



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la diversidad de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown, en la región suroccidental de Colombia.

Gisela Mabel Paz Perafán MSc.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Valle, Colombia
2019

Evaluación de la diversidad de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown, región suroccidental de Colombia.

Gisela Mabel Paz Perafán MSc.

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Doctor en Ciencias Agrarias

Directores:

Ph.D. Jaime Eduardo Muñoz Flórez

Ph.D Ricardo Benítez Benítez

DCs. Agp. Amanda Ortiz Escobar

Línea de Investigación: Mejoramiento genético

Grupos de Investigación: Diversidad Biológica

Química de productos naturales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Palmira, Colombia

2019

Dedicatoria

Primero Dios, y mis ángeles del cielo que me fortalecen, A mis padres, quienes entregaron parte de sus vidas en mi formación. A mi preciosa hija Sofía, quien me acompañó en esta aventura y de quien aprendí de su espontaneidad y la alegría de la vida, A mi hijo Luis Eduardo, a quien llevo en mi corazón, A mi hermana Jaqueline, por su permanente apoyo. A todos y cada uno de mis familiares y amigos quienes de una u otra manera hicieron que este proyecto fuera una realidad.

Agradecimientos

- Universidad del Cauca. Por la comisión, para emprender este proyecto de vida.
- Colciencias Colfuturo. Por su apoyo económico.
- MSc. Manuel Salvador q.e.p.d, a quien recuerdo por su apoyo incondicional.
- PhD. Jaime Eduardo Muñoz. Director de Tesis
- Amanda Ortiz. Directora de Tesis.
- Ricardo Benitez. Director de Tesis
- PhD. Mario García Dávila. Profesor de la Universidad Nacional de Colombia, por su colaboración en el análisis de los datos.
- MSc. Paula Andrea Rugeles. por su apoyo logístico en el laboratorio de Biología Molecular, Universidad Nacional de Colombia.
- Marzory Andrade Bernal, Laboratorio de Biometria, Universidad Nacional de Colombia, por su colaboración en la organización del documento y corrida de algunos programas SAS.
- MSc. Jorge Mario Londoño, por su cooperación en el aislamiento de ADN.
- PhD. Andres Posso Terranova. Profesor de la Universidad de Saskatchewan, Canadá, por su colaboración en el análisis de datos genómicos y revisión del documento.
- PhD. Jonh Bi-Fu. Científico investigador de Recursos Genéticos de plantas de Canadá, (Plant Gene Resources of Canada, Agriculture and Agri-Food Canada / Government of Canada), por su enseñanza en el análisis de los datos genómicos.
- MSc. Armando Zapata Valencia, director de CEUNP. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, por su colaboración en la logística para la siembra y mantenimiento de plantas en campo.
- Laboratorio de Microscopia electrónica de la Universidad Nacional. Por el préstamo de los equipos.
- Laboratorio de Microscopia electrónica de la Universidad del Cauca. Por el préstamo de los equipos.

Resumen

Lippia alba, conocida comúnmente como prontoalivio, es una planta medicinal ampliamente utilizada por pobladores locales para el tratamiento de varias enfermedades; de gran proyección para la industria farmacéutica, Se presentan los estudios de su diversidad morfológica, química y genética en los departamentos del Choco, Valle del Cauca, Cauca, Nariño, Putumayo, Amazonas, así como en Costa Rica y Ecuador.

Se analizó la diversidad de 43 introducciones de *L. alba* mediante varios caracteres morfológicos; el análisis de los componentes químicos mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), y se estimó la diversidad y estructura genética por medio de Genotipificación por Secuenciación (GBS). El valor promedio de altura fue de 102.78 cm; el promedio del largo foliar fue de 2.5 cm, el ancho foliar de 1.3 cm, el área foliar de 2.5 cm². En el estudio anatómico con microscopio de alta resolución, se encontraron 366 tricomas no glandulares y 51 tricomas glandulares. Los resultados del análisis por CG-MS reportaron 141 compuestos, con mayor presencia del Quimiotipo carvona – Linalool en todas las introducciones. Se presentan dos diferentes Quimiotipos aún no reportados para Colombia y Costa Rica.

Se presenta el primer set de 37.917 marcadores de polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) para esta especie. La diversidad genética dentro de las poblaciones fue de 93.35% con índice de diferenciación $F_{st}=0.06648$. El análisis Bayesiano identificó cuatro grupos de introducciones separando claramente las poblaciones de Amazonas y Ecuador, y el análisis de coordenadas principales (ACoP), al igual que el Neighbor-Joining fueron consistentes.

Palabras clave: Diversidad morfológica, Análisis CG-MS, Diversidad genética, SNPs.

Abstract

Lippia alba, commonly known as prontoalivio, is a medicinal plant widely used by local people for the treatment of various diseases; of great projection for the pharmaceutical industry. Studies of its morphological, chemical and genetic diversity are presented in the departments of Choco, Valle del Cauca, Cauca, Nariño, Putumayo, Amazonas, as well as in Costa Rica and Ecuador.

The diversity of 43 introductions of *L. alba* was analyzed by several morphological characters; the analysis of the chemical components by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-MS), and the genetic structure and diversity were estimated by means of Genotyping by Sequencing (GBS). The average value of height was 102.78 cm; the average leaf length was 2.5 cm, the leaf width 1.3 cm, the leaf area 2.5 cm². In the anatomic study with a high resolution microscope, 366 non-glandular trichomes and 51 glandular trichomes were found. The results of the analysis by CG-MS reported 141 compounds, with a greater presence of the carvone-Linalool chemotype in all the introductions. Two different chemotypes not yet reported for Colombia and Costa Rica are presented.

The first set of 37,917 single nucleotide polymorphism (SNP) markers for this species is presented. The genetic diversity within the populations was 93.35% with differentiation index $F_{st} = 0.06648$. The Bayesian analysis identified four groups of introductions clearly separating the populations of Amazonas and Ecuador, and the analysis of principal coordinates (ACoP), as well as the Neighbor-Joining were consistent.

Keywords: Morphological diversity, CG-MS analysis, genetic diversity, SNPs,

Contenido

	Pág.
1. Capítulo 1. Estado del arte de <i>L. alba</i>	23
1.1 Clasificación taxonómica de la especie y distribución	23
1.2 Morfología de <i>Lippia alba</i>	24
1.4 Genotipificación de plantas medicinales	33
1.5 Bibliografía	35
2. Capítulo 2. Determinantes morfológicos e histológicos en ocho introducciones de <i>L. alba</i> provenientes de seis departamentos Colombianos, Ecuador y Costa Rica.	47
2.1 Resumen	47
2.2 Summary	48
2.3 Introducción	49
2.4 Material y método	50
2.4.1 Área de estudio	50
2.4.2 Material	50
2.4.3 Metodología.....	51
2.5 Resultados.....	54
2.5.1. Material vegetal	54
2.5.2. Análisis morfométricos.....	54
2.5.3 Análisis anatómico	70
2.6 Discusión	74
2.7 Bibliografía	76
3. Capítulo 3. Caracterización química de ocho introducciones de <i>L. alba</i>, provenientes de seis departamentos Colombianos y Costa Rica.....	89
3.1 Resumen	89
3.2 Summary	90
3.3 Introducción	91
3.4 Material y método	92
3.4.1 Área de estudio	92
3.4.2 Material	92
3.4.3 Metodología.....	93

3.5 Resultados	96
3.6 Discusión	100
4. Capítulo 4. Caracterización genética de <i>L. alba</i> de la zona pacífica, Putumayo, Ecuador, Costa Rica y Leticia mediante la técnica de GBS	117
4.1 Resumen	117
4.2 Summary	118
4.3 Introducción	118
4.4 Material y método	120
4.4.1 Área de estudio	120
4.4.2 Material vegetal y extracción de ADN.....	121
4.4.3 Genotipificación por secuenciación.....	124
4.5 Resultados	133
4.5.1 Cantidad y Calidad de las lecturas	133
4.5.2 Análisis bioinformático.....	134
4.5.3 Análisis de diversidad genética	134
4.6 Discusión	141
4.7. Bibliografía	144
5. Discusión general	157
5.1 Conclusiones Generales	157
5.1.1 Conclusiones capítulo 1	164
5.1.2 Conclusiones capítulo 2	164
5.1.3 Conclusiones capítulo 3	164
5.2 Recomendaciones	165

Lista de figuras

	<i>pág.</i>
Figura 1-1. Distribución de quimiotipos de <i>L. alba</i> en América (Dellacassa, 2010).....	29
Figura 2-1. a). Plántula de <i>L. alba</i> , localidad Costa Rica b). Siembra de <i>L. alba</i> en CEUNP. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.	52
Figura 2-2. Hojas de diferentes plantas o introducciones donde se evidencian los cambios morfológicos del limbo foliar de acuerdo a la localidad: a). Costa Rica; b). Nariño; c). Palmira-Valle; d). Cauca; e). Amazonas.....	56
Figura 2-3. Resultado del Análisis de Componentes principales (ACP) en 43 individuos de diferentes poblaciones de Colombia, Costa Rica y Ecuador, con las variables: altura de la planta, largo foliar, ancho foliar, área foliar, longitud del peciolo y número de dientes.....	57
Figura 2-4. Diagrama de dispersión de las variables área foliar y relación largo/ancho para diferentes introducciones de <i>L. alba</i>	63
Figura 2-5. Formas de crecimiento de <i>L. alba</i> . Los puntos de color azul, representan la introducción de Amazonas (A1), puntos de color amarillo representan la introducción de Cauca, y puntos de color rojo representa la introducción de Nariño (N1).	67
Figura 2-6. Modelos de crecimiento de introducciones de <i>L. alba</i> . Los puntos de color azul, representan la introducción de Amazonas (A1), puntos de color amarillo representan la introducción de Cauca, y puntos de color rojo representa la introducción de Nariño (N1).	69
Figura 2-7. Modelos de las velocidades de crecimiento en introducciones de <i>L. alba</i> . Los puntos de color azul, representan la introducción de Amazonas (A1), puntos de color amarillo representan la introducción de Cauca, y puntos de color rojo representa la introducción de Nariño (N1).....	69
Figura 2-8. Diferentes tricomas presentes en <i>L. alba</i> . a). TIPO I de 3 células presente en la introducción de Chocó, aumento 100x, b). TIPO II de 4 células o más, presente en la introducción de Ecuador, aumento 100x, c). TIPO III, de dos células, presente en la introducción de Ecuador, aumento 100x, y d). TIPO IV como tricomas glandulares, presente en la introducción de Ecuador, de cabeza globosa, aumento 100x.....	71
Figura 2-9. Dendrograma de relación entre genotipos de <i>Lippia alba</i> y los diferentes tipos de tricomas.....	72
Figura 2-10. Fotos en MEB, de tricomas glandulares y no glandulares en diferentes introducciones de <i>L. alba</i> . 1. Tricomas no glandulares de Nariño; 2. Tricomas no glandulares de Costa Rica; 3. Tricoma glandular de Costa Rica con cabeza bicelular globosa; 4. Tricomas glandulares de Chocó, de cabeza unicelular globosa.	73
Figura 2-11. Foto en MEB del mesófilo dorsiventral en <i>L. alba</i> , epidermis uniestructurada, y parénquima empalizada uniseriada, en la introducción del Valle.	73
Figura 3-1. Equipo tipo Arrastre con vapor, para la extracción de los aceites esenciales de <i>L. alba</i> . Extractor en acero inoxidable a presión (a), condensador de doble tubo (b) y aceite con agua floral (c).....	95

Figura 3-2. Resultado del Análisis de Componentes Principales (ACP), para 142 compuestos en las introducciones de Chocó, Cauca, Palmira, Nariño, Putumayo, Amazonas, Costa Rica y Valle. (a) Vista del agrupamiento general, (b) análisis sin tener en cuenta los quimiotipos más distantes (CR y V).	99
Figura 3-3. Análisis de UPGMA, de las relaciones entre los 142 compuestos presentes en <i>L. alba</i> . Los nombres de las introducciones están representados como: Cauca (CAU), Palmira (PAL), Nariño (N1), Putumayo (PT1), Chocó (CH3), Amazonas (A5), Costa Rica (CR) y Candelaria-Valle (V).....	100
Figura 4-1. Mapa de los lugares de procedencia de <i>L. alba</i> . La población total está representada por 10 introducciones del Cauca, 10 de Leticia-Amazonas, 3 de Chocó, 5 de Putumayo, 4 de Nariño, 2 del Valle, 1 de Costa Rica y 8 de Ecuador-Loja.	122
Figura 4-2. Adaptadores para GBS, PCR e iniciadores (primers) de secuenciación. (a). Secuencias del adaptador de código de barras “barcode adapter” de doble banda y secuencia del adaptador común “common adapter”. Las posiciones de la secuencia “barcode” y ApeKI se muestran cercanas al inserto de ADN; (b). Secuencias del iniciador PCR 1 (PCR primer 1) que contiene una secuencia complementaria al “flowcell” y la secuencia complementaria al adaptador de código de barras (strand of barcode adapter). (c). Secuencias del iniciador PCR 2 (PCR primer 2) que contiene una secuencia complementaria a la placa y la secuencia complementaria al adaptador común (Elshire et al., 2011).....	125
Figura 4-3. Código de barras combinatorios para GBS.	126
Figura 4-4. Ejemplo de una librería con doble lectura (paired end) y resultado de las secuencias. Cada una de las lecturas empieza con un “barcode”, seguido por el sitio de corte y luego la secuencia del ADN genómico.	126
Figura 4-5. Método de genotipificación por secuenciación GBS (Elshire et al., 2011). .	129
Figura 4-6. Categorías de los tamaños de los fragmentos y las lecturas resultantes....	130
Figura 4-7. Resultados del electroferograma donde se observa el tamaño de los fragmentos originados en la secuenciación de <i>L. alba</i>	133
Figura 4-8. Cuatro agrupamientos genéticos de 43 introducciones de <i>L. alba</i> obtenidas por el análisis de 37.917 SNPs, con el programa STRUCTURE. a. Se presenta el primer análisis con todas las introducciones donde se definen dos grupos. b. Representación del análisis STRUCTURE con el grupo Rojo de a., donde se observa la separación de las introducciones de Ecuador y Amazonas. c. Representación del análisis, con el grupo verde de a. donde se observan los últimos dos agrupamientos con la separación de introducciones del Cauca.....	137
Figura 4-9. Análisis de distancias genéticas, basadas en el estadístico de máxima verosimilitud usando el algoritmo de NJ con 317.917 SNPs, empleando 1000 réplicas bootstrap. Cada introducción es numerada después de cada símbolo marcado en diferentes colores diferenciando las poblaciones. La escala indicada en la parte inferior izquierda, representa el número de SNP diferentes acumulados.	138
Figura 4-10. Relaciones genéticas de las 43 introducciones revelada por el Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) con 37.917 marcadores SNPs. Los diagramas muestran la relación de las dos primeras coordenadas principales; en a.) las introducciones se encuentran marcadas con los colores de los agrupamientos formados por STRUCTURE y en b) y c) se muestra las introducciones por población.....	139
Figura 5-1. Relación entre los quimiotipos de <i>L. alba</i> y la diversidad genética mediante el análisis de Neighbor-Joining y las inferencias Bayesianas de STRUCTURE.....	160
Figura 5-2. Relación genética entre la forma de las hojas de las diferentes introducciones de <i>L. alba</i> y el análisis de NJ. El grupo de Ecuador (E) y Amazonas (A) se diferencian claramente, y un grupo mayor de introducciones, representado por Cauca (CAU), Chocó	

(CH), Valle (V), Putumayo (Pt), formaron un grupo que representan a las hojas con mayor relación L/A. 163

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Descripción y aparición de seis tipos de tricomas glandulares en los morfotipos de Melissa y Cidreira en <i>L. alba</i> (Jezler et al., 2013).	25
Tabla 1-2. Regiones de América, con diferentes quimiotipos de <i>L. alba</i> (Dellacassa, 2010).	28
Tabla 1-3. Quimiotipos encontrados en Colombia (Durán G. et al., 2007)	29
Tabla 1-4. Constituyentes de aceites esenciales en diferentes regiones de Colombia (Durán G. et al., 2007).	30
Tabla 1-5. Tipos de compuestos de uso farmacológico extraído de aceites esenciales en <i>L. alba</i> (Cuadro de resumen elaborado por la autora).	33
Tabla 2-1. Ubicación del lugar de colecta, número de introducciones por lugar, coordenadas, altura, temperatura promedio usos y nombres comunes de las introducciones de <i>L. alba</i> para el presente estudio.	55
Tabla 2-2. Valores promedio, desviación estándar y valores mínimos y máximos de las diferentes mediciones realizadas en las 43 diferentes introducciones de <i>L. alba</i>	58
Tabla 2-3. Valores de cuadrados medios del análisis ANOVA para las variables: Área foliar (cm ²), Longitud del pecíolo (cm), número de dientes, largo foliar (cm) y ancho foliar (cm).	58
Tabla 2-4. Relación entre el área foliar y las introducciones de <i>L. alba</i> (Valor de la media en cm ²).	59
Tabla 2-5. Relación entre la longitud del pecíolo y las introducciones de <i>L. alba</i> (valor de la media en cm).	60
Tabla 2-6. Relación entre el número de dientes de la hoja y el origen de cada una de las introducciones de <i>L. alba</i>	60
Tabla 2-7. Relación entre el largo de las hojas y las introducciones de <i>L. alba</i> (Valor de la media en cm).	61
Tabla 2-8. Relación entre el ancho de las hojas y las introducciones de <i>L. alba</i> (Valor de la media en cm).	61
Tabla 2-9. Correlación entre los valores medios de las variables morfológicas de las hojas de <i>L. alba</i>	62
Tabla 2-10. Modelos de regresión del área foliar, para introducciones de <i>L. alba</i> . AF= Área foliar, LA= largo x ancho.	64
Tabla 2-11. Resultados del análisis de varianza de la variable altura. a.) Agrupamiento de Duncan, en cada introducción de <i>L. alba</i> . b.) Resultado del análisis ANOVA.....	65
Tabla 2-12. Modelos de crecimiento de mejor ajuste y velocidad de crecimiento para introducciones de <i>L. alba</i> con valores de R ²	68
Tabla 2-13. Relación de valores χ^2 calculados y tabulados para las variables: introducción y localidad.....	71
Tabla 3-1. Lista de Introducciones de <i>L. alba</i> utilizadas en el estudio, coordenadas geográficas, usos, altura, temperatura promedio y otros nombres comunes.....	93

Tabla 3-2. Volumen de aceite final obtenido en la extracción, rendimiento y número de compuestos químicos obtenidos después del análisis por GC-MS en cada una de las introducciones de <i>L. alba</i>	97
Tabla 3-3. Compuestos más abundantes para cada una de las introducciones de <i>L. alba</i> . Chocó (CH3), Candelaria-Valle (V), Cauca (CAU), Palmira (PAL), Nariño (N1), Putumayo (PT1), Amazonas (A5), Costa Rica (CR).	98
Tabla 3-4. Introducciones de <i>L. alba</i> en estudio y su relación con los quimiotipos reportados para Colombia y América. Se presentan los Quimiotipos propuestos para Colombia con los tres constituyentes mayores (A,D,F: Quimiotipos A,D y F; QT3: Quimiotipo 3; QT1: Quimiotipo 1).....	102
Tabla 4-1. Número de introducciones, localidad, nombre y origen de las plantas seleccionadas de <i>L. alba</i>	122
Tabla 4-2. Resumen de la información general de SNP antes y después de la eliminación de la muestra repetida (J5) utilizando el programa TASSEL 5.....	134
Tabla 4-3. Resultados de los valores óptimos de K de acuerdo a Evanno y col., 2005., para las 43 introducciones de <i>L. alba</i> . a. Primer análisis Bayesiano, con todas las introducciones b. Segundo análisis con 20 individuos c. Tercer análisis con 23 individuos previamente seleccionados por el programa STRUCTURE.....	135
Tabla 4-4. Resultados del análisis de varianza molecular para las poblaciones de <i>L. alba</i> basado en 37.917 SNPs.....	139