

Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Trabajo Final de Graduación

Título:

“Evaluación de la utilidad del código de barras genético (barcode) para la identificación de las especies de la flora del Gran Chaco”

Autor: Matías Ezequiel Baldi

Directora: Dra. Viviana Griselda Solís Neffa

Co-directora: Dra. María Laura Pérez

Lugar de Trabajo: Instituto de Botánica del Nordeste – Laboratorio de Citogenética y Evolución Vegetal (IBONE – CONICET)

Año: 2021

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	6
Introducción	8
Hipótesis	12
Objetivos	12
Materiales y Métodos	13
Resultados	22
Discusión	39
Conclusiones	46
Bibliografía	47
Anexo	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Tampón de ligación para plantas (500 ml).	16
Tabla 2. Tampón de ligación para plantas (96 ml).	16
Tabla 3 Solución para el lavado de proteínas.	17
Tabla 4. Tampón de lavado.	17
Tabla 5. Reactivos y volúmenes utilizados para las reacciones PCR	19
Tabla 6 Condiciones para la amplificación de <i>rbcl</i> .	20
Tabla 7 Condiciones para la amplificación de ITS.	20
Tabla 8 Número de secuencias y sitios variables.	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 El Gran Chaco Americano.	9
Figura 2 Secuencias obtenidas para dos regiones (<i>rbcL</i> e ITS) de 196 ejemplares de la flora chaqueña.	22
Figura 3 Correspondencia de las secuencias del gen <i>rbcL</i> obtenidas a partir de muestras de la flora chaqueña con las disponibles en la base de datos BLAST.	24
Figura 4 Correspondencia de las secuencias de ITS obtenidas a partir de muestras de la flora chaqueña con las disponibles en la base de datos BLAST.	25
Figura 5 Dendrograma UPGMA generado a partir de secuencias del gen <i>rbcL</i> de ejemplares del Gran Chaco	30
Figura 6 Dendrograma UPGMA generado a partir de secuencias de la región ITS de ejemplares del Gran Chaco	32
Figura 7 Dendrograma UPGMA generado a partir de secuencias concatenadas <i>rbcL</i> + ITS de ejemplares del Gran Chaco.	34
Figura 8 Dendrograma UPGMA generado a partir de secuencias <i>rbcL</i> de ejemplares de Fabaceae del Gran Chaco.	36
Figura 9 Dendrograma UPGMA generado a partir de secuencias ITS de ejemplares de Fabaceae del Gran Chaco.	38

ANEXO

	Página
Tabla 1. Material estudiado	60
Tabla 2. Sitios variables en las secuencias del gen <i>rbcL</i> de 4 especímenes del género <i>Desmodium</i> .	75
Tabla 3. Sitios variables en las secuencias del gen <i>rbcL</i> de 3 especímenes del género <i>Galactia</i>	75
Tabla 4. Sitios variables en las secuencias del gen <i>rbcL</i> de 4 especímenes del género <i>Macroptilium</i> .	76
Tabla 5. Sitios variables en las secuencias del gen <i>rbcL</i> de 4 especímenes del género <i>Senna</i> .	76
Tabla 6. Sitios variables en las secuencias de la región ITS de 4 especies del género <i>Desmodium</i> .	77
Tabla 7. Sitios variables en las secuencias de la región ITS de 3 especies del género <i>Galactia</i> .	78
Tabla 8. Sitios variables en las secuencias de la región ITS de 3 especies del género <i>Macroptilium</i> .	79
Tabla 9. Sitios variables en las secuencias de la región ITS de 2 especímenes del género <i>Prosopis</i> .	80

Tabla 10. Sitios variables en las secuencias de la región ITS de 5 especímenes del género *Senna*. **80**

Resumen

El Gran Chaco Americano es una llanura sedimentaria que ocupa una gran extensión entre Argentina, Bolivia, Paraguay y Brasil. La existencia de gradientes de temperatura y humedad, así como las características edáficas y topográficas permiten la formación de una gran diversidad de ambientes lo que se traduce en una alta biodiversidad. Estas características hacen del Gran Chaco una de las regiones de mayor importancia socio-ambiental de Sudamérica. A pesar de ello, en la actualidad, la tala destructiva y la creciente expansión de la frontera agrícola provocan la degradación y desaparición de miles de hectáreas de bosques nativos. Ante la necesidad de prevenir la pérdida de biodiversidad y de preservar los recursos bióticos del Gran Chaco es necesario tanto la realización de inventarios de biodiversidad de la flora, a fin de establecer criterios de conservación, así como el desarrollo de métodos para la identificación precisa de las especies para la lucha contra el contrabando de especies protegidas o no permitidas. En este contexto, el código de barras de ADN puede constituir una herramienta muy valiosa para la identificación de las especies de la flora chaqueña. La identificación de especies mediante secuencias de ADN ha sido empleada con éxito en animales y en hongos, así como en una amplia gama de estudios ecológicos y de conservación, en los que la identificación taxonómica tradicional no es práctica. En la actualidad, las investigaciones están orientadas hacia la búsqueda del mejor código de barras para ser aplicado a las plantas. Para el Gran Chaco se han reconocido más de 3.400 especies de plantas, de las cuales aproximadamente 400 son endémicas. Sin embargo, hasta el momento, no se ha establecido el código de barras genético para la identificación de dichas especies. Por lo tanto, a fin de evaluar la utilidad del código de barras genético para la identificación de las especies de la flora chaqueña, en este Trabajo Final de Graduación se analizaron las secuencias de ITS y del gen cloroplástico *rbcL* recomendadas por IBOL. Se utilizaron 181 muestras pertenecientes

a 83 géneros del Chaco Húmedo. Como resultado se aportaron 263 secuencias a la base de datos Bold System, de las cuales, 153 son del gen *rbcL* (553 pb) y 110 de ITS (524 pb). El poder discriminatorio de las secuencias para la identificación de las especies se evaluó en la familia Fabaceae mediante un análisis filogenético de 44 especies. El análisis permitió discriminar géneros y en menor medida especies, siendo más informativa la región ITS. Si bien el análisis con las secuencias recomendadas por el consorcio IBOL es prometedor, sería necesario incorporar más secuencias para una identificación inequívoca de especies.

Introducción

La ecorregión del *Gran Chaco* es uno de los espacios silvestres más importantes de Sudamérica. Esta amplia superficie de sabanas, bosques secos y humedales ocupa una gran extensión entre Argentina, Bolivia, Paraguay y Brasil (Fig. 1) (Viglizzo et al., 2005; Nauman, 2006). Se extiende desde los 16° 55' de latitud Sur, en la zona tropical, a los 33° 52' de latitud Sur, en la zona templada, y desde los 67° 50' de latitud Oeste al pie de los Andes, hasta los 57° 52' de latitud Oeste en la provincia de Corrientes, Argentina (Cartografía y Superficie de Bosques Nativos de Argentina, 2002). El 60% del territorio del *Gran Chaco* se encuentra en la Argentina y abarca a 12 provincias: Salta, Jujuy, Tucumán, La Rioja, Catamarca, San Juan, San Luis, Córdoba, Chaco, Formosa, Santiago del Estero y Corrientes) (Naumann, 2006).

El *Gran Chaco* es una región sujeta a un régimen pluvial que proviene del Atlántico, comprendiendo un extenso gradiente de humedad, presentando precipitaciones medias de 1.300 mm anuales al este, hasta 500 mm anuales en el sector sur-occidental. La estacionalidad de las lluvias dentro de la región se ve acentuada en el gradiente E-O, presentándose largos períodos de sequía durante el invierno: 4 meses al este y 6 meses al oeste. La temperatura media anual es de 18°C al sur, 26°C al norte, con temperaturas absolutas de verano que rondan los 48°C y con heladas en invierno (Erize et al., 1995).

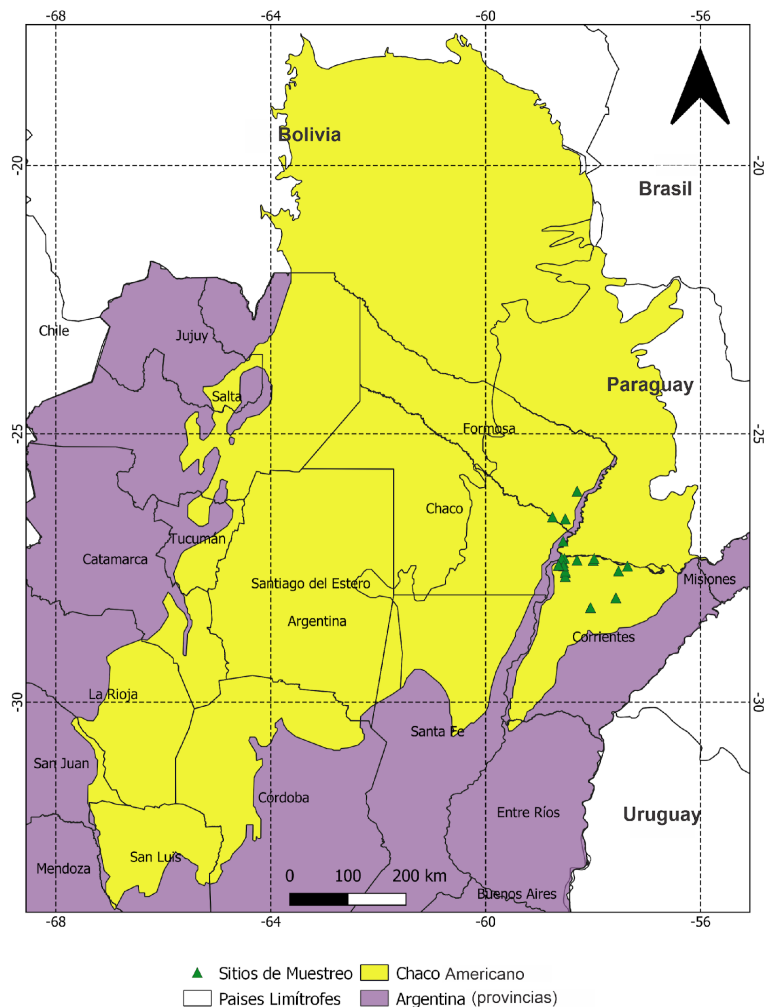


Fig. 1. El Gran Chaco Americano (en amarillo). Escala: 1/ 5.800.000. Datos SIG:

Instituto Geográfico Nacional (IGN), EFRAINMAPS

(<https://tapiquen-sig.jimdofree.com/>). Elaboración propia.

A lo largo del gradiente climático y edáfico, la vegetación varía desde bosques xerófitos en el *Chaco Occidental* (noroeste), hasta bosques semidecíduos en el *Chaco Oriental* (sureste). Siendo características del Chaco Oriental un exceso de humedad, resultante de la combinación de factores pluviométricos, topográficos y edáficos, donde las precipitaciones superan las pérdidas por evapotranspiración. Esto permite la

formación de diferentes ambientes, los cuales pueden ser: bosques, arbustales, palmares, sabanas, pajonales, ríos, riachos, lagunas, esteros, bañados y cañadas (Ginzburg & Adámoli, 2006). La gran heterogeneidad ambiental del Gran Chaco, se refleja en su composición florística, transicional entre el dominio Chaqueño y el Amazónico (Cabrera, 1971; Prado, 1993; Di Giacomo & Krapovickas, 2005; Biani et al., 2006; Contreras et al., 2015).

Todo esto se traduce en una alta biodiversidad que hace del *Gran Chaco* una de las regiones de mayor importancia socio-ambiental de Sudamérica (Viglizzo et al., 2005).

Argentina, para finales del siglo XIX poseía más de 100 millones de hectáreas de bosques, montes y selvas originarias. En las últimas décadas del siglo XX el avance agropecuario ha sido incontenible, lo que ha moldeado el paisaje de nuestro país, ayudado por los factores climáticos y fisiográficos (Zarrilli, 2008; Cardozo et al., 2011).

En menos de medio siglo, el país perdió más de dos tercios de su patrimonio forestal autóctono. Las diferentes provincias perjudicadas por la deforestación acumulan una tasa anual de 200 km². El caso más emblemático de deforestación desmedida es el del quebracho colorado (*Schinopsis balansae* Engl.). Asimismo, el palo santo (*Bulnesia sarmientoi* Lorentz ex Griseb.), es una especie de la flora chaqueña de gran importancia que se encuentra en el apéndice II, de CITES (<https://www.cites.org/esp>), lo que representa una importancia mucho mayor respecto a su tráfico como madera u ornamental.

Ante la necesidad de prevenir la pérdida de biodiversidad y de preservar los recursos bióticos del Gran Chaco es necesario tanto la realización de inventarios de biodiversidad de la flora a fin de establecer criterios de conservación, así como el desarrollo de métodos para la identificación precisa de las especies para la lucha

contra el contrabando de especies protegidas o no permitidas (Stoeckle, 2003). En este contexto, el código de barras de ADN puede constituir una herramienta muy valiosa para la identificación de las especies de la flora chaqueña además de aportar información sobre la historia evolutiva de dichas especies.

El código de barras de ADN (barcode) es una herramienta utilizada para identificación de especies mediante secuencias de ADN (Hebert, 2003, a & b), que fue ganando la atención de la comunidad científica mundial (Blaxter, 2003; Stoeckle, 2003; Marshall, 2005). Este procedimiento se ha utilizado en una amplia gama de estudios ecológicos y de conservación, en los que la identificación taxonómica tradicional no es práctica (Lahaye et al., 2008), incluso puede contribuir a la identificación de nuevos taxones aún no descritos (Stoeckle, 2003). Entre las plantas, especialmente las Angiospermas, las identificaciones basadas en ADN se han utilizado creativamente para reconstruir dietas de herbívoros extintos (Poinar, 1998; Hofreiter, 2000), para la identificación de maderas (Deguilloux, 2002), correlacionar raíces que crecen en cuevas con la flora superficial (Jackson, 1999), como herramienta para la identificación de las especies de hierbas medicinales (Zerega, 2002); y aunque los usos no han sido en todos los casos exitosos a nivel de especie se han obtenido grandes aproximaciones (Kress, 2005).

Para el Gran Chaco se han reconocido más de 3.400 especies de plantas, de las cuales aproximadamente 400 son endémicas. Sin embargo, hasta el momento, no se ha analizado la utilidad del código de barras genético para identificar las especies de la flora chaqueña.

Por lo tanto, en este Trabajo Final de Graduación se analizaron las secuencias de ITS y del gen cloroplástico *rbcl* recomendadas por IBOL (International Barcode of Life) de especies de la flora chaqueña del Gran Chaco a fin de evaluar la utilidad del código de barras genético para la identificación de las mismas.

Objetivos generales y particulares

Objetivo General:

- Evaluar la utilidad del código de barras genético basado en la secuencia nuclear ITS y el gen cloroplástico *rbcL* para identificar las especies de la flora chaqueña.

Objetivo particular:

- Contribuir a la biblioteca de código de barras genético (Bold Systems), con secuencias de la flora del Gran Chaco Argentino.
- Establecer el código de barras genético de especies representativas de las diferentes comunidades vegetales del Gran Chaco.
- Realizar un inventario de los códigos de barras de las especies de la flora chaqueña.
- Evaluar el poder discriminatorio de la secuencia nuclear de ITS y del gen cloroplástico *rbcL* para la identificación de especies de la flora chaqueña.

Hipótesis de Trabajo

La utilización conjunta de dos marcadores de código de barras (*ITS* y *rbcL*) permite la identificación de las especies de la flora chaqueña.

Materiales y Métodos

1) Materiales

Durante el desarrollo del trabajo se emplearon muestras de 190 especímenes, pertenecientes a 83 géneros de 41 familias (Anexo 1). Las muestras fueron obtenidas en diferentes localidades de las provincias de Corrientes y Formosa en el marco de tres proyectos de IBOL, llevados a cabo en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) durante los años 2014 y 2015. Los ejemplares coleccionados fueron procesados con los métodos convencionales de secado en estufa, etiquetados y enviados a especialistas para su determinación. Asimismo, de cada ejemplar colectado se obtuvieron fotografías a campo y muestras de hojas frescas para los estudios del ADN, las que fueron deshidratadas en silicagel (Adams et al., 1991) y posteriormente conservadas a -80°C hasta su procesamiento. Los ejemplares testigo de las especies estudiadas se encuentran depositados en el Herbario del IBONE (CTES).

a) Registro de datos de los especímenes en la plataforma BOLD Systems

La información detallada de cada espécimen analizado (número de ejemplar de herbario, nombre de la especie y familia a la cual pertenece, localidad de colección, así como las coordenadas geográficas) además de las fotografías (a campo o de los ejemplares de herbario) fue ingresada en la plataforma BOLD Systems de acuerdo a los protocolos preestablecidos (http://v4.boldsystems.org/index.php/resources/handbook?chapter=3_submissions.html).

Para tal fin, los datos se incorporaron al proyecto llamado “*Plane*” y “*BWCF*”, desde el cual se obtuvieron las planillas “*Specimen Data*” que consta de 4 hojas (voucher info, taxonomy, specimen detail y collection data), “*Sample Record*” permite obtener el orden de cada espécimen en la placa de procesamiento para el laboratorio, e “*Image Data*” que contiene los datos de las fotos de referencia de cada espécimen. Dichas planillas fueron completadas previamente al procesamiento de los materiales en el laboratorio y subidas nuevamente a la plataforma dentro del proyecto correspondiente. Las planillas son una condición necesaria para que una vez llegadas las ampliaciones a Canadá se proceda a la secuenciación y presentación de las mismas en la base de datos de Bold System.

b) Extracción de ADN

Se procedió al montaje de las muestras de hojas en la placa de lisis (20 mg) siguiendo el croquis generado a partir de la planilla “*Sample Record*”. Las placas están señalizadas con números y letras, de manera que cada espécimen sea colocado en su correspondiente pocillo, cada placa contiene 96 pocillos. Este ordenamiento se mantuvo durante todo el procesamiento.

Se extrajo el ADN total de cada muestra, a partir de hojas, utilizando el protocolo de [Ivanova et al. \(2008\)](#). Las muestras se colocaron en microtubos de 2 ml junto con 2 esferas de acero inoxidable y luego fueron sometidas a maceración mecánica en un equipo lisador de tejidos (Tissue Lyser de Qiagen), a una velocidad de 28 hz por 3 minutos; o más tiempo en aquellos casos donde se consideró necesario. Posteriormente, se procedió a la lisis química con CTAB (bromuro de cetil trimetilamonio) 2x.

La placa fue centrifugada a 1500 g durante 1 min e incubada a 65 °C durante 1,5 horas. Luego se transfirieron 50 µl del lisado a una placa de 96 pocillos; se agregó a cada pocillo 100 µl de una solución tampón para plantas (Tablas 1 y 2) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla de lisis se transfirió a los pocillos correspondientes de una placa con una membrana de fibra de vidrio de poros de 1 µm (PALL1) para poder realizar los lavados del ADN retenido en la membrana con las soluciones tampón correspondientes. La placa PALL se colocó sobre un contenedor para recepcionar el líquido que atraviesa la membrana durante los lavados. La placa PALL junto al contenedor receptor fueron centrifugados a 5000 g por 5 min. Luego se realizaron dos lavados, el primero con una solución tampón para lavar proteínas (Tabla 3), siendo centrifugado a 5000 g por 2 min, y el segundo lavado con solución tampón de lavado (Tabla 4), siendo centrifugado a 5000 g por 5 min. Una vez que las membranas con el ADN fueron lavadas se procedió a la elución del mismo con agua libre de ARNasa, y el ADN de cada espécimen se colectó en una placa de PCR con 96 pocillos y centrifugado a 5000 g por 5 min. Tanto la solución tampón para plantas como la solución para el lavado de proteínas requirieron en su preparación de un tampón de ligación que se encuentra descrito en su composición en la Tabla 2.

Tabla 1. Tampón de ligación para plantas (500 ml).

<i>Tampón de ligación</i>		
6M GuSCN	GuSCN	354,6 g
500 ml 20 mM EDTA pH 8,0	0,5 EDTA, pH 8,0	20 ml
10 mM Tris-HCl pH 6,4	0,1 Tris-HCl, pH 6,4	50 ml
4% Triton X-100	Triton X-100	20 ml
Total		500 ml

Tabla 2. Tampón de ligación para plantas (96 ml).

<i>Tampón para plantas</i>	
Tampón de ligación	80 ml
ddH ₂ O	16 ml
Total	96 ml

Tabla 3. Solución para el lavado de proteínas.

<i>Solución para lavado de proteínas</i>	
Tampón de ligación	50 ml
EtOH 96%	50 ml
Total	100 ml

Tabla 4. Tampón de lavado.

<i>Solución tampón de lavado</i>		
60 % EtOH	EtOH 96 %	300 ml
50 mM NaCl	1 M NaCl	23,75 ml
10 mM Tris-HCl, pH 7,4	1 M Tris-HCl, pH 7,4	4,75 ml
0,5 mM EDTA, pH 8,0	0,5 EDTA, pH 8,0	0,47 ml
Total		475 ml

c) Amplificación de ADN

Una vez obtenido el ADN de las muestras, se procedió a la amplificación por PCR, utilizando los cebadores propuestos por IBOL ITS-S2 directa (ATGCGATACTTGGTGTGAAT, [Chen et al. 2010](#)) e IT-S4 reversa

(TCCTCCGCTTATTGATATGC [White et al. 1990](#)); y *rbcLa* directa (ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC, [Levin 2003](#)) y *rbcLa* reversa (GTAAAATCAAGTCCACCRCG, [Kress & Erickson 2007](#)).

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 12,5 µl. Se emplearon las concentraciones de los reactivos del protocolo de [Ivanova \(2008\) modificado](#) (Tabla 5).

Tabla 5. Reactivos y volúmenes utilizados para las reacciones PCR. En negritas se destacan las modificaciones realizadas al protocolo de [Ivanova \(2008\)](#).

REACTIVOS (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR (μl)
Trealosa 10%	6,25
Agua mili-Q estéril	1,565*
Buffer 10X	1,25
MgCl ₂ (50 mM)	0,625
Primer A 10 μ M	0,25*
Primer B 10 μ M	0,25*
dNTPs 10 mM	0,25*
Taq polimerasa (5U/ μ l)	0,06
DNA	2

Las muestras fueron centrifugadas a 1000 g por 1 min. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Eppendorf-Mastercycler Gradient con diferencias en las condiciones para cada par de cebadores (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Condiciones para la amplificación de *rbCL*:

CONDICIONES		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización del ADN		94°C	4'
35 ciclos	Desnaturalización	94°C	30''
	Hibridación	55°C	30''
	Extensión	72°C	1'
Extensión final		72°C	10'

Tabla 7. Condiciones para la amplificación de ITS:

CONDICIONES		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización del ADN		94°C	5'
35 ciclos	Desnaturalización	94°C	30''
	Hibridación	56°C	30''
	Extensión	72°C	45''
Extensión final		72°C	10'

Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en seco, utilizando geles de agarosa (E-gel® 96 al 2% Agarose, Invitrogen) y un equipo de electroforesis (Invitrogen™ Mother E-Base™ Device), así como el programa E-Gel 96", por 4-6 min. El gel fue observado en transiluminador con luz UV y se identificó la presencia de bandas amplificadas. Cuando se obtuvieron más de 75 muestras amplificadas positivamente se procedió a traspasar los productos de PCR a una placa especial con sellado de aluminio, la cual posee además un código de barras único para su envío al Centro Canadiense para el Código de Barras de ADN (CCDB), donde fueron secuenciadas.

2) Análisis de datos

A partir de las secuencias de ITS y del gen *rbcL* obtenidas en este trabajo se realizó un inventario de las secuencias para las especies de la flora chaqueña. Los 181 especímenes analizados fueron volcados a una tabla de Excel donde; para cada uno de ellos se detalló: *Orden, Familia, Subfamilia, Género, Especie, Subespecie, Coordenadas geográficas., Proyecto al que pertenece, Número de herbario, Secuencia del fragmento de ADN (rbcL e ITS)* y longitud de los fragmentos obtenidos.

Con el fin de corroborar la identidad del fragmento de ADN, las secuencias se compararon con secuencias ITS y *rbcL* de ADN disponibles en la base de datos pública de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov.) utilizando la herramienta de búsqueda de secuencias BLAST N. Luego, las secuencias fueron alineadas usando Clustal W del programa DNASTar MegAlign (DNASTAR software, Lasergene, London).

Posteriormente, a fin de evaluar si los géneros, familias y órdenes formaban grupos, se construyeron para cada región por separado y a partir de las secuencias concatenadas, dendrogramas utilizando el método de máxima similitud (UPGMA) con

1000 réplicas de bootstrap usando la rutina incluida en el software MEGA (Kumar et al., 2018).

Asimismo, a fin de evaluar el poder discriminatorio de los marcadores de código de barras vegetales para la identificación de especies, se analizaron 44 especies de Fabaceae, mediante un análisis de agrupamiento a partir de secuencias *rbcL* y/o ITS con el método UPGMA. Además, utilizando el software MEGA, se realizó un alineamiento y con la función de análisis de datos se recuperaron las posiciones en el alineamiento que son diferentes entre las secuencias.

Resultados

Se aportaron 263 secuencias de ADN a la base de datos de Bold System, correspondientes a 181 ejemplares, pero en sólo un grupo de ejemplares se obtuvieron secuencias para ambas regiones (*rbcL* + ITS). En los restantes ejemplares sólo se obtuvieron secuencias del gen *rbcL* o de la región ITS (Fig. 2). Del total de secuencias, 153 corresponden al gen *rbcL* y 110 a la región ITS, presentando cada una de las secuencias una longitud de 553 y 524 pb, respectivamente. Los sitios variables encontrados a nivel de familias para ambos marcadores fueron de 233/553 y 434/524 para el gen *rbcL* y la región ITS, respectivamente (Tabla 7).

Asimismo, del total de ejemplares analizados, la mayoría pertenece a la familia Fabaceae (42%), seguida de Malvaceae (7,2%), Poaceae (4,4%) y Solanaceae (3,3%).

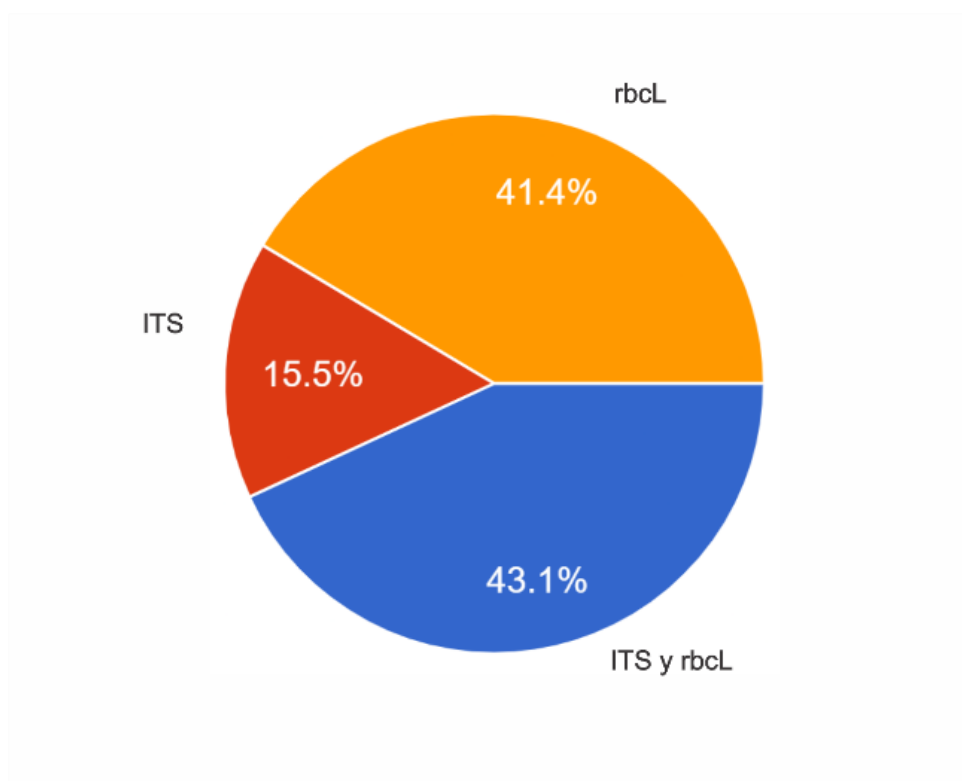


Fig. 2. Secuencias obtenidas para dos regiones (*rbcL* e ITS) de 196 ejemplares de la flora chaqueña analizados.

Para los 181 ejemplares de la flora chaqueña de los que se obtuvo al menos una de las dos secuencias, el porcentaje de correspondencia de las secuencias de cada región analizada (expresado en relación con el de ejemplares que se amplificaron para cada región) con las disponibles en la base de datos BLAST varió entre las regiones y en las diferentes categorías taxonómicas. El porcentaje de resolución del gen *rbcL* fue mayor a nivel de orden, familia y género (Fig. 3); mientras que el porcentaje de resolución la región ITS fue a mayor a nivel de especie (Fig. 4).

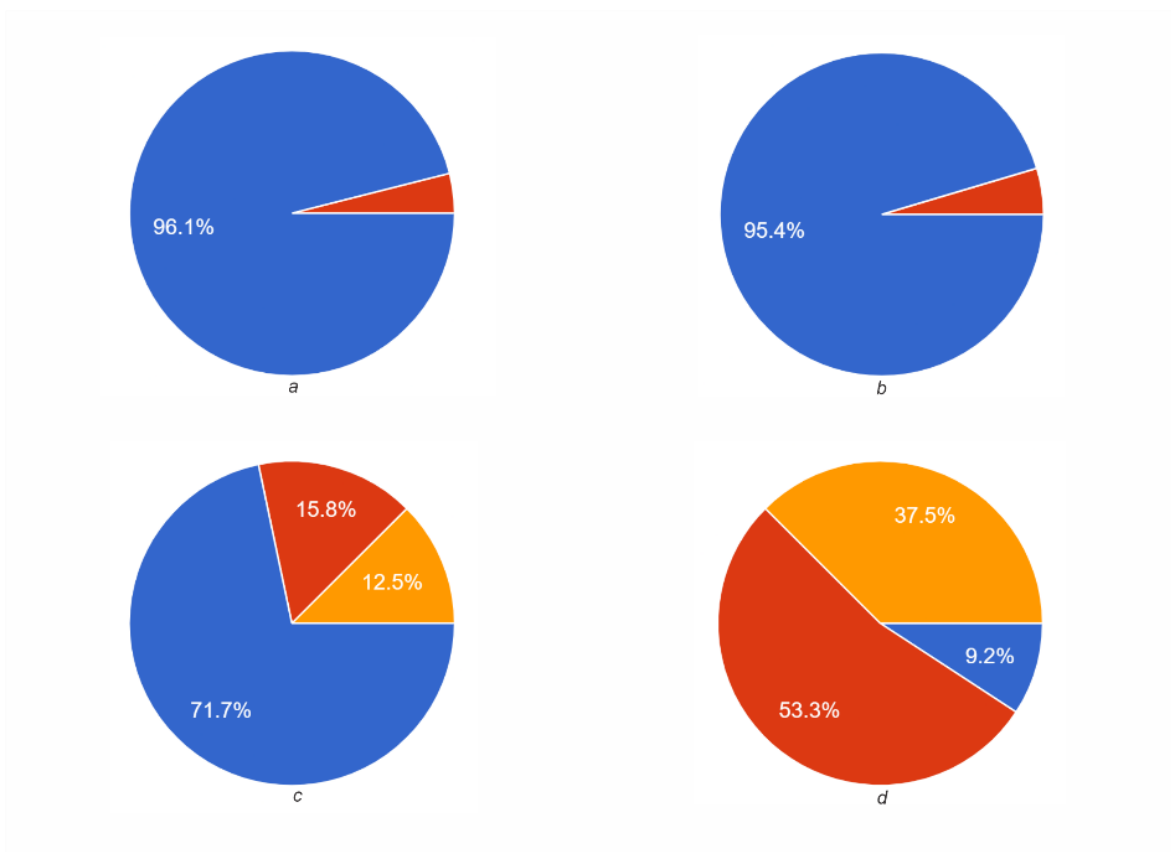


Fig. 3. Correspondencia de las secuencias del gen *rbcL* obtenidas a partir de muestras de la flora chaqueña con las disponibles en la base de datos BLAST en las diferentes categorías taxonómicas: a) orden; b) familia; c) género y, d) especie. El color azul representa el porcentaje de correspondencia entre las secuencias de las muestras analizadas y las obtenidas de BLAST, el color rojo el porcentaje de las secuencias que no se corresponden y el color anaranjado el porcentaje de ejemplares que al momento de realizar el TFG no habían sido identificados taxonómicamente pero cuya identidad fue inferida a partir de la comparación de las secuencias obtenidas en este trabajo con las obtenidas de la base BLAST.

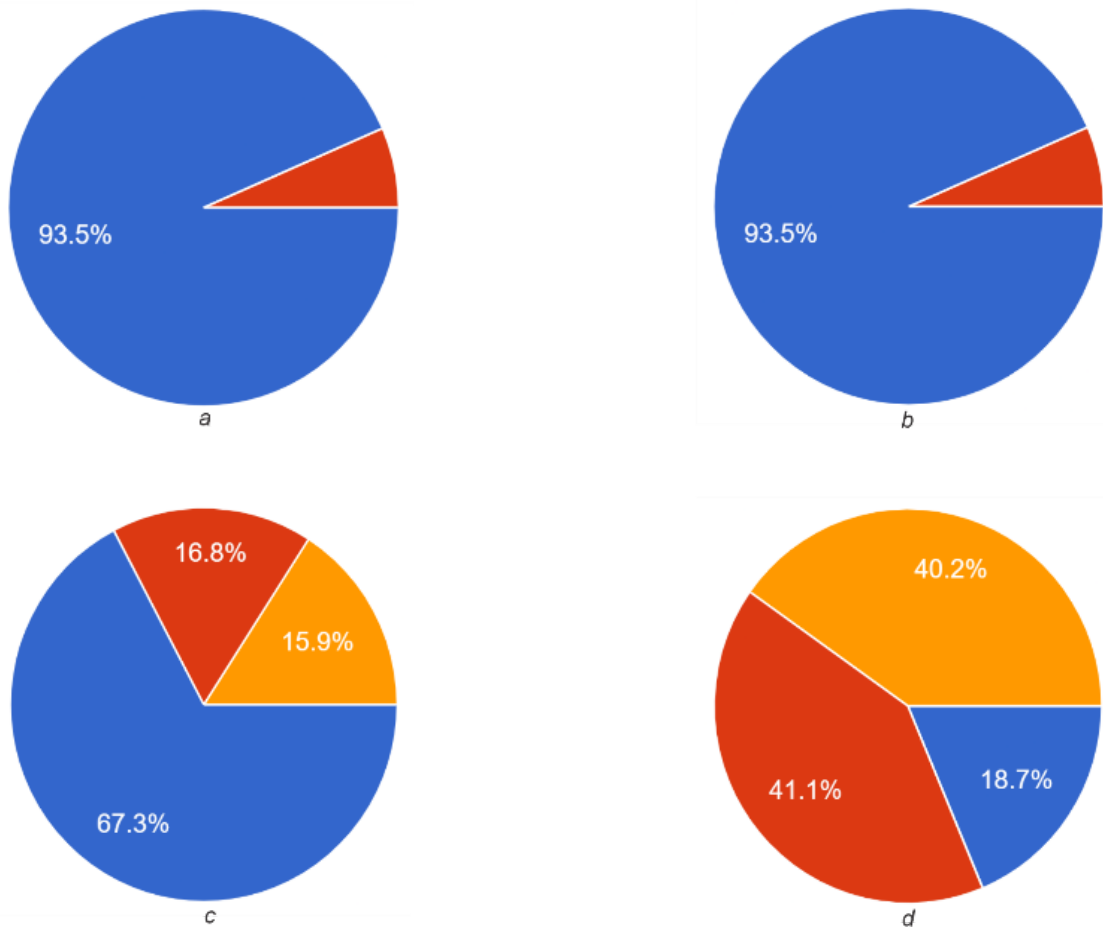


Fig. 4. Correspondencia de las secuencias de ITS obtenidas a partir de muestras de la flora chaqueña con las disponibles en la base de datos BLAST en las diferentes categorías taxonómicas: a) orden; b) familia; c) género y, d) especie. El color azul representa el porcentaje de correspondencia entre las secuencias de las muestras analizadas y las obtenidas de BLAST, el color rojo el porcentaje de las secuencias que no se corresponden y el color anaranjado el porcentaje de ejemplares que al momento de realizar el TFG no habían sido identificados taxonómicamente pero cuya identidad fue inferida a partir de la comparación de las secuencias obtenidas en este trabajo con las obtenidas de la base BLAST.

Tabla 8. Número de secuencias y de sitios variables encontrados de las familias analizadas.

Familia	rbcL		ITS	
	Número de secuencias	Sitios variables	Número de secuencias	Sitios variables
<i>Acanthaceae</i>	2	0/553	2	119/524
<i>Amaranthaceae</i>	3	63/553	2	37/524
<i>Anacardiaceae</i>	---	---	1	---
<i>Apiaceae</i>	2	0/553	1	---
<i>Apocynaceae</i>	---	---	1	---
<i>Areaceae</i>	2	6/553	---	---
<i>Aristolochiaceae</i>	3	49/553	2	101/524
<i>Asteraceae</i>	6	18/553	6	146/524
<i>Bignoniaceae</i>	4	12/553	2	1/524
<i>Bromeliaceae</i>	2	5/553	---	---
<i>Cannabaceae</i>	2	36/553	---	---
<i>Capparaceae</i>	2	3/553	---	---
<i>Celastraceae</i>	1	---	---	---
<i>Convolvulaceae</i>	2	6/553	1	---
<i>Cyperaceae</i>	3	27/553	3	38/524
<i>Euphorbiaceae</i>	1	---	2	74/524
<i>Fabaceae</i>	68	143/553	48	356/524

<i>Gesneriaceae</i>	1	---	1	---
<i>Juncaceae</i>	---	---	1	---
<i>Malpighiaceae</i>	1	---	2	0/524
<i>Malvaceae</i>	8	27/553	10	117/524
<i>Moraceae</i>	---	---	1	---
<i>Myrtaceae</i>	---	---	1	---
<i>Onagraceae</i>	1	---	---	---
<i>Orobanchaceae</i>	1	---	1	---
<i>Passifloraceae</i>	5	60/553	5	94/524
<i>Plantaginaceae</i>	1	---	2	53/524
<i>Poaceae</i>	6	33/553	4	107/524
<i>Polygonaceae</i>	1	---	---	---
<i>Pontederiaceae</i>	1	---	---	---
<i>Rubiaceae</i>	1	---	1	---
<i>Salicaceae</i>	2	17/553	1	---
<i>Sapindaceae</i>	3	56/553	1	---
<i>Sapotaceae</i>	1	---	1	---
<i>Scrophulariaceae</i>	1	---	---	---
<i>Simaroubaceae</i>	1	---	---	---
<i>Smilacaceae</i>	1	---	---	---
<i>Solanaceae</i>	4	10/553	2	48/524
<i>Typhaceae</i>	1	---	---	---

<i>Urticaceae</i>	1	---	1	---
<i>Verbenaceae</i>	5	39/553	2	31/524
<i>Violaceae</i>	1	---	1	---
Total	152	233/553	110	439/524

Análisis de agrupamiento

Los resultados del análisis de agrupamiento a partir de secuencias de gen *rbcL*, de la región ITS y de ambas secuencias concatenadas de todos los ejemplares analizados mostraron que, en general, los ejemplares de una misma familia y las familias de un mismo orden quedaron incluidos en un mismo grupo.

rbcL

El dendrograma generado a partir de las secuencias del gen *rbcL* de todos los ejemplares estudiados se muestra en la Fig. 5. Las dos primeras ramas, separan a los ejemplares de la familia Cyperaceae (Poales, grupo II) de los ejemplares de las restantes familias. A su vez, el grupo I incluye varios subgrupos. Los subgrupos III, IV y V incluyen ejemplares de Passifloraceae (Malpighiales), Rubiaceae (Gentianales) y Amaranthaceae (Caryophyllales), respectivamente. El subgrupo VI incluye a ejemplares de Malvaceae (Malvales), así como de Sapindaceae y Simaroubaceae (Sapindales). El subgrupo VII, incluye ejemplares de las familias Typhaceae y Bromeliaceae (Poales). El subgrupo VIII presentó dos grupos, uno de ellos conformado por la familia Solanaceae y Convolvulaceae (Solanales) además de Amaranthaceae (Caryophyllales) y Fabaceae (Fabales); mientras que el otro incluyó a las familias Acanthaceae, Plantaginaceae, Verbenaceae, Gesneriaceae y Orobanchaceae (Lamiales), junto a dos ejemplares de Fabaceae. El grupo IX incluye ejemplares de Onagraceae (Myrtales) y Capparaceae (Brassicales); mientras que el grupo X incluyó ejemplares de Polygonaceae (Caryophyllales), Apiaceae (Apiales), Sapotaceae (Ericales), Asteraceae (Asterales) y Aristolochiaceae (Piperales). Los grupos XI y XII incluyen ejemplares de Violaceae (Malpighiales) y Fabaceae (Fabales), respectivamente; mientras que el grupo XIII contiene a las familias Euphorbiaceae y Malpighiaceae (Malpighiales). Los restantes grupos, XIV, XVI, XVII y XIX incluyen

ejemplares de la familia Fabaceae; el grupo XV incluye a las familias Cannabaceae y Urticaceae (Rosales), mientras que el grupo XVIII incluye ejemplares de Celastraceae (Celastrales), Salicaceae (Malpighiales) y Cannabaceae (Rosales).

ITS

El dendrograma obtenido a partir de las secuencias ITS de todos los ejemplares analizados (Fig. 6) presenta dos grandes grupos (I y II). El grupo I se divide, a su vez, en otros dos grupos, uno de ellos (grupo IV) incluye ejemplares de la familia Fabaceae (Fabales), mientras que el otro (grupo III) incluye ejemplares de las familias Rubiaceae, Apocynaceae (Gentianales), Aristolochiaceae (Piperales), Apiaceae (Apiales) y Amaranthaceae (Caryophyllales). El grupo II, presenta una mayor diversidad de familias, y se divide en dos grupos (V y VI). El grupo V, compuesto por ejemplares de Cyperaceae, Juncaceae y Poaceae (Poales) además de Anacardiaceae (Sapindales). El grupo VI incluye los grupos VII a XII. El grupo VII conformado por ejemplares de Passifloraceae, el grupo VIII por ejemplares de Convolvulaceae y Solanaceae (Solanales), además de Sapotaceae (Ericales), el grupo IX por ejemplares de Orchidaceae (Asparagales) y el X por ejemplares de Violaceae (Malpighiales). El grupo XI incluye ejemplares de las familias Bignoniaceae, Verbenaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae y Gesneriaceae (Lamiales) además de Fabaceae (Fabales). Finalmente, el grupo XII incluye ejemplares de Malpighiaceae, Passifloraceae, Salicaceae, Euphorbiaceae (Malpighiales), Myrtaceae (Myrtales), Malvaceae (Malvales) y Moraceae (Rosales). La secuencia de ITS del último ejemplar se correspondió con la de una especie de Malvaceae en el análisis de BLAST.

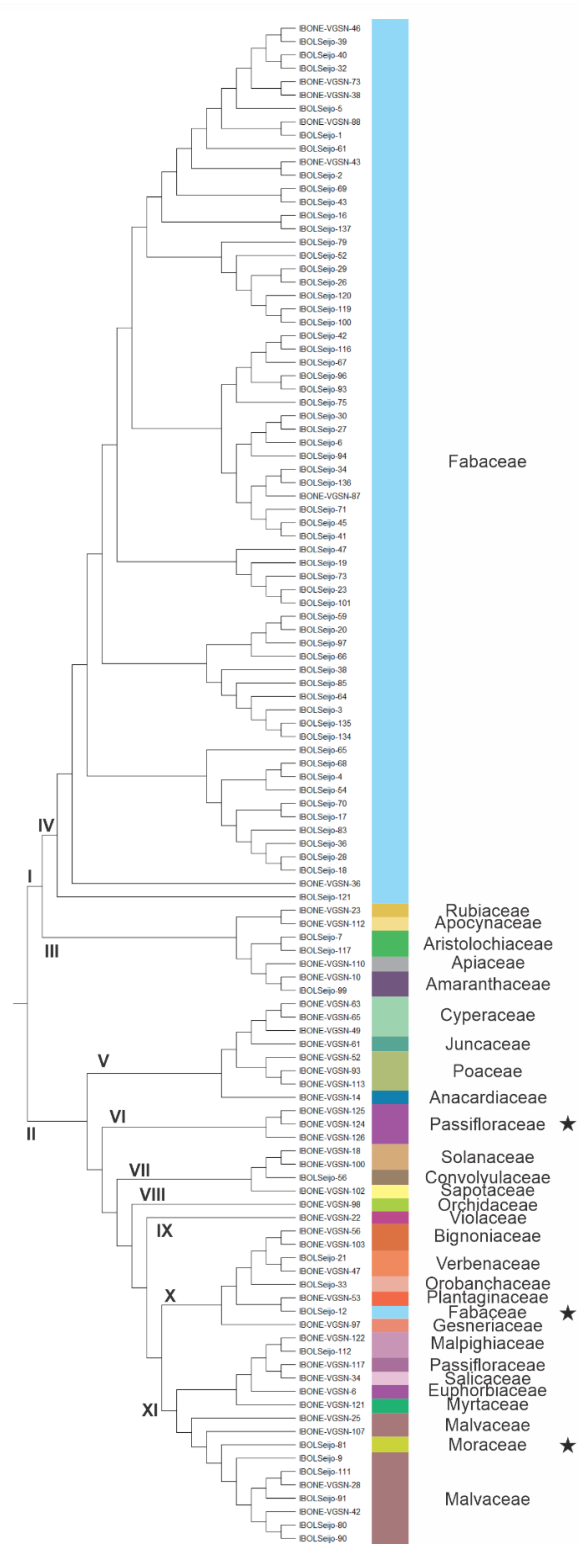


Fig. 6. Dendrograma UPGMA generado a partir de secuencias de la región ITS de ejemplares del Gran Chaco. Las estrellas indican ejemplares que fueron identificados como pertenecientes a otras familias a partir de la comparación de las secuencias obtenidas con las de BLAST.

***rbcL* + ITS**

El dendrograma obtenido a partir de las secuencias concatenadas ITS + *rbcL* de aquellos ejemplares de los que se disponía de ambas secuencias se muestra en la Fig. 7. El árbol generado presenta dos grupos, uno de ellos (grupo II) se compone de ejemplares de la familia Poaceae (Poales); mientras que el grupo I se subdivide en otros dos grupos, el IV que incluye ejemplares de Cyperaceae (Poales) y el grupo III que incluye ejemplares de Aristolochiaceae (Piperales, grupo VI) y al grupo V. Este último incluye a la familia Orchidaceae (Asparagales, grupo VIII) y al grupo VII que reúne a varias familias en diversos subgrupos (XII, XIV, XV y XVI). El grupo XII incluye ejemplares de las familias Amaranthaceae (Caryophyllales), Fabaceae (Fabales), Orobanchaceae, Plantaginaceae, Gesneriaceae, Verbenaceae, Bignoniaceae (Lamiales), Sapotaceae (Ericales), Rubiaceae (Gentianales), Apiaceae (Apiales), Aristolochiaceae (Piperales) y Asteraceae (Asterales). El grupo el grupo XIII incluye ejemplares de Fabaceae (Fabales), Euphorbiaceae (Malpighiales) y Urticaceae (Rosales); mientras que el grupo XIV comprende ejemplares de Malvaceae (Malvales), Sapindaceae (Sapindales), Violaceae, Malpighiaceae, Salicaceae y Passifloraceae (Malpighiales).

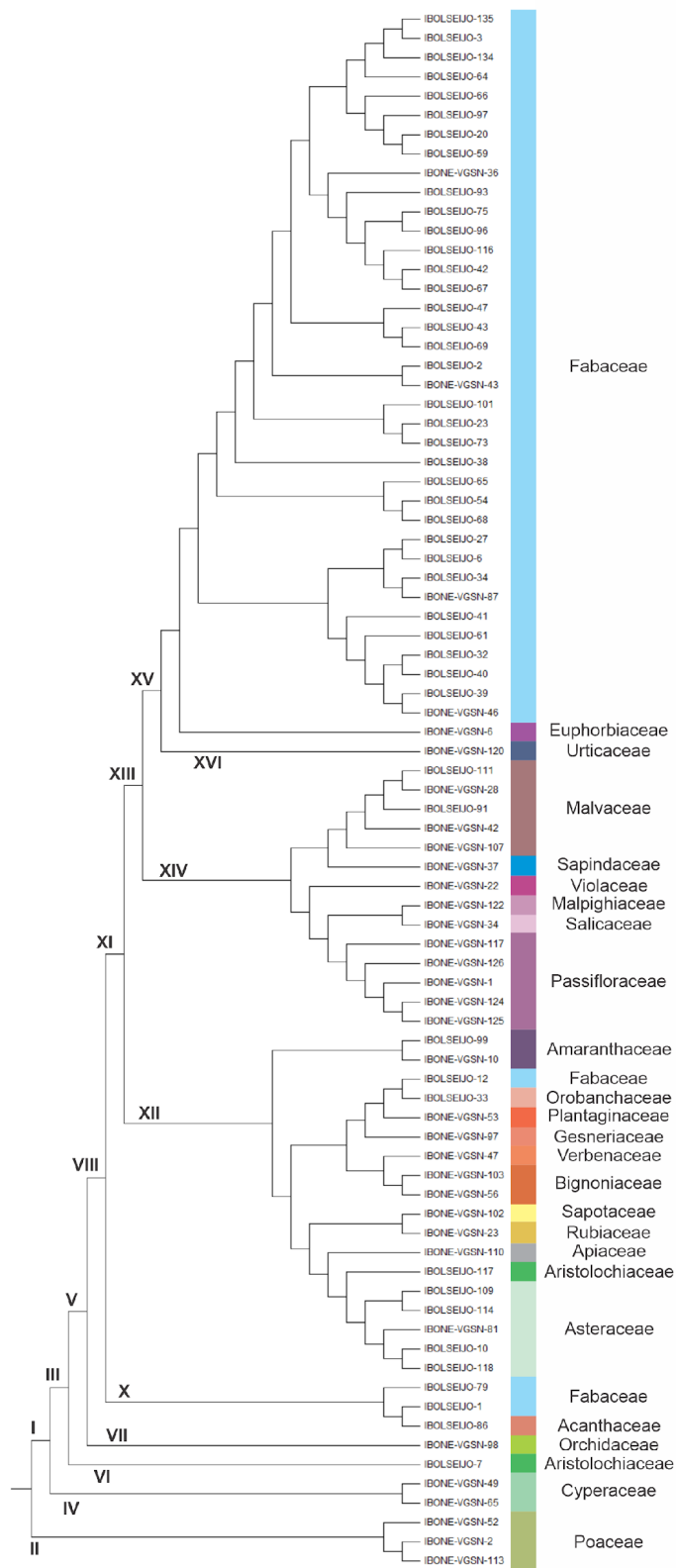


Fig. 7. Dendrograma UPGMA generado a partir de secuencias concatenadas *rbcL* + ITS de ejemplares del Gran Chaco.

Fabaceae

Los resultados del análisis de agrupamiento a partir de secuencias de gen *rbcL* y de la región ITS de los ejemplares de Fabaceae analizados mostraron que, en general, los ejemplares de un mismo género y los géneros de una misma subfamilia quedaron incluidos en un mismo grupo.

rbcL

El dendrograma obtenido a partir de las secuencias *rbcL* de los ejemplares de Fabaceae se muestra en la Fig. 8. En el árbol se observa que un ejemplar de *Mimosa* se separa de los restantes ejemplares que quedaron incluidos en el grupo I. En este grupo, el género *Vicia* (IV) se separa de los restantes géneros del grupo III. En este último grupo, la mayoría de los géneros de Mimosoideae y Faboideae quedaron incluidos en grupos separados de los géneros de otras subfamilias, *Mimosa* en el grupo XIV mientras que algunos ejemplares de *Acacia*, así como los de *Neptunia* y *Desmanthus* quedaron incluidos en el grupo XVI. El otro género de Mimosoideae, *Prosopis*, junto a un ejemplar de *Acacia*, están incluidos en el grupo XV junto a los géneros *Senna*, *Gleditsia* y *Chamaecrista* (Caesalpinioideae) así como *Sesbania* e *Indigosfera* (Faboideae), aunque uno de los ejemplares de *Prosopis* y el de *Acacia* fueron identificados como pertenecientes a otras familias a partir de la comparación de las secuencias obtenidas con las de BLAST. Por otra parte, los ejemplares de los restantes géneros de Faboideae quedaron incluidos en los grupos VI (*Aeschynomene*, *Stylosanthes* y *Arachis*), VIII (*Crotalaria* y *Zornia*), X (*Macroptilium*, *Vigna*, *Erythrina*, *Galactia* y *Desmodium*) y XII (*Rhynchosia*).

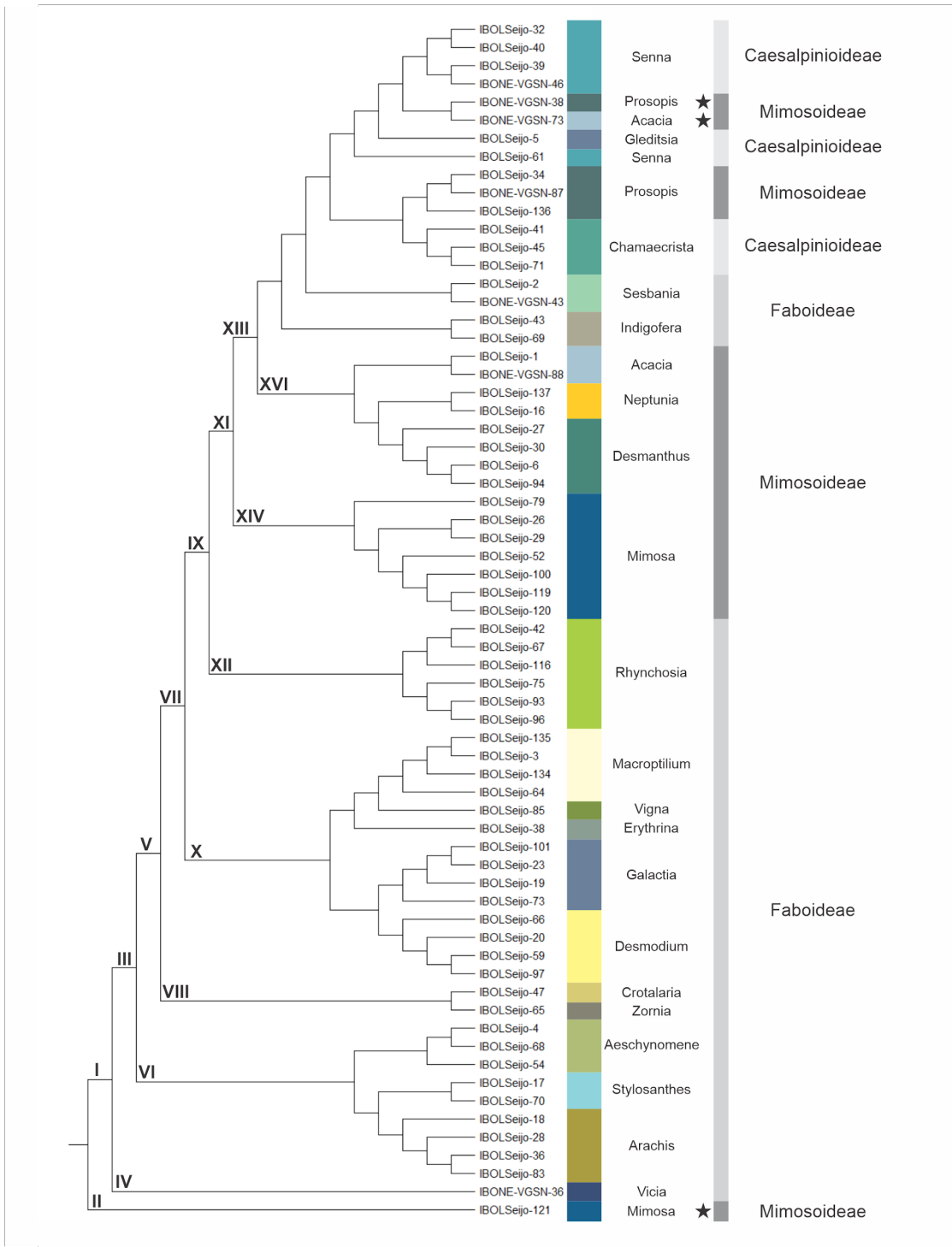


Fig. 8. Dendrograma UPGMA generado a partir de secuencias del gen *rbcL* de ejemplares de Fabaceae del Gran Chaco. Las estrellas indican ejemplares que fueron identificados como pertenecientes a otros géneros a partir de la comparación de las secuencias obtenidas con las de BLAST.

ITS

El dendrograma obtenido a partir de las secuencias ITS de ejemplares de Fabaceae se muestra en la Fig. 9. Se identifican dos grandes grupos. El grupo I incluye ejemplares de Faboideae y Caesalpinioideae, mientras que el grupo II incluye los géneros *Enterolobium*, *Desmanthus* y *Prosopis* (Mimosoideae). En el grupo I, los géneros, *Chamaecrista* y *Senna* (Caesalpinioideae) forman un grupo (III) separado de los géneros de Faboideae: *Rhynchosia*, *Erythrina*, *Desmodium*, *Macroptilium* (grupo X), *Galactia* (grupo IX), *Sesbania* (grupo VIII), *Collea*, *Aeschynomene*, *Vicia*, *Indigofera*, *Crotalaria* (grupo VII), *Aeschynomene*, *Rhynchosia* (grupo VI) y *Zornia* (grupo V) así como de *Gleditsia* (grupo IV).

Análisis comparado de las secuencias

El análisis comparado de las secuencias entre las especies de un mismo género, mostró que las del gen *rbcL* no variaron, como en *Prosopis*, o presentaron escasos sitios variables (de 1 en *Galactia* a 9 en *Desmodium*) (Anexo Tablas 2-5), mientras que las secuencias de la región ITS presentaron desde 5 sitios variables en *Prosopis* a más de 40 en *Desmodium* y *Senna* (Anexo Tablas 6-9). En los casos en los que se pudieron analizar dos poblaciones de una misma especie, en general, no se detectaron diferencias interpoblacionales en las secuencias.

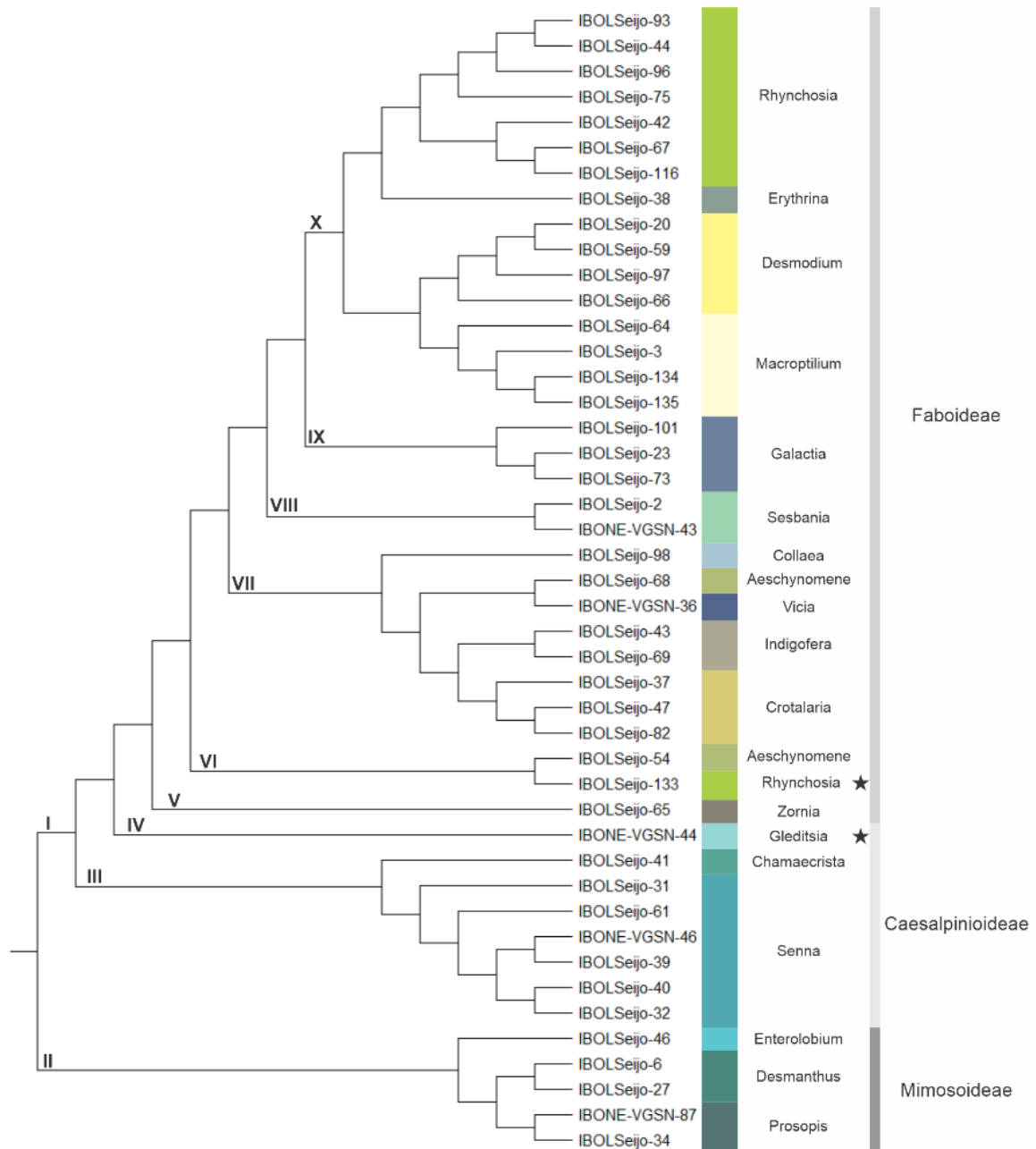


Fig. 9. Dendrograma UPGMA generado a partir de secuencias ITS de ejemplares de Fabaceae del Gran Chaco. Las estrellas indican ejemplares que fueron identificados como pertenecientes a otros géneros a partir de la comparación de las secuencias obtenidas con las de BLAST.

Discusión

Los códigos de barras de ADN son marcadores genéticos especie-específicos que permiten la identificación taxonómica de las muestras biológicas. En este sentido, la iniciativa IBOL tiene como objetivo producir inventarios de biodiversidad en forma de bibliotecas de códigos de barras de ADN con el fin de proporcionar una base de datos de referencia para ayudar a la identificación de taxones no identificados o difíciles de identificar ([Ratnasingham & Hebert, 2007](#); [Jinbo et al., 2011](#)). La riqueza de los datos de las secuencias moleculares disponibles en estas bibliotecas ha permitido generar filogenias regionales bien resueltas, cuantificar más precisamente la estructura de las comunidades y de las interacciones entre las especies ([Kress et al., 2009](#); [Kesanakurti et al., 2011](#)), identificar muestras fragmentarias o etapas de vida morfológicamente indistintas (por ejemplo, brotes, huevos o larvas), o para la detección temprana y/o monitoreo de especies invasoras ([Dejean et al., 2012](#); [Scriver et al., 2015](#); [Xu et al., 2018](#)), entre otras aplicaciones. A medida que se han ampliado los esfuerzos de codificación, un reto importante ha sido generar bibliotecas de códigos de barras de ADN para floras completas ([Elliot & Davies, 2014](#)). Sin embargo, algunos de los principales inconvenientes planteados incluyen la recolección de especímenes de especies raras o efímeras, el acceso limitado a la experiencia taxonómica necesaria para la identificación fiable de especímenes de referencia y los desafíos moleculares en la amplificación y la coincidencia de los datos del código de barras. Por los motivos antes mencionados, el éxito de la iniciativa global del código de barras para floras completas depende de la estrecha colaboración de taxónomos, recolectores de plantas y biólogos moleculares ([Frézal & Leblois, 2008](#)). Hasta el momento se han publicado pocos estudios sobre la codificación de floras regionales, siendo la mayoría de estos oriundos del Hemisferio Norte ([Burgess et al., 2011](#); [Bruni et al., 2012](#); [Kuzmina et al., 2012](#); [de Vere et al., 2012](#)).

En el Neotrópico, i.e. la región que se extiende desde el centro de México hasta el centro de Argentina, incluyendo el Caribe (Morrone, 2013 & 2014), el código de barras de ADN se ha empleado para la identificación de especies de Lepidópteros (Lavinia et al. 2017; Dias et al., 2019; Silva-Brandão et al., 2020), ictioplancton (Frantine-Silva et al., 2015), Anuros (Koroiva et al., 2020), aves (Lijtmaer et al. 2011), mamíferos (K Lim, 2012; Burton et al. 2016), así como de determinados grupos de plantas vasculares (Newmaster et al., 2006; Newmaster et al., 2008; Newmaster & Ragupathy 2009; Kress et al., 2009) con fines taxonómicos, evolutivos y de conservación. A nivel de comunidades ecológicas, se cuenta con una biblioteca de referencia para la identificación de especies de peces del Bajo Paraná (Díaz et al., 2016).

El Gran Chaco Americano es la ecorregión boscosa más extensa del Neotrópico después del Amazonas. Se trata de un área natural que contiene una enorme diversidad de ambientes, tales como las selvas ribereñas, bosques secos, sabanas y pastizales, matorrales desérticos, esteros, bañados y salares (Spensley et al., 2013). Hasta el momento, no se disponían datos de códigos de barras para la flora de esta región. En este sentido, el aporte a la base de datos BOLD System, contribuyendo con 263 secuencias de ADN (153 del gen *rbcL* y 110 de la región ITS) de 181 ejemplares de plantas vasculares obtenidas en este Trabajo Final de Graduación, representan uno de los primeros intentos de codificar las especies de plantas vasculares tanto del Gran Chaco, como de la flora Neotropical.

El código de barras en plantas

Las características clave para un código de barras de ADN eficaz incluyen la universalidad (loci que pueden ser amplificados en todos los taxones con los cebadores comunes), la calidad (loci que más probablemente producen secuencias

bidireccionales con pocas o ninguna base ambiguas), la discriminación (loci que distinguen el mayor número de especies) y la rentabilidad (Hollingsworth et al. 2011).

El código de barras de ADN basado en secuencias del gen mitocondrial que codifica la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (COI) ha sido muy útil para el reconocimiento de especies animales como ser insectos (Hajibabaei et al., 2006), peces (Ward et al., 2005; Hubert et al., 2008), aves (Hebert et al., 2004; Kerr et al., 2007), primates (Lorenz et al., 2005), entre otros. Esta región, también ha permitido identificar algunas especies de hongos (Badotti et al., 2017) así como oomicetos (Robideau et al., 2011). Sin embargo, el gen de la citocromo oxidasa I y otros genes mitocondriales tienen utilidad limitada para la identificación de las especies de plantas, debido a los bajos niveles de variación genética (Kress et al., 2005; Pennisi, 2007; Chase et al., 2007). Uno de los posibles motivos de esta escasa variación genética en plantas puede ser por la ocurrencia de hibridación e introgresión, lo que genera un cambio rápido de estructura a nivel genómico mitocondrial (Adams, 2015).

Diversos autores han sugerido el empleo de la combinación de las secuencias del gen *rbcL* y *matK* como código de barras de ADN para plantas terrestres (Stoeckle, 2003; Fazekas et al., 2008; Hollingsworth et al., 2011), aunque otros marcadores (véase Hollingsworth et al., 2011), como el espaciador transcrito interno (ITS), también se han propuesto para discriminar las especies en algunos clados de plantas (Li et al., 2011). Trabajos recientes han explorado la eficacia de estos marcadores para discriminar diferentes especies en las floras regionales (por ejemplo, Burgess et al., 2011) y la resolución que proporcionan en la reconstrucción de árboles filogenéticos regionales (por ejemplo, Kress et al., 2009). Sin embargo, la determinación de una región

genética para usar como código de barras en plantas, de aplicabilidad general, aún se encuentra en proceso de investigación.

La ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBis-CO) es la enzima responsable de la fijación del CO₂ durante el proceso de fotosíntesis, y la estructura cuaternaria de la enzima consta de ocho subunidades grandes y ocho subunidades pequeñas. Dicha proteína es codificada por el gen plastidial *rbcL* para la subunidad mayor, mientras que la subunidad menor se encuentra codificada en el gen nuclear *rbcS* (Palmer, 1985). El gen *rbcL* es un marcador que se ha secuenciado ampliamente, y los resultados obtenidos hasta el momento en diferentes grupos de plantas sugieren que es confiable para desvelar relaciones filogenéticas de orden superior (Kress & Erickson, 2007). Es un gen grande [>1400 pares de bases (pb)], lo que proporciona un elevado número de caracteres, pudiendo llevar a cabo estudios filogenéticos; además, la tasa evolutiva para *rbcL* es apropiada para abordar cuestiones de filogenia en angiospermas a nivel de familia o superiores (Soltis et al., 2000). Sin embargo, dado que el gen *rbcL* no muestra suficiente variación como para permitir la identificación por debajo del nivel de género (Renner, 1999; Salazar et al., 2003; Jaén-Molina et al., 2010), se ha sugerido que un código de barras genético válido para plantas debería ser multilocus, abarcando a una región codificante (*rbcL*) en combinación con una región de evolución más rápida no codificante como la región espaciadora transcrita interna del cistrón ribosómico nuclear (18S - 5,8S - 26S), ITS (Kress et al., 2009; De Groot et al., 2011).

Por otra parte, ITS es el locus secuenciado más comúnmente cuando se desean resolver relaciones filogenéticas por debajo del nivel de familia (Álvarez, 2003). Es una región de ADN que ha mostrado una amplia utilidad en organismos fotosintéticos y hongos, exceptuando a las Pterydophytas (Stoeckle, 2003). ITS es un marcador que ha sido válido para discriminar a nivel de especie, presentando una facilidad técnica en la mayoría de estudios filogenéticos donde se emplea. Sin embargo, también se han

documentado taxones donde el marcador presenta limitaciones (Kress, 2005). Entre ellas se ha registrado la ampliación preferencial de hongos endófitos contaminantes, aunque esto puede eliminarse con un diseño de cebadores específicos para plantas. Además, dado que es una región no codificante, semiconservativa, y de evolución rápida (mayor variabilidad a nivel de bases), requiere de alineamientos más complejos, ayudados por algoritmos de búsquedas, lo que puede limitar su utilidad en estudios filogenéticos a nivel de orden y familia (Kress et al., 2005; Sass et al., 2007; Chen et al., 2010; Yao et al., 2010). Una de las ventajas que presenta la región ITS, es que puede ser amplificada en dos fragmentos más pequeños (ITS1 e ITS2), adyacentes al locus 5,8 S, el cual ha sido de especial utilidad cuando se trabaja con muestras degradadas (Kress, 2005; Yao et al., 2010), aunque el poder discriminatorio es mayor cuando se analiza la región completa (Hollingsworth, 2011).

De acuerdo a lo esperado por su facilidad de amplificación y secuenciación en la mayoría de plantas terrestres (Renner, 1999; salazar et al., 2003; Kress & Erickson, 2007; Jaén-Molina et al., 2010), los resultados obtenidos en este Trabajo Final de Graduación mostraron que el número de secuencias obtenidas del gen *rbcL* (41,4%) fue mayor que el de la región ITS (15,5%). Asimismo, el porcentaje de correspondencia de las secuencias obtenidas a partir de muestras de la flora chaqueña con las disponibles en la base de datos BLAST en las diferentes categorías taxonómicas también fue mayor para *rbcL*.

Por otra parte, el hecho que en el análisis de agrupamiento a partir de secuencias del gen *rbcL*, de la región ITS y de ambas secuencias concatenadas, tanto de todos los ejemplares analizados como de los ejemplares de Fabaceae exclusivamente, los ejemplares de una misma categoría taxonómica (orden, familia y género) quedaron incluidos en un mismo grupo, sugiere que tanto las secuencias del gen *rbcL* como las de la región ITS (independientes o concatenadas), podrían ser buenos códigos de

barras para las especies de plantas del Gran Chaco, aunque el poder discriminatorio de las secuencias de ITS sería mayor como lo evidencia la conformación de los grupos en el análisis UPGMA. Asimismo, en aquellos géneros en los que se pudieron analizar varias especies como *Desmodium*, *Galactia*, *Macroptilium*, *Prosopis* y *Senna*, las secuencias de *rbcL* permitieron diferenciar claramente los géneros, mientras que las secuencias de ITS permitieron diferenciar las especies. Las diferencias entre las secuencias del gen *rbcL* y de la región ITS de dichas especies evidencian que las secuencias combinadas de ambos marcadores podrían constituir un buen código de barras genético a nivel de especies. Los resultados aquí obtenidos sugieren que, de acuerdo con lo propuesto por China Plant BOL Group (2009), en aquellos casos donde no se cuenta con dos secuencias génicas, los marcadores unilocus también podrían resultar útiles tanto para una identificación orientativa, como una herramienta colaborativa para sustentar los datos taxonómicos, principalmente a niveles de variedades y especies crípticas (Bell et al., 2012).

Por otra parte, las discrepancias detectadas entre la asignación taxonómica mediante caracteres morfológicos y los datos moleculares en algunas muestras podría ser el resultado de errores en la identificación fenotípica, por lo que los ejemplares testigo de dichas muestras deberían ser analizados nuevamente con el fin de esclarecer su identidad taxonómica.

Finalmente, algunos géneros que incluyen una serie de grupos taxonómicamente complejos presentan considerables desafíos para la identificación morfológica debido a la hibridación, la poliploidía y/o la agamosperma (Fazekas et al., 2008; Roy et al., 2010), siendo la codificación de barras una tarea compleja. Entre las especies de mayor valor forestal características del Gran Chaco Americano se encuentran las especies del género *Prosopis*, bajo el nombre vernáculo de algarrobos. En este género existen antecedentes de estudios sobre la variación genética, sistemas de

apareamiento y flujos de genes a través de caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares que demuestran la existencia de altos índices de variación genética intraespecífica y de híbridos interespecíficos (Solbrig & Bawa, 1975; Saidman & Vilardi, 1987; Verga, 1995; Joseau, 2006; Mottura, 2006; Ferreyra et al., 2013; Velazco Sastre, 2019). La explotación actual que sufren las especies forestales de *Prosopis* para la provisión de madera, extraída principalmente del bosque nativo (SAyDS, 2007), resulta insostenible a mediano plazo y está ocasionando un deterioro importante de los bosques nativos remanentes. Por lo tanto, la posibilidad de identificar muestras de estas especies a partir de códigos de barras de ADN resulta de interés tanto desde un punto de vista taxonómico, como evolutivo y de conservación. Las diferencias detectadas en las secuencias de ITS de los materiales analizados de *Prosopis* sugieren que el código de barras genético podría ser una herramienta muy valiosa para la identificación inequívoca de las especies, aunque será necesario analizar, tanto un número mayor de especies como de secuencias de otros marcadores para lograr la identificación inequívoca de las especies de este género.

Conclusiones

Este estudio es el primero que reporta secuencias de código de barras genético (barcode) de especies de la flora del Gran Chaco.

El código de barras genético es una herramienta eficiente y permite la correcta identificación taxonómica a nivel de órdenes, familias y géneros de las plantas vasculares del Gran Chaco debido a su alta especificidad.

Si bien el análisis con las secuencias recomendadas por el consorcio IBOL es prometedor, sería necesario incorporar más secuencias para lograr la identificación inequívoca de las especies.

Bibliografía

- Adams, R.P. (2015). Allopatric hybridization and introgression between *Juniperus maritima* RP Adams and *J. scopulorum* Sarg. II. Additional evidence from nuclear and cpDNA genes in Montana, Wyoming, Idaho and Utah. *Physiologia*, 97, 187-199.
- Álvarez, I.J. & Wendel, J.F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. "*Molecular phylogenetics and evolution*", 29(3), 417-434.
- Anjum T., Jabeen, .R, Adkins, S. & Akram, W. (2020). Exploring Parthenium weed biotypes by chloroplast DNA barcode analysis. *Planta Daninha*, 38: e020191623. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582020380100052>
- Aras, S., Duran, A. & Yenilmez, G. (2003). Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis* L. specimens. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21(4), 461-462.
- Asahina, H., Shinozaki, J., Masuda, K., Morimitsu, Y. & Satake, M. (2010). Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequences. *Journal of Natural Medicines*, 64(2), 133-138.
- Badotti, F., de Oliveira, F.S., Garcia, C.F., Vaz, A.B. M., Fonseca, P.L.C., Nahum, L.A. & Góes-Neto, A. (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC microbiology*, 17(1), 1-12.
- Bafeel, S. O., Arif, I. A., Bakir, M. A., Khan, H. A., Al Farhan, A. H., Al Homaidan, A. A. & Thomas, J. (2011). Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (*matK*) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (*rbcL*) for barcoding of some arid plants. *Plant Omics*, 4(4), 195-198.

- Bell, D., Long, D.G., Forrest, A.D., Hollingsworth, M.L., Blom, H.H. & Hollingsworth, P. M. (2012). DNA barcoding of European *Herbertus* (Marchantiopsida, Herbertaceae) and the discovery and description of a new species. *Molecular Ecology Resources*, 12(1), 36-47.
- Biani, N.J., Vesprini & Prado. D. (2006). Conocimiento sobre el gran Chaco Argentino en el siglo XX. En: Arturi, M.F., J.L. Frangi & J.F. Goya (eds.). *Ecología y Manejo de los bosques de Argentina*, pp. 1-19. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata.
- Blaxter, M. (2003). Molecular systematics: counting angels with DNA. *Nature*. 421, 122–124.
- Blaxter, M. L. (2004). The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1444), 669-679.
- Bruni, I., De Mattia, F., Martellos, S., Galimberti, A., Savadori, P., Casiraghi, M., & Labra, M. (2012). DNA barcoding as an effective tool in improving a digital plant identification system: a case study for the area of Mt. Valerio, Trieste (NE Italy).
- Burgess, K.S., Fazekas, A.J., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Husband, B.C., Newmaster, S.G. & Barrett, S.C. (2011). Discriminating plant species in a local temperate flora using the rbcL+ matK DNA barcode. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(4), 333-340.
- Burton K. Lim & Lina Maria Arcila Hernandez (2016) DNA barcoding of Jamaican bats: implications to Neotropical biodiversity, *Mitochondrial DNA Part A*, 27:4, 3013-3019, DOI: [10.3109/19401736.2015.1063047](https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1063047)
- Cabrera, A.L. (1971). Fitogeografía de la república Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 14: 1-42.

- Cardozo, S.A., Tálamo & Mohr F. (2011). Composición, diversidad y estructura del ensamble de plantas leñosas en dos paleocauces con diferente intervención antrópica del Chaco semiárido, Argentina. *Bosque*. 32: 279-286.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth P.M., Van den Berg, C., Madriñan, S., Petersen G. & Pedersen N. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*. 56: 295–299.
- Chen, S.H., Yao, J., Han, C., Liu, J., Song, L., Shi & Luo K. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species.
- China Plant, B.O.L.G., Li, D.Z., Gao, L.M., Li, H.T., Wang, H., Ge, X.J., ... & 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 of the United States of America*, 108(49), 19641-6.
- Contreras, S.A., Contreras, F.I., Lutz, A.I. & Zucol A.F. (2015). Contribución al conocimiento florístico de Chaco oriental, sudeste de la provincia de Formosa, Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 50: 531-574.
- De Groot, G.A., During, H.J., Maas, J.W., Schneider, H., Vogel, J.C. & Erkens, R. H. (2011). Use of *rbcL* and *trnL-F* as a two-locus DNA barcode for identification of NW-European ferns: an ecological perspective. *PLoS one*, 6(1), e16371.
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. & Miaud, C. (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of applied ecology*, 49(4), 953-959.

- de Vere, N., Rich, T.C., Ford, C.R., Trinder, S.A., Long, C., Moore, C.W.,... & Wilkinson, M. J. (2012). DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. *PloS one*, 7(6), e37945.
- Dias, F.M.S., Janzen, D., Hallwachs, W., Chacón, I., Willmott, K., Ortiz-Acevedo, E.,... & Casagrande, M.M. (2019). DNA barcodes uncover hidden taxonomic diversity behind the variable wing patterns in the Neotropical butterfly genus *Zaretis* (Lepidoptera: Nymphalidae: Charaxinae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 185(1), 132-192.
- Díaz, J., Villanova, G.V., Brancolini, F., Del Pazo, F., Posner, V.M., Grimberg, A. & Arranz, S.E. (2016). First DNA barcode reference library for the identification of South American freshwater fish from the lower Paraná river. *PLoS One*, 11(7), e0157419.
- Di Giacomo, A.G. & Krapovickas S.F. (2005). Historia natural y paisaje de la Reserva El Bagual, provincia de Formosa, Argentina. *Temas de Nat. y Cons.* 4:1-592.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie D. & A. Rambaut (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molec. Boil. & Evol.* 29: 1969-1973.
- Elliot T.L. & Davies J. (2014) Challenges to barcoding an entire flora. *Molecular Ecology Resources* 14: 883–891. doi: 10.1111/1755-0998.12277
- Erize, F. (1995). National Parks of Argentina and other natural areas. *El Ateneo*.
- Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., ... & Barrett, S.C. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PloS one*, 3(7), e2802.

- Feliner, G.N. & Rosselló, J.A. (2007). Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *"Molecular phylogenetics and evolution"*, 44(2), 911-919.
- Ferreyra L, Vilardi, J, Verga A, López V, Saidman B (2013) Genetic and morphometric markers are able to differentiate three morphotypes belonging to Section Algarobia of genus *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae). *Plant Systematics and Evolution*, 299,1157-1173.
- Frantine-Silva W., S. H. Sofia, M. L. Orsi and F. S. Almeida., 2015 DNA barcoding of freshwater ichthyoplankton in the Neotropics as a tool for ecological monitoring. *Molecular Ecology Resources* (2015) 15, 1226–1237 doi: 10.1111/1755-0998.1235
- Frézal, L. & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727-736.
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X., ... & Chen, S. (2010). Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of ethnopharmacology*, 130(1), 116-121.
- Ginzburg, R. & Adámoli J. (2006). Situación ambiental en el Chaco húmedo. En: Brown, A., U. Martínez Ortíz, M. Acerbi & J. Corcuera (eds.), *La Situación Ambiental Argentina 2005*, pp. 103-113. Fundación Vida Silvestre, Buenos Aires.
- Group, C.P.B., Li, D.Z., Gao, L.M., Li, H.T., Wang, H., Ge, X.J. & Duan, GW. (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(49), 19641-19646.

- Group, C.P.W., Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S. & Little, D.P. (2009). A DNA barcode for land plants. *"Proceedings of the National Academy of Sciences"*, 106(31), 12794-12797.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W. & Hebert, P.D. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 968-971.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M. & Godfray, C. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology*, 2(10), e312.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham, S. & deWaard. J.R. (2003) (b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. Ser. B* 270: S96–S99.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball, J.R. deWaard. 2003 (a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. Ser. B* 270: 313–321.
- Hollingsworth, P. M. (2011). Refining the DNA barcode for land plants. *"Proceedings of the National Academy of Sciences"*, 108(49), 19451-19452.
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., Burrige, M.,...& Bernatchez, L. (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS one*, 3(6), e2490.
- Ivanova, N.V., Fazekas, A.J. & Hebert P.D. (2008). Semi-automated, membrane-based protocol for DNA isolation from plants. *Plant Molec. Biol. Rep.* 26: 186.
- Jaén-Molina, R., Rodríguez, A., Reyes-Betancort, J.A., Suárez, J.N., Santos-Guerra, A., Caujape-Castells, J. & Ros, R.M. (2010). La flora endémica del parque nacional de Garajonay bajo la perspectiva molecular: Las secuencias de ADN como herramienta en la identificación taxonómica.

Naturaleza y Parques Nacionales. Serie Investigación en la red. Madrid, Spain: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 249-273.

- Jinbo, U., Kato, T. & Ito, M. (2011). Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science*, 14(2), 107-124.
- Joseau, M.J., Ledesma, M., Verga, A. & Carranza, C. (2006). El cultivo del algarrobo: obtención de semilla, vivero y plantación del algarrobo: con especial referencia al Chaco árido argentino. Ediciones INTA.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F. & Donoghue M.J. (2008) *Plant Systematics, a Phylogenetic Approach* (Sinauer, Sunderland, MA), 3rd Ed.
- Kerr, K.C., Stoeckle, M.Y., Dove, C.J., Weigt, L.A., Francis, C.M. & Hebert, P.D. (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular ecology notes*, 7(4), 535-543.
- Kesanakurti, P.R., Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Percy, D.M., Newmaster, S.G., Graham, S.W.,...& Husband, B.C. (2011). Spatial patterns of plant diversity belowground as revealed by DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 20(6), 1289-1302.
- Koroiva, R., Rodrigues, L.R.R & Santana, D.J. (2020). DNA barcoding for identification of anuran species in the central region of South America. *PeerJ* 8:e10189 <https://doi.org/10.7717/peerj.10189>
- K Lim, B. (2012). Preliminary assessment of Neotropical mammal DNA barcodes: an underestimation of biodiversity. *The Open Zoology Journal*, 5(1).
- Kress W.J., Erickson D.L., Jones F.A., Swenson N.G. & Perez R. (2009) Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18627–18632.

- Kress, W.J. & Erickson, D.L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. & Janzen, D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8369-8374.
- Kuo, L.Y., Li, F.W., Chiou, W.L. & Wang, C.N. (2011). First insights into fern *matK* phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59(3), 556-566.
- Kuzmina, M.L., Johnson, K.L., Barron, H.R. & Hebert, P.D. (2012). Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library. *BMC ecology*, 12(1), 1-11.
- Lahaye, R.M., Van der Bank, D., Bogarin, J., Warner, F., Pupulin, G., Gigot & Sovolainen R. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 2923–2928.
- Lavinia PD, Núñez Bustos EO, Kopuchian C, Lijtmaer DA, Garcí’a NC, Hebert PDN, et al. (2017) Barcoding the butterflies of southern South America: Species delimitation efficacy, cryptic diversity and geographic patterns of divergence. *PLoS ONE* 12(10): e0186845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186845>
- Levin, R.A., Wagner W.L., Hoch, P.C., Nepokroeff, M., Pires, J.C., Zimmer E.A. & Sytsma. K.J. (2003). Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data. *AM. J. BOT.* 90: 107-115.
- Li, F.W., Kuo, L.Y., Rothfels, C.J., Ebihara, A., Chiou, W.L., Windham, M.D. & Pryer, K.M. (2011). *rbcL* and *matK* earn two thumbs up as the core DNA barcode for ferns. *PLoS One*, 6(10), e26597.

- Lijtmaer, D.A., Kerr, K.C.R., Barreira, A.S., Hebert, P.L.D.N., Turabo, P.L. (2011). DNA barcode libraries provide insight into continental patterns of avian diversification. *PLOS ONE* 6, 20744 - 20744
- Lorenz, J.G., Jackson, W.E., Beck, J.C. & Hanner, R. (2005). The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1869-1877.
- Manen, J. F., Habashi, C., Jeanmonod, D., Park, J. M., & Schneeweiss, G. M. (2004). Phylogeny and intraspecific variability of holoparasitic Orobanchaceae (Orobanchaceae) inferred from plastid *rbcl* sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 33(2), 482-500.
- Marshall, E. (2005). Will DNA barcodes breathe life into classification? 307: 1037-1037.
- Meyer, C.P. & Paulay G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol.* 3: 2229–2238.
- Morrone, J.J. (2013). Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics* 30: 202–214.
- Morrone, J.J. (2014). Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa* 3782: 1–110.
- Mottura, M. C. (2006). Development of microsatellites in *Prosopis* spp. and their application to study the reproductive system (Doctoral dissertation, Georg-August-Universität Göttingen).

- Naumann, M. (2006). Atlas del Gran Chaco Sudamericano. Sociedad Alemana de Cooperación Técnica (GTZ). ErreGé & Asoc., Buenos Aires, Argentina. 92 pp.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, R.A.D., & Janovec, J. (2008). Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular ecology resources*, 8(3), 480-490.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J. & Ragupathy, S. (2006). DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach. *Botany*, 84(3), 335-341.
- Palmer, J.D. (1985). Comparative organization of chloroplast genomes. *Annual review of genetics*, 19(1), 325-354.
- Parveen, I., Gafner, S., Techen, N., Murch, S.J. & Khan, I.A. (2016). DNA barcoding for the identification of botanicals in herbal medicine and dietary supplements: strengths and limitations. *Planta Medica*, 82(14), 1225-1235.
- Pennisi, E. (2007). Wanted: a barcode for plants. *Science*. 318: 190–191.
- Prado, D.E. (1993). What is the Gran Chaco vegetation in South America? I: A review. Contribution to the study of flora and vegetation of the Chaco. *Candollea*. 48: 145-172.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364.
- Renner, S. S. (1999). Circumscription and phylogeny of the Laurales: evidence from molecular and morphological data. *American Journal of Botany*, 86(9), 1301-1315.
- Rieseberg, L.H., Wood, T.E. & Baack, E.J. (2006). The nature of plant species. *Nature*, 440(7083), 524-527.

- Robideau, G.P., De Cock, A.W., Coffey, M.D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K.,...& André Lévesque, C. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular ecology resources*, 11(6), 1002-1011.
- Roy, S., Tyagi, A., Shukla, V., Kumar, A., Singh, U. M., Chaudhary, L. B.,...& Tuli, R. (2010). Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: a case study with Indian *Berberis* species. *PloS one*, 5(10), e13674.
- Saidman, B.O. & Vilardi, J.C. (1987). Analysis of the genetic similarities among seven species of *Prosopis* (Leguminosae: Mimosoideae). *Theoretical and Applied Genetics*, 75(1), 109-116.
- Salazar, G.A., Chase, M.W., Soto Arenas, MA. & Ingrouille, M. (2003). Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany*, 90(5), 777-795.
- Sass, C., Little, D.P., Stevenson, D.W. & Specht, C.D. (2007). DNA barcoding in the cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads. *PloS one*, 2(11), e1154.
- SAyDS (2007) 1° Inventario Nacional de Bosques Nativos. Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. Buenos Aires, Argentina.
- Scrivera, M., Marinich, A., Wilson, C. & Freeland, J. (2015). Development of species-specific environmental DNA (eDNA) markers for invasive aquatic plants. *Aquatic Botany*, 122, 27-31.
- Silva-Brandão, K.L., Lyra, M.L. & Freitas, A.V. (2009). Barcoding Lepidoptera: current situation and perspectives on the usefulness of a contentious technique. *Neotropical entomology*, 38, 441-451.

- Solbrig, O.T. & Bawa, K.S. (1975). Isozyme variation in species of *Prosopis* (Leguminosae). *Journal of the Arnold Arboretum*, 56(4), 398-412.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Chase, M.W., Mort, M.E., Albach, D.C., Zanis, M.,...& Farris, J.S. (2000). Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 133 (4), 3881-461.
- Spensley, J., Sabelli, A., Buenfil, J. (2013). Estudio de vulnerabilidad e impacto del cambio climático en el gran Chaco americano. Ed. Programa de las Nacionales Unidas para el medio ambiente – PNUMA
- Starr, J.R., Naczi, R.F. & Chouinard, B.N. (2009). Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *Molecular ecology resources*, 9, 151-163.
- Stebbins, G.L. (1950). *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press.
- Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience*, 53(9), 796-797.
- Swofford, D.L., Waddell, P.J., Huelsenbeck, J.P., Foster, P.G., Lewis P.O. & Rogers, J.S. (2001). Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Systematic biology*. 50: 525-539.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N. Stecher, G. Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 28(10), 2731-2739.
- Tamura, M.N., Fuse, S., Azuma, H. & Hasebe, M. (2004). Biosystematic studies on the family Tofieldiaceae I. Phylogeny and circumscription of the family inferred from DNA sequences of matK and rbcL. *Plant Biology*, 6(05), 562-567.

- Temiesak, P., Pooprompan, P. & Limsomboonchai, M. (1993). Prospection for Using RAPD Analysis for Varietal Identification in Tomato and Cucumber. *Agriculture and Natural Resources*, 27(5), 52-56.
- Vanijajiva, O., Sirirugsa, P. & Suvachittanont, W. (2005). Confirmation of relationships among *Boesenbergia* (Zingiberaceae) and related genera by RAPD. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(2), 159-170.
- Velasco Sastre, T. (2019). Dinámica evolutiva de enjambres híbridos entre *Prosopis caldenia* y *Prosopis flexuosa* en el Espinal, distrito del Caldenal. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Verga, A. (1995). Genetic study of *Prosopis chilensis* y *Prosopis flexuosa* (Mimosaceae) in the dry Chaco of Argentina. Tesis Doctoral. Göttingen Research Notes in Forest Genetics. Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen.
- Viglizzo, E.F., Frank, F.C., Carreño, L., Brown, A., Martínez Ortiz, U., Acerbi M. & Corcuera J. (2005). Ecorregiones Pampa y Campos y Malezales. La situación ambiental en las ecorregiones Pampa y Campos y Malezales. *La situación ambiental argentina*.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. & Hebert, P.D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.
- Wells, J.D., Pape, T. & Sperling, F.A. (2001). DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *Journal of Forensic Science*, 46(5), 1098-1102.

- White, T.J., T. Bruns, S.J., Lee & Taylor, J.L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 18: 315-322.
- Xu, S.Z., Li, Z. Y. & Jin, X.H. (2018). DNA barcoding of invasive plants in China: A resource for identifying invasive plants. *Molecular ecology resources*, 18(1), 128-136.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., ... & Chen, S. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PloS one*, 5(10), e13102.
- Zarrilli, A. (2008). Bosques y agricultura: una mirada a los límites históricos de sustentabilidad de los bosques argentinos en un contexto de la explotación capitalista en el siglo XX. *Revista Luna Azul*. N°26.

Anexo

Tabla 1. Material estudiado.

Especie	Coleccionista y número de colección	Localidad	Coordenadas	Número de Secuencia en Bold System
Fabaceae				
<i>Arachis correntina</i> (Burkart) Krapov. & W.C. Greg.	Seijo 5039	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 24' 10,8" S 58° 33' 07,2" W	PLANE020-14
	Seijo 5047	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 23' 45,6" S 58° 35' 49,2" W	PLANE027-14
<i>A. glabrata</i> Benth.	Seijo 5086	Corrientes, Dpto. Berón de Astrada.	27° 33' 14,4" S 57° 31' 40,8" W	PLANE064-14
<i>Chamaecrista rotundifolia</i> (Pers.) Greene	Seijo 5052	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 45,6" S 58° 38' 49,2" W	PLANE032-14
	Seijo 5076	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 19' 15,6" S 57° 58' 51,6" W	PLANE056-14

<i>C. erecta</i>	Seijo 5056	Corrientes, Dpto. San Cosme	27° 26' 45,6" S 58° 38' 49,2" W	PLANE036-14
<i>Chamaecrista</i> sp.	Seijo 5093	Corrientes, Dpto. Concepción.	28° 14' 09,6" S 58° 03' 00,0" W	PLANE071-14
<i>Collea</i> Lindl. sp.	Seijo 5096	Corrientes, Dpto. Concepción.	28° 14' 09,6" S 58° 03' 00,0" W	PLANE074-14
<i>Crotalaria incana</i> L.	Seijo 5048	Corrientes, Dpto. San Cosme	27° 26' 27,6" S 58° 38' 34,8" W	PLANE028-14
	Seijo 5085	Corrientes, Dpto. Gral. Paz.	27° 27' 50,4" S 57° 21' 36,0" W	PLANE063-14
<i>C. micans</i> Link	Seijo 5058	Corrientes, Dpto. San Cosme	27° 26' 45,6" S 58° 38' 49,2" W	PLANE038-14
<i>Desmanthus</i> <i>acuminatus</i> Benth.	Seijo 5038	Corrientes, Dpto. San Cosme	27° 27' 21,6" S 58° 33' 10,8" W	PLANE019-14

	Seijo 5041	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 28,8" S 58° 00' 00,0" W	PLANE022-14
<i>D. virgatus</i> (L.) Willd.	Seijo 5025	Corrientes, Dpto. San Luis del Palmar.	27° 64' 44,4" S 58° 31' 08,4" W	PLANE006-14
<i>Desmanthus</i> Willd.sp.	Seijo 5092	Corrientes, Dpto. Concepción.	28° 14' 09,6" S 58° 03' 00,0" W	PLANE070-14
<i>Desmodium</i> <i>incanum</i> (Sw.) DC.	Seijo 5033	Corrientes, Dpto. San Luis del Palmar.	27° 39' 21,6" S 58° 31' 12,0" W	PLANE014-14
<i>D. affine</i> Schltldl.	Seijo 5065	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 14,4" S 58° 17' 52,8" W	PLANE045-14
<i>Desmodium</i> Desv.sp.	Seijo 5071	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 14,4" S 58° 17' 52,8" W	PLANE051-14
<i>D. cuneatum</i> Hook. & Arn.	Seijo 5095	Corrientes, Dpto. Concepción.	28° 14' 09,6" S 58° 03' 00,0" W	PLANE073-14

<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	Seijo 5057	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 45,6" S 58° 38' 49" W	PLANE037-14
<i>Erythrina crista-galli</i> L.	Seijo 5049	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 27,6" S 58° 38' 34,8" W	PLANE029-14
<i>Galactia</i> P. Browne sp.	Seijo 5099	Corrientes, Dpto. Concepción.	28° 14' 09,6" S 58° 03' 00,0" W	PLANE077-14
	Seijo 5036	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 27' 21,6" S 58° 33' 10,8" W	PLANE017-14
<i>G. latisiliqua</i> Desv.	Seijo 5032	Corrientes, Dpto. San Luis del Palmar.	27° 39' 21,6" S 58° 31' 12,0" W	PLANE013-14
<i>G. volubilis</i> P. Browne	Seijo 5078	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 19' 15,6" S 57° 58' 51,6" W	PLANE057-14
<i>Gleditsia amorphoides</i> (Griseb.) Taub.	Seijo 5024	Corrientes, Dpto. San Luis del Palmar.	27° 34' 44,4" S 58° 331' 08,4" W	PLANE005-14

Indigosfera sp.	Seijo 5054	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 45,6" S 58° 38' 49,2" W	PLANE034-14
Indigofera asperifolia	Seijo 5074	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 14,4" S 58° 17' 52,8" W	PLANE054-14
<i>Macroptilium</i> (Benth.) Urb. sp.	Seijo s/n	Chaco, Dpto. Bermejo.	27° 00' 00,0" S 58° 33' 32,4" W	PLANE097-18
<i>M. lathyroides</i> (L.) Urb.	Seijo s/n	Chaco, Dpto. Bermejo.	27° 00' 00,0" S 58° 33' 32,4" W	PLANE096-18
	Seijo 5022	Corrientes, Dpto. San L. del Palmar.	27° 34' 44,4" S 58° 31' 08,4" W	PLANE003-14
<i>M. psammodes</i> (Lindm.) S. I. Drewes & R. A. Palacios	Seijo 5069	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 14,4" S 58° 17' 52,8" W	PLANE049-14
<i>Mimosa balansae</i> Micheli	Seijo 5040	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 28,8" S 58° 00' 00,0" W	PLANE021-14
<i>M. debilis</i> Humb. & Bonpl. ex Willd.	Seijo 5098	Corrientes, Dpto. Concepción.	28° 14' 09,6" S 58° 03' 00,0" W	PLANE076-14

	Seijo 5112	Corrientes, Dpto. San Miguel.	28° 03' 14,4" S 57° 34' 37,2" W	PLANE091-14
	Seijo 5113	Corrientes, Dpto. San Miguel.	28° 03' 14,4" S 57° 34' 37,2" W	PLANE092-14
<i>M. diplotricha</i> C. Wright	Seijo 5082	Corrientes, Dpto. Gral. Paz.	27° 27' 50,4" S 57° 21' 36,0" W	PLANE060-14
<i>M. erecta</i>	Seijo 5114	Corrientes, Dpto. San Miguel.	28° 03' 14,4" S 57° 34' 37,2" W	PLANE093-14
<i>M. pigra</i> L.	Seijo 5060	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 07,2" S 58° 18' 00,0" W	PLANE040-14
<i>Neptunia</i> Lour. sp.	Seijo 5029	Chaco, Dpto. Bermejo.	27° 00' 00,0" S 58° 33' 32,4" W	PLANE099-18
	Seijo 5029	Corrientes, Dpto. San Luis del Palmar.	27° 39' 21,6" S 58° 31' 12,0" W	PLANE010-14
<i>Prosopis</i> L. sp.	Solis Neffa 2265	Formosa, Dpto. Laishi.	26° 35' 02,4" S 58° 31' 08,4" W	BWCF030-14

	Solis Neffa 2314	Formosa	25° 52' 48,0" S 58° 54' 18,0" W	BWCF068-14
<i>P. affinis</i> Spreng.	Seijo 5046	Chaco, Dpto. Bermejo.	27° 00' 00,0" S 58° 33' 32,4" W	PLANE098-18
	Seijo 5046	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 19' 08,4" S 58° 32' 02,4" W	PLANE026-14
<i>Rhynchosia</i> Lour. sp.	Seijo 5109	Corrientes, Dpto. San Miguel.	28° 03' 14,4" S 57° 34' 37,2" W	PLANE088-14
	Seijo 5091	Corrientes, Dpto. Concepción.	28° 14' 09,6" S 58° 03' 00,0" W	PLANE069-14
	Seijo 5053	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 45,6" S 58° 38' 49,2" W	PLANE033-14
	Seijo 5055	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 45,6" S 58° 38' 49,2" W	PLANE035-14
	Seijo 5072	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 14,4" S 58° 17' 52,8" W	PLANE052-14

	Seijo 5094	Corrientes, Dpto. Concepción.	28° 14' 09,6" S 58° 03' 00,0" W	PLANE072-14
<i>R. edulis</i> Griseb.	Seijo 5109	Chaco, Dpto. Bermejo.	27° 00' 00,0" S 58° 33' 32,4" W	PLANE095-18
	Seijo 5079	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 19' 15,6" S 57° 58' 51,6" W	PLANE058-14
<i>Senna alata</i> (L.) Roxb.	Seijo 5067	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 14,4" S 58° 17' 52,8" W	PLANE047-14
<i>S. obtusifolia</i> (L.) H.S. Irwin & Barneby	Seijo 5042	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 28,8" S 58° 00' 00,0" W	PLANE023-14
<i>S. occidentalis</i> (L.) Link	Seijo 5043	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 28,8" S 58° 00' 00,0" W	PLANE024-14
<i>S. pendula</i> (Humb. & Bonpl. ex Willd.) H.S. Irwin & Barneby	Seijo 5050	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 27,6" S 58° 38' 34,8" W	PLANE030-14
	Solis Neffa 2273	Formosa, Dpto. Laishi	26° 32' 42,0" S 58° 45' 28,8" W	BWCF038-14

<i>S. scabriuscula</i> (Vogel) H.S. Irwin & Barneby	Seijo 5051	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 45,6" S 58° 38' 49,2" W	PLANE031-14
<i>Sesbania</i> Adans. sp.	Solis Neffa 2270	Formosa, Dpto. Laishi	26° 35' 02,4" S 58° 31' 08,4" W	BWCF035-14
<i>S. virgata</i> (Cav.) Poir.	Seijo 5021	Corrientes, Dpto. San L. del Palmar.	27° 34' 44,4" S 58° 31' 08,4" W	PLANE002-14
<i>Stylosanthes</i> Sw.sp	Seijo 5030	Corrientes, Dpto. San Luis del Palmar.	27° 39' 21,6" S 58° 31' 12,0" W	PLANE011-14
	Seijo 5075	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 14,4" S 58° 17' 52,8" W	PLANE055-14
<i>Tipuana tipu</i> (Benth.) Kuntze	Seijo 233	Corrientes, Dpto. San L. del Palmar.	27° 39' 21,6" S 58° 31' 12,0" W	PLANE094-14
<i>Vicia</i> L. sp.	Solis Neffa 2263	Formosa, Dpto. Laishi	26° 35' 02,4" S 58° 31' 08,4" W	BWCF028-14
<i>Vigna</i> Savi sp.	Seijo 5087	Corrientes, Dpto. Berón de Astrada.	27° 33' 14,4" S 57° 31' 40,8" W	PLANE065-14

<i>Zornia</i> J.F. Gmel. sp.	Seijo 5070	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 14,4" S 58° 17' 52,8" W	PLANE050-14
Gesneriaceae				
<i>Sinningia tubiflora</i> (Hook.) Fritsch	Solis Neffa 2324	-----	-----	BWCF105-16
Juncaceae				
<i>Juncus</i> <i>microcephalus</i> Kunth	Solis Neffa 2288	Formosa.	26° 04' 04,8" S 58° 17' 56,4" W	BWCF048-14
Malpighiaceae				
<i>Janusia</i> A. Juss. sp.	Solis Neffa 2349	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 21' 07,2" S 58° 18' 00,0" W	BWCF090-14
-----	Seijo 5105	Corrientes, Dpto. San Miguel.	28° 03' 14,4" S 57° 34' 37,2" W	PLANE084-14
Malvaceae				
<i>Sida</i> L.	Seijo 5104	Corrientes, Dpto. San Miguel.	28° 03' 14,4" S 57° 34' 37,2" W	PLANE083-14

	Seijo 5027	Corrientes, Dpto. San Luis del Palmar.	27° 39' 21,6" S 58° 31' 12,0" W	PLANE008-14
	Seijo 5090	Corrientes, Dpto. Concepción.	28° 18' 36,0" S 58° 16' 37,2" W	PLANE068-14
	Solis Neffa 2346	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58° 54' 18,0" W	BWCF087-14
-----	Seijo 5083	Corrientes, Dpto. Gral. Paz.	27° 27' 50,4" S 57° 21' 36,0" W	PLANE061-14
-----	Seijo 5089	Corrientes, Dpto. Concepción.	28° 18' 36,0" S 58° 16' 37,2" W	PLANE067-14
-----	Solis Neffa 2334	-----	-----	BWCF099-14
-----	Solis Neffa 2255	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 52,8" S 58° 38' 42,0" W	BWCF024-14
-----	Solis Neffa 2269	Formosa, Dpto. Laishi.	26° 65' 02,4" S 58° 31' 08,4" W	BWCF034-14

-----	Solis Neffa 2301	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58° 54' 18,0" W	BWCF057-14
			Moraceae	
<i>Ficus</i> L.	Seijo 5084	Corrientes, Dpto. Gral. Paz.	27° 27' 50,4" S 57° 21' 36,0" W	PLANE062-14
			Myrtaceae	
<i>Psidium guajava</i> L.	Solis Neffa 2348	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58° 54' 18,0" W	BWCF089-14
			Onagraceae	
<i>Ludwigia lagunae</i> (Morong) H. Hara	Solis Neffa 2342	-----	-----	BWCF102-14
			Orchidaceae	
-----	Solis Neffa 2325	-----	-----	BWCF097-14
			Orobanchaceae	
<i>Agalinis</i> Raf. sp.	Seijo 5045	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 19' 08,4" S 58° 32' 02,4" W	PLANE025-14
			Passifloraceae	

<i>Passiflora caerulea</i> L.	Solis Neffa 2344	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58° 54' 18,0" W	BWCF085-14
<i>Piriqueta</i> Aubl. sp.	Solis Neffa 2353	Corrientes, Dpto. Berón de Astrada.	27° 33' 14,4" S 57° 31' 40,8" W	BWCF103-14
<i>Turnera grandiflora</i> (Urb.) Arbo	Solis Neffa 2352	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 19' 15,6" S 57° 58' 51,6" W	BWCF093-14
<i>T. hassleriana</i> Urb.	Solis Neffa 2351	Corrientes, Dpto. Itatí.	27° 19' 15,6" S 57° 58' 51,6" W	BWCF092-14
<i>T. sidoides</i> L.	Solis Neffa 496	Corrientes, Dpto. Paso de la Patria.	27° 19' 01,2" S 58° 34' 58,8" W	BWCF001-14
Plantaginaceae				
<i>Plantago myosuroides</i> Lam.	Solis Neffa 2280	Formosa, Dpto. Laishi.	26° 32' 42,0" S 58° 45' 28,8" W	BWCF043-14
<i>P. tomentosa</i> Lam.	Solis Neffa 2305	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58° 54' 18,0" W	BWCF061-14
Poaceae				
<i>Elionurus muticus</i> (Spreng.) Kuntze	Solis Neffa 2320	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58° 54' 18,0" W	BWCF073-14

<i>Rhynchelytrum</i>	Solis Neffa 2229	Corrientes,	28° 14' 09,6" S 58°	BWCF002-14
Nees sp.		Dpto.	02' 49,2" W	
		Concepción.		

<i>Setaria P. Beauv.</i>	Solis Neffa 2354	-----	-----	BWCF104-14
sp.				

-----	Solis Neffa 2340	-----	-----	BWCF101-14
-------	------------------	-------	-------	------------

-----	Solis Neffa 2262	Formosa,	26° 35' 02,4" S 58°	BWCF027-14
		Dpto. Laishi.	31' 08,4" W	

-----	Solis Neffa 2275	Formosa,	26° 32' 42,0" S 58°	BWCF040-14
		Dpto. Laishi.	45' 28,8" W	

-----	Solis Neffa 2279	Formosa,	26° 32' 42,0" S 58°	BWCF042-14
		Dpto. Laishi.	45' 28,8" W	

Polygonaceae

<i>Polygonum</i> L. sp.	Seijo 5059	Corrientes,	27° 21' 07,2" S 58°	PLANE039-14
		Dpto. Itatí.	18' 00,0" W	

Rubiaceae

-----	Solis Neffa 2250	Corrientes,	27° 26' 52,8" S 58°	BWCF019-14
		Dpto. San	38' 42,0" W	
		Cosme.		

Salicaceae

<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	Solis Neffa 2261	Formosa, Dpto. Laishi.	26° 35' 02,4" S 58° 31' 08,4" W	BWCF026-14
<i>Xylosma venosa</i> N.E. Br.	Solis Neffa 2251	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 52,8" S 58° 38' 42,0" W	BWCF020-14
Sapindaceae				
<i>Allophylus edulis</i> (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Hieron. ex Niederl.	Solis Neffa 2264	Formosa, Dpto. Laishi.	26° 35' 02,4" S 58° 31' 08,4" W	BWCF029-14
	Solis Neffa 2302	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58° 54' 18,0" W	BWCF058-14
Sapotaceae				
<i>Chrysophyllum marginatum</i> (Hook. & Arn.) Radlk.	Solis Neffa 2329	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58° 54' 18,0" W	BWCF078-14
Scrophulariaceae				
<i>Buddleja stachyoides</i>	Solis Neffa 2266	Formosa, Depto. Laishi.	26° 35' 02,4" S 58° 31' 08,4" W	BWCF031-14

(Benth.) E.M.

Norman

Simaroubaceae

<i>Castela coccinea</i>	Solis Neffa 2312	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58°	BWCF067-14
Griseb.			54' 18,0" W	

Smilacaceae

<i>Smilax</i>	Solis Neffa 2257	Corrientes,	27° 26' 52,8" S 58°	BWCF025-14
<i>campestris</i>		Dpto. San	38' 42,0" W	
Griseb.		Cosme.		

Solanaceae

<i>Nierembergia</i>	Solis Neffa 2327	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58°	BWCF076-14
<i>linarifolia</i> Graham			54' 18,0" W	

<i>Solanum</i> L. sp.	Seijo 5068	Corrientes,	27° 21' 14,4" S 58°	PLANE048-14
		Dpto. Itatí.	17' 52,8" W	

<i>S. comptum</i> C.V.	Solis Neffa 2247	Corrientes,	27° 26' 52,8" S 58°	BWCF016-14
Morton		Dpto. San	38' 42,0" W	
		Cosme.		

<i>S. elaeagnifolium</i>	Solis Neffa 2236	Corrientes,	28° 03' 14,4" S 57°	BWCF007-14
Cav.		Dpto. San	34' 37,2" W	
		Miguel.		

<i>S. malmeanum</i>	Solis Neffa 2254	Corrientes,	27° 26' 52,8" S 58°	BWCF023-14
Bitter		Dpto. San	38' 42,0" W	
		Cosme.		
Typhaceae				
<i>Typha subulata</i>	Solis Neffa 2293	Formosa.	26° 04' 04,8" S 58°	BWCF053-14
Crespo & R.L.			17' 56,4" W	
Pérez-Mor.				
Urticaceae				
<i>Cecropia</i>	Solis Neffa 2347	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58°	BWCF088-14
<i>pachystachya</i>			54' 18,0" W	
Trécul				
Verbenaceae				
<i>Aloysia</i> sp.	Seijo 5034	Corrientes,	27° 39' 21,6" S 58°	PLANE015-14
Paláu		Dpto. San L.	31' 12,0" W	
		del Palmar.		
<i>A. gratissima</i>	Solis Neffa 2328	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58°	BWCF077-14
(Gillies & Hook.)			54' 18,0" W	
Tronc.				
<i>Glandularia</i>	Solis Neffa 2291	Formosa.	26° 04' 04,8" S 58°	BWCF051-14
<i>aristigera</i> (S.			17' 56,4" W	
Moore) Tronc.				

<i>G. peruviana</i> (L.) Small	Solis Neffa 2274	Formosa, Dpto. Laishi.	26° 32' 42,0" S 58° 45' 28,8" W	BWCF039-14
-----------------------------------	------------------	---------------------------	------------------------------------	------------

<i>Lantana megapotamica</i> (Spreng.) Tronc.	Solis Neffa 2303	Formosa.	25° 52' 48,0" S 58° 54' 18,0" W	BWCF059-14
---	------------------	----------	------------------------------------	------------

Violaceae

<i>Pombalia communis</i> (A. St.-Hil.) Paula-Souza	Solis Neffa 2249	Corrientes, Dpto. San Cosme.	27° 26' 52,8" S 58° 38' 42,0" W	BWCF018-14
--	------------------	------------------------------------	------------------------------------	------------

Tabla 2. Sitios variables en las secuencias del gen *rbcL* de 4 especímenes del género *Desmodium*. La primera secuencia es usada como referencia, los guiones indican que las bases son iguales a la de referencia.

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)								
	21	25	54	243	249	315	342	435	477
<i>D. incanum</i>	T	C	A	T	T	G	A	A	T
<i>D. affine</i>	G	G	-	-	-	-	-	T	A
<i>Desmodium sp.</i>	G	.	C	G	C	-	G	C	A
<i>D. cuneatum</i>	G	G	-	-	-	A	-	C	A

Tabla 3. Sitios variables en las secuencias del gen *rbcL* de 3 especímenes del género *Galactia*. La primera secuencia es usada como referencia, los guiones indican que las bases son iguales a la de referencia.

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)
	418
<i>Galactia sp. (IBOLSeijo-101)</i>	G
<i>Galactia sp. (IBOLSeijo-23)</i>	-
<i>G. volubilis</i>	A

Tabla 4. Sitios variables en las secuencias del gen *rbcL* de 4 especímenes del género *Macroptilium*. La primera secuencia es usada como referencia, los guiones indican que las bases son iguales a la de referencia.

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)		
	56	121	286
<i>M. lathyroides</i> (IBOLSeijo-134)	C	A	C
<i>M. lathyroides</i> (IBOLSeijo-3)	-	-	-
<i>Macroptilium</i> sp.	-	-	-
<i>M. psammodes</i>	G	T	A

Tabla 5. Sitios variables en las secuencias del gen *rbcL* de 4 especímenes del género *Senna*. La primera secuencia es usada como referencia, los guiones indican que las bases son iguales a la de referencia.

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)							
	28	121	205	250	256	322	371	378
<i>S. occidentalis</i>	A	T	C	G	T	G	T	T
<i>S. alata</i>	C	G	T	T	C	A	-	-
<i>S. pendula</i> (IBOLSeijo-39)	-	-	-	-	C	-	G	C
<i>S. pendula</i> (IBONE-VGSN-46)	-	-	-	-	C	-	G	C
<i>S. scabriuscula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6. Sitios variables en las secuencias de la región ITS de 4 especies del género *Desmodium*. La primera secuencia es usada como referencia, los guiones indican que las bases son iguales a la de referencia.

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)											
	62	82	96	100	106	109	115	116	123	128	129	131
<i>D. incanum</i>	T	T	T	C	C	C	-	-	A	C	C	-
<i>Desmodium sp.</i>	C	-	C	T	A	T	-	-	-	-	T	A
<i>D. affine</i>	C	C	-	-	-	A	C	C	-	-	-	-
<i>D. cuneatum</i>	C	-	-	-	-	-	-	-	C	G	-	-

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)											
	132	133	134	137	142	147	149	170	172	173	179	181
<i>D. incanum</i>	-	-	-	-	C	G	T	T	G	C	C	T
<i>Desmodium sp.</i>	C	T	A	A	T	-	C	G	A	T	T	C
<i>D. affine</i>	-	-	-	-	T	-	C	-	-	-	T	-
<i>D. cuneatum</i>	-	-	-	-	T	T	-	-	T	A	T	-

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)											
	183	187	199	200	204	205	207	208	209	214	228	258
<i>D. incanum</i>	C	G	G	C	G	C	T	C	T	T	A	T
<i>Desmodium sp.</i>	T	A	-	-	C	T	-	G	A	-	T	-
<i>D. affine</i>	-	-	-	-	C	-	C	G	-	-	-	-
<i>D. cuneatum</i>	-	-	-	-	C	G	-	G	C	C	T	C

Tabla 6 (continuación).

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)										
	260	264	265	267	275	276	281	285	289	308	309
<i>D. incanum</i>	A	C	G	G	G	C	C	G	C	C	-
<i>Desmodium sp.</i>	-	T	C	A	-	-	T	A	-	A	T
<i>D. affine</i>	-	-	-	-	-	-	-	A	T	-	-
<i>D. cuneatum</i>	G	T	-	-	-	-	-	A	T	T	-

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)									
	319	340	342	355	363	368	454	465	466	
<i>D. incanum</i>	C	T	G	C	T	C	C	T	G	
<i>Desmodium sp.</i>	T	-	A	-	C	T	T	C	-	
<i>D. affine</i>	-	-	A	-	-	T	-	-	-	
<i>D. cuneatum</i>	-	G	A	T	-	T	T	-	T	

Tabla 7. Sitios variables en las secuencias de la región ITS de 3 especies del género *Galactia*. La primera secuencia es usada como referencia, los guiones indican que las bases son iguales a la de referencia.

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)									
	101	149	167	168	207	230	306	370	398	454
<i>Galactia sp.</i> (IBOLSeijo-101)	T	T	G	A	C	C	C	G	C	C
<i>Galactia sp.</i> (IBOLSeijo-23)	G	-	T	G	T	T	G	T	T	A
<i>G. volubilis</i>	G	C	T	-	T	T	G	N	T	N

Tabla 8. Sitios variables en las secuencias de la región ITS de 3 especies del género *Macroptilium*. La primera secuencia es usada como referencia, los guiones indican que las bases son iguales a la de referencia.

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)										
	1	15	16	59	96	97	98	120	122	159	229
<i>M. lathyroides</i> (IBOLSeijo-134)	A	T	T	-	C	A	A	-	G	A	A
<i>M. lathyroides</i> (IBOLSeijo-3)	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-
<i>Macroptilium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. psammodes</i>	G	C	C	-	T	C	C	G	T	G	T

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)										
	260	261	262	263	292	297	313	317	320	322	332
<i>M. lathyroides</i> (IBOLSeijo-134)	G	T	T	-	A	T	T	A	T	C	G
<i>M. lathyroides</i> (IBOLSeijo-3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Macroptilium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. psammodes</i>	C	C	A	T	G	C	C	G	C	A	C

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)							
	339	346	347	351	355	363	364	420
<i>M. lathyroides</i> (IBOLSeijo-134)	G	T	C	T	C	G	T	T
<i>M. lathyroides</i> (IBOLSeijo-3)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Macroptilium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-

<i>M. psammodes</i>	A	C	G	C	T	A	C	A
---------------------	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 9. Sitios variables en las secuencias de la región ITS de 2 especímenes del género *Prosopis*. La primera fila indica las posiciones de las bases en la secuencia alineada.

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)				
	207	229	338	361	366
<i>Prosopis affinis</i>	T	A	N	N	N
<i>Prosopis sp.</i>	C	G	G	C	G

Tabla 10. Sitios variables en las secuencias de la región ITS de 5 especímenes del género *Senna*. La primera fila indica las posiciones de las bases en la secuencia alineada, los guiones indican que las bases son iguales a la de referencia.

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)										
	56	96	104	117	123	124	126	146	147	148	155
<i>S. occidentalis</i>	C	T	G	C	A	C	T	A	T	G	C
<i>S. alata</i>	T	-	-	A	C	T	.	C	A	A	G
<i>S. pendula</i> (IBOLSeijo-39)	-	C	-	-	-	-	C	-	G	-	-
<i>S. pendula</i> (IBONE-VGSN-46)	-	C	-	-	-	-	C	-	G	-	-
<i>S. scabriuscula</i>	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 10 (continuación).

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)										
	156	159	161	183	206	207	212	214	221	222	224
<i>S. occidentalis</i>	G	C	A	T	A	T	C	T	T	T	-
<i>S. alata</i>	C	T	.	C	T	.	T	C	C	C	-
<i>S. pendula</i> (IBOLSeijo-39)	.	.	G	.	.	C	.	C	.	.	-
<i>S. pendula</i> (IBONE-VGSN-46)	.	.	G	.	.	C	.	C	.	.	-
<i>S. scabriuscula</i>	-

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)										
	228	229	230	263	270	275	295	306	307	308	309
<i>S. occidentalis</i>	A	A	G	G	G	C	A	G	C	T	A
<i>S. alata</i>	T	T	A	A	A	T	T	A	G	A	C
<i>S. pendula</i> (IBOLSeijo-39)	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	T
<i>S. pendula</i> (IBONE-VGSN-46)	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	T
<i>S. scabriuscula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Género y especie	Posición dentro de la secuencia (pb)										
	335	340	358	359	360	367	368	373	410	416	419
<i>S. occidentalis</i>	A	A	G	-	C	T	C	T	G	G	G
<i>S. alata</i>	G	C	-	-	T	C	A	A	-	A	T
<i>S. pendula</i> (IBOLSeijo-39)	-	-	C	-	A	-	-	-	T	-	-
<i>S. pendula</i> (IBONE-VGSN-46)	-	-	C	-	A	-	-	-	T	-	-
<i>S. scabriuscula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 10 (continuación).

<i>Género y especie</i>	<i>Posición dentro de la secuencia (pb)</i>		
	458	459	496
<i>S. occidentalis</i>	T	C	T
<i>S. alata</i>	G	T	C
<i>S. pendula</i> (IBOLSeijo-39)	-	-	-
<i>S. pendula</i> (IBONE-VGSN-46)	-	-	-
<i>S. scabriuscula</i>	-	-	-

EVALUACIÓN DEL DIRECTOR Y CODIRECTOR DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

El alumno Matías Ezequiel Baldi, llevó a cabo todas las tareas propuestas en el plan de trabajo presentado oportunamente.

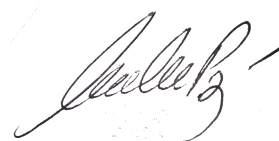
El alumno ha dado muestras de responsabilidad, iniciativa y perseverancia en sus trabajos. Además, posee las cualidades necesarias para integrar un equipo de trabajo y llevar a cabo tareas en colaboración.

Los resultados que ha obtenido en este TFG fueron presentados en el XLVIII Congreso Argentino de Genética (2020).

Por los motivos antes expuestos, consideramos que el desempeño del alumno Matías Ezequiel Baldi ha sido muy satisfactorio.



Dra. Viviana G. Solís Neffa
(Directora)



Dra. María Laura Perez
(co-directora)