACTATGGTGTTCBAAGAGCCCTGCAATGATATTTAGGTATCAAGGAAATCTATTCTGTTTTGAAAGATCCCAACCCGGTATGTTAAACCTTCAAGGCCCTCTCATGGCATCAAGTTGAGAGAGATAAATGACCAAGTATGGTCCGCCCTGTTGGGATGACTATTAAACCTAAATGGGGTATCCGCTAAAACTATGGTAGAGCAGTTTATGAATGCTCTCCGGG

Amino Acid Sequence

ILVQLRQAVKDPKSHLRLFFHEYNLNLNLSATXNPRFVLLTKRNQRLVFLVNSVVEYESIFFLINQFSLHRSTFRDLLEHDFVCRKEGLEKTFKAFHRTNLWLKFPAMHYRVYQGSRLFLLKGTSLNNKYYLVTFCESYLALCFHSERVYKLANHSLDFMVDVLSVRLKSAIVRSENLQNSFLINNAIKXFFPSPVPEPLTGLSLKERRFCNRLGHPKSKAWADLSDPDEIDMFRGKCNLSHYHGGSSKKSFVRISQYLRLSCKATLAX

ITS2

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

TGCAGAAATCCCGTGAACCATGAGTCTTTGAAAGCAAGTTCCGCCCAAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGCTGCTCGGGCGTCACGATCGCGTCCGCCCCCAACCCCTGTGTGTTAACTCTACGGGTGATGTGAGGGGGCGAAACTGGCTCCCGTCTGGCCCGCGGCTGGCCCTAAATGCGAGTCCCTGAGACGGACCGGACGACAAAGTGGTGGTAGTCTCAACTAAGGTGCTGTCCGCCGACGCCCGTGAATTAGGAGACTCCCGACCCCTGATGACGCGCTCATTAAAGCCTGCTACGACCG

Figura F. Código de barras de ADN e información taxonómica de la especie *Gentianella sp.*

Nota: La figura muestra los códigos de barras y secuencias de los nucleótidos de los genes de las regiones: rbcl, ITS, matK

Taxonomy

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Gentianales
Family: Gentianaceae
Subfamily:
Genus: *Gentianella*
Species: *Gentianella* sp.

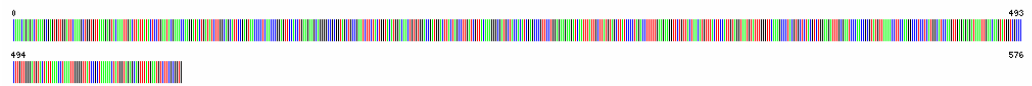


Specimen Details

Sample ID: UNASAM-HDS-140
Process ID: HDSCT009-18
Project: HDSCT
Institution Storing: Universidad Nacional Santiago Antunez De Mayolo
Field ID:
Museum ID: UNASAM-HDS-140
Collection Code:
Reference Link:
Note: Herbarium

rbcl

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

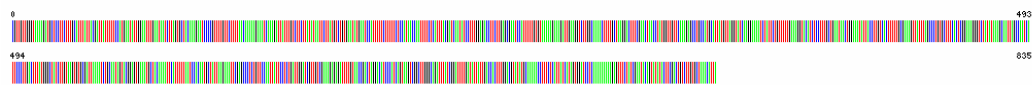
CAABACAGAGACTAAAGCGAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGAGTACAATGACTTATTATACCTCTGAATACGAACCAAGGATGATGATATCTGGCAGCATTCCGAGTAACCCCTCAACCCGGAGTCCACCTGAAGAAGCAGGGGCCCGCGTAGCTCCGGAATCTTACTGGTACATGGCAACTGTGTGG
 ACCGATGGACTTACTAGCTGTGATCGTTACAAAGGGGATGCTACACATCGAGCCCGTCTCGGAGAAGAGATCAATTTATGCTTATGATGCTTATCCCTAGACCTTTTGAAGAAGTCTGTGTAACATGTTACTCCATTTGAGGTAAATGTTGGGTTCAAAGCCCTACGCTCTACGCTGGAGAT
 TTGGGAATCCCAACCGGATGTTAAACCTTCAAAGCCCTCATGGATCCCAAGTGAAGAGATAAATGAACAAGTATGCTCGCCCTGTGGGATGATCTAAACCTAAATGGGGTTATCCGCTAAABAACTATGGTAGAGAGTTTATGAATGCTCCGGGGT

Amino Acid Sequence

QTETKASVGFKAGKVEYLLVYTPETKDTDLAARFVTPQVPPPEEAGAAVAESSTGTHTVNTDGLTSLDRYKGRVHTEPVPGEEDFIAVAVPLDLFEEGVTNMFSTIVGVWFQFKALRALRLDRLZPTAVVKTQGPHTQVERDKLNVYRPLLGCTIKPKLGLSANNVRAVVECLRGX

matK

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

CGTTGTGGTAAAGATGCTCTCTTTCGATTTATACGATATTTTTCATGAATATGGATTTGAATAATCTAGTGTACAAAGATCCCGCTTTTGTCTTTAAACAAAAGAAATCAAAGATATTGCTCTTATATAATCTTATGCTGTGAATATGAATCCATTTCTTTTCTCCATAACCAATTT
 TCTCATTTACGATCAATATCTCTGGAGCTCTTGGAGCAATCATTTTGTGTAAGAAGAAAGATGAGGCTCTGGCAAACTTTTGTAAAGGACTTTCGAACCTATGCTGTTCAAAGAGCTGCCATGATTTGTTAGGTATCAAGGAAATCTATCTCTGTTTGAAGGTACATCTCTTCTGCTGAAT
 AACTGGAAATTAACCTGTGCACTTTTGGGAAGTTAATTAAGCTCTGCTCGAAGGCTTATATAGAGCAATTAAGCAATCATCTCCCTGACTTTATGGCTATCTGTAAAGTGTGCAATGAATCTGCAATAGTAGAGGATGAATGCTACAAATCATTTTAACTCAAGTGTATTAAAGAAATTC
 GAGCCTCTGCTCAATATCTCTGATGGATCGTTGTGAAGAGAGATTTGTAAACCACTAGGACATCCCATCAAGTAACTGGCTGGGACAGATTTATCGATTTTATATTGACACTTTGGACATATATGCAAAAACCTTCTCATATCATAGTGGATCTCCTCAAAAAGAGATTTCTCATGAATACAG
 TATATACTCGACTCTCTGTGTAACATTA

Amino Acid Sequence

RCVANDAPSLHLRLFFHEHNLNLNLSATNPFPVLLTKMQLVFLVNSVYCEVESTFLVHMQFSHLRSISFDGLLERIHWVNRKIEGLKTFKDFRNLHLFKEPANVYVRQKSLFLKIGTSPLLNNKYYLVTFCEYSYALCFHSVERVYKQLANISLDFHVLVSVRLKSAIVRSEMLQNSFLDINAIXKF
 EFSVPIIPLTIGLSKERFCNRLGHPISKSAWADLSDFDIQRICXNLSHVHSGSKKSFYRIZQLRLSCAKHX

ITS2

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

TGCAGATCCCTGACCCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTGGCCCGAGGCCATTAGGCCGAGGGCACGCTCGCCCTGGGCTCACGCATCGCTGCCCCCC-ACCCTGTGTAACTCTACGGGTGACGTGAGGGGGCCGAAACTGGCTTCCGCTGTGGCCGGCTGGCCAAATCGGAGTCCCTTGAGACGGA
 CCGGAGCAGACAGTGTGGTATAGTCTCAACTAAGGTGCTGTGGCCGACGCCCTCGAATTAGGAGACTCCCGACCTGATGACGCGCTGTGACGACGCTTCTGACGAGC

Figura G. Código de barras de ADN e información taxonómica de la especie *Gentianella* sp.

Nota: La figura muestra los códigos de barras y secuencias de los nucleótidos de los genes de las regiones: rbcl, ITS, matK

Taxonomy

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Rosales
Family: Rosaceae
Subfamily:
Genus: *Polylepis*
Species: *Polylepis incana*



Specimen Details

Sample ID: UNASAM-HDS-141
Process ID: HDSCT010-18
Project: HDSCT
Institution Storing: Universidad Nacional Santiago Antunez De Mayolo
Field ID:
Museum ID: UNASAM-HDS-141
Collection Code:
Reference Link:
Note: Herbarium

rbcl

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

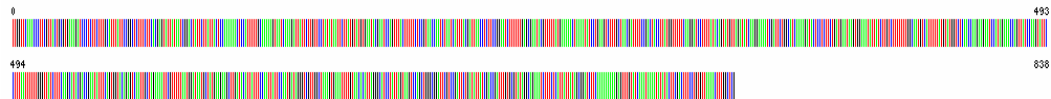
GAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGACTTATTACTCCGGACTATGAACCAAGAGACTGATATCTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGCGTCCGCCCTGAGGAAGCAGGGGCGCGGTAGCTGGGAACTCTCGACTGGTACATGGCAACTGTATGACTGAC
 GGACTTACAGCTCTGATCGTTACAAGGGCGCTGCTACCATATTGAACCTGTTCTGGAGAGAACTCAATTTATTGCTATGTAGCTACCCCTTAGACCTTTTGAAGAGGGTTCGGTAACTAACATGTTACTTCCATTGTAGGTAATGATTTGGGTTCAAGGCTTTCGCCGCTACGTCTGGAGGATTTACGA
 ATTCCTCTGCTATGTTAAAACCTTCAAGGGCCCTCACGGATCCAAGTGAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGCCGCCCTATTGGGATGCACCTAAACTAAATTTGGGGTATCTCTAAGAATTACGGTAGCAGGATTTATGAATGTCTACGCCGT

Amino Acid Sequence

ETKASVGFKAGVKVYLYYFVDFVDTDILAAFRVTPQVPPPEEAGAAVAESSTGTWTTWDTLSLDRVYGRVYIEPVGEEQFIAVYVPLDLFEEGVSVMFTSIVGNVFGKALRALRLDLRIPPVAVKTFQGPPIHQVERDKLNKVGRLLLGCTIKPKLGLSANNVRAVVECLRG

matK

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

TTGGTTCAAACTCTGCTACTGGTGAAGATCCCTCTCTTGGATTATCCGGCTCTTCTCACGAGTATATAATCGGACTATTCTTACTCCAAAAAATCCATTTTGCAAAAAGTAAACAAGATTATCTTGTCTCTATAAATCTTATGTATGTGAATACGAATCCAGTTACTTTTCTCGGTAAC
 CAATCAATCATTACGATTAACCTCTCCGGATCTTTTGGAGGATACGTTTTATGAAAACTAAAATATCCCTGAAGTCTTTGCTAACGATTTCCGACTACCTTATGGTTTTCAAGGATCCCTTTTACAGATGTTAGATATCAAGGAATCGATTCTGGCATCAAAAGATCTCTCTCTGATGAATAAG
 TGGAAATATTACTTGTCTTTTTTGGCAATGTCATTTTTATGTATGGTCTCAACCAAGAGGATCCATAGAACCCAGTTATCCAAGTATCCCTTAAATTTTTGGGTTATCTTCAAGCATACGACCGAATTTCAAGTGGTACAGAGTCAATTTCTAGAAAAATCGTTTTTAAATGGATAATGCTATGAAGAAGCTTGT
 ACATATTCCCAATATTCCAATGATAGGGTCTGGCTAAAGTGAATTTTTGTAAACATATTAGGGATCCCTATTAGTAAGTCCAGCTGGGGGATTCGTCGATCTGATATTATCGACCGATTTGTGGCTATAGCGAATAATCTTCTCATTATTATAGCGGATCTTCAAAAAAAGAGTTTGTATCAATAAATAAT
 ATACTTCGACTTCTCTGTTAAAACCTTGGCTCG

Amino Acid Sequence

LVQTLRYVWDPSSLHLFLFLHEYYNRTLITPKNSIFAKSNQRLFLFLVNSVCEYESSLLFLRNQSNILRLTSSGIFFERIRFYEKLYPEVFNDFPTLWFKDFIQQVVRVQKSLASKDPLLNKWKYVYVFFWQCHVYVWSPRRIRHNQLSKSYNFLGYLSIRPNSVQQLLENSFLMDNAWKLLD
 TLFPIPTMIGSLAKVKFNTLGHPIKSNWADSSDSDITDRVTRGRNLSHYVSGSKKSLVQIKYLRLLSCKVTLAX

Figura H. Código de barras de ADN e información taxonómica de la especie *Polylepis incana*.

Nota: La figura muestra los códigos de barras y secuencias de los nucleótidos de los genes de las regiones: rbcl, matK

Taxonomy

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Rosales
Family: Rosaceae
Subfamily:
Genus: Polylepis
Species: Polylepis sericea



Specimen Details

Sample ID: UNASAM-HDS-142
Process ID: HDSCT011-18
Project: HDSCT
Institution Storing: Universidad Nacional Santiago Antunez De Mayolo
Field ID:
Museum ID: UNASAM-HDS-142
Collection Code:
Reference Link:
Note: Herbarium

rbcl

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

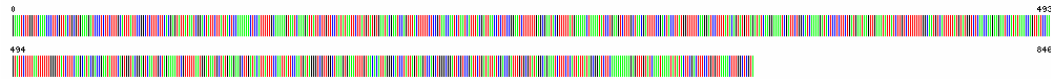
```
GAGACTAAAGCAAGTGTGGATCAAGCTGGTGTAAAGATTAAATGACTTATTACTCCGGACTATGAACCAAGATACTGATATCTGGCAGCATTCCGAGTAACCTCTCAACCTGGCGTCCGGCTGAGGAAGCAGGGGCGCGTAGCTCGGGAATCTCGACTGGTACATGGACAACCTGTATGGACTGACGGACTTACCGACTTGTGCTGACAAAGGGGCGCTACCAATTGAACTGTCTCGGAGAGAACTCAATTTATGCTTATGAGCTTACCCCTTAGACTCTTTGAAAGAGGGTTCGGTTACTAACTGTTACTTCCATTGTAGGTAATGATTTGGGTTCAAGGGCTTTCGGGCTCTACGCTCGGAGGATTAACGATTCCTCTGCTTGTATTAACCTTTCCAGGGCTCACGGGATCCAGGTTGAAGAGTAATTAACCAAGTACGGGCGCCGCTATTGGGATGACTTAACTAAATTTGGGTTATCTGCTAAGAACTACGGTAGAGCAAGTTATGAATGCTACGGGGT
```

Amino Acid Sequence

```
ETKASVFGKAGKDKVLLYYTPOVETKTDLILAAFRVTPQRPVPEEAGAAVAESSTGWTVMVTDGLTSLDRYKGRCHIEPVGEEQFIAVYVPLDLFEEGVTNHTSIVGNVFGKALRALRLDRLRPPAVVKTQQPPHGIQVERDKLNYGRPLLGLCTKPKLGLSANNVRAVVECLRGX
```

matK

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

```
GAAATCTTGGTCAAAACCTCTGCTACTGGGTGAAGATCCCTCTCTTGGCATTATCCGGCTCTTCTCACAGATTAATAATCGGACTTCTTACTCCAAAACCTCATTTTTGCAAAAGTAACTCAAGATTATCTCTGTTCTATATAAATCTTATGTATGTGAATACGAATCCAGTTTACTTTTCTCCTAAGCAATCTAATGATTTACGATTAACCTCTCCGGATCTTTTGGAGGATACGTTTTATGAAGAACTAAATATCTCGAATCTTTGCTAAGGATTTCCGACTACTCTATGGTTTTCAAGGATCTTTTATACAGTATGTAGATATGAGGAAATCGATCTCGGATCAAGGATCTCTCTCTGATGAAATAGTGAATATATCTGCTCTTTTGGCAATGATTTTATGATATGATGATCAACCAAGAAATCAATATAAACCACTTCCAGATTTCTTAAATTTTGGGTTACTTCAAGCATACGACCGAATATTTCAAGTGGTAGAGGATCAATGCTAGAAAATCTGTTTAAATGATATGCTATGAGGATCTGTATACATTATCCCAATATCCCAATGATAGGGTCTGGGCTAAAGTGAATTTTGAACACATAGGGCATCTATTAAAGTCCAGCTGGGCGGATTCGTCGATTTATGACCCGATTTGGGCTATAGGCGAAGATCTTCTCATTATATAGCGGATCTCAAAAAAAGAGGTTTGTATCAATAAATATACTCGACTTCTCTGTTAAACCTTGGCTGTA
```

Amino Acid Sequence

```
ETLVQLTVYCVKDPSSLHLFRLEHYNRTLLTPKNSFAKSNQLRFLFLVNSVYCEYESSLLFRNQSNHLRLTSSGGIFERIFRVEYKLYPEVFANDPPTLLHFKDFPIQVIRVQKSLASKDTPLLNKKLYLVFHWQHFVYASQPRRIZHNLQSKYSVNFGLVLSSTRPNSVRSQLLENSLFDNAKMKLDTLFPPIPHIGSLAKVKFNTLGHPSKSMADSDSDIIRFVIRGNLSHYVSGSSKKSLYQRYLRLSCVKTLRX
```

ITS2

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

```
CTCGTGGCCCCCCCCCTCTGGGGTCTGGAGGGAGGATGATGGCTCCCTGCTGCGCCCTCACGGCTGGCATAACTCGAGCTCTGGGACCGACCCGACCAATCGGTGTGTAGAGCTCGGTGCTCTGTCTGCGCGCGCTCTCTGGGGGCTCATGATGCGGCTGATCTCGACGCTTCAA
```

Figura I. Código de barras de ADN e información taxonómica de la especie *Polylepis sericea*

Nota: La figura muestra los códigos de barras y secuencias de los nucleótidos de los genes de las regiones: rbcl, ITS, matK

Taxonomy

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Rosales
Family: Rosaceae
Subfamily:
Genus: *Polylepis*
Species: *Polylepis weberbaueri*



Specimen Details

Sample ID: UNASAM-HDS-143
Process ID: HDSCT012-18
Project: HDSCT
Institution Storing: Universidad Nacional Santiago Antunez De Mayolo
Field ID:
Museum ID: UNASAM-HDS-143
Collection Code:
Reference Link:
Note: Herbarium

rbcl

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

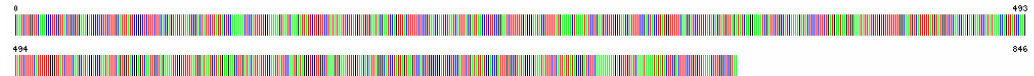
```
ACTAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGACTTATTACTCCGGACTATGAACCAAGATACTGATCTGGCAGCATTTCGAGTAACCTCAACCTGGCGTCCGCCCTGAGGAAGCAGGGGGGGGGTGTAGCTGGGAACTCTCGACGGTACACGGACAACTGTATGGACTGACGGG  
CTTACCAAGCTCTGATCGTTACAAGGGGGCGCTGACCAATTGAACCTGCTCGGAGAAAGAACTCAATTTATGCTTATGAGCTTACCCCTAGACCTTTTTGAAGAGGGTTCGGTACTAACAATGTTACTCCATTGTAGGTAATGATTTGGGTTCAAGGCTTCCGGCTCTACGCTCGGAGGATTTACGAATT  
CCTCCTGCTTATGTTAAACCTTCCAGGGCTCCCAAGTTGAAGAGAGATAAATGAAACAGTACGGCCGCCCTATTGGGATCGCACTATAAACCTAAATGGGGTATCTGCTAAGAAATTACGGTAGAGCAAGTTATGAATGCTACGGCGT
```

Amino Acid Sequence

```
TKASVGFKAGVDKYLTVYTFDYEKDTDLAARVTFPQGVVPEEAGAAVAAESSTGTTWTDGLSLDRYGRCHIEPVPGEETQFIAYVAVPLDFEEGVSNTWFTSVGNVGFKALRALRLLEDLRTPAVVKTQGFPHGIQVERDKLNKVGRLGLGCTIKPKLGLSAKNVGRAVVECLRIG
```

matK

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

```
GAATCTTGGTTCAAACCTTCGTTACTGGGTGAAGATCCCTCTTCTTGCATTTATCCGGCTCTTCTTCCAGAGTATTATAACCGACTATCTTATCTCCAAAACCTCCATTTTGCAAAAGTAATCAAGATTATTCTGTGCTATATAATCTTATGTATGTAATCAAGATCCAGTTACTTTTTCTCC  
GTAAACCAATTAATCAATTTAGGATTAACCTCTCCGGAACTTTTTGAGCGAATAGTTTTATGAABAAATAAATATCTGAACTCTTGGCAAGATTTCGCACTACTCTATGTTTTCAAGATCTTTTATACATATGTTAGATATCAAGGAAATGCAATCTCGGATCAAAAGATACTCTCTCTGATGA  
ATAAGTGAATAATATCTGTCTTTTTTGGCAATGTCATTTTATGATGGTCTCAACCAAGAGAACTCAATATAAACCAAGTATTCAGATTTCTTTCATTTTTGGGTTATCTTCAAGCATACAGCCGAATTTCACTGGTACGAGTCAATGCTAGAAAATTCGTTTTAATGATAATGCTATGAAGAGC  
TTGATCAATTTTCCAATTTCCAATGATAGGGTCTGGCTAAAGTGAATTTGTAAACACATTAAGGCACTCTATTAGTAACTCCAGCTGGGGGATTCGTCGCTGATATATCGACGATTTGTGCTATAGCCAGAAATTTCTCATTATATAGGGATCTCAAAAAAAGAGTTTGTATCAAAAT  
AATATATACTTGCATCTTCGTGTAAACCTTGGCTGTAA
```

Amino Acid Sequence

```
ILVQLRYVWDPSSLHLFRLFLHEYNRITLLTPKNSIFAKSNQRLFLVNSVYVEYESSLLFLRNQSNHLRLTSSGIFFRIFRYEKLYPEVFANDPPTLLMFKDPIQVRYVQKSLASKDTPLLMKNKYYLVFVQCHFYVWSQPRRITHNQLSKYSFHFLLVLSIRPNISVRSQLENSFLMNAHKLL  
DTLFPPIIPMIGSLAKVFCNTLGHIPISKSSMADSSDSIDRFRVIRGRNISHYSSGSKSLVQIKYLRLSCVKTLARX
```

ITS2

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

```
GTCTGTGCCCTCCCCCAACCTTTCGGGTGCAAGCTGAGCGATGATGGCTCCCGTATGCTCCATCAGCGGGCTGGCATAAATACCAAGTCTCGGTGAGCAACGCCATGATAATCGGGTGTGTAACACCTCAGTGTCTGTGTGCGCGCGTGGTGAAGGGCTGTGATGACAGTGTGATCGACGCTT  
TCAA
```

Figura J. Código de barras de ADN e información taxonómica de la especie *Polylepis weberbaueri*

Nota: La figura muestra las barras y secuencias de los nucleótidos de los genes de las regiones: rbcl, ITS, matK

Taxonomy

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Rosales
Family: Rosaceae
Subfamily:
Genus: Polylepis
Species: Polylepis racemosa

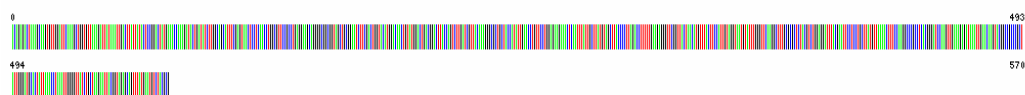


Specimen Details

Sample ID: UNASAM-HDS-144
Process ID: HDSCT013-18
Project: HDSCT
Institution Storing: Universidad Nacional Santiago Antunez De Mayolo
Field ID:
Museum ID: UNASAM-HDS-144
Collection Code:
Reference Link:
Note: Herbarium

rbcl

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

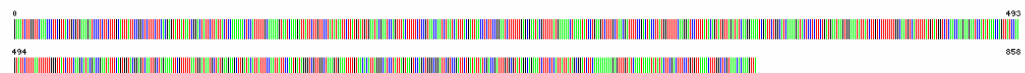
ACAGAGACTAAGCAAGTGTGGATTCAAGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGAATTTATATACTCCGGACTATGAACCAAGAGACTGATCTTGGCAGCATTTCGAGTAACTCTCAACCTGGCGTCCCGCTCGAGGAAGCAGGGGGGGGGGGTACGCTGGGAATCTTCGACTGGTACATGGCAACTGTATGGAC
GACGGACTTACCAGCTTGTGATGCTTACAAAGGGGCTGCTACCATATTGAACCTGTTCCCGAGAGAAGAACTCAATTTATGCTTATGTAGCTTACCCCTTAGACCTTTTTGAAGAGGGTTCGGTTACTAAGCATGTTTACTCTCATTTGATAGTAAATGATTTGGGTTCAAGGCTTTCGCGCTCTACGCTCGAGGATTT
CGAATTCCTCGCTTATGTTAAACTTTCGAAGGCTCCGCTCACGGGATCCAAAGTTGAAGAGATAAATGAACAAAGTACGGCCGCTCCCTATTTGGGATGCACTATTAACCTAAATGGGGTTATCTCTGAAGAAATACGGTAGAGCAATTTATGAATGCTACGGC

Amino Acid Sequence

TETKASVGFKAGVDKLYTTPDYETKDTDLAARVTPQVPEEAGAAVAESSTGTWTTWDTGLSLDRYGRCHIEFVPGTEETQIAYVAYPLDLFEEGVSVMFTSVGNVGFKALRALRLLEDLRIPPAVYKTFQGPPIHGIQVERDKLNYGRPLLGCTIKPKLGLSAXNYGRAVVECLR

matK

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

GAATCTTGGTTCACACCTCTCGGTACTGGTGAAGATCCCTCTCTTGGCATTATCCGGCTCTCTTCAGGATATTATAATCGGACTATCTTACTCCAAAACCCCATTTTTGCAAAAAGTAAACAAGATATTCTTGTCTATATAATCTTATGATGTGAATACGAATCCAGTTACTTTTTCT
CGTAAGCAACTCATATTACGATTAACTCTTCGGAACTTTTTGAGCGAATAGTTTTATGAAAACATAAATATCCGAAAGTCTTTCGAACTACTATGTTTTCCGACTACTATGTTTTCAAGGATCCCTTTATACAGTATGTTAGATATCAAGGAAATCGATCTGGCATCAAAAGATACCTCTCTGAT
AATAAGGAAATATTATCTGCTTTTTTGGCAATGTCATTTATGATGGTCAACCAAGAAAGATCCATATAACCAAGTATCCAAATCTTTAATTTTTGGGTTATCTTTCAAGGATACGACCGAATTTCAAGTGGTACGGAGTCAATTCGATAGAAATCGTTTTAATGGATAATGATGAAGAA
CTTGATACATTTTCAAATTTCCAAATGATAGGGTCTGGCTAAGTGAATTTTGTAAACACATTAGGGCATCCTATTAGTAACTCCAGTGGGGGATTCGCTGATATTATCGACGATTTGCGTATAGGCAAGATCTTCTCATTTATAGCGGATCTCAAAAAGAAAGAGTTTGTATCAAAAT
AAATATATACTTGCACCTTCCCTGTTAAACTTTGGCTCGTAAACAAAGTTA

Amino Acid Sequence

ETLVQLRYCVKQPSLHLFRLF LHEYNRTILITPKNSIFAKSNQRLFLFLVNSVYCEYESSLLFRNQSNHLRTSSGFFERIRFYELKLYPEVDFNDPFTLWFKDFPFIQVIRYVQGSILASKDTPLLNHWKYYLVFNQCHVYVNSQPRRIHINQLSKYSYFMFLVYLSIRPNISVRSQLENSFLMNDANKH
LDTLFPISPHYGLSARVFKNTLQHPZSKSVAWSDSDZDRFVIRGRNLSHYVSGSKKSLYQTKYLLRLSCVTLARKHWKX

ITS2

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

GTGTGTCCTCCCTCCAAACCTTTGGGGGTCGGAGGTGACGGATGATGGCTCCCGTATGCTCCATCACGGCTGGCATAAATACCAAGTCTCGGTGAGCAACGCCACGATAATCAAGTGTGTAACCTCGGTGCTCTGCTGCTGCGCCCTCGGTGAGGGCTGTCAATGATCGG

Figura K. Código de barras de ADN e información taxonómica de la especie *Polylepis racemosa*

Nota: La figura muestra las barras y secuencias de los nucleótidos de los genes de las regiones: rbcl, ITS, matK

Anexo 2

Fotografías de especies colectadas en la Quebrada Uta



Ageratina_azangaroensis



Bartsia_sp.



Belloa_longifolia



Berberis_lutea



Bidens_andicola



Bomarea_sp.



Cortaderia_sp.



Drymaria_sp



Gentianella weberbaueri



Gynoxys oleifolia



Halenia umbellata



Hesperomeles magellanica



Muehlenbeckia_volcanica



Perezia_coerulescens



Polylepis_reticulata



Polylepis_reticulata



Polylepis_sericea



Senecio_arachnolomus



Senecio_klatii



Senecio_sp.



Solanum_sp.



Senecio_sp.

Anexo 3

Tablas del análisis de divergencia entre secuencias

Tabla A. Estimaciones de divergencia evolutiva entre secuencias de la región ITS del género *Perezia*

Especies 1	Especies 2	Distancia	Error estándar
P. multiflora-ITS	P. multiflora FJ979652	0.012	0.007
P. multiflora-ITS	P. coerulescens-ITS	0.033	0.011
P. multiflora FJ979652	P. coerulescens-ITS	0.028	0.011
P. multiflora-ITS	P. ciliaris FJ979644	0.033	0.011
P. multiflora FJ979652	P. ciliaris FJ979644	0.028	0.011
P. coerulescens-ITS	P. ciliaris FJ979644	0.000	0.000
P. multiflora-ITS	P. coerulescens FJ979649	0.033	0.011
P. multiflora FJ979652	P. coerulescens FJ979649	0.028	0.011
P. coerulescens-ITS	P. coerulescens FJ979649	0.000	0.000
P. ciliaris FJ979644	P. coerulescens FJ979649	0.000	0.000
P. multiflora-ITS	P. purpurata EF530239	0.041	0.013
P. multiflora FJ979652	P. purpurata EF530239	0.037	0.012
P. coerulescens-ITS	P. purpurata EF530239	0.008	0.006
P. ciliaris FJ979644	P. purpurata EF530239	0.008	0.006
P. coerulescens FJ979649	P. purpurata EF530239	0.008	0.006
P. multiflora-ITS	P. pinnatifida FJ979650	0.037	0.012
P. multiflora FJ979652	P. pinnatifida FJ979650	0.033	0.011
P. coerulescens-ITS	P. pinnatifida FJ979650	0.004	0.004
P. ciliaris FJ979644	P. pinnatifida FJ979650	0.004	0.004
P. coerulescens FJ979649	P. pinnatifida FJ979650	0.004	0.004
P. purpurata EF530239	P. pinnatifida FJ979650	0.004	0.004
P. multiflora-ITS	P. virens FJ979648	0.037	0.012
P. multiflora FJ979652	P. virens FJ979648	0.033	0.012
P. coerulescens-ITS	P. virens FJ979648	0.012	0.006
P. ciliaris FJ979644	P. virens FJ979648	0.012	0.006
P. coerulescens FJ979649	P. virens FJ979648	0.012	0.006

Especies 1	Especies 2	Distancia	Error estándar
P.purpurata EF530239	P.virens FJ979648	0.020	0.008
P.pinnatifida FJ979650	P.virens FJ979648	0.016	0.008
P. multiflora-ITS	P.pinnatifida-ITS	0.037	0.012
P. multiflora FJ979652	P.pinnatifida-ITS	0.033	0.011
P. coerulescens-ITS	P.pinnatifida-ITS	0.004	0.004
P.ciliaris FJ979644	P.pinnatifida-ITS	0.004	0.004
P. coerulescens FJ979649	P.pinnatifida-ITS	0.004	0.004
P.purpurata EF530239	P.pinnatifida-ITS	0.004	0.004
P.pinnatifida FJ979650	P.pinnatifida-ITS	0.000	0.000
P.virens FJ979648	P.pinnatifida-ITS	0.016	0.008
P. multiflora-ITS	Arctium-minus-MG217961	0.165	0.027
P. multiflora FJ979652	Arctium-minus-MG217961	0.170	0.028
P. coerulescens-ITS	Arctium-minus-MG217961	0.166	0.028
P.ciliaris FJ979644	Arctium-minus-MG217961	0.166	0.028
P. coerulescens FJ979649	Arctium-minus-MG217961	0.166	0.028
P.purpurata EF530239	Arctium-minus-MG217961	0.166	0.027
P.pinnatifida FJ979650	Arctium-minus-MG217961	0.171	0.028
P.virens FJ979648	Arctium-minus-MG217961	0.171	0.028
P.pinnatifida-ITS	Arctium-minus-MG217961	0.171	0.028

Tabla B. Estimaciones de divergencia evolutiva entre secuencias de la región MATK del género *Perezia*

Especie 1	Especies 2	Distancia	Error estándar
P.recurvata KM192120	Arctium-minus KP210360-matK	0.048	0.008
P.recurvata KM192120	P. coerulescens matK	0.000	0.000
Arctium-minusKP210360-matK	P. coerulescens matK	0.048	0.008
P.recurvata KM192120	P.pinnatifida matK	0.000	0.000
Arctium-minus-KP210360-matK	P.pinnatifida matK	0.048	0.008
P. coerulescens matK	P.pinnatifida matK	0.000	0.000
P.recurvata KM192120	P. multiflora matK	0.012	0.004
Arctium-minus-KP210360-matK	P. multiflora matK	0.058	0.009
P. coerulescens matK	P. multiflora matK	0.012	0.004
P.pinnatifida matK	P. multiflora matK	0.012	0.004
P.recurvata KM192120	P.carthamoides EU841357	0.003	0.002
Arctium-minus-KP210360-matK	P.carthamoides EU841357	0.051	0.008
P. coerulescens matK	P.carthamoides EU841357	0.003	0.002
P.pinnatifida matK	P.carthamoides EU841357	0.003	0.002
P. multiflora matK	P.carthamoides EU841357	0.014	0.004
P.recurvata KM192120	P.purpurata EU385385	0.005	0.002
Arctium-minus-KP210360-matK	P.purpurata EU385385	0.052	0.008
P. coerulescens matK	P.purpurata EU385385	0.005	0.002
P.pinnatifida matK	P.purpurata EU385385	0.005	0.002
P. multiflora matK	P.purpurata EU385385	0.017	0.005
P.carthamoides EU841357	P.purpurata EU385385	0.008	0.003

Tabla C. Estimaciones de divergencia evolutiva entre secuencias de la región MATK del género *Polylepis*

Species 1	Species 2	Distancia	Error estándar
P.racemosa matK	P.sericea matK	0.001	0.001
P.racemosa matK	P.incana matK	0.004	0.003
P.sericea matK	P.incana matK	0.006	0.003
P.racemosa matK	P.weberbaueri matk	0.001	0.001
P.sericea matK	P.weberbaueri matk	0.003	0.002
P.incana matK	P.weberbaueri matk	0.006	0.003
P.racemosa matK	Prunus persica JF955823	0.131	0.014
P.sericea matK	Prunus persica JF955823	0.133	0.015
P.incana matK	Prunus persica JF955823	0.133	0.015
P.weberbaueri matk	Prunus persica JF955823	0.131	0.014
P.racemosa matK	Prunus mume JF955822	0.133	0.015
P.sericea matK	Prunus mume JF955822	0.135	0.015
P.incana matK	Prunus mume JF955822	0.135	0.015
P.weberbaueri matk	Prunus mume JF955822	0.133	0.015
Prunus persica JF955823	Prunus mume JF955822	0.003	0.002

Anexo 4

**Documento de autorización para ingresar al
Parque Nacional Huascarán**



PERÚ

Ministerio
del Ambiente

Servicio Nacional
de Áreas Naturales Protegidas
por el Estado



AUTORIZACION DE INGRESO AL ANP- N° 022 - 2019-SERNANP-PNH/J.

La Jefatura del Parque Nacional Huascarán, mediante *Resolución Jefatural del Parque Nacional Huascarán N° 005-2019-SERNANP-JEF*, de fecha 05 de abril de 2019, otorga la autorización de ingreso al interior del Área Natural Protegida- PNH, con el único propósito de realizar el proyecto Investigación científica titulada "Códigos de Barra de ADN como Herramienta en la Identificación de Flora Silvestre Alto andina Amenazada en la quebrada Uta del Parque Nacional Huascarán, Ancash - 2018", por un periodo de dos años (02) contados a partir de la fecha de emisión de la presente Resolución.

Responsable del estudio: *Srta. Gina Paola Alfaro Lopez*
Investigadora

Comprometiéndose a cumplir lo siguiente:

1. Cumplir con la normatividad de las Áreas Naturales Protegidas por el Estado.
2. Cumplir con lo establecido en el Reglamento de Uso Turístico y Recreativo del Parque Nacional Huascarán.
3. Mantener limpia el área de uso y **RETIRAR LA BASURA FUERA DEL ÁREA NATURAL PROTEGIDA** y disponer en lugares adecuados y autorizados para tal fin.
4. No alterar bajo ninguna circunstancia los ecosistemas del Parque Nacional Huascarán.
5. No extraer especies de flora y fauna ni producir incendios.
6. Difundir la importancia del Parque Nacional Huascarán.
7. Promocionar las actividades de conservación realizadas por el personal del Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas- SERNANP
8. Acatar las disposiciones del Guardaparque.
9. La presente autorización no se responsabiliza de ningún accidente que pueda suscitarse, referente al objetivo del presente documento.
10. Presentar a esta Jefatura un informe detallado de los trabajos realizados dentro del ANP- PNH.

La Jefatura del Parque Nacional Huascarán se reserva el derecho de dejar sin efecto la presente autorización en los casos que se transgredan las normas contenidas en la Ley N° 26834 - Ley de Áreas Naturales Protegidas; D.S. N° 038-2001-AG - Reglamento de Áreas Naturales Protegidas; D.L. N° 1013, modificado por D.L. N° 1039 - Ley de Creación, Organización y Funciones del Ministerio del Ambiente y el SERNANP; D.S. N° 006-2008-MINAM - Reglamento de Organización y Funciones del SERNANP; D.L. N° 1079 - Establece Medidas que Garanticen el Patrimonio de las Áreas Naturales Protegidas, y su Reglamento según D.S. N° 008-2008-MINAM; R.J. N° 196-2006-INRENA - Reglamento de Uso Turístico y Recreativo del PNH.

Huazac, 05 de abril de 2019



Atentamente

[Firma]
Ing. Wilton Martínez Fiquín
Jefe del Parque Nacional Huascarán
SERNANP- MINAM
WMFps
C.O. activo

CUT: 009588-2019

TUPA: PNH- 001-2019

Calle Dirección N° 151, Urb. El Polvorín- San Isidro, Lima 27
Aparado Postal 0452
Teléfono 01-2159453
LIMA - PERÚ

Dr. Federico Sal y Plaza N° 533
Teléfono 043 - 421886
e-mail: pnhuascarani@sernanp.gob.pe
HUASAC-ANCASH

Figura L. Documento de autorización de ingreso al Parque Nacional Huascarán