

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL Y AMBIENTAL
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERA AMBIENTAL**

**DNA BARCODING DE POÁCEAS ASOCIADAS A
PAJONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
FIRMA ESPECTRAL EN EL ACP TILACANCHA,
AMAZONAS**

Autor(a):

Bach. Vilma Aguilar Rafael

Asesores:

Ph.D. Danilo Edson Bustamante Mostajo

Dra. Ligia Magali García Rosero

Registro(.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2022

DATOS DE LOS ASESORES:

PhD. Danilo Edson Bustamante Mostajo

DNI: 43496105

Registro ORCID: 0000-0002-5979-6993

<https://orcid.org/0000-0002-5979-6993>

Dra. Ligia Magali García Rosero

C.E. 001691738

Registro ORCID: 0000-0001-7508-7516

<https://orcid.org/0000-0001-7508-7516>

Campo de la Investigación y el Desarrollo, según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE):

2.07.00 -- Ingeniería ambiental

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme permitido tener buenas personas en mi vida (familia, amigos, docentes) que me han inspirado para seguir adelante.

A mis asesores por la dedicación de su tiempo y apoyo mutuo en el desarrollo del este proyecto de investigación.

Al proyecto Dron por las facilidades para realizar este proyecto de investigación.

Al “Team de Biología Molecular” del INDES-CES, por su apoyo para el mejor desarrollo de este proyecto de investigación.

A todas las personas que de una u otra manera me brindaron su ayuda para el desarrollo de esta investigación.

Vilma

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. Policarpio Chauca Valqui

Rector

Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón

Vicerrector Académico

Dr. Flor Teresa García Huamán

Vicerrectora de Investigación

**M. Sc. Rosalynn Yohanna Rivera
López**

Decana de la facultad de Ingeniería
Civil y Ambiental

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada DNA BARCODING DE DOÑCEAS ASOCIADAS A PAVONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FIRMA ESPECTRAL EN EL ACP TILACANCHA, AMAZONAS. del egresado Vilma Aguiar Rafael de la Facultad de Ingeniería Civil y Ambiental Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 29 de noviembre del 2021

Firma y nombre completo del Asesor

David E. Bustamante Mastayo



VISTO BUENO DE LA ASESORA DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (x)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada DNA BARCOYING
DE POÍCEAS ASOCIADAS A PASOJALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
FIBRA ESPECTRAL EN EL ACP TILACANCHA, ATTAZONAS;
del egresado Vilma Aguilar Rafael
de la Facultad de Ingeniería Civil y Ambiental
Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental
de esta Casa Superior de Estudios.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.



Chachapoyas, 29 de noviembre de 2021

Firma y nombre completo del Asesor

Ligia Magali García Rosero

JURADO EVALUADOR



Ph D. Martha Steffany Calderon Ríos



M.Sc. Eli Pariente Modragón

Secretario



Dr. Carlos Eduardo Millones Chaname

Vocal

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



ANEXO 3-O

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

DNA BARCODING DE POÁCEAS ASOCIADAS A PASONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FIRMA ESPECTRAL EN EL ACP TILACANCHA, AMAZONAS

presentada por el estudiante ()/egresado (x) VILTA AGUILAR RAFAEL

de la Escuela Profesional de INGENIERÍA AMBIENTAL

con correo electrónico institucional 7696619241@untram.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 24 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene ----- % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 15 de enero del 2021


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-Q

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 16 de febrero del año 2021, siendo las 3:00pm horas, el aspirante: Wilma Aguilar Rafael, defiende en sesión pública presencial () / a distancia (x) la Tesis titulada: DNA BARRCODING DE POÁCEAS ASOCIADAS A PATONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FIRMA ESPECTRAL EN EL ACP TILACANCHA, AMAZONAS, teniendo como asesor a Dr. Danilo Edson Bustamante Mostajo y Dra. Ligia Nagali García Roxero para obtener el Título Profesional de Ingeniera Ambiental, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Dra. Martha Steffany Calderon Ríos

Secretario: M.Sc. Eli Pariente Mondragón

Vocal: Dr. Carlos Eduardo Hillones Chaname

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado (x) Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 5:00pm horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

SECRETARIO

PRESIDENTE

VOCAL

OBSERVACIONES:

.....
.....

ÍNDICE

RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN	16
II. MATERIAL Y MÉTODOS	18
2.1. Lugar de estudio.....	18
2.2. Población muestra y muestreo	19
2.3. Colección de muestras para Identificación molecular.....	19
2.3.1. Limpieza de las muestras	21
2.3.2. Extracción, amplificación, purificación y secuenciamiento de ADN	22
2.4. Metodología para determinar la firma espectral de las Poáceas	27
2.4.1. Fase I: Preparación de la plataforma UAV	28
2.4.2. Fase II: Obtención de Imágenes.....	31
III. RESULTADOS	32
3.1. Análisis filogenéticos	32
3.2. Diversidad de especies de Poaceae	38
3.3. Firma espectral.....	42
IV. DISCUSIÓN	43
V. CONCLUSIONES	46
VI. RECOMENDACIONES	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de muestras de Poáceas colectadas en la ACP Tilacancha.	20
Tabla 2. Protocolos de amplificación de gramíneas para los marcadores plastidiales rbcL y espaciador trnH-psbA.....	25
Tabla 3. Especificaciones de Parrot Disco-Pro AG UAV.	28
Tabla 4. Especificaciones de la cámara multiespectral.....	29
Tabla 5. Bandas espectrales de la cámara multiespectral Parrot sequoia.	29
Tabla 6. Especies de Poaceae identificadas usando el DNA-Barcoding (porcentaje de similitud genética = 100% en la opción búsqueda Blast de la base del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI) del espaciador intergénico trnH-psbA.	40
Tabla 7. Valores de reflectancia de Poáceas, respecto a la longitud de onda, obtenidos en este estudio.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación del ACP Tilacancha en la región Amazonas.	18
Figura 2. Protocolo de limpieza y trituración de las muestras para el proceso de extracción de ADN.	22
Figura 3. Protocolo de extracción de ADN de Poáceas colectadas del ACP Tilacancha.	24
Figura 4. Protocolo de amplificación de los amplicones de los marcadores plastidiales <i>rbcL</i> y <i>trnH-psbA</i> de Poáceas.	25
Figura 5. Captura (azul), procesamiento (amarillo) y análisis (verde) de imágenes para la generación de firma espectral de pajonales de la ACP Tilacancha.	28
Figura 6. Partes del Drone usado para toma de imágenes multiespectrales para determinación de firma espectrales de Poaceae en la ACP Tilacancha.	28
Figura 7. Cámara multiespectral.	29
Figura 8. Recorrido del dron sobre el área de estudio.	30
Figura 9. Árbol filogenético basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador intergénico <i>trnH-psbA</i> de las especies de Poaceae de la ACP Tilacancha. Escala muestra la sustitución de nucleótidos.	34
Figura 10. Árbol filogenético destacando el linaje de A (Subtribu Loliinae) basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador intergénico <i>trnH-psbA</i>	34
Figura 11. Árbol filogenético destacando el linaje B (Subtribu Calothecinae p.p) basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador intergénico <i>trnH-psbA</i>	35
Figura 12. Árbol filogenético destacando el linaje C (Subtribu Koeleriinae, Aveninae, Koeleriinae) basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador intergénico <i>trnH-psbA</i>	36
Figura 13. Árbol filogenético destacando el linaje D (Subtribu Danthoniinae y Arundinariinae) basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador intergénico <i>trnH-psbA</i>	37
Figura 14. Porcentajes de especímenes distribuidos en tribus de la Familia Poaceae colectados en la ACP Tilacancha.	38
Figura 15. Porcentajes de especímenes distribuidos en subtribus de la Familia Poaceae colectados en la ACP Tilacancha.	39
Figura 16. Diversidad de especies de Poaceae colectadas en la ACP Tilacancha.	42

Figura 17. Firma Multiespectral de pajonales obtenida mediante detección remota del dron de ala fija y cámara Parrot Sequoia +. 43

RESUMEN

El Área de Conservación Privada Tilacancha (ACP) fue creada con el fin de conservar la diversidad biológica y las fuentes de recursos hídricos. Actualmente, la biodiversidad de la ACP Tilacancha, principalmente la de los pajonales, se encuentra amenazada por factores antrópicos. En este sentido, el presente estudio caracterizó la diversidad de especies de Poáceas asociadas a pajonales mediante el uso de técnicas moleculares (DNA-barcoding) con la amplificación de los marcadores plastidiales *rbcL* y *trnH-psbA* y determinó la firma espectral de dicho grupo usando imágenes multiespectrales y técnicas de cálculo de la reflectancia. Los barcodes generados para las muestras colectadas permitieron la identificación de 10 especies de la familia Poaceae. Estas especies se agruparon en 2 tribus (Poeae y Danthoniinae) y 7 subtribus (Aveninae, Arundinariinae, Calothecinae p.p., Danthoniinae, Koeleriinae.A, Koeleriinae.B, Loliinae,) de la familia Poaceae. Por otro lado, los valores de la reflectancia obtenidos nos indicaron el comportamiento espectral de poáceas. El valor de reflectancia más elevado fue 0.6893 a una longitud de onda de 660nm, indicado una óptima longitud de onda, en medición de las poáceas. Este tipo de estudios integrados genera las bases para la realización de monitoreos de vegetación de gran precisión con la identificación óptima de la biodiversidad oculta, y adicionalmente la firma espectral de las Poáceas obtenida a lo largo de la ACP.

Palabras claves: DNA-Barcoding, firma espectral, imagen multiespectral, marcadores moleculares, Poáceas.

ABSTRACT

The Tilacancha Private Conservation Area (PCA) was created to conserve biological diversity and water sources. Currently, the biodiversity of the Tilacancha PCA, mainly that within the grasslands, is threatened by anthropogenic factors. In this sense, the present study characterized the diversity of Poaceae species associated with grasslands by using molecular techniques (DNA-barcoding) with the amplification of plastidial markers *rbcL* and *trnH-psbA* and determined the spectral signature of these species using multispectral images and reflectance calculation techniques. The barcodes generated for the samples collected for the molecular markers allowed the identification of 10 species of the family Poaceae. These species were grouped into 2 tribes (Poeae and Danthoniinae) and 7 subtribes (Aveninae, Arundinariinae, Calothecinae p.p., Danthoniinae, Koeleriinae.A, Koeleriinae.B, Loliinae,) of the family Poaceae. On the other hand, the reflectance values obtained indicated the spectral behavior of Poaceae. The highest reflectance value was 0.6893 at a wavelength of 660nm, indicating an optimal wavelength, in measurement of Poaceae. This type of integrated studies generates the basis for high precision vegetation monitoring with optimal identification of hidden biodiversity, and additionally the spectral signature of Poaceae obtained along the PCA.

Key words: DNA-Barcoding, multispectral imaging, molecular markers, Poaceae, spectral signature

I. INTRODUCCIÓN

El área de conservación privada Tilacancha está ubicada en la provincia de Chachapoyas, región Amazonas (norte del Perú) creada mediante Resolución del Ministerio del Ambiente N° 118-2010-MINAM, el 06 de julio del 2010, por un periodo de 20 años (SERNANP, 2020). Según el Mapa de Ecosistemas del Perú, la ACP presenta cuatro ecosistemas: Bosque altimontano (pluvial) de Yunga con 287,82 ha, Jalca con 5802,39 ha, Pastizales/Herbazales con 250,19 ha y Vegetación Secundaria con 460,08 ha (MINAM, 2018). El área total de ACP Tilacancha suma 6800,48 ha y fue creada con la finalidad de conservar los bosques montanos y la diversidad biológica asociada a las subcuencas Tilacancha y Cruzhuayco asegurando los bienes y servicios ambientales para el desarrollo sostenible comunal, distrital y regional (MINAM, 2010). La subcuenca de Tilacancha es la principal fuente de recursos hídricos para la ciudad de Chachapoyas y, además es el hábitat de una importante diversidad de flora y fauna, especialmente en los ambientes de pajonales, donde la diversidad de Poáceas es completamente desconocida (Guzmán *et al.*, 2012) Sin embargo, esta subcuenca se encuentra actualmente amenazada por la extensión de la agricultura y los efectos del cambio climático.

Actualmente, la ACP Tilacancha se encuentra amenazada por factores antrópicos como agricultura, ganadería, deforestación, roza, quema de pajonales y bosques naturales, que degradan el suelo (Guzmán *et al.*, 2012; Salas, *et al.* 2018). La pérdida de suelo progresiva se considera como un fenómeno irreversible, puesto que el tiempo requerido para su recuperación es extremadamente largo (Morgan, 1997), lo que influye negativamente en la biomasa, almacenamiento, filtrado y transformación del agua y del hábitat (Addis & Klik, 2015).

Las especies de la familia Poaceae, también conocidas como gramíneas (Poaceae, Magnoliophyta) tienen una distribución cosmopolita, y abarcan más de 12,000 especies contenidas en 771 géneros y 12 subfamilias, las cuales han mostrado una considerable diferencia inclusive dentro de cada linaje (Soreng *et al.*, 2015). Las especies de gramíneas (poáceas) son componentes muy importantes en los ecosistemas terrestres (Kellogg 2001, 2002; Davis 2004). La presencia de gramíneas (poáceas) es muy común en los pajonales, ambientes que tienen un clima característico por la acción de la lluvia, la niebla y otros procesos atmosféricos, permitiendo la acumulación de agua en los suelos y generando la formación de pastizales entre ellos ichu, arbustos y quenuales (Pellet & Hauck, 2017). Los pajonales, además de formar parte de un valioso ecosistema permiten la mitigación

de la pobreza, previenen la erosión del suelo contribuyendo a la protección del medio ambiente y el desarrollo sostenible por los beneficios ecosistémicos (Raveendar *et al.*, 2019). Los géneros de Poáceas predominantes en un pajonal son: *Agrostis*, *Bellardiochloa*, *Bromus*, *Calamagrostis*, *Catabrosa*, *Dactylis*, *Desmazeria*, *Holcus*, *Hordeum*, *Koeleria*, *Molinia*, *Nardus*, *Poa*, *Spartina*, *Stenotaphrum*, y *Stipa* (Ulloa & Moller, 1995).

El DNA Barcoding, conocido también como código de barras de ADN, está basado en la utilización de una región corta de ADN (genes y regiones no codificantes) con información genética única, para la identificación de especies, estudios de diversidad biológica, evolución y biología de la conservación, ya que permite la determinación objetiva de diferentes taxa (Xiwen *et al.*, 2015; Daravath *et al.*, 2018; Raveendar *et al.*, 2019). La premisa del código de barras de ADN es que, al comparar la secuencia amplificada con una base de datos de secuencias de referencia (Ejemplo: NCBI) se puede identificar de forma única un organismo o una especie (Yao *et al.*, 2017).

Los códigos de barras de ADN ofrecen una solución rápida para distinguir especies morfológicamente similares o con plasticidad fenotípica (Jaikumar *et al.*, 2019); especialmente para la mayoría de especies de plantas, entre ellas las de la familia Poaceae (Saadullah *et al.*, 2016). El uso del DNA-barcoding se ha aplicado ampliamente para la identificación de las poáceas, siendo los marcadores plastidiales, *rbcL* y *trnH-psbA* los más utilizados (Birch *et al.*, 2014; Saadullah *et al.*, 2016; Birch *et al.*, 2017; Tahir *et al.*, 2018; Krawczyk *et al.*, 2018).

Los estudios de diversidad biológica son complementados con la determinación de firmas espectrales de especies para poder entender su distribución y caracterizar su fenología (Jensen, 2009). La firma espectral es un conjunto de niveles de radiación a diferentes longitudes de onda asociadas a un objeto y a sus características comprendiendo una serie de valores de reflectancia y remitancia (Jensen, 2009). El proceso de reflexión espectral en la planta se puede describir como el proceso donde las hojas absorben luz en la zona azul y roja visible debido a la presencia de la clorofila, dejando el reflejo dominante de las longitudes de onda visibles en la zona verde, el cual es específico para diferentes plantas (Aboelghar & Khdery, 2017). La firma espectral también es utilizada para cuantificar y caracterizar diferentes etapas de crecimiento de cultivos (por ejemplo: maíz, soja, trigo, canola) mediante índices de vegetación. Estos índices son combinaciones de

bandas del espectro electromagnético que la vegetación emite o refleja, los cuales son obtenidos en una imagen multiespectral, y posteriormente validada con la firma espectral (Hesham *et al.*, 2019).

El presente proyecto busca estudiar la diversidad de especies de Poáceas asociadas a pajonales mediante el uso de técnicas moleculares (DNA-barcoding de marcadores plastidiales) y, además, determinar la firma espectral de las Poáceas haciendo uso de imágenes multiespectrales y técnicas de cálculo de la reflectancia. Permitiendo conocer la distribución y diversidad de Poáceas a lo largo de la ACP.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Lugar de estudio

El lugar de estudio fue el Área de Conservación Privada Tilacancha perteneciente a los Distritos de Mayno y Levanto, Provincia Chachapoyas ubicada a una altitud de 2300 - 3500 msnm (**Figura 1**), se contó con un permiso de autorización con fines de investigación científica de flora silvestre (RDG-D000236-2020-MINAGRI-SERFOR-DGGSPFFS) entregada por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR).

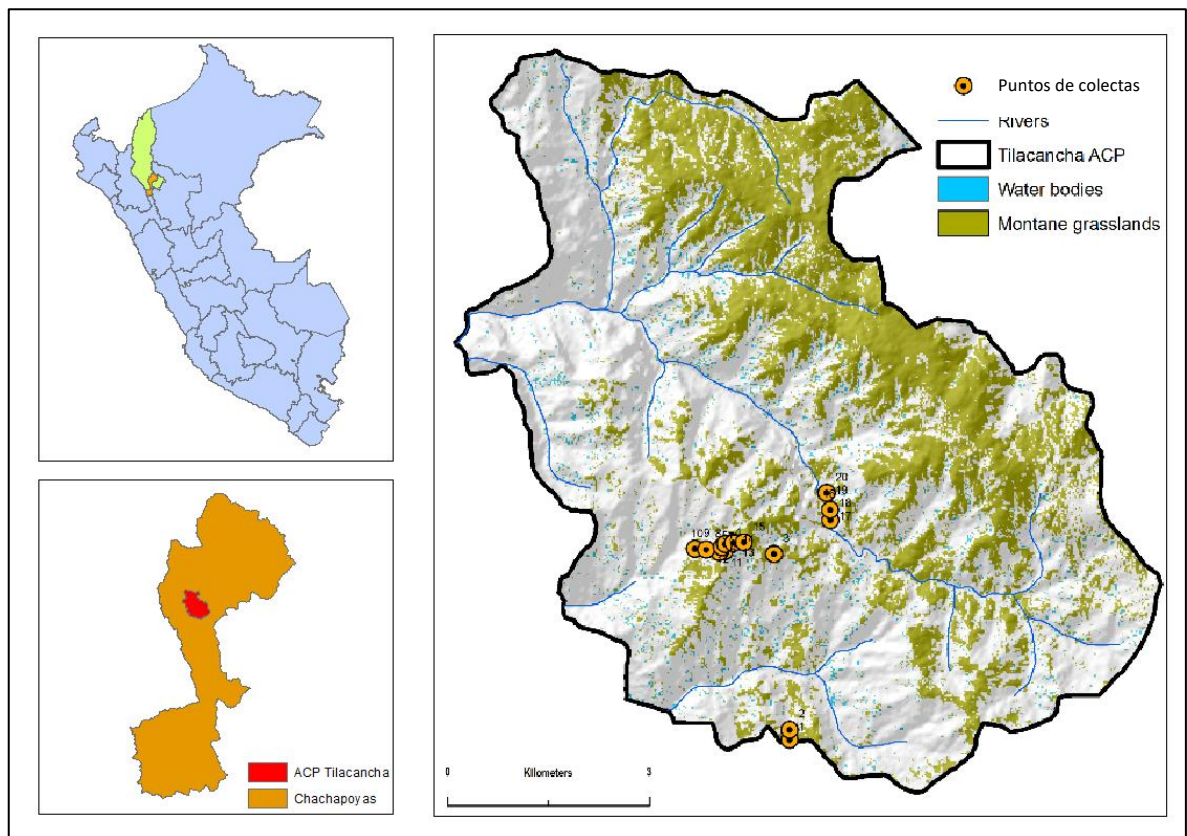


Figura 1. Mapa de ubicación del ACP Tilacancha en la región Amazonas.

2.2. Población muestra y muestreo

La población estuvo conformada por los pajonales presentes en área de conservación privada Tilacancha, de los Distritos Mayno y Levanto, en la provincia en la Chachapoyas, Amazonas.

La muestra total estuvo constituida de 34 especímenes que fueron obtenidos de 34 puntos en el mes de diciembre del año 2019. La colecta de especímenes se realizó teniendo en cuenta el estado de madurez, verificando su mejor estado posible. sobre todo, en sus hojas.

Se utilizó un muestreo no probabilístico y aleatorio, tomando como referencia a la mayor presencia de especies en el pajonal a lo largo del ACP Tilacancha. Ayudados de los vuelos preliminares del Drone (Parrot Sequoia Disco-Pro AG, USA).

2.3. Colección de muestras para Identificación molecular

Se colectó un total de 34 muestras de especímenes pertenecientes a la familia Poaceae asociados a pajonales en la ACP Tilacancha. Las colectas fueron independientes del estadio fenológico de las Poaceae. Se colectó la planta completa incluyendo raíz, la cual fue extraída con la ayuda de un machete y una pala (Rivera-Jiménez et al., 2020). Las colectas se realizaron en diciembre del 2019 debido a los permisos de colecta, procedimientos logísticos de acceso y condiciones climáticas del ACP Tilacancha. Cada muestra colectada fue etiquetada y preservada en papel absorbente para evitar su deterioro debido a la humedad. Cada punto muestreado de la ACP Tilacancha fue georreferenciado con GPS Garmim (eTrex30, Japón) en coordenadas UTM (**Tabla1**), en los que se tomaron fotografías de los especímenes en cada punto de muestreo. Estos especímenes se trasladaron al Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-A) para iniciar con el proceso de extracción de ADN.

Además, los registros y morfologías de las Poaceae colectadas fueron revisados y contrastados con bases de datos y colecciones como el Fondo de Información sobre Biodiversidad Global (<https://www.gbif.org/>), Trópicos del Jardín Botánico de Missouri (<http://www.tropicos.org>), el herbario William y Lynda Steere del Jardín Botánico de Nueva York (<http://sweetgum.nybg.org/science>) y JSTOR Global Plants (<https://plants.jstor.org>).

Luego, los especímenes fueron fotografiados y colocados posteriormente en una prensa, para realizar el secado por absorción bajo presión durante 10 a 12 días hasta que las

plantas queden completamente deshidratadas y posteriormente fueron depositadas en el herbario de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (KUELAP).

Tabla 1. Lista de muestras de Poáceas colectadas en la ACP Tilacancha.

Código de colecta	Herbario voucher	Lugar	Altitud (m.s.n.m)	Latitud sur	Longitud oeste
IP1	KUELAP-1827	ACP TILACANCHA	2814	188839	9295370
IP2	KUELAP-1828	ACP TILACANCHA	2938	189155	9296695
IP3	KUELAP-1829	ACP TILACANCHA	3168	188594	9298124
IP4	KUELAP-1830	ACP TILACANCHA	3014	187904	9298175
IP5	KUELAP-1831	ACP TILACANCHA	2984	187905	9298176
IP6	KUELAP-1832	ACP TILACANCHA	2978	187804	9298176
IP7	KUELAP-1833	ACP TILACANCHA	2918	187805	9298182
IP8	KUELAP-1834	ACP TILACANCHA	2882	187589	9298185
IP9	KUELAP-1835	ACP TILACANCHA	2926	187334	9298222
IP10	KUELAP-1836	ACP TILACANCHA	2955	187589	9298183
IP11	KUELAP-1837	ACP TILACANCHA	2997	187822	9298221
IP12	KUELAP-1838	ACP TILACANCHA	3176	187903	9298273
IP13	KUELAP-1839	ACP TILACANCHA	3213	187923	9298281
IP14	KUELAP-1840	ACP TILACANCHA	3215	187922	9298280
IP15	KUELAP-1841	ACP TILACANCHA	3233	187705	9298989
IP16	KUELAP-1842	ACP TILACANCHA	3222	187157	9299365
IP17	KUELAP-1843	ACP TILACANCHA	2767	182297	9310924
IP18	KUELAP-1844	ACP TILACANCHA	2955	189331	9298778
IP19	KUELAP-1845	ACP TILACANCHA	2964	189413	9298616
IP20	KUELAP-1846	ACP TILACANCHA	2963	189413	9298613
IP21	KUELAP-1847	ACP TILACANCHA	2965	189402	9298603
IP22	KUELAP-1848	ACP TILACANCHA	2957	189383	9298560
IP23	KUELAP-1849	ACP TILACANCHA	2955	189331	9298778
IP24	KUELAP-1850	ACP TILACANCHA	2968	189386	9298695
IP25	KUELAP-1851	ACP TILACANCHA	2959	189328	9298912
IP26	KUELAP-1852	ACP TILACANCHA	2959	189328	9298912
IP27	KUELAP-1853	ACP TILACANCHA	2959	189328	9298912
IP28	KUELAP-1854	ACP TILACANCHA	2962	189225	9298980

IP29	KUELAP-1855	ACP TILACANCHA	2962	189225	9298980
IP30	KUELAP-1856	ACP TILACANCHA	2963	189071	9299271
IP31	KUELAP-1857	ACP TILACANCHA	2953	188940	9299506
IP32	KUELAP-1858	ACP TILACANCHA	2929	188712	9299982
IP33	KUELAP-1859	ACP TILACANCHA	2930	187373	9300978
IP34	KUELAP-1860	ACP TILACANCHA	2933	186879	9301357

2.3.1. Limpieza de las muestras

La limpieza de los especímenes de gramíneas colectadas para la extracción de ADN se realizó en el área de Biología Molecular y Genómica del laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal (FISIOVEG) de la UNTRM-A.

Pequeños tejidos de hojas de poáceas de 3cm² fueron limpiadas meticulosamente con el uso de pinzas y bisturí bajo un estereoscopio Labtech, (Linitron, Reino Unido). Estas muestras limpias, pasaron a ser trituradas por un equipo disruptor de congelación y aplastamiento (SK-10, Japón) (**Figura 2**).



Figura 2. Protocolo de limpieza y trituración de las muestras para el proceso de extracción de ADN.

2.3.2. Extracción, amplificación, purificación y secuenciamiento de ADN

- **Extracción de ADN**

El ADN genómico total fue extraído usando el kit NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) de la siguiente manera (**Figura 3**):

- ✓ Se agregó 400 μL del Buffer PL1 y 10 μL de RNasa a cada muestra. Y se cerró los tubos y mezcló durante 15 a 30 segundos, a 1500 rpm y se incubó las muestras a 65°C durante 10 minutos.
- ✓ Se centrifugó las muestras durante 1 minuto.
- ✓ Se cargó el lisado en la columna con anillo violeta y centrifugó durante 2 minutos a 11,000 x rpm.
- ✓ Luego se agregó 450 μL de Buffer PC y mezcló bien, pipeteando 5 veces
- ✓ Se colocó una columna NucleoSpin Plant II (anillo verde) en un nuevo tubo de recogida (2mL), y se cargó un máximo de 700 μL de la muestra y posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 11, 000 rpm y desechar el flujo.
- ✓ **1er Lavado:** Se agregó 400 μL Buffer PW1 a la NucleoSpin Plant II Columna, y centrifugó durante 1 minuto a 11, 000 rpm y desechar el flujo.
- ✓ **2do Lavado:** Se agregó 700 μL Buffer PW2 a la NucleoSpin Plant II Columna y centrifugó durante 1 minuto a 11, 000 x rpm y desechar el flujo.
- ✓ **3er Lavado:** Se agregó 200 μL más de Buffer PW2 a la Columna NucleoSpin Plant II y centrifugó durante 2 minutos a 11, 000 rpm.
- ✓ **Elución:** Se colocó la columna NucleoSpin Plant II en un tubo nuevo de microcentrífuga de 1,5 mL, en la que se agregó 50 μL de Buffer PE (65°C), incubando la columna durante 5 minutos a 65°C. y centrifugando durante 1 minuto a 11, 000 rpm para eludir el ADN. Se repitió este paso.

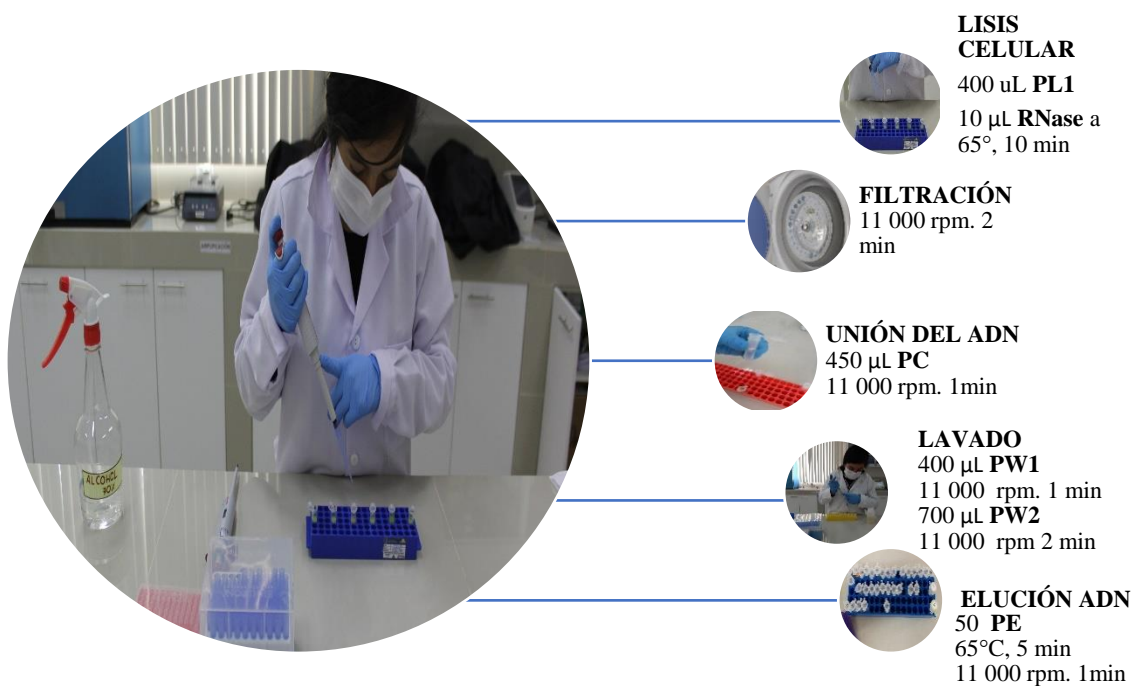


Figura 3. Protocolo de extracción de ADN de Poáceas colectadas del ACP Tilacancha.

- **Amplificación de ADN**

La amplificación de los genes plastidiales *rbcL* (ribulosa-bisfosfato carboxilasa) y el espaciador *trnH-psbA* fue realizada mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La mezcla de PCR consistió en una mezcla total de 10 μ L conteniendo 0,2 μ L de primers sentido y antisentido para *rbcL* y *trnH-psbA* (Cheng *et al.*, 2016); 5 μ L de 10 mM dNTP Master mix (mezcla que contiene la enzima Taq polimerasa, dNTPs y Mg^{+2}); 2,6 μ L de agua ultrapura y 2 μ L de ADN genómico. Se colocaron las muestras con la mezcla en un Termociclador (T100™ Thermal Cycler- Biorad, USA). Luego se configuraron las temperaturas y tiempo bajo los protocolos (**Tabla 2**).

Los productos amplificados se confirmaron visualmente mediante electroforesis en gel de agarosa. Se cargó 1 μ L de la muestra en los pocillos del gel de agarosa, al 1% (Agarosa 1,44 g, 150ml TAE 1X, 6 μ L de 0,02 μ L/mL de SYBR® Safea DNA Gel Stain.), sumergido en tampón Tris-borato 1X. En la cámara de electroforesis se consideró un voltaje de 100 V durante 15 minutos tiempo en el cual las muestras de ADN migraron del polo negativo al positivo. Las bandas resultantes se dimensionaron con la escalera de 1 kb (0,5 μ g - 50 μ g) y fueron fotografiadas con el fotodocumentador (OMNIDOC Cleaver Scientific, Reino Unido) (**Figura 4**). Finalmente, la reacción amplificada fue purificada con el kit de limpieza Zymo Reseach DNA Clean & Concentrator™-5 USA).

Tabla 2. Protocolos de amplificación de gramíneas para los marcadores plastidiales *rbcL* y espaciador *trnH-psbA*

FASE	<i>rbcL</i>			<i>trnH-psbA</i>		
	95°	3min	1x	94°	4min	1x
Pre-desnaturalización	94°	0.5 min	35x	94°	1min	40x
Desnaturalización	50°	1min	35x	50°	1min	40x
Annealing	72°	1min		72°	2.5 min	
Extensión	72°	5 min	1x	72°	7min	1x
Extensión final	95°	3min	1x	94°	4min	1x



Figura 4. Protocolo de amplificación de los amplicones de los marcadores plastidiales *rbcL* y *trnH-psbA* de Poáceas.

- **Purificación ADN**

La reacción amplificada fue purificada con el kit de limpieza Zymo Research DNA Clean & Concentrator™-5 USA), de acuerdo al siguiente protocolo:

- ✓ Se mezcló 1 volumen de muestra con 2 volúmenes de Buffer NT1 (10 µL con 20 µL)
- ✓ Luego se colocó una columna NucleoSpin® Extract II en el tubo de colección (2mL) y fue cargado hasta 700 µL de muestra y centrifugado por 30 segundos a 11,000 rpm.; se desechó el flujo y se volvió a colocar la columna en el tubo de recogida.
- ✓ Se agregó 700 µL de Buffer NT3 en la Columna NucleoSpin® II y centrifugó durante 30 segundos a 11,000 rpm. y se desechó el flujo. La columna fue colocada de nuevo en el tubo de colección.
- ✓ Se centrifugó durante 2 minutos a 11,000 rpm para eliminar el Buffer NT3 completamente. Se constató que la columna giratoria no entre contacto con el flujo mientras se retira de la centrifuga y del tubo de recolección
- ✓ Se colocó la columna de extracción de NucleoSpin® Extracto II en un tubo nuevo de microcentrífuga de 1,5 mL (no suministrado). Se Añadió 15-30 µL Buffer NE e incubó a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 1 min y centrifugó durante 1 min. a 11.000 rpm.

- **Secuenciamiento del ADN**

Se generó un total de 68 amplicones de los marcadores *rbcL* y el espaciador intergénico *trnH-psbA* de los 34 especímenes, los cuales colectados fueron secuenciadas comercialmente por Macrogen, Seúl, Corea del Sur. Los electroferogramas obtenidos de cada una de los amplificados, se editaron manualmente utilizando el programa Chromas v2.6.5 (Bustamante *et al.*, 2021).

- **Análisis filogenético**

Todos los barcodes obtenidos para el gen *rbcL* y el espaciador intergénico *trnH-psbA* fueron contrastados con la base de datos del NCBI para asignar la identidad de especies con material tipo de Poaceae con un porcentaje superior al 99% de similitud (Saarela *et al.*, 2017; Bustamante *et al.*, 2021). Las secuencias de estas especies identificadas y otras obtenidas del GenBank de miembros de la familia Poaceae fueron alineadas manualmente usando el algoritmo MUSCLE implementado en el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2018). Para el análisis filogenético, se utilizaron un total de 213 secuencias. La mejor estrategia de partición y modelo de evolución se seleccionó basándose en el Criterio de Información Bayesiano (BIC) haciendo uso del programa PartitionFinder v. 2.1.1

(Lanfear et al., 2016) y el software MrBayes v. 3.2.5 (Ronquist et al., 2012). El modelo de sustitución de nucleótidos para ambos marcadores (*rbcL* e intergénico *trnH-psbA*) se realizó mediante análisis de máxima verosimilitud (ML) utilizando el modelo (GTR + Γ + I). Los análisis de máxima verosimilitud (ML) se realizaron con el programa RAXML HPC-AVX implementado en la interface RaxML GUI v. 2.0.0 beta 10 (Edler *et al.*, 2019) y usando el modelo GTRGAMMAI 1000 réplicas de bootstrap.

2.4. Metodología para determinar la firma espectral de las Poáceas

La determinación de la firma espectral de las Poáceas en el ACP Tilacancha se ejecutó en 4 fases (Flujograma de la **Figura 5**).

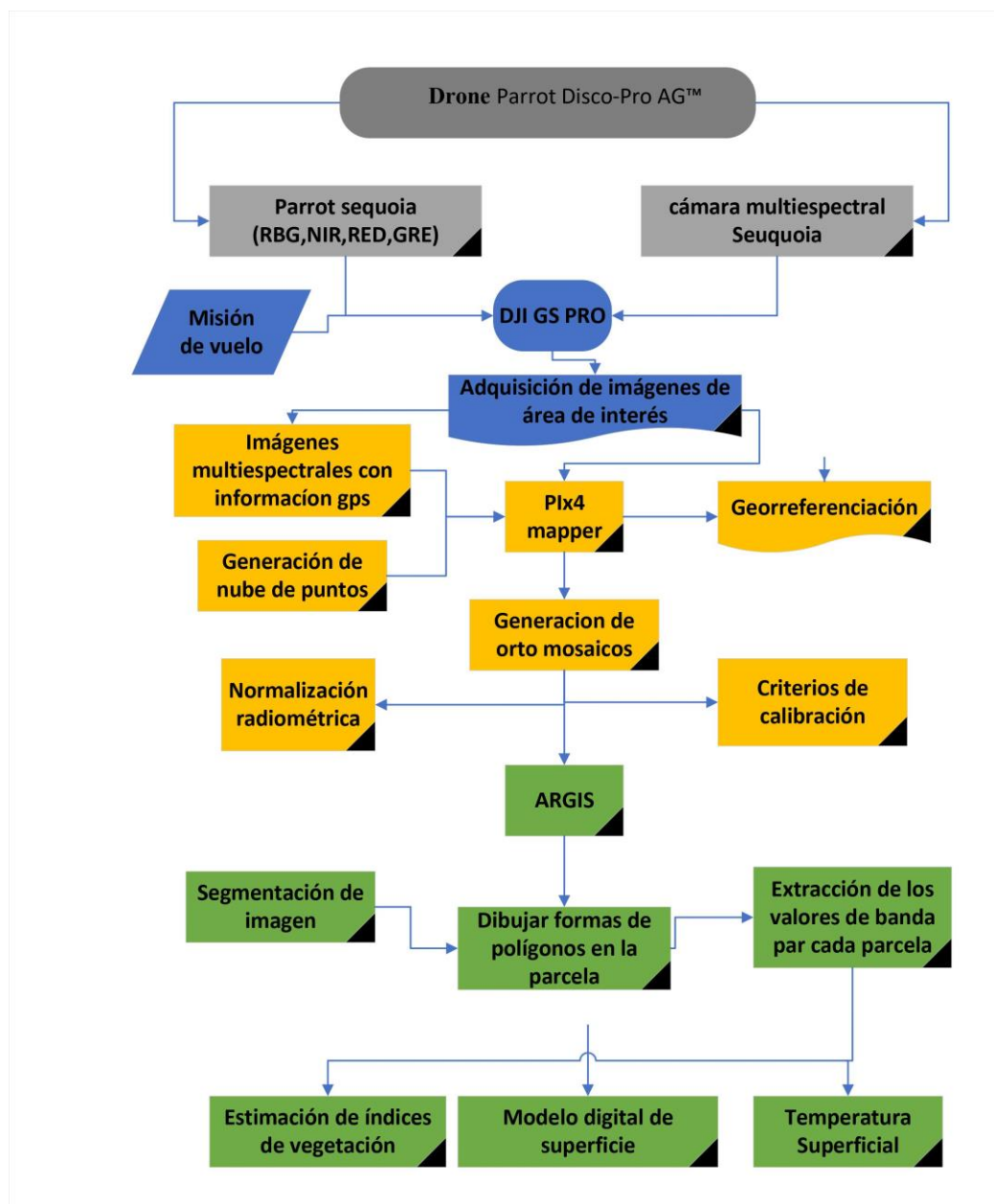


Figura 5. Captura (azul), procesamiento (amarillo) y análisis (verde) de imágenes para la generación de firma espectral de pajonales de la ACP Tilacancha.

2.4.1. Fase I: Preparación de la plataforma UAV

El vehículo aéreo no tripulado (UAV) utilizado para la ejecución de vuelo fue: el Drone Parrot Sequoia con una cámara multispectral Sequoia incorporada (**Figura 6**).



Figura 6. Partes del Dron usado para toma de imágenes multispectrales para determinación de firma espectrales de Poaceae en la ACP Tilacancha.

Tabla 3. Especificaciones de Parrot Disco-Pro AG UAV.

División	Contenidos
Dimensiones	1150x580x120mm
Peso	780 g sin la cámara Parrot Sequoia
Cobertura	80 hectáreas a 120 metros de altura en un solo vuelo
Resolución topográfica	14,8 cm/px a 120 m de altura
Alcance	Hasta 2km con Parrot Skycontroller 2 en un entorno sin obstáculos ni interferencias
Cámara	Angular de 14 megapíxeles en parte frontal
Sensores	Sensor de velocidad del aire (Sonda Pitot)
	GPS+ GLONASS integrados
	Sistema de navegación inercial
	Alímetro
Batería	Ultrasonido
	Tiene una duración de 30 minutos con Parrot Sequoia y es del tipo Li-Po de 3 celdas de 2700 mAh/25A



Figura 7. Cámara multispectral.

Tabla 4. Especificaciones de la cámara multispectral.

Especificaciones	
Peso	72 g
Dimensiones	59x41x28 mm
Distancia de muestra del suelo	8,2 cm/pixel (por banda) a 120 m
Velocidad de captura	1 imagen por segundo (todas las bandas) RAW DE 10 bit

Tabla 5. Bandas espectrales de la cámara multispectral Parrot sequoia.

Número de banda	Nombre de banda	Terminación del nombre del archivo en Sequoia	Center Wavelength (nm)	Abbreviation
1	Green	GREE	550nm	R _g
2	Red	RED	660nm	R _r
3	Near-infrared	NIR	790nm	R _{nir}
4	RedEdge	REG	735nm	R _{re}

El sensor Sunshine incorporado en la cámara tiene que estar integrado en la parte superior del dron con una visión hemisférica clara sobre él. Además, el sensor tiene que estar perfectamente horizontal, alineado con el dron; el cuerpo principal tiene que estar integrado debajo del dron, orientado hacia el suelo y puede sujetar en cualquier dirección del eje x (Gutiérrez et al., 2018). Y estar firmemente sujeto para limitar las vibraciones durante el vuelo. Su sujeción debe estar consolidada y su movimiento debe ser al unísono, el cambio de orientación de uno debe reflejarse en el otro de manera que el ángulo entre sus planos permanezca constante (Claros et al., 2016).

Se debe verificar la Calibración Radiométrica de Imágenes Parrot Sequoia: La calibración radiométrica se refiere a la capacidad de convertir los números digitales registrados por los sistemas de imágenes por satélite en la unidad física, radiancia ($W / m^2 / sr / \mu m$) o reflectancia. La calibración convierte la información de la imagen original de cada pixel, de Niveles Digitales -ND- a Niveles de Reflectancia al ser captada mediante el sensor en el tope de la atmosfera, permitiendo la disminución de los efectos de dispersión, absorción ocasionados por la existencia de partículas en la atmósfera (Delgado-Correal & García 2011; Jensen 2009). La calibración radiométrica completa con Parrot Sequoia es automática cuando se procesan los datos con el software Pix4D (Pix4Dfields y Pix4Dmapper). Esta calibración automática ahorra tiempo operativo y permite una precisión profunda en las mediciones de reflectancia.

- **Modelo del plan de vuelo.** El recorrido del dron formó 6 líneas sobre el área de estudio (**Figura 8**), y en el recorrido de la primera línea y la última se toman las fotografías con el uso de la cámara multiespectral (Duffy *et al.*, 2018).



Figura 8. Recorrido del dron sobre el área de estudio.

- **Planificación de vuelo.** Se tuvo en cuenta criterios óptimos sobre dónde y cuándo volar y se identificaron ubicaciones seguras para el despegue y aterrizaje del dron, la orografía del terreno, altura de vuelo, velocidad e inclinación de la cámara (Duffy *et al.*, 2018).

El día de vuelo se realizó en el sector Lagunas en el ACP Tilacancha el 1/12/2019 a las 12:15:33 pm at Mountain Standard Time con una duración de: 00:05:56 minutos. Como referencia de vuelo se tuvo las siguientes coordenadas geográficas: -6,341022, -77,824907, con una altitud desde 2996,30 m hasta 3142.38 m. Las capturas de las imágenes multiespectrales se realizaron en época lluviosa (diciembre 2019) debido a que la toma de datos de coberturas vegetales son más eficientes y no muestran diferencias significativas con respecto a la época seca al no estar relacionados a las condiciones climáticas (Estrada Zuñiga, 2021; Matteucci et al., 2015). El vuelo se programó mediante el Programa Pix4D capture 4.10; en la función de ajustes, se seleccionó al dron Disco-Pro AG, seguidamente se hicieron los ajustes al plan de vuelo con un ángulo de la cámara 90°

- **Ejecución de vuelo.** El vuelo se ejecutó mediante Datamapper Inflight teniendo en cuenta parámetros obtenidos en la planificación (Rodríguez, 2017).

2.4.2. Fase II: Obtención de Imágenes

Las imágenes multiespectrales fueron tomadas en los puntos de muestreo que se realizó en el ACP Tilacancha. Logrando la obtención de las imágenes multiespectrales tomadas por la cámara multiespectral Parrot Sequoia + (**Figura 7**) la cual proporcionó mediciones de reflectancia respecto a cada banda (Ahamed *et al.*, 2017). Esta cámara tiene incorporada en sus 4 bandas espectrales, una cámara RGB de 16Mpx.

Las imágenes Multiespectrales RGB generadas de las tomas en el ACP Tilacancha fueron de 17.80 cm. Para las imágenes proporcionadas por la cámara multiespectral se hizo una superposición frontal de 80% y una superposición lateral de 70%. Además, se utilizó una velocidad de 60 km/hora con una altura de vuelo de 100 metros. Mientras se operaba el UAV, la tasa de duplicación, el tiempo de vuelo y la altitud de vuelo se establecieron en 80%, aproximadamente 20 min y 150 m, respectivamente

Con la calibración radiométrica automática de las imágenes multiespectrales obtenidas se logró imágenes de mejor calidad pues al estar implementadas por software Pix4DFields 1.8.1, corrigen cada valor de píxel basándose en un modelo físico del proceso de adquisición de imágenes, en particular un modelo de luz que llega al sensor (EPFL, 2011).

Fase III: Procesamiento de imágenes

Para el procesamiento de las imágenes se formaron orto mosaicos usando el programa Pix4D. Adicionalmente, se formaron polígonos con el uso del programa ARGIS sobre los lugares de los puntos de muestreo donde se tomaron imágenes (Pastonchi, 2020).

Fase IV: Extracción de características

Para las especies de Poáceas, se obtuvo el comportamiento espectral dentro del rango vegetación. El comportamiento a distintas longitudes de onda y diversos valores de reflectancia de ciertos tipos de vegetación, como coníferas y pastos verdes fueron obtenidas tomando como referencia la **imagen 43** de Hernández (2011), y **figura 1** de Kharuf, (2018).

III. RESULTADOS

3.1. Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos basados en el marcador *rbcL* no brindaron resolución ya que se generó muchas politomías y agrupamientos incongruentes (**Anexo 1**). Por otro lado, los análisis filogenéticos del marcador intergénico *trnH-psbA* agruparon los especímenes colectados en la ACP Tilacancha y sus parientes cercanos en siete linajes (**Figura 9, Tabla 6**). En el primer linaje se ubicaron cinco muestras (IP7, IP9, IP28, IP29, IP30) del género *Festuca* de la subtribu *Loliinae* (**Figura 10**). En el segundo linaje se ubicó una muestra (IP31) del género *Relchela* de la subtribu *Calothecinae p.p* (**Figura 11**). En el tercer linaje dos especímenes (IP4, IP8) pertenecientes al género *Trisetum* de la subtribu *Koeleriinae B* (**Figura 12**). En el cuarto linaje los especímenes (IP1, IP2, IP17, IP11, IP21, IP26, y IP27) se ubicaron dentro del género *Duyeuxia* de la subtribu *Koeleriinae A* (**Figura 12**). En el quinto linaje, encontramos los especímenes (IP3, IP5, IP15, y IP34) ubicándose en el género *Helictotrichon* de la subtribu *Aveninae* (**Figura 12**). Cinco especímenes (IP6, IP10, IP13, IP19, P22) se ubicaron en el género *Cortaderia* de la subtribu *Arundinariinae* en el linaje seis (**Figura 13**). Finalmente, un espécimen (IP16) se ubicó en el género *Danthonia* de la subtribu *Danthoniinae* en el linaje siete (**Figura 13**).

Figura 9. Árbol filogenético basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador intergénico *trnH-psbA* de las especies de *Poaceae* de la ACP Tilacancha. Escala muestra la sustitución de nucleótidos.

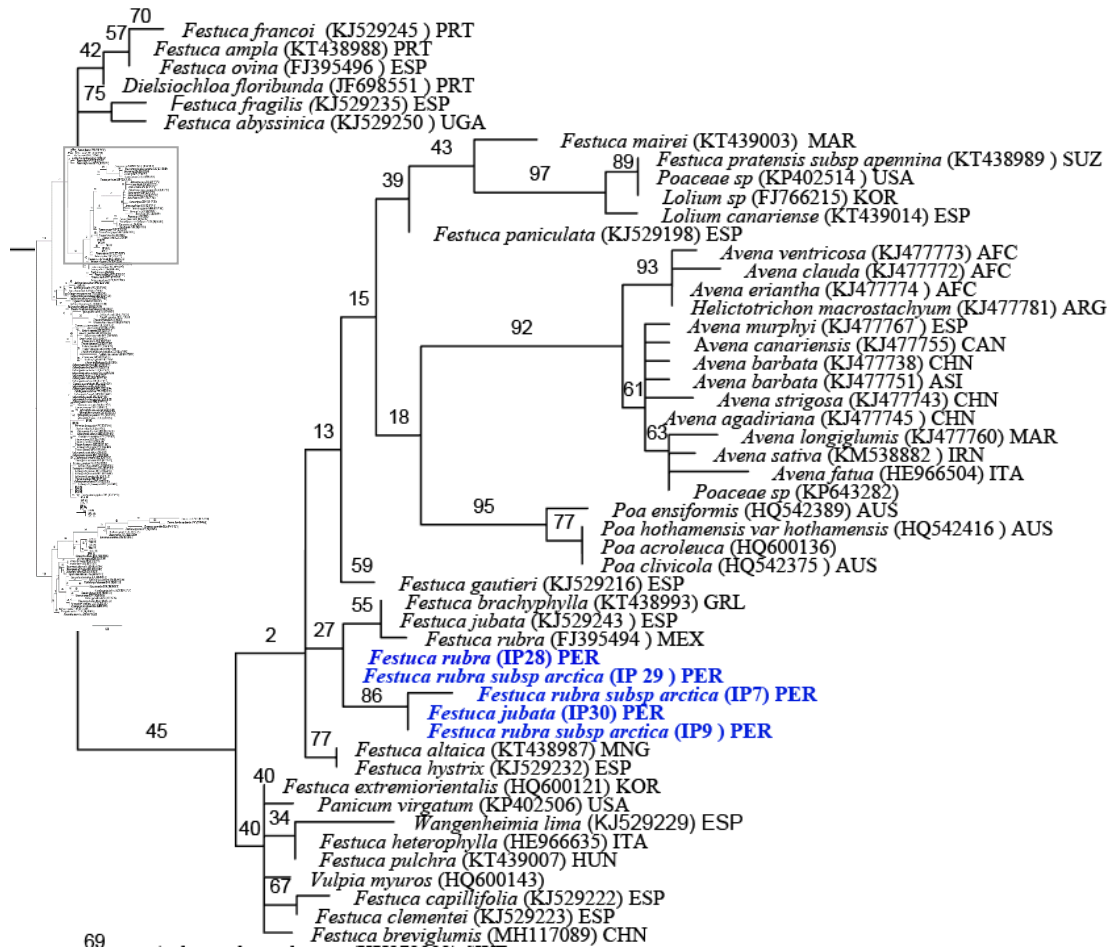


Figura 10. Árbol filogenético destacando el linaje de A (Subtribu Loliinae) basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador intergénico *trnH-psbA*.

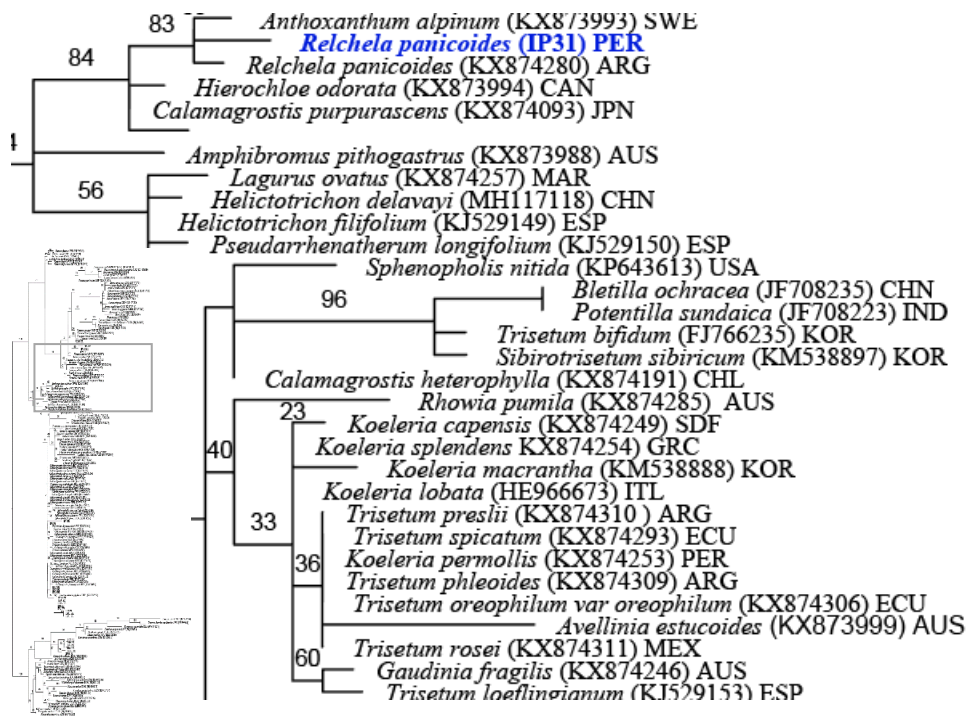


Figura 11. Árbol filogenético destacando el linaje B (Subtribu Calothecinae p.p) basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador intergénico *trnH-psbA*.

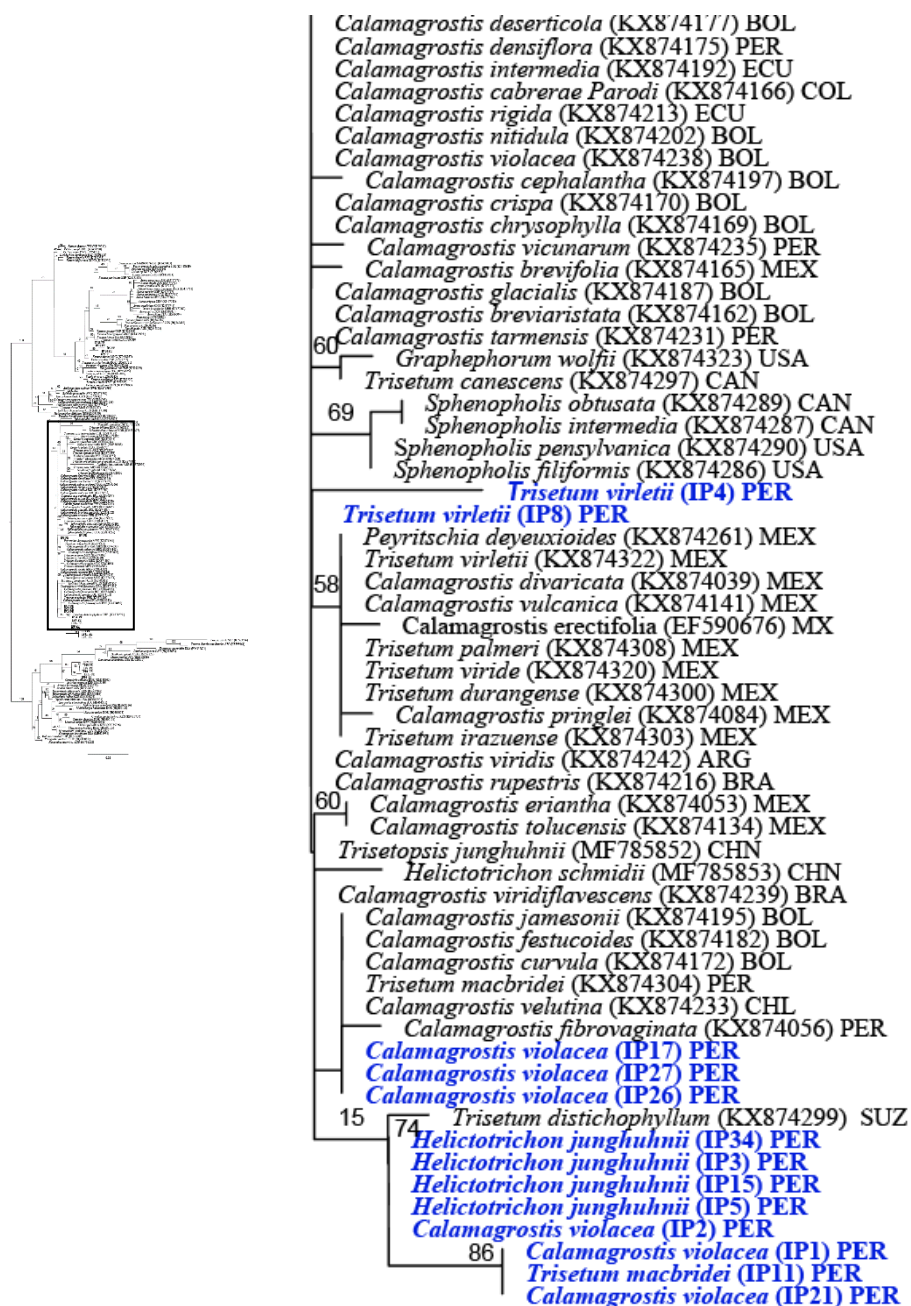


Figura 12. Árbol filogenético destacando el linaje C (Subtribu Koeleriinae, Aveninae, Koeleriinae) basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador intergénico *trnH-psbA*.

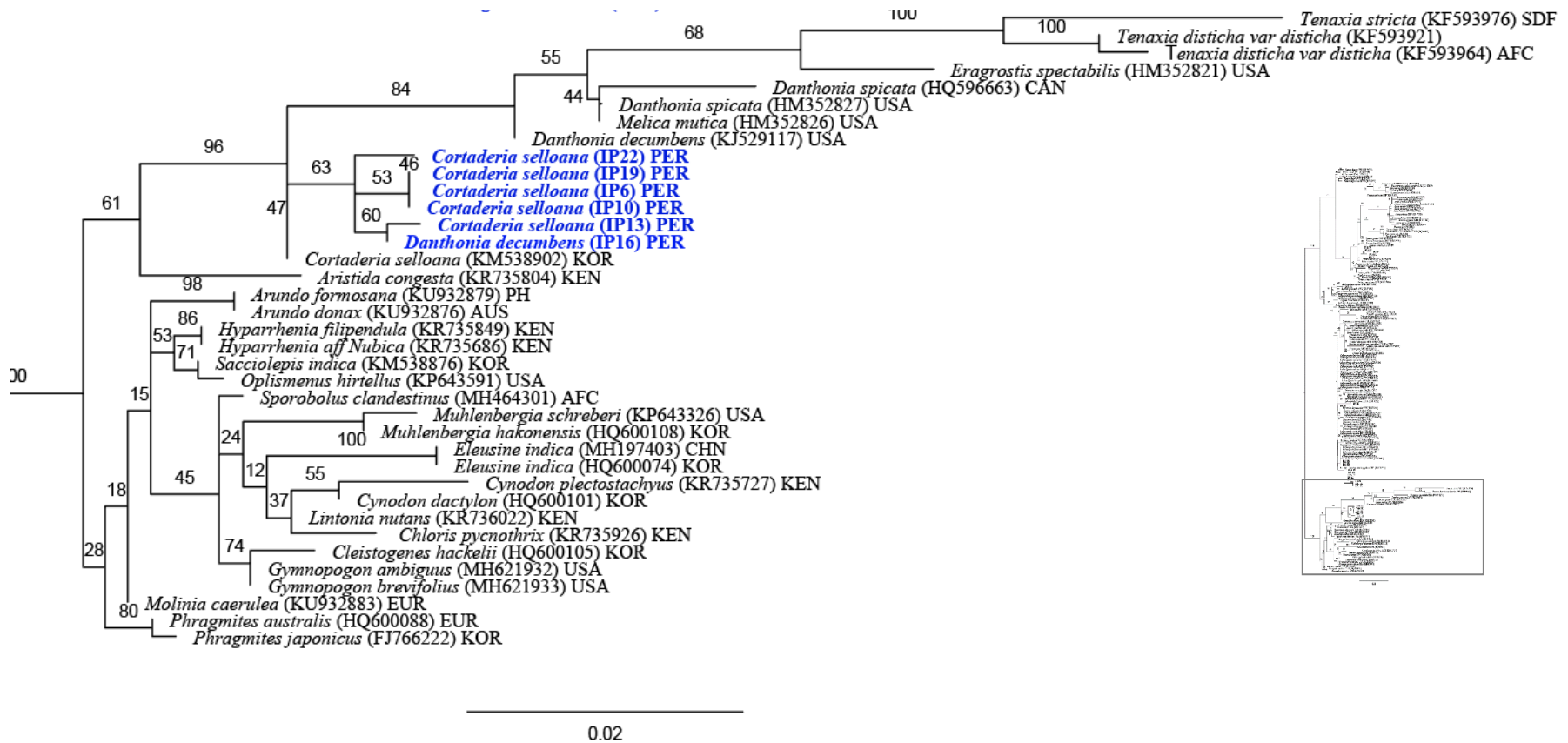


Figura 13. Árbol filogenético destacando el linaje D (Subtribu Danthoniinae y Arundinariinae) basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador intergénico *trnH-psbA*.

3.2. Diversidad de especies de Poaceae

Usando el marcador intergénico *trnH-psbA*, las muestras colectadas de Poáceas en la ACP Tilacancha se agruparon en 2 tribus y 7 subtribus (**Figs. 14, 15**), donde 71% de las especies colectadas pertenecen a la tribu *Poeae* y 29% a la tribu *Danthoniinae* (**Figura 14**). De todas las muestras colectadas, se encontró el siguiente porcentaje de individuos para cada Subtribu: *Aveninae* 16%, *Koeleriinae.A* 28%, *Loliinae* 20%, *Calothecinae p.p.* 4%, *Koeleriinae.B* 8%, *Danthoniinae* 4%, *Arundinariinae* 20% (**Figura 15**).

Los barcodes generados para las muestras colectadas del marcador intergénico *trnH-psbA*, luego de compararlas con la base de datos del NCBI (Porcentaje de similaridad genética = 100%) permitieron identificar las siguientes 10 especies de la familia Poaceae: *Helictotrichon junghuhnii* (Zuniga *et al.*, 2017); *Calamagrostis violácea* (Saarela *et al.*, 2017); *Trisetum macbridei* (Saarela *et al.*, 2017); *Festuca rubra subsp. arctica* (Cheng, 2015); *Festuca jubata* (Cheng, 2015); *Festuca rubra* (James, *et al.*, 2008); *Relchela Panicoides* (Saarela *et al.*, 2017); *Trisetum virleti* (Saarela *et al.*, 2018); *Danthonia decumbens* (Pimentel *et al.*, 2014) *Cortaderia selloana* (Lee, J.H. & Kim, Y.D, 2014) (**Tabla 6**).

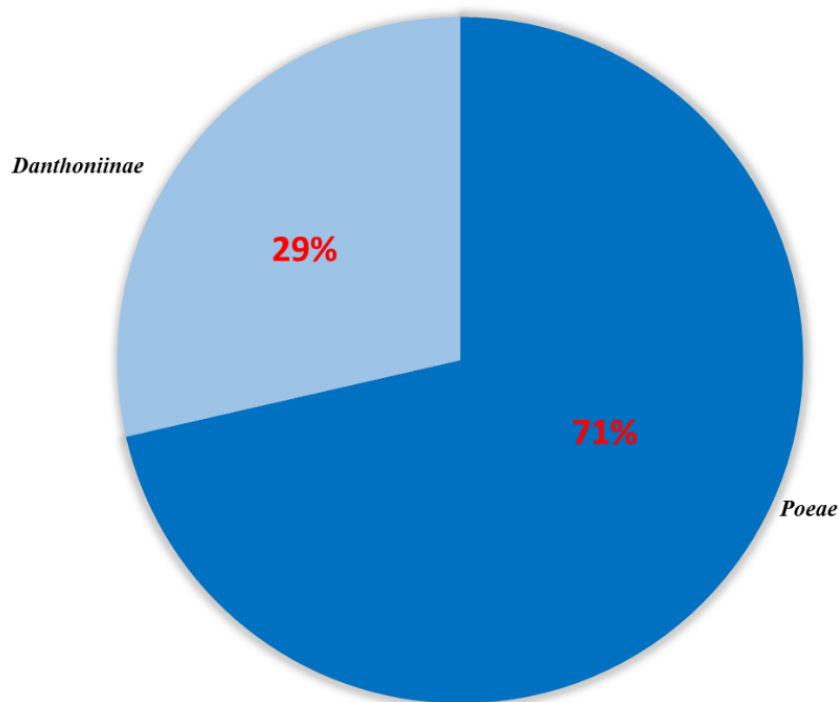


Figura 14. Porcentajes de especímenes distribuidos en tribus de la Familia Poaceae colectados en la ACP Tilacancha.

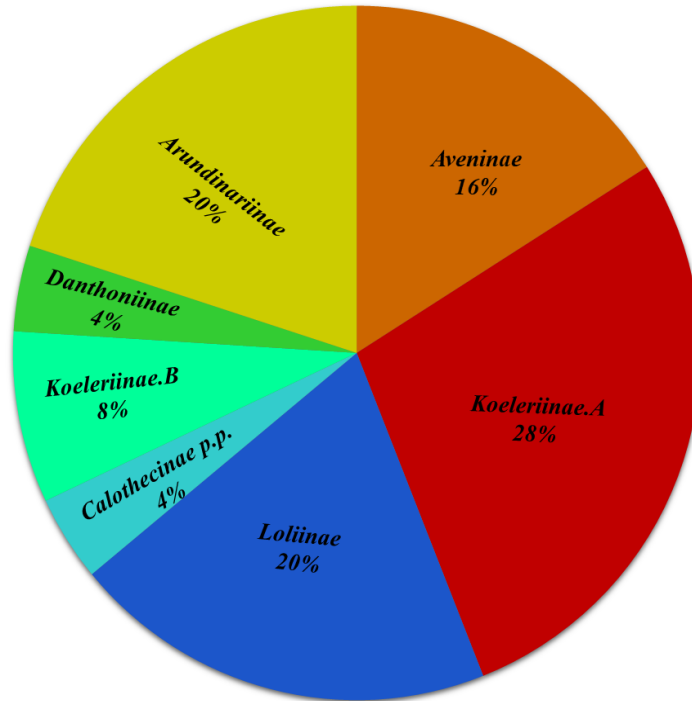


Figura 15. Porcentajes de especímenes distribuidos en subtribus de la Familia Poaceae colectados en la ACP Tilacancha.

Tabla 6. Especies de Poaceae identificadas usando el DNA-Barcoding (porcentaje de similitud genética = 100% en la opción búsqueda Blast de la base del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI) del espaciador intergénico *trnH-psbA*.

NCBI= <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

CÓDIGOS DE COLECTA	SECUENCIAS_BLAST	Subtribu	TRIBU
KUELAP-1860	<i>Helictotrichon junghuhnii</i>	Aveninae	Poeae
KUELAP-1829	<i>Helictotrichon junghuhnii</i>		
KUELAP-1841	<i>Helictotrichon junghuhnii</i>		
KUELAP-1831	<i>Helictotrichon junghuhnii</i>		
KUELAP-1828	<i>Calamagrostis violacea</i>	Koeleriinae.A	
KUELAP-1843	<i>Calamagrostis violacea</i>		
KUELAP-1853	<i>Calamagrostis violacea</i>		
KUELAP-1852	<i>Calamagrostis violacea</i>		
KUELAP-1837	<i>Trisetum macbridei</i>		
KUELAP-1847	<i>Calamagrostis violacea</i>		
KUELAP-1827	<i>Calamagrostis violacea</i>	Loliinae	
KUELAP-1835	<i>Festuca rubra subsp. arctica</i>		
KUELAP-1833	<i>Festuca rubra subsp. arctica</i>		
KUELAP-1855	<i>Festuca rubra subsp. arctica</i>		
KUELAP-1856	<i>Festuca jubata</i>		
KUELAP-1854	<i>Festuca rubra</i>	Calothecinae p.p.	
KUELAP-1857	<i>Relchela panicoides</i>		
KUELAP-1834	<i>Trisetum virletii.</i>		
KUELAP-1830	<i>Trisetum virletii.</i>	Koeleriinae.B	
KUELAP-1842	<i>Danthonia decumbens</i>	Danthoniinae	Danthoniinae
KUELAP-1839	<i>Cortaderia selloana</i>	Arundinariinae	
KUELAP-1832	<i>Cortaderia selloana</i>		
KUELAP-1845	<i>Cortaderia selloana</i>		
KUELAP-1836	<i>Cortaderia selloana</i>		
KUELAP-1848	<i>Cortaderia selloana</i>		

Danthonia decumbens



Deyeuxia viridis



Calamagrostis violácea



Cortaderia selloana



Festuca rubra



Festuca rubra subsp. arctica



Festuca jubata



Helictotrichon junghuhnii



Relchela panicoides





Figura 16. Diversidad de especies de Poaceae colectadas en la ACP Tilacancha.

3.3. Firma espectral

La firma espectral de los pajonales se obtuvo mediante la cámara multiespectrales Parrot Sequoia + pues esta proporcionó mediciones de reflectancia absoluta (**Figura 17**). La cámara Sequoia capturó longitudes de onda verde, roja, roja y NIR (**Tabla 7**), las cuales ayudaron a la captura de imágenes para la formación del orto-mosaico pasando a ser procesados mediante el software Pix4D (Pix4Dfields y Pix4Dmapper). La distancia de muestreo a tierra (GSD) fue de 11 cm/pxl.

Tabla 7. Valores de reflectancia de Poáceas, respecto a la longitud de onda, obtenidos en este estudio.

Bandas	Longitud de onda en nm	Reflectancia de 0 a 1
Green	550	0,5328
Red	660	0,6893
RedEdge	735	0,4569
Near-infrared	790	0,4561

Los valores de la reflectancia obtenidos indicaron el comportamiento espectral de las poáceas de pajonales ubicados en una longitud de onda de 550 - 790 nm. Además, no se observaron diferencias en los valores de reflectancia dentro de todo el grupo de Poáceas respecto a cada banda. La firma espectral se generó utilizando los valores de longitud de onda y reflectancia de cada banda, la cual es un patrón de respuesta característico, ya que cada material en la naturaleza tiene su propia interacción con la energía electromagnética

(reflectancia) (**Figura 16, Tabla 7**). También se observó que el mayor valor de reflectancia es de 0,6893 a una longitud de onda de 660nm, indicado una óptima longitud de onda para realizar la medición de las poáceas.

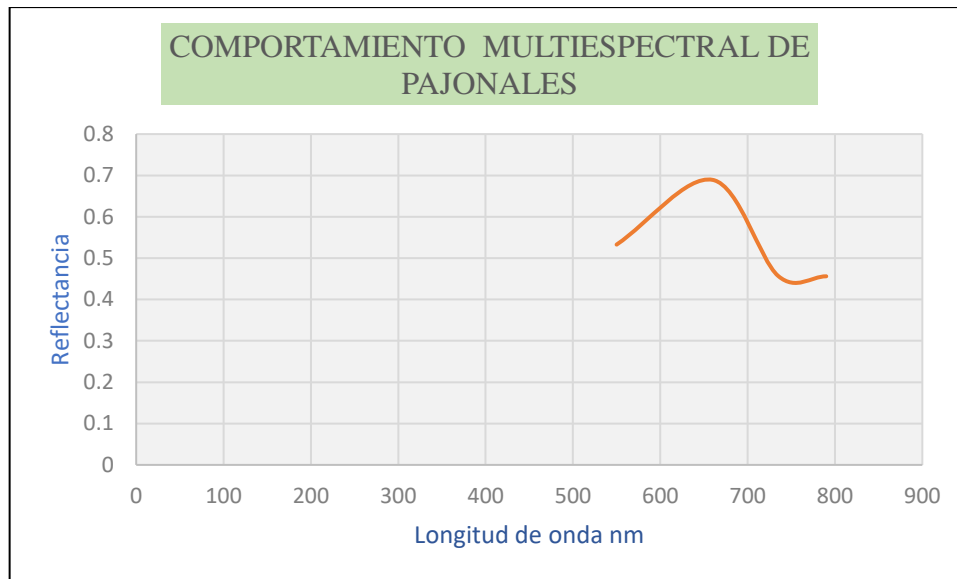


Figura 17. Firma Multiespectral de pajonales obtenida mediante detección remota del dron de ala fija y cámara Parrot Sequoia +.

IV. DISCUSIÓN

Actualmente, el Perú cuenta con un total 147 Áreas de Conservación Privada (ACP) que brindan servicios ambientales y ecosistémicos, las cuales están protegidas legalmente por el Estado peruano (SERNANP, 2021). En una de ellas, la ACP Tilacancha, se han desarrollado tradicionalmente estudios con un enfoque en servicios ecosistémicos y de evaluación del impacto de las actividades antrópicas y cambios de cobertura vegetal (Guzmán *et al.*, 2012; Salas *et al.*, 2018). Sin embargo, la ACP Tilacancha presenta diferentes ecosistemas que albergan una gran diversidad biológica que aún se mantiene desconocida (SERNANP, 2021). Uno de los motivos de este desconocimiento de la diversidad se debe a las grandes similitudes morfológicas (plasticidad fenotípica) entre especies que comparten el mismo hábitat, siendo su identificación casi imposible si solo se usan técnicas tradicionales (Jaikumar *et al.*, 2019). El presente estudio es el primero en Amazonas en utilizar herramientas moleculares, como el DNA barcoding para la caracterización de la diversidad de especies (Poáceas), y a su vez uno de los pioneros en el uso de drones para la caracterización de la firma espectral de la diversidad de pajonales en la ACP Tilacancha.

El DNA Barcoding es un método para la discriminación de especies y generación de inventarios florales (Sánchez *et al.*, 2020) y muestra una elevada eficiencia en la diferenciación de especies de Poaceae (Barker *et al.*, 1995; GPWG II, 2011; Hollingsworth, 2011; Awad *et al.*, 2017; Kumar, 2017; Sánchez *et al.*, 2020). A pesar de la efectividad de esta metodología, en la actualidad, en el Perú, se siguen reportando especies de poáceas en base sólo a características morfológicas (Peralta & Sinfuentes, 2018; Gutierrez, 2021). En el presente estudio, 10 especies de poáceas fueron identificadas en la ACP Tilacancha entre los 2700 y 3490 m.s.n.m. con el uso del DNA barcoding para el marcador intergénico *trnH-psbA* (**Tabla 6**). Estas especies también fueron analizadas con el marcador plastidial *rbcL* (**Anexo 1**); sin embargo, la presencia de politomías en sus respectivas filogenias limita su utilidad como marcador de registros florísticos para Poaceae. Por el contrario, la gran resolución del marcador intergénico *trnH-psbA* para la identificación de especies confirma su gran utilidad, tal y como fue previamente propuesto para la discriminación de especies de otras Poaceae como las gramíneas (*Cynosurus cristatus*, *Dactylis glomerata* y *Trisetum favescens*), leguminosas y cereales (Awad *et al.*, 2017; Kumar, 2017; Sánchez *et al.*, 2020).

Las poáceas de los pajonales generalmente se encuentran distribuidas en climas templados fríos y a una altitud superior a los 2000 msnm (Soreng *et al.*, 2015). Estos ecosistemas son típicos de la ACP Tilacancha. En esta ACP, el presente estudio identificó especies de los géneros *Calamagrostis*, *Cortaderia*, *Danthonia*, *Deuyexia* y *Trisetum* que son consideradas como taxa nativas del Perú (Saarela *et al.*, 2017). Adicionalmente, se confirma los primeros reportes de tres especies en el Perú. Por ejemplo, *Relchela panicoides* considerada nativa del Sur de Argentina (Govaerts *et al.*, 2021), *Helictotrichon junghuhnii* reportada como nativa de Java, Nueva Guinea y Sumatra (Govaerts *et al.*, 2021) y especies del género *Festuca* distribuidas en regiones subárticas y México (Govaerts *et al.*, 2011).

La mayor cantidad de reportes de especies de poáceas para el Perú se basan en estudios morfológicos; sin embargo 41 especies de Poaceae fueron confirmadas molecularmente a partir de muestras tomadas del museo de Canadá y colectadas de los departamentos de Ancash, Arequipa, Cajamarca, Junín, Huánuco, La libertad, Lima, Moquegua, Puno, y Tacna (Saarela *et al.*, 2017). El presente estudio confirmó la presencia de 10 especies de Poaceae en el ACP Tilacancha, incrementando el número de reportes de estos taxa y, asimismo, mostrando la diversidad oculta presente en los pajonales altoandinos. Esta

diversidad es difícil de ser detectada con metodologías tradicionales como la taxonomía clásica (Herzog & Latvis 2021); por lo que el uso de herramientas moleculares como DNA Barcoding permiten entender la diversidad de especies presente en ecosistemas poco estudiados.

Para complementar los hallazgos obtenidos del DNA Barcoding, el presente estudio elaboró la firma multiespectral de las poáceas de los puntos muestreados en el ACP Tilacancha con el uso de un vehículo aéreo no tripulado (UAV's). Actualmente, estos dispositivos son ampliamente usados al permitir la incorporación de cámaras multiespectrales que son indispensables en el monitoreo del estado y de los procesos de cambio de los ecosistemas con un mayor detalle al de las imágenes satelitales (Ducoy, 2015; Fernández & Gutiérrez, 2016; Romero & Rodríguez, 2020). Estas imágenes multiespectrales obtenidas por los drones han permitido realizar estudios más detallados debido a la mejor resolución espacial que se obtienen de las cámaras multiespectrales (Khaliq *et al.*, 2019; Messina *et al.*, 2020). En este sentido, el presente estudio empleó los UAV's con la finalidad de obtener niveles de reflectancia más sensibles a la clorofila a y b ubicadas entre 450 y 650nm hasta la banda "red Edge" para entender el comportamiento espectral de poáceas asociadas a pajonales del ACP Tilacancha. Esto se fundamenta en que la absorción de la clorofila a y b influye directamente en las longitudes de onda más cortas en esta porción del espectro (**Figura17, Tabla7**), mientras que las longitudes de onda más largas son impulsadas por las características estructurales del dosel como el índice de área de la hoja (LAI) y la distribución del ángulo de la hoja LAD (Ahamed *et al.*, 2017; Hesman *et al.*, 2017).

Es importante resaltar que cada cobertura vegetal tiene una firma espectral específica, lo que facilita la identificación más precisa de cada tipo de vegetación. Los valores de reflectancia de Poáceas obtenidos en este estudio (0,4561-0,6893) fueron consistente con los reportados en investigaciones anteriores; por ejemplo, los reportados para los cultivos de maíz (0,56 – 0,93), arroz (0,06 - 0,48), trigo (0,73 - 0,91) y maní (0,171 -0,817), los cuales son utilizados para el monitoreo y vigilancia de crecimiento y madurez (Duan *et al.*, 2019; Hesman *et al.*, 2019; Gano *et al.*, 2021).

La obtención de firma multiespectral de las poáceas de los pajonales del ACP Tilacancha permitirá abordar, en un tiempo menor, temas de conservación de la biodiversidad, monitoreo de incendios, observar las propiedades de la vegetación y la variabilidad de

especies en zonas no visibles desde el suelo. Además, estos análisis ayudarán a llevar un mejor monitoreo y vigilancia de los pajonales frente a las perturbaciones que se vienen intensificando por la ganadería, incendios y otras actividades antrópicas. Estas perturbaciones ocasionan cambios en las coberturas vegetales del ACP que son difícil de controlar con metodologías tradicionales debido a la gran extensión de los pajonales (Guzmán *et al.*, 2012; Cruzan *et al.*, 2016; Gonzales *et al.*, 2016; Mani & Varghese, 2018; Luque *et al.*, 2020).

Por lo tanto, el DNA Barcoding conjuntamente con la firma espectral son herramientas de apoyo para la conservación y monitoreo de la diversidad. El presente estudio ha identificado especies de Poaceae y caracterizado su firma multiespectral para entender la diversidad de especies presentes en la ACP Tilacancha y su comportamiento espectral cuando éstas no están perturbadas. Este estudio permitió conocer a las especies de pajonales involucradas en la preservación de recursos hídricos y disminución de la erosión del suelo de la ACP Tilacancha.

V. CONCLUSIONES

Mediante la técnica de DNA Barcoding se determinó un total de 10 diferentes especies de poáceas asociadas a los pajonales del ACP Tilacancha. Adicionalmente, se obtuvo la firma multiespectral (comportamiento espectral) de poáceas asociadas a los pajonales mediante el uso de UAV's con niveles de reflectancia sensibles a la clorofila a y b (ubicadas entre 450 y 650nm). Las poáceas asociadas a pajonales fueron *Clamagrostis violácea*, *Cortaderia seollana*, *Danthonia decumbences*, *Festuca jubata*, *Festuca rubra*, *Festuca rubra subsp. artica*, *Helictotrichon junghuhnii*, *Relchea Pnicoides*, *Trisetum virletii* y *Trisetum macbridei*.

VI. RECOMENDACIONES

Debido a las limitantes iniciales del marcador plastidial *rbcL* en la identificación de especies de Poaceae asociadas a pajonales, es importante la amplificación de marcadores moleculares adicionales. El presente estudio utilizó el marcador intergénico *trnH-psbA* para una mayor resolución entre las especies de poáceas.

Para lograr una correcta captura de imágenes mediante el VANT y el sensor multiespectral Parrot Sequoia es necesario un tener en cuenta la orografía del terreno y poca existencia de vientos. Por otro lado, es importante comprobar la distribución de estas especies a lo largo del ACP Tilacancha mediante el uso de la firma espectral.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboelghar, M. A. & Khdery, G. A. (2017). Spectroscopic and morphological characteristics of genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). *Asian Journal. Agriculture. Biological.*, 47-50.
- Addis, H. K. & Klik, A. (2015). Predicting the spatial distribution of soil erodibility factor using USLE nomograph in an agricultural watershed, Ethiopia. *International Soil and Water Conservation Research*. 282–290.
- Ahmed, O. S., Shemrock, A., Chabot, D., Dillon, C., Williams, G., Wasson, R. & Franklin, S. E. (2017). Hierarchical land cover and vegetation classification using multispectral data acquired from an unmanned aerial vehicle. *International Journal of Remote Sensing* 38(8-10): 2037-2052.
- Awad, M., Fahmy, R. M., Mosa, K. A., Helmy, M. & El-Feky, F.A. (2017). Identification of effective DNA barcodes for *Triticum* plants through chloroplast genome-wide analysis. *Computational Biology and Chemistry* 71: 20-31.
- Barker, N. P., Linder, H.P. & Harley, E. H., (1995). Polyphyly of Arundinoideae (Poaceae): evidence from *rbcL* sequence data. *Systematic Biology* 20, 423–435.
- Birch, J. L., David J. C., Neville, G. W. & Daniel, J. M. (2014). Phylogenetic Investigation and Divergence Dating of *Poa* (Poaceae, Tribe Poeae) in the Australasian Region. *Botanical Journal. of the Linnean Societ*, 10: 523-52.
- Birch, J. L., Walsh, N. G., Cantrill, D. J., Holmes, G. D. & Murphy, D. J. (2017). Testing efficacy of distance and tree-based methods for DNA barcoding of grasses (Poaceae tribe Poeae) in Australia. *PLoS One* 12: e0186259.
- Bustamante, D. E., Calderon, M. S., Leiva, S., Mendoza, J. E., Arce, M. & Oliva, M. (2021). Three new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* and *Longibrachiatum* lineages from Peruvian cacao crop soils based on an integrative approach. *Mycologia*, 113(5).
- Estrada Zuñiga, A. C (2021). Comunidades Vegetales y Estimación de Biomasa con Sensores Multiespectrales y Sistemas Aéreos no Tripulados en Pastizales de Puna Seca. (Tesis para optar el grado de doctor). UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA. <http://hdl.handle.net/20.500.12390/3078>

- Cheng, Y., Zhang, X. & Ma, X. (2015). Phylogenetic relationships in *Festuca-Lolium* complex (Triticeae; Poaceae): Evidence from chloroplast *trnQ-rps16*, *trnH-psbA* and *rbcL* sequences. *Frontiers in Ecology and Evolution* 4:89.
- Cheng, Y., Zhou, K., Humphreys, M. W., Harper, J. A., Ma, X., Zhang, X. & Huang, L. (2016). Phylogenetic relationships in the *Festuca-Lolium* complex (Loliinae; Poaceae): New insights from chloroplast sequences. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 1:12.
- Cruzan, M. B., Weinstein, B. G., Grasty, M. R., Kohn, B.F., Hendrickson, E.C., Arredondo, T. M. & Thompson, P. G. (2016). Small unmanned aerial vehicles (Micro-UAVs, drones) in plant ecology. *Applications in Plant Sciences* 4: 1600041
- Davis, J. I. (2004). Poaceae. Flowering Plants of the Neotropics (2da ed.). Princeton University Press, 470-473.
- Daravath, S., Bannoth, R. N., Selvi, M.T. & Ankanagari, S. (2018). DNA Barcoding Significance and Utilities. *Springer International Publishing AG, part of Springer Nature DNA Barcoding and Molecular Phylogeny* 3–29.
- Duan, B., Fang, S., Zhu, R., Wu, X., Wang, S., Gong, Y. & Peng, Y. (2019). Remote Estimation of Rice Yield With Unmanned Aerial Vehicle (UAV) Data and Spectral Mixture Analysis. *Frontiers in Plant Science* 11(5).
- Duffy, J. P. Cunliffe, A. M., DeBell, L., Sandbrook, C., Wich, S. A., Shutler, J. D., Myers-Smith, I. H., Varela, M. R. & Anderson, K. (2018) Considerations when using lightweight drones in challenging environments. *Remote sensing in ecology and conservation*, 4(1): 7-19
- Edler, D., Klein, J. T., Antonelli, A. & Silvestro, D. (2019). RaxmlGUI 2.0 beta: a graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML.
- EPFL. (2011). École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Manual del software Pix4Dmapper.
- Fernández, L. J. & Gutiérrez, A. G. (2016). Aplicaciones geológicas de los drones. *Revista de la sociedad geológicas de España* 29(1): 89-105.}
- Gano, B., Dembele, J.S. B., Ndour, A., Luquet, D., Beurier, G., Diouf, D. & Audebert, A. (2021). Using UAV borne, multi-spectral imaging for the field phenotyping of

shoot biomass, leaf area index and height of west african sorghum varieties under two contrasted water conditions. *Agronomy*, 11(5).

- Govaerts, R., Lughadha, E., Black, N., Turner, R. & Paton, A. (2021). La Lista de verificación mundial de plantas vasculares, un recurso que se actualiza continuamente para explorar la diversidad global de plantas. *Datos científicos* 8: 215.
- Govaerts, A. (2011). Actualización publicada de la lista mundial de verificación de familias de plantas seleccionadas Facilitado por los Fideicomisarios de los Royal Botanic Gardens, Kew. Gen.PL.ed 5, 33
- Guzmán, W., Arellanos, E. & Chávez, S. (2012). Determinación e incidencia de la disposición a pagar en esquemas de pagos por servicios ambientales hídricos: Estudio de caso en las capitales de las provincias de Chachapoyas, Rodríguez de Mendoza y Utcubamba. *Folia Amazónica. Volumen 21*: pp 141-151
- Grass Phylogeny Working Group (GPWG). (2001). Phylogeny and sub familial classification of the grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 373–457
- Jaikumar, I. M., Periyakali, S. B., Rajendran, U. S. & Ramasamy, K. (2019). Authentication of commercially available frozen shrimp meats using DNA barcoding. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 7: 79-87
- James, K. E., Rumsey, F., Spencer, M., Carine, M., Vogel, J. C. & Schneider, H. (2008) Barcoding Darwin's meadow: high-throughput DNA barcoding from specimen to sequence. *Botany, Natural History Museum, Cromwell Road, London SW7 5BD, UK. Darwin-Inspired Learning*, 257–270.
- Jensen, J. R. (2009). Remote Sensing of the Environment: An Earth Resource (2da ed.). India: Edit. *Pearson Education*, 592.
- Hernández, J. & Montaner, D. (2007). Patrones de respuesta espectral,» vol. 1, p. 14, 2007
- Hernández, J. (2011), “Procesamiento digital de imágenes, Apuntes de Clases”, [en línea], pp. 1-34. Actualización del capítulo "Percepción Remota" en Hernández, J., de la Maza, C. y Estados, C. (eds.) (2007), Manejo y Conservación de Recursos Forestales. Serie Biodiversidad. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
- Herrera, M., Porras, L. & Estrella, C. (2018). Propuesta de declaración del espectro electromagnético para Ecuador. *Geoespacial*, 15 (1): 15-32

- Hesham, A., Scot, E. S., Nader, A. & Diane, L. R. (2019). Using Multispectral Imagery to Extract a Pure Spectral Canopy Signature for Predicting Peanut Maturity. *Computers and Electronics in Agriculture* 162: 561–572.
- Hilu, W. K. W., Alice, L. A. & Liang, H. (2000). Phylogeny of Poaceae Inferred from matK Sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 835-851.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W. & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One* 6:e19254.
- Herzog, S.A. & Latvis, M. (2021). Examining the utility of DNA barcodes for the identification of tallgrass prairie flora. *Applications in plant sciences*, 9(1), e11405.
- Kellogg, E. A. (2001). Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* 125: 1198–1205.
- Kellogg, E. A. (2000). The grasses: A case study in macroevolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:217-238
- Krawczyk, K., Nobis, M., Myszczynski, K., Klichowska, E. & Sawicki, J. (2018). Plastid super-barcodes as a tool for species discrimination in feather grasses (Poaceae: Stipa). *Scientific Reports* 8: 1-10
- Khaliq, A., Comba, L., Biglia, A., Ricauda A., Chiaberge, M. & Gay, P. (2019). Comparison of Satellite and UAV-Based Multispectral Imagery for Vineyard Variability Assessment. *Remote Sensing* 11(4):436.
- Kharuf, G. S., Hernández S. L., Orozco M. R., Aday, D. O. & Delgado M. I. (2018). Analysis of multispectral images acquired with unmanned aerial vehicles. *Ingeniería Electrónica, Automática y Comunicaciones*, 39(2): 79-91
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2018). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution*, msw260.
- Lee, J. H. & Kim, Y. D. (2014). Molecular phylogeny of Korean Poaceae based on seven plastid markers. *Frontier in Plant Sciences* 12: 638597.

- Liu, H., Zhang, Y. & Zhang, X. (2018). Monitoring vegetation coverage in Tongren from 2000 to 2016 based on Landsat7 ETM+ and Landsat8. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(3): 2721-2730.
- Lorente, D. (2007). Trabajo de final de carrera. Universidad Politécnica De Cataluña.
- Luque, A. H., Larico-Mamani, J., Ruiz-Vásquez., E; Monteza-Rosales, O. & Jose Quiñonez-Choquecota, J. (2020). Análisis de incendios forestales en pajonales andinos utilizando sistemas de información geográfica y teledetección, Macari – Puno. *Ceprosimad* 8(2), 30-37.
- Mani, J. K. & Varghese, A. O. (2018). Remote Sensing and GIS in Agriculture and Forest Resource Monitoring. *Springer International Publishing AG, part of Springer Nature, Monitoring and Management, Geotechnologies and the Environment*, 1st ed.;Volume 21, pp. 377–400.
- Matteucci, S.; Morello, J.; Rodríguez, A. y Silva, M. (2015). Ecorregiones y complejos ecosistémicos argentinos. Proyecto Land use change consequences on the socio-ecological system in the Chaco region, Argentina.
- Morgan, R. P. C. (1997). Estimating regional variations in soil erosion hazard in Peninsular Malaysia. *Malayan. Nature Journal* 28: 94-106.
- MINAM. (2010). Ministerio del Ambiente Resolución Ministerial N° 118-2010
- Pastonchi, L., Di Gennaro, S., Toscano, P, & Matese , A (2020). Comparison between satellite and ground data with UAV-based information to analyse vineyard spatio-temporal variability. Australia. Guests editors: *Cassandra Collins and Roberta De Bei*
- Pellet, C. & Hauck, C. (2017). Monitoring Soil Moisture from Middle to High Elevation in Switzerland: Set-up and First Results from the SOMOMOUNT Network. *Hydrology and Earth System Sciences* 21: 3199–3220.
- Pimentel, M., Escudero, M., Sahuquillo, E., Minaya, M. A. & Catalan, P. (2014). Are diversification rates and chromosome evolution in the temperate grasses (Pooideae) associated with major environmental changes in the Oligocene-Miocene?. *PeerJ* 5:e3815.
- Raveendar, S., Lee, G. A., Lee, K. J., Shin, M. J., Kim, S. H., Lee, J. R. & Hyun, D. Y.

- (2019). DNA barcoding for efficient identification of *Triticum* subspecies: Evaluation of four candidate loci on phylogenetic relationships. *Plant Breeding and Biotechnology* 7: 220–228.
- Rivera-Jiménez, H.J., Rossini, B.C., Humanez Alvarez, A.C., Silva, S.R., Yepes Escobar, J., & Marino, C.L. (2020). DNA barcoding for molecular identification of *Gynerium sagittatum*(Poales: Poaceae): genetic diversity in savannah genotypes from Córdoba, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 68(4), 1049-1061.
- Rodríguez, C. J. (2017). Índices de vegetación a partir de datos obtenidos mediante el sistema VANT. UTPL. Loja
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61, 539–542.
- Saadullah, K. Z., Ashfaq, M. & Zaib-u-Nisa. (2016). Identification of the grass family (Poaceae) by using the plant dna barcodes rbcl and matK. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 8: 175-186 .
- Saarela, J.M., Bull, R.D., Paradis, M.J., Ebata S.N., Peterson P.M., Soreng R.J. & Paszko B. (2017). Molecular phylogenetics of cool-season grasses in the subtribes Agrostidinae, Anthoxanthinae, Aveninae, Brizinae, Calothecinae, Koeleriinae and Phalaridinae (Poaceae, Pooideae, Poeae, Poeae chloroplast group 1). *PhytoKeys* 87: 1-139.
- Salas, R., Barboza, E., Rojas, N. & Rodríguez, N. (2018). Deforestation in the Tilacancha private conservation area: water recharge zone and water supply for Chachapoyas. *Revista de Investigación Agroproducción Sustentable* 2: 54-64
- Sánchez, M. L., Bruno. S. & Kölliker, R. (2020). DNA barcode trnH-psbA is a promising candidate for efficient identification of forage legumes and grasses. *BMC Research Notes* 13: 1-6.
- SERNANP (2021). Servicio nacional de áreas naturales protegidas por el estado. Áreas naturales protegidas de administración nacional con categoría definitiva. Lima, Perú

- Soreng, R. J., Peterson, P. M., Romaschenko, K., Davidse, G., Zuloaga, F. O., Judziewicz, E. J. & Morrone, O., (2015). A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II. *Journal of Systematics and Evolution* 55: 259-290.
- Tahir, A., Hussain, F., Ahmed, N., Ghorbani, A. & Jamil, A., (2018). Assessing universality of DNA barcoding in geographically isolated selected desert medicinal species of Fabaceae and Poaceae. *PeerJ*, 2-12
- Ulloa, U. C. & Moller, J. P. (1995). Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador (2da ed.). Quito, Ecuador: Edit. Abya-Yala, 329.
- Xiwen, L., Yang, Y., Robert, J. H., Maurizio, R., Yitao, W. & Shilin, C. (2015). Plant DNA Barcoding: From Gene to Genome. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 90: 157-166.
- Yao, P. C., Gao, H. Y., Wei, Y. N., Zhang, J. H., Chen, X. Y. & Li, H., (2017). Evaluating sampling strategy for DNA barcoding study of coastal and inland halotolerant Poaceae and Chenopodiaceae : A case study for increased sample size. *PloS one* 12: e0185311.
- Zuniga, J. D., Gostel, M. R., Mulcahy, D.G., Barker, K., Hill, A., Sedaghatpour, M., Vo, S. Q., Funk, V. A. & Coddington, .A. (2017). Data Release: DNA barcodes of plant species collected for the Global Genome Initiative for Gardens Program, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. *PhytoKeys* 88: 119–122.

ANEXOS

Anexo 1. Árbol filogenético basado en inferencia de máxima verosimilitud para el marcador plastidial *rbcL* de las especies de Poaceae de la ACP Tilacancha. Escala muestra la sustitución de nucleótidos.

