

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Hibridación interespecífica, intraespecífica e intergenérica de plantas *Lippia origanoides* Kunth, *L. alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton y P. Wilson y *Lantana canescens* Kunth, bajo condiciones ambientales controladas.

Ariadna Silva Morales

Trabajo de grado para optar al título de Bióloga

Directora

Elena E. Stashenko

Doctora en Química

Codirector

Cristian Andrés Oliveros

Magíster en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

Bucaramanga

2024

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Dedicatoria

“A mis Nonitas.

A Martha, por enseñarme a ser una mujer fuerte, valiente y tenaz, por ser luz y mi lugar seguro siempre. A Elisa, porque corres por mis venas y no te puedo abrazar”

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Agradecimientos

A Julis, porque te ríes y mi mundo se vuelve importante.

A mis padres y a toda mi familia, por ser ese apoyo incondicional y mi motivación para ser una gran profesional.

A mi nono Luis, porque me hiciste el fruto de tu actuar.

A Juan David, por enseñarme que una verdadera amistad no se trata de ser inseparables, sino de honestidad, lealtad, escucha y amor YTA.

A Dania, Cristhian, Natalia, Juliana, Nathaniel, Camila y José, por hacerme amar la carrera porque compartir con ustedes salidas de campo, laboratorios y clases, me llenó el corazón de recuerdos imborrables.

A mis PetroAmigos, por hacerme mis días en la universidad más felices, quererme tal cual soy, apoyarme y ayudarme en todos los aspectos de mi vida.

A Sebas, Cris y Erika, por una valiosa amistad, por darme seguridad y sostenerme en muchos momentos. Porque siempre agradeceré la suerte de encontrarlos.

A Vane, que me muestra cada día como es posible convertirse en una mujer fuerte, inteligente y brillante.

A Lupe, por enseñarme que el amor incondicional existe y se expresa de muchas formas.

A mis profesores de la escuela de Biología, por las enseñanzas recibidas en esta disciplina.

Al CENIVAM, por permitirme hacer parte de su equipo de trabajo y al proyecto interno VIE Grant N° 3736, VIE-UIS.

A Elena Stashenko, por ser un modelo para seguir, para mí y muchas mujeres en la ciencia.

A Cristian Oliveros, por sus enseñanzas, apoyo y confianza a lo largo de este proceso.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Tabla de Contenido

Introducción	11
1. Objetivos	16
1.1. Objetivo general.....	16
1.1. Objetivos específicos.....	16
2. Competencias	17
3. Cuerpo de Trabajo	18
3.1. Métodos.....	18
3.1.1. Material vegetal.....	18
3.1.2. Caracterización morfológica de plantas parentales.....	18
3.1.3. Polinización manual para hibridación interespecífica, intraespecífica e intergenérica de las especies <i>Lippia origanoides</i> , <i>L. alba</i> y <i>Lantana canescens</i>	19
3.1.4. Extracción por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida de hojas de los parentales.....	19
3.1.5. Análisis de datos por GC/MS.....	20
3.1.6. Viabilidad y caracterización morfológica de híbridos.....	21
3.2. Resultados.....	21
3.2.1. Caracterización morfológica de plantas parentales.....	21
3.2.2. Polinización manual para hibridación interespecífica, intraespecífica e intergenérica de las especies <i>Lippia origanoides</i> , <i>L. alba</i> y <i>Lantana canescens</i>	28
3.2.3. Extracción por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida de hojas de los parentales.....	30

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

3.2.4. Análisis de datos por GC/MS/FID de los Parentales.....	30
3.2.5. Caracterización morfológica de plantas híbridas.....	33
3.2.6. Extracción por dispersión de matriz en fase sólida de hojas de plantas híbridas.....	38
3.2.7. Análisis de datos por GC/MS/FID de los híbridos.....	38
3.3. Discusión.....	41
4. Conclusiones.....	44
5. Recomendaciones.....	45
Referencias Bibliográficas.....	45

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Lista de Tablas

Tabla 1. Seguimiento del proceso de hibridación	28
Tabla 2. Identificación por GC/MS de compuestos mayoritarios en los extractos MSPD, obtenidas de hojas de plantas parentales estudiadas.....	33
Tabla 3. Identificación por GC/MS de compuestos mayoritarios de los extractos MSPD, obtenidos de hojas de plantas híbridas estudiadas.....	40

Lista de Figuras

Figura 1. Caracterización morfológica parental de <i>Lantana canescens</i> Kunth.....	23
Figura 2. Caracterización morfológica parental de <i>Lippia origanoides</i> Kunth quimiotipo Timol.	25
Figura 3. Caracterización morfológica parental de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton y P. Wilson quimiotipo Citral.....	27
Figura 4. Tipos de sustratos para la siembra de semillas híbridas.....	29
Figura 5. Montaje de dilución hojas de <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo Timol.....	30
Figura 6. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de los extractos MSPD de hojas de <i>Lippia alba</i> quimiotipo Citral.....	31
Figura 7. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de los extractos MSPD de hojas de <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo Timol.....	32
Figura 8. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los extractos MSPD de hojas de <i>Lantana canescens</i>	32
Figura 9. Caracterización morfológica del híbrido de <i>Lantana canescens</i> x <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo Timol.....	35
Figura 10. Caracterización morfológica del híbrido de <i>Lippia alba</i> quimiotipo Citral x <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo Timol.....	37
Figura 11. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de los extractos MSPD obtenidos de hojas de <i>Lippia alba</i> x <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo Timol.....	38
Figura 12. Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de los extractos MSPD obtenidos de hojas <i>Lantana canescens</i> x <i>Lippia origanoides</i> quimiotipo Timol.....	39

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Lista de Apéndices

Apéndice A. Base de datos de análisis cromatográfico.

Los apéndices están adjuntos y se pueden visualizar en la base de datos de la biblioteca UIS.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Resumen

Título: Hibridación interespecífica, intraespecífica e intergenérica de plantas de *Lippia origanoides* Kunth, *alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton y P. Wilson y *Lantana canescens* Kunth, bajo condiciones ambientales controladas*

Autor: Ariadna Silva Morales**

Palabras Clave: cromatografía de gases, extracción, hibridación, polinización, Verbenaceae.

Descripción: La humanidad durante su proceso evolutivo y construcción de civilizaciones ha vivido en función de las plantas para la obtención de recursos, como es el caso de las plantas de los géneros *Lippia* y *Lantana*, que presentan un valor económico potencial, gracias a sus metabolitos secundarios. En el presente estudio se realizó hibridación entre las especies *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Lantana canescens*, se caracterizaron morfológicamente tanto sus plantas parentales como sus híbridos y se extrajeron por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) los metabolitos secundarios, que se analizaron por cromatografía de gases GC acoplada a detector selectivo de masas (MS) y detector de ionización en llama (FID), GC/MS/FID. Se encontraron similitudes y diferencias morfológicas como tamaño, forma y posición de flores, hojas, inflorescencias y fruto. Los metabolitos secundarios fueron los siguientes, del híbrido interespecífico: óxido de piperitenona, *trans*- β -cariofileno, germacreno D, limoneno, β -elemeno, mientras que en el híbrido intergenérico: *trans*- β -cariofileno, γ -sitosterol, germacreno D, γ -terpineno, biciclogermacreno, α -humuleno, limoneno, entre otros. Se logró confirmar la viabilidad de llevar a cabo la polinización manual y de crear híbridos entre diferentes especies de la familia Verbenaceae, cuyos aceites esenciales o extractos (ingredientes naturales) pueden ser de interés en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica, gracias a sus diversas actividades biológicas.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Biología. Director: Elena E. Stashenko. Química, Ph.D. Co-director: Cristian Andrés Oliveros. Químico M. Sc.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Abstract

Title: Interspecific, intraspecific and intergeneric hybridization of *Lippia origanoides* plants Kunth, *alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton and P. Wilson and *Lantana canescens* Kunth, under controlled environmental conditions*

Author: Ariadna Silva Morales**

Keywords: extraction, gas chromatography, hybridization, pollination, Verbenaceae.

Description: Humanity during its evolutionary process and construction of civilizations has lived based on plants to obtain resources, as is the case of the plants of the *Lippia* and *Lantana* genera, which have a potential economic value, thanks to their metabolites secondary. In the present study, hybridization was carried out between the species *Lippia alba*, *Lippia origanoides* and *Lantana canescens*, both their parental plants and their hybrids were morphologically characterized, and the secondary metabolites were extracted by solid phase matrix dispersion (MSPD), which were analyzed by gas chromatography GC coupled to mass selective detector (MS) and flame ionization detector (FID), GC/MS/FID. Morphological similarities and differences were found such as size, shape and position of flowers, leaves, inflorescences and fruits. The secondary metabolites were the following, from the interspecific hybrid: piperitenone oxide, trans- β -caryophyllene, germacrene D, limonene, β -elemene, while in the intergeneric hybrid: γ -sitosterol, trans- β -caryophyllene, germacrene D, γ -terpinene, bicyclogermacrene, α -humulene, limonene, among others. It was possible to confirm the viability of carrying out manual pollination and creating hybrids among different species of the Verbenaceae family, whose essential oils or extracts (natural ingredients) may be of interest in the cosmetic, food and pharmaceutical industries, thanks to their diverse biological activities.

* Degree Work

**Faculty of Sciences. Biology School. Biology. Director: Elena E. Stashenko. Ph.D. in chemistry Co-director: Cristian Andrés Oliveros. M. Sc in chemistry.

Introducción

La humanidad, durante su proceso evolutivo y construcción de civilizaciones, ha vivido y desarrollado en función de las plantas para obtener diferentes recursos, lo que ha permitido, de una u otra forma, mejorar las condiciones de vida. Los beneficios que se han adquirido de las plantas son energía y oxígeno, alimentación, fibras, tintes, textiles, medicinas, aceites, entre otros (Kumar, 2018; Ghorbanpour et al., 2017; van der Veen, 2014). La necesidad de mejorar y optimizar los recursos obtenidos de las plantas no es algo nuevo, se ha tenido desde las épocas más antiguas. Según la evidencia arqueológica, en Babilonia se practicaba la polinización artificial de palmas datileras (Salomón-Torres et al., 2021); en Mesoamérica, se mejoraba el maíz por métodos de selección (García-Lara y Serna-Saldivar, 2019).

La polinización es el proceso, cuando el material genético se transfiere desde las anteras a los estigmas, por medio del polen. En plantas con autopolinización, la transmisión ocurre en flores del mismo individuo, caso contrario sucede en las plantas con polinización cruzada, las flores de los individuos diferentes son las que conjugan el material genético (Barrett, 2010). El transporte del polen está mediado por polinizadores animales como insectos, aves, murciélagos; y vectores abióticos como el viento y agua (Albrecht et al., 2012; Cox, 1991).

La hibridación ha estado presente en el proceso evolutivo de las plantas, se ha identificado introgresión de genes que ha permitido la radiación adaptativa y especiación (Taylor y Larson, 2019; Abbott et al., 2013). La diversificación de especies ha sido el resultado más importante. Los rasgos adaptativos, que se han transmitido entre las plantas, les han brindado la capacidad de prosperar en nuevos ecosistemas y aumentar las posibilidades de su reproducción (Hovick y Whitney, 2014). En esta era antropocéntrica, existe una creciente conciencia sobre las ventajas del potencial de la hibridación como una herramienta valiosa para mejorar, aumentar o

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

reducir características específicas de interés, como es el caso de los fitomejoradores (Cooper et al., 2021).

sin embargo, no todas las plantas tienen la misma probabilidad para hibridar. Los análisis moleculares y revisiones literarias han informado sobre la capacidad que tienen algunos clados filogenéticos para la transmisión de genes y, a su vez, que estos sean funcionales y permitan las ventajas de selección (Mitchell et al., 2019). Con el surgimiento de la secuenciación de nueva generación y el aumento de la capacidad de caracterización de genomas, se ha podido evidenciar la hibridación entre plantas filogenéticamente distantes, aspecto que anteriormente no se tenía registro, dado que las morfologías en algunos casos son similares entre las plantas parentales y filiales y, en otras ocasiones, los híbridos son muy diferentes morfológicamente a sus antecesores (Payseur y Rieseberg, 2016; Mitchell y Holsinger, 2018).

La polinización cruzada es el principal fundamento para el éxito de la hibridación, ya que permite el intercambio de genoma entre individuos diferentes, y puede propiciar un mejoramiento en las capacidades de la planta resultante en cuanto a la adaptación, posibilidades de reproducción, aumento en las cantidades de semillas, frutos e incremento en la cantidad total de biomasa, factor importante en plantas usadas para la extracción de componentes bioquímicos útiles como es el caso de la caña de azúcar (Shukla et al., 2020; Kempe y Gils, 2011). En este sentido, la investigación científica intensifica sus esfuerzos para lograr conseguir mejores cultivares por medio de la hibridación en plantas de interés económico para obtener diferenciales en algunos de estos rasgos y generar un aumento en las tasas de ganancia (Kutka, 2011).

Las plantas aromáticas, medicinales y condimentarias (PAMC) se han utilizado desde hace 60.000 años aproximadamente (Kiani et al., 2016). Son reconocidas como un recurso importante a nivel mundial, dado que contribuyen al desarrollo de la economía desde la etapa de

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

cultivo y postcosecha en el sector agrícola hasta su procesamiento a productos industriales y la comercialización (Tofiño, 2017). Entre las PAMC se encuentran las plantas de la familia Verbenaceae, que está compuesta por dos grandes grupos en los cuales se encuentran la mayoría de las especies, el complejo *Verbena/Glandularia/Junellia* con aproximadamente 170 especies y el complejo *Lantana/Lippia/Aloysia* compuestos por 200-400 especies, y otros más pequeños como *Citharexylum* y *Starchytarpheta* con más de 50 especies y más de 20 géneros restantes con menos de 20 especies cada uno (Paternina, 2018).

Los géneros *Lippia* y *Lantana* (Verbenaceae), nativos de América Central y del Sur y de África tropical, poseen muchas especies medicinales importantes con un valor económico potencial (Silva et al., 2010). El género *Lippia* atrae la atención de los investigadores, por la variedad de las especies que posee diferentes quimiotipos y muchos usos en medicina y culinaria. Los aceites esenciales de plantas del género *Lippia* poseen propiedades organolépticas atractivas y actividades biológicas, e.g, antifúngicas y antibacterianas, lo que, las convierten en buenos candidatos como ingredientes naturales en productos cosméticos y de aseo personal (Stashenko et al., 2014).

Cabe destacar que *Lantana canescens* es una especie altamente tolerante a la sequía, su decocción o infusión se utiliza como analgésico y está demostrada su actividad biológica como antioxidante y antiinflamatorio (Sena et al., 2010). La mayoría de las aplicaciones de las plantas aromáticas y, particularmente, de sus aceites esenciales, están relacionadas con la presencia de determinadas sustancias biológicamente activas (metabolitos secundarios), por lo que su identificación y cuantificación es un requisito fundamental para utilizarlos adecuadamente para sus diversas aplicaciones: terapéuticas, agroalimentarias, fitosanitarias, entre otras (Llorens-Molina, 2021).

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Para el aislamiento de los metabolitos secundarios se utilizan diferentes métodos de extracción, entre los cuales figuran, microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), hidrodestilación, destilación por arrastre de vapor, dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés). Este último, es un procedimiento de preparación de muestra sencillo, económico y relativamente rápido, que implica la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras sólidas y semisólidas debido a la mezcla mecánica directa de la muestra con un sorbente, principalmente, gel de sílice modificada C₁₈ (Dawidowicz et al., 2011; Barker, 2007). La MSPD permite unir varios pasos en la preparación de la muestra (Karasová et al., 2003), requiere una cantidad de muestra pequeña (0,5 a 1 g), poca cantidad de sorbente y bajo consumo de solvente (10 a 25 mL), este último refleja un bajo impacto ambiental y económico (Ettiene et al., 2013).

La cromatografía es la técnica empleada en el análisis de los metabolitos secundarios. La cromatografía de gases (GC) permite la separación, cuantificación e identificación de compuestos volátiles y semi-volátiles, los cuales fluyen en una corriente gaseosa sobre o a través de una fase estacionaria fijada en el interior de un capilar largo y fino, la cual puede ser un sólido adsorbente de empaquetamiento, o un líquido viscoso no volátil que recubre las paredes internas de la columna. Este método permite realizar tanto análisis cualitativo, como cuantitativo de sustancias o sus derivados volátiles estables a altas temperaturas menores de 320-350 °C (Salamanca y Sánchez, 2009). Existen dos tipos principales de cromatografía de gases: la cromatografía de gases con fase líquida (GLC) y la cromatografía de gases con fase sólida (GSC). En la GLC, se utiliza un mecanismo de partición y en la GSC, un mecanismo de adsorción (Grob, 2004).

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

En el presente estudio, se realizó la hibridación entre las especies *Lippia origanoides*, *Lippia alba* y *Lantana canescens*, en busca de incorporar las diferentes características morfológicas y variar la composición de los metabolitos secundarios. Estos últimos fueron extraídos por el método MSPD y caracterizados por cromatografía de gases GC/MS-FID para cada especie y su respectivo híbrido, proporcionando así una información novedosa a la investigación biológica en este campo.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Caracterizar los metabolitos secundarios de los híbridos intergenéricos, interespecíficos e intraespecíficos, obtenidos de cruces entre las especies *Lippia origanoides*, *Lippia alba* y *Lantana canescens* de la familia Verbenaceae.

1.1. Objetivos específicos

Obtener híbridos intergenéricos, interespecíficos e intraespecíficos de cruces entre las especies *Lippia origanoides*, *Lippia alba* y *Lantana canescens* de la familia Verbenaceae, usando la polinización manual.

Caracterizar parentales e híbridos obtenidos mediante la evaluación del resultado fenotípico de las plantas.

Obtener los metabolitos secundarios de hojas de las plantas parentales e híbridos por la técnica de extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD).

Determinar la composición química de los extractos MSPD de las hojas de plantas parentales e híbridos, usando el análisis por GC/MS/FID.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

2. Competencias

Aplica los procedimientos correctos para la realización de una hibridación intergenérica, interespecífica e intraespecífica (revisión bibliográfica y capacitaciones).

Realiza un adecuado trabajo de campo a la hora de llevar a cabo una polinización manual (hibridación intergenérica, interespecífica e intraespecífica) entre las especies *Lippia origanoides*, *Lippia alba* y *Lantana canescens* (bitácora de campo).

Logra un correcto análisis de datos con el manejo del *software* MS-ChemStation G1701-DA.

Elabora un informe técnico con la información obtenida durante el estudio.

Contribuye a nueva información sobre los híbridos de la familia Verbenaceae (competencia apreciativa).

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

3. Cuerpo de Trabajo**3.1. Métodos****3.1.1. Material vegetal**

Las plantas de las especies de *Lippia origanoides*, *Lippia alba* y *Lantana canescens* se obtuvieron de parcelas experimentales expuestas a la luz solar del Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), ubicado el campus principal de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

La recolección del material vegetal se realizó con el permiso de colecta, otorgado a través del contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados con fines de bioprospección N° 270, suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Industrial de Santander.

3.1.2. Caracterización morfológica de plantas parentales

Se tomaron plantas adultas de las especies de *Lippia origanoides* (quimiotipos Timol y Felandreno), *L. alba* (quimiotipo Citral) y *Lantana canescens*, a las cuales se les estudió la morfología y dinámica floral, con ayuda de los libros especializados en botánica (Mayfield, 2021; Beentje, 2010; Stearn, 1983); se observaron en el estereoscopio (marca OLYMPUS, modelo SZ2-ILST, fabricado en Filipinas por Olympus Corporation de Tokyo, Japón), las flores abiertas y se evaluaron los siguientes caracteres: longitud de la flor, rama y hoja, dimensiones del gineceo y de los estambres, y se especificaron detalles como posición y organización y, por último, diámetro y forma de semillas.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

3.1.3. Polinización manual para hibridación interespecífica, intraespecífica e intergenérica de las especies *Lippia origanoides*, *L. alba* y *Lantana canescens*

Las tres diferentes hibridaciones se realizaron de forma manual. Las plantas se mantuvieron en observación constante y, cuando éstas se encontraban en el estado de floración, se procedió a tomar el polen. Para ello, se abrió la flor a la mitad del parental masculino con ayuda de una aguja, éste se adhirió a una pluma de pavo, la cual se insertó en el estigma del parental femenino, fecundando así la flor. Luego, la inflorescencia polinizada se cubrió con un pequeño toldillo el cual fue asegurado con hilo para evitar visitas de insectos polinizadores que hubieran podido generar una contaminación cruzada.

El primer cruce se realizó entre *Lippia origanoides* (quimiotipo Felandreno) x *Lippia origanoides* (quimiotipo Timol), dos individuos de la misma especie, pero con características diferentes, en este caso el quimiotipo. El segundo cruce fue entre *Lantana canescens* x *Lippia origanoides* (quimiotipo Timol), una hibridación intergenérica donde se unieron especies de diferente género y, por último, entre *Lippia alba* (quimiotipo Citral) x *Lippia origanoides* (quimiotipo Timol), una hibridación interespecífica, la cual se produjo entre especies de un mismo género. En cada cruce, se trabajó con cinco individuos de cada especie.

3.1.4. Extracción por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida de hojas de los parentales

El proceso de extracción por MSPD se realizó por triplicado, se utilizó la sílice modificada C₁₈ como material dispersante y diclorometano como solvente de elución. Como primer paso se homogeneizaron 2 g del material vegetal de cada parental y se pesaron 0.5 g de éste. Posteriormente, este material vegetal se maceró con la sílice modificada C₁₈ y 1 mL de isopropanol, durante diez minutos; una vez se formó un polvillo verde, éste se introdujo en una jeringa de 10 mL, que contenía un filtro de algodón en el fondo.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Se procedió a la elución con 3 mL de diclorometano, el eluato se recogió en un tubo Falcón de 15 mL. Una vez finalizó la elución, la solución se evaporó parcialmente con una corriente de nitrógeno, en un baño de hielo, esto para concentrar el extracto a 1 mL. Luego, se preparó una solución *stock* de patrón n-tetradecano, para ello, se adicionaron 50 μ L de n-tetradecano a un balón de 5 mL. Se aforó con diclorometano a 1 mL y, después, se tomaron 25 μ L de la solución y se depositaron en un balón de 1 mL, el cual contenía el extracto concentrado y se aforó a 1 mL usando diclorometano. Se pasó el extracto por un filtro de 0.22 μ m hacia un frasco cromatográfico para el análisis por GC/FID. Finalmente, al adicionar los 25 μ L de la solución *stock* al extracto y aforar a 1 mL, se trasvasó el extracto a una columna, la cual contenía 0.02 g de carbón activado, se pasó por un filtro de 0.22 μ m y se transfirió a un frasco cromatográfico para el análisis por GC/MS.

3.1.5. Análisis de datos por GC/MS

La identificación de los compuestos se realizó teniendo en cuenta criterios cromatográfico, i.e., índices de retención lineal (IRL) calculados a partir de una mezcla de n-alcenos C₈-C₄₀ y espectrométrico, basado en los espectros de masas obtenidos por ionización con electrones de 70 eV. Los espectros obtenidos se compararon con los de las bases de datos Wiley, Adams y NIST, y con los de las sustancias de referencia disponibles.

Los datos espectroscópicos y cromatográficos se obtuvieron en un cromatógrafo de gases GC 7890 (Agilent Technologies, AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector selectivo de masas MSD 5975C [Ionización por impacto de electrones (EI), 70 eV; AT, Palo Alto, CA, EE. UU.], inyector *split/splitless* (1:30) y el sistema de datos *MS-ChemStation*, versión G1701-DA, que incluyó las bibliotecas espectrales WILEY, NIST y ADAMS. Se usó una columna capilar de sílice fundida DB-5MS [(J&W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m x

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

0,25 mm de d.i., recubierta con 5 % fenil (polidimetilsiloxano) (0,25 μm de espesor de película)] y una columna DB-WAX (J&W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.) de 60 m x 0,25 mm de d.i., recubierta con poli(etilenglicol) (película de 0,25 μm de espesor). La temperatura del horno GC se programó de 50 °C (5 min) a 150 °C (2 min) a 5 °C min^{-1} , luego, a 230 °C (10 min), a 5 °C min^{-1} . Las temperaturas del puerto de inyección, la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron a 250 °C, 230 °C y 285 °C, respectivamente. Como gas de arrastre se utilizó helio (99.995%, gas AP, Messer, Bogotá, Colombia), con una velocidad de flujo de 1 mL/min, se usó un inyector automático AT 7893.

3.1.6. Viabilidad y caracterización morfológica de híbridos

Se realizaron las descripciones morfológicas de las semillas obtenidas, producto de las hibridaciones. Las semillas se sembraron en bandejas de propagación y se hizo el conteo de los híbridos. Las plántulas de los híbridos se sembraron en materas y, cuando alcanzaron el estado fenológico de floración, se realizó la descripción morfológica (véase inciso 3.1.2), la extracción por dispersión de la matriz en fase sólida de las hojas (véase inciso 3.1.4) y el análisis por GC/MS (véase inciso 3.1.5).

3.2. Resultados

3.2.1. Caracterización morfológica de plantas parentales

Lantana canescens Kunth es un arbusto aromático que puede alcanzar una altura de dos metros. Posee un tallo leñoso con un indumento frecuentemente grisáceo y adpreso. Cada rama presenta una distancia entre nodos de 3 a 5 cm. Sus hojas son opuestas y ovadas (Figura 1A), con dimensiones de 2 a 5.5 cm de largo y de 1 a 3 cm de ancho. Exhiben un margen serrado, ápice atenuado, base también atenuada y tomentosas. El peciolo tiene una longitud de 6 mm a 1 cm y muestra un color verde oscuro en el haz (Figura 1B). El envés presenta un color verde opaco y

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

son penninervias (Figura 1C). Las inflorescencias tienen forma capituliforme y se ubican en las axilas de las hojas, poseen pedúnculos de 1 a 3 cm de largo y en la parte inferior presentan brácteas con forma ovada y pubescentes de color verde claro (Figura 1D).

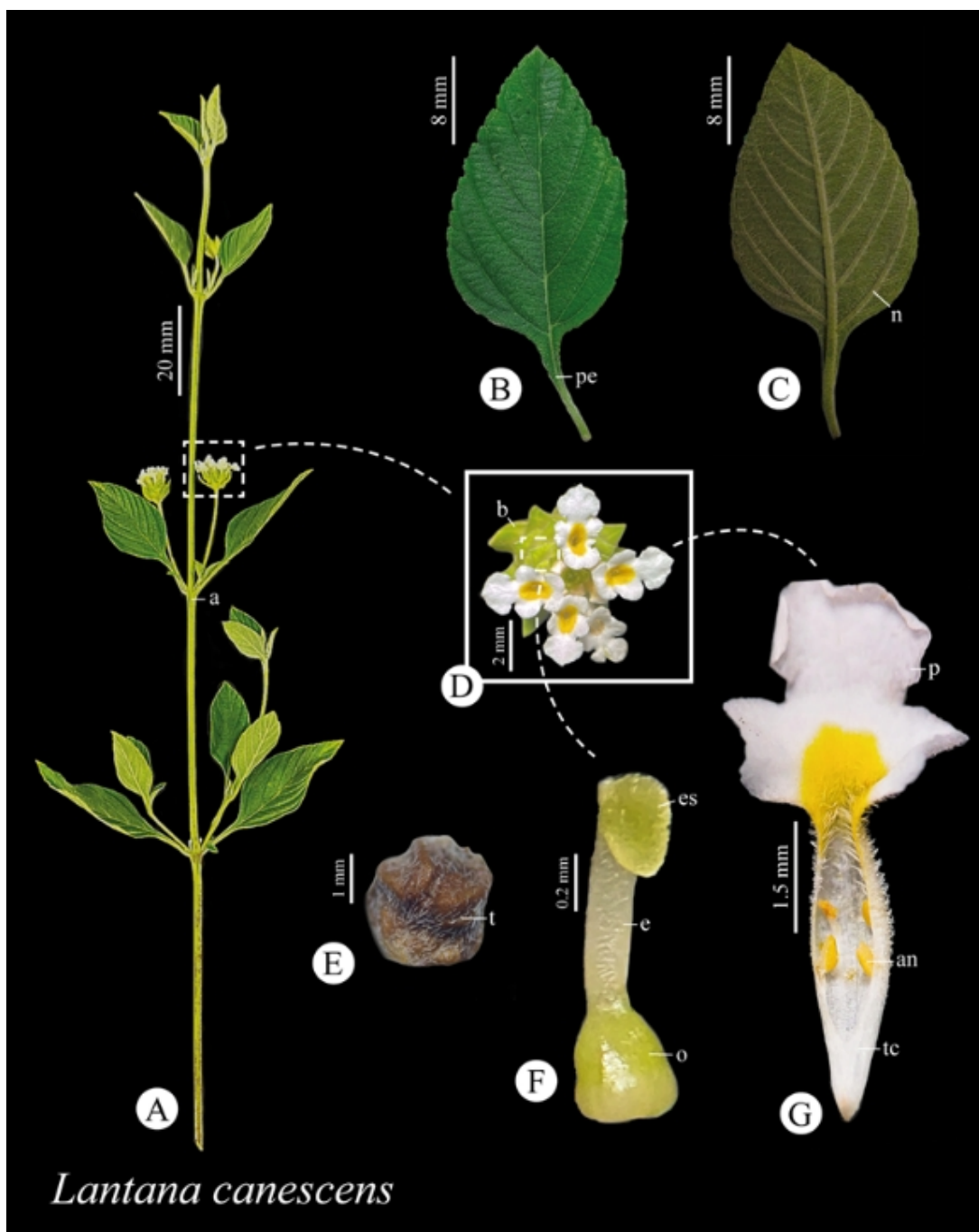
La flor es hermafrodita con una simetría zigomorfa y su longitud es de 1 cm. La corola es de color blanco, con un tubo corolino o cáliz tubuloso también blanco que presenta una longitud de 4 mm y es levemente pubescente (Figura 1G). Además, su androceo, presenta cuatro estambres didínamos y su gineceo está compuesto por un estigma de color verde, un estilo de 1 mm de largo de color amarillo a transparente y un ovario supero (Figura 1F).

El fruto es seco, con forma de cápsula bicarpelar con un diámetro de 1.5 mm, posee un color café oscuro y presenta tricomas de color blanco (Figura 1E).

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Figura 1

Caracterización morfológica parental de Lantana canescens Kunth.



Nota. A) Morfología general; B) Haz de la hoja; C) Envés de la hoja; D) Inflorescencia; E) Fruto.

F) Gineceo; G) Flor. (a) axila; (an) anteras didínamas; (b) bráctea; (e) estilo; (es) estigma; (n) nervadura; (o) ovario; (p) pétalo; (pe) peciolo; (t) tricomas; (tc) tubo corolino.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Lippia origanoides Kunth es un arbusto aromático que puede alcanzar una altura de tres metros, posee tallo leñoso de color café a grisáceo. Es conocido comúnmente como orégano de monte. Cada rama presenta una distancia entre nodos de 1 a 4 cm. Sus hojas son simples y opuestas (Figura 2A). A su vez, son ovadas, con margen serrado, ápice redondeado y base obtusa a cordada, tienen peciolas de 6 mm a 2 cm de longitud con un indumento tomentoso; en el haz, las hojas muestran un color verde llamativo (Figura 2B); mientras que en el envés su color varía de verde opaco a grisáceo, y son penninervias (Figura 2C); el tamaño promedio de las hojas es de 2 a 6.5 cm de largo y de 1 a 3.5 cm de ancho. La inflorescencia es de tipo racemosa, y se encuentra ubicada en las axilas de las hojas, con brácteas ovadas, pubescentes y pedúnculos de 4 mm a 1 cm de longitud (Figura 2 D).

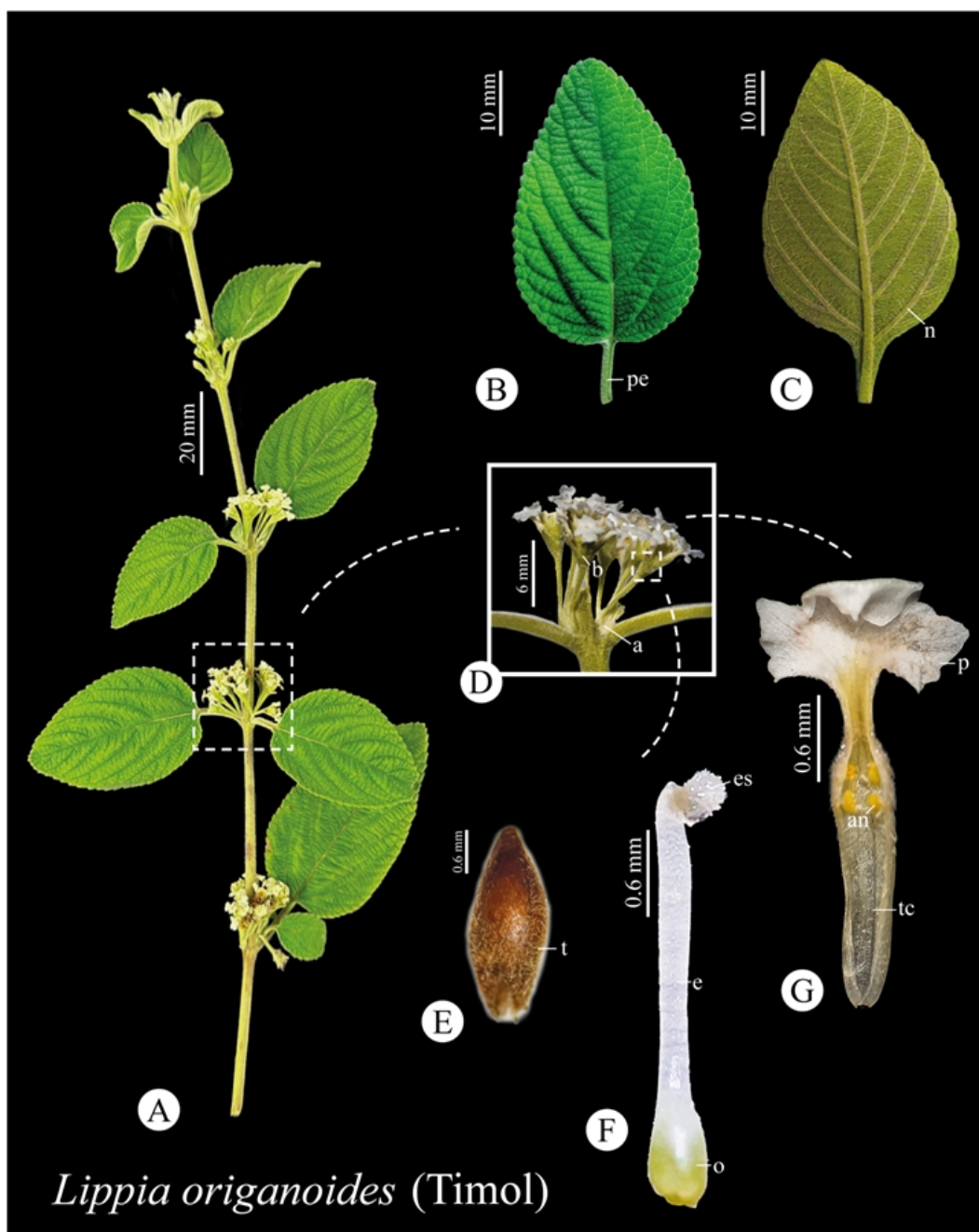
Las flores son hermafroditas con simetría zigomorfas, poseen con una corola de color blanco y un tubo corolino o cáliz tubuloso de color blanco a amarillo, levemente pubescente, con una longitud promedio de 3 mm (Figura 2G); su androceo, presenta cuatro estambres didínamos y el gineceo está compuesto por un ovario supero de color verde, un estilo de 1.8 mm de largo y un estigma de color blanco a transparente (Figura 2F).

Por su parte, los frutos son núculas de color café con tricomas blancos a transparentes con una longitud de 1 mm (Figura 2E).

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Figura 2

Caracterización morfológica parental de *Lippia origanoides* Kunth quimiotipo Timol.



Nota. A) Morfología general; B) Haz de la hoja; C) Envés de la hoja; D) Inflorescencia; E) Fruto. F) Gineceo; G) Flor. (a) axila; (an) anteras didínamas; (b) bráctea; (c) bráctea; (e) estilo; (es) estigma; (n) nervadura; (o) ovario; (p) pétalo; (pe) peciolo; (t) tricomas; (tc) tubo corolino.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex Britton y P. Wilson, es un arbusto aromático que alcanza una altura de 1.5 m, la planta se conoce comúnmente como pronto alivio. Posee un tallo leñoso; cada rama muestra una distancia entre nodos de 1.5 a 4 cm, tiene hojas opuestas que miden de 2 a 5 cm de largo y de 1 a 2.5 cm de ancho (Figura 3A), las hojas son lanceoladas, con un ápice obtuso-agudo, margen serrado y base atenuada; el haz exhibe un color verde oscuro (Figura 3B), mientras que, en el envés, el color se torna a verde opaco, con una textura tomentosa y, según su nervadura, la hoja es penninervia (Figura 3C). Además, sus peciolo tienen una longitud de 5 mm a 1.5 cm. Su inflorescencia, está situada en las axilas de las hojas y tienen forma de espigas capituliformes, presenta brácteas de color verde y pubescentes, con pedúnculos de 8 mm (Figura 3D).

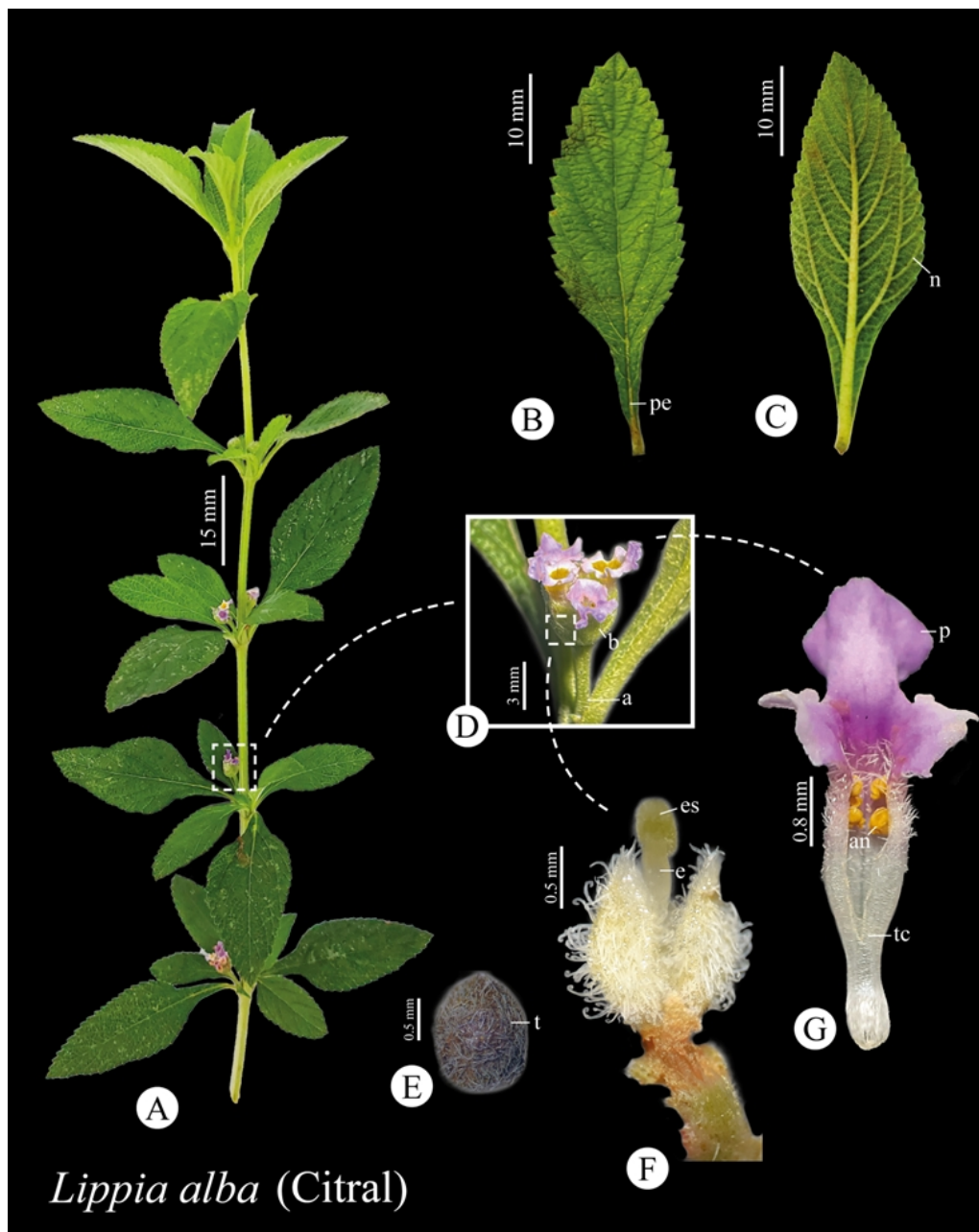
Las flores son hermafroditas, de simetría zigomorfas, con 4 mm de longitud. La corola varía de color de lila a morado, con la presencia de cuatro estambres dispuestos en dos pares didínamos. El tubo corolino es blanco y pubescente, con una longitud de 1.5 mm (Figura 3G). El gineceo está conformado por un ovario supero, un estilo transparentoso de 1 mm de longitud y un estigma de color verde claro (Figura 3F).

El fruto es seco y subsférico, con dos núculas tardíamente separables, de color grisáceo a café oscuro, con la presencia de tricomas blancos y un diámetro cercano a 1.2 mm (Figura 3E).

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Figura 3

Caracterización morfológica parental de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton y *P. Wilson* quimiotipo Citral.



Nota. A) Morfología general; B) Haz de la hoja; C) Envés de la hoja; D) Inflorescencia; E) Fruto, F) Gineceo; G) Flor. (a)axila; (an) anteras didínamas; (b) bráctea; (e) estilo; (es) estigma; (n) nervadura; (p) pétalo; (pe) peciolo; (t) tricomas; (tc) tubo corolino.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

3.2.2. Polinización manual para hibridación interespecífica, intraespecífica e intergenérica de las especies *Lippia origanoides*, *L. alba* y *Lantana canescens*

Se entregaron 14 plantas híbridas al *Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales tropicales* CENIVAM, una de la hibridación interespecífica, *Lippia alba* quimiotipo Citral x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol; 13 de la hibridación intergenérica, *Lantana canescens* x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol. Para la hibridación intraespecífica, no se logró producir ninguna planta.

Tabla 1

Seguimiento del proceso de hibridación

Fecha	Tipo de hibridación	Hibrido	Flores intervenidas	Semillas	Plántulas
Ago/21	Intraespecífica	<i>L. origanoides</i> F x <i>L. origanoides</i> T	30	2	0
Sept/21	Intergenérica	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> T	30	3	1
Oct/21	Interespecífica	<i>L. alba</i> C x <i>L. origanoides</i> T	40	2	0
Ene/22	Intraespecífica	<i>L. origanoides</i> F x <i>L. origanoides</i> T	55	5	0
Feb/22	Intergenérica	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> T	35	8	6
Mar/22	Interespecífica	<i>L. alba</i> C x <i>L. origanoides</i> T	45	6	1
Jun/22	Intraespecífica	<i>L. origanoides</i> F x <i>L. origanoides</i> T	45	3	0
Jul/22	Intergenérica	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> T	32	15	6
Ago/22	Interespecífica	<i>L. alba</i> C x <i>L. origanoides</i> T	30	10	0

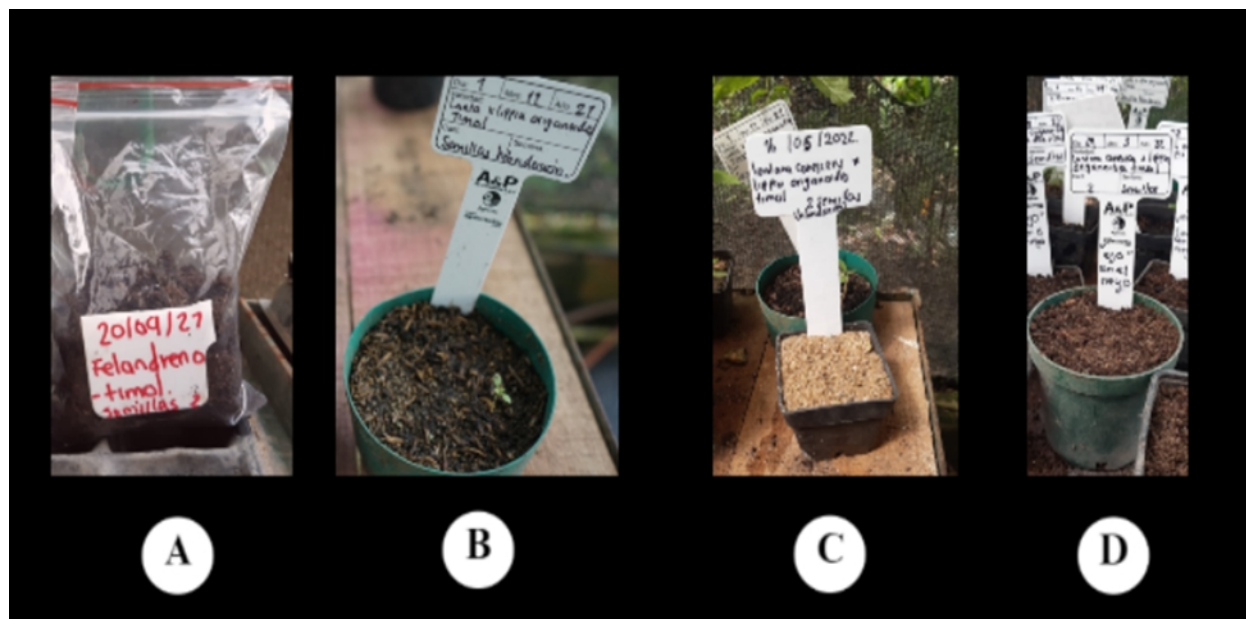
Nota. (T) quimiotipo Timol; (C) quimiotipo Citral; (F) quimiotipo Felandreno.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Para la siembra de semillas híbridas, se usaron diferentes sustratos que se describen en la Figura 4; donde el híbrido interespecífico de *Lippia alba* quimiotipo Citral x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol, germinó y creció en un sustrato de 70% arena con 30% materia orgánica. Las plantas de la hibridación intergenérica *Lantana canescens* x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol, se germinaron dos y crecieron en un sustrato de 100% arena y las 11 restantes, en un sustrato de 70% arena con 30% de materia orgánica. Las plántulas permanecieron en el invernadero aproximadamente cuatro meses. Cuando alcanzaron una altura promedio de 20 cm, se expusieron a la luz solar, en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM).

Figura 4

Tipos de sustratos para la siembra de semillas híbridas.



Nota. A) 100% materia orgánica; B) 50% arena - 50% materia orgánica; C) 100% arena; D) 70% arena - 30% materia orgánica.

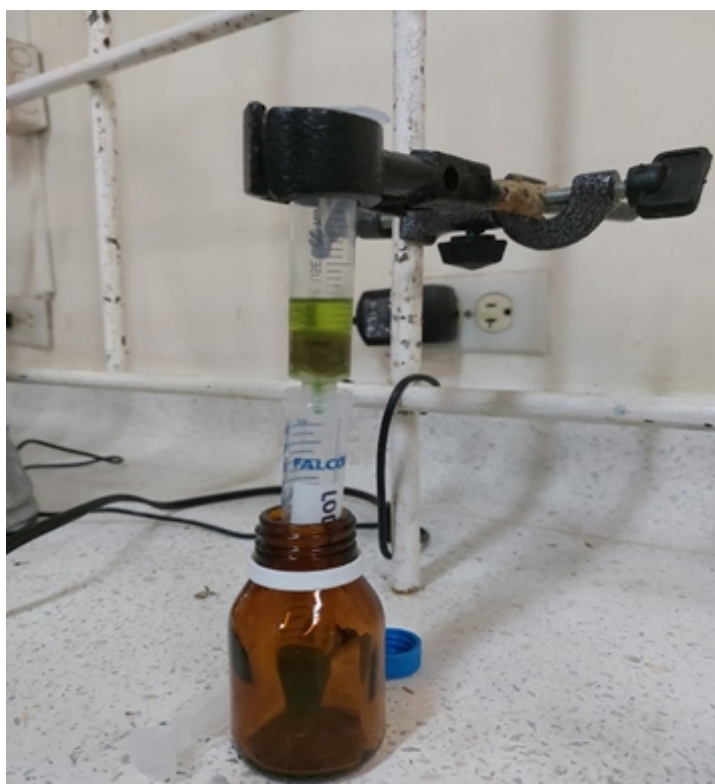
HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

3.2.3. Extracción por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida de hojas de los parentales

De cada parental, se obtuvieron tres tubos Falcon con 5 mL de extracto, para un total de nueve tubos, tres de *Lippia origanoides* quimiotipo timol, tres de *Lippia alba* quimiotipo citral, tres de *Lantana canescens*, que se rotularon así: LO, LA, LC. En la Figura 5 se puede observar el montaje para la obtención del extracto de hojas de *Lippia origanoides* quimiotipo Timol.

Figura 5

Montaje de dilución hojas de Lippia origanoides quimiotipo Timol.

**3.2.4. Análisis de datos por GC/MS/FID de los Parentales**

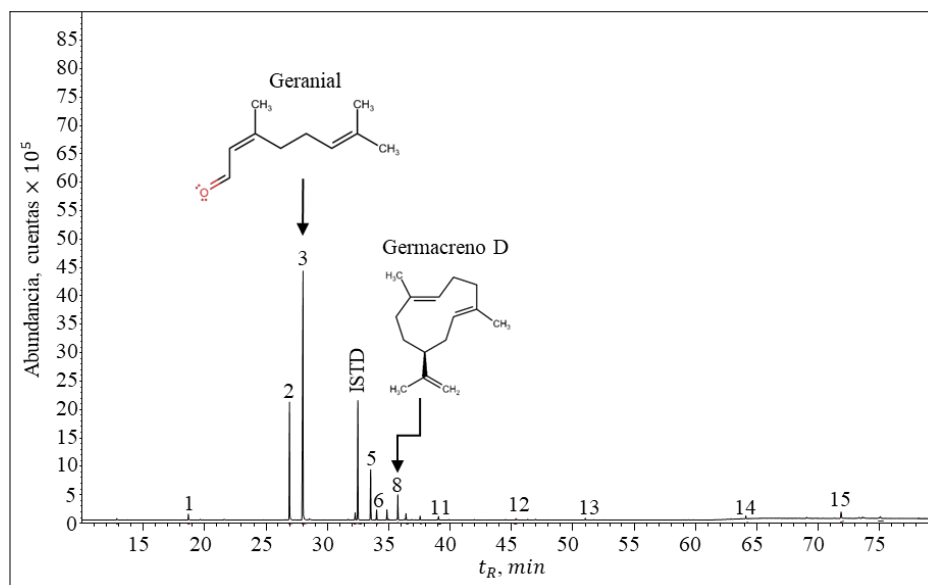
En las Figuras 6, 7 y 8 se observan los perfiles cromatográficos de los extractos MSPD de hojas de *Lippia alba* quimiotipo Citral, *Lippia origanoides* quimiotipo Timol y *Lantana*

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

canescens, junto con las estructuras químicas de los componentes mayoritarios, que se exponen con sus cantidades relativas en porcentaje en la Tabla 2.

Figura 6

Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de los extractos MSPD de hojas de Lippia alba quimiotipo Citral.

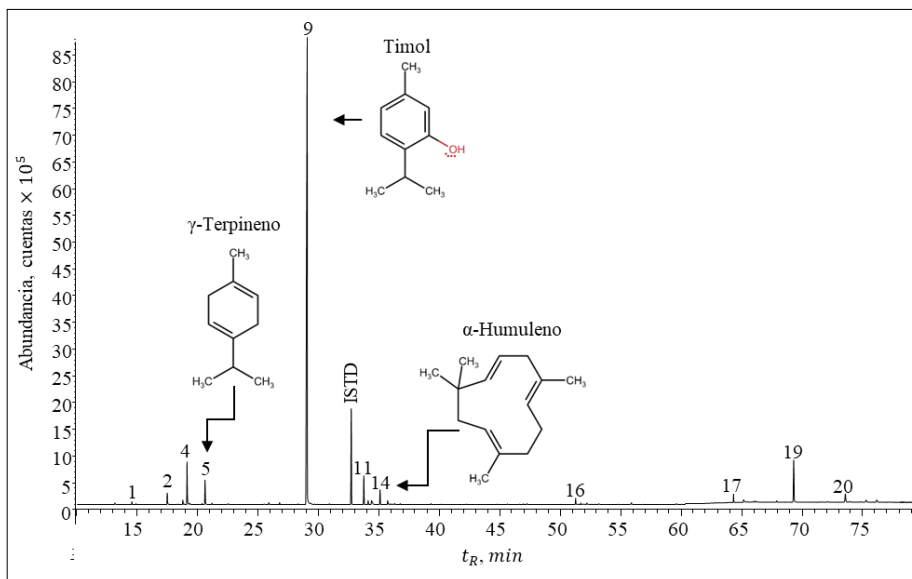


Nota. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la Tabla 2.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Figura 7

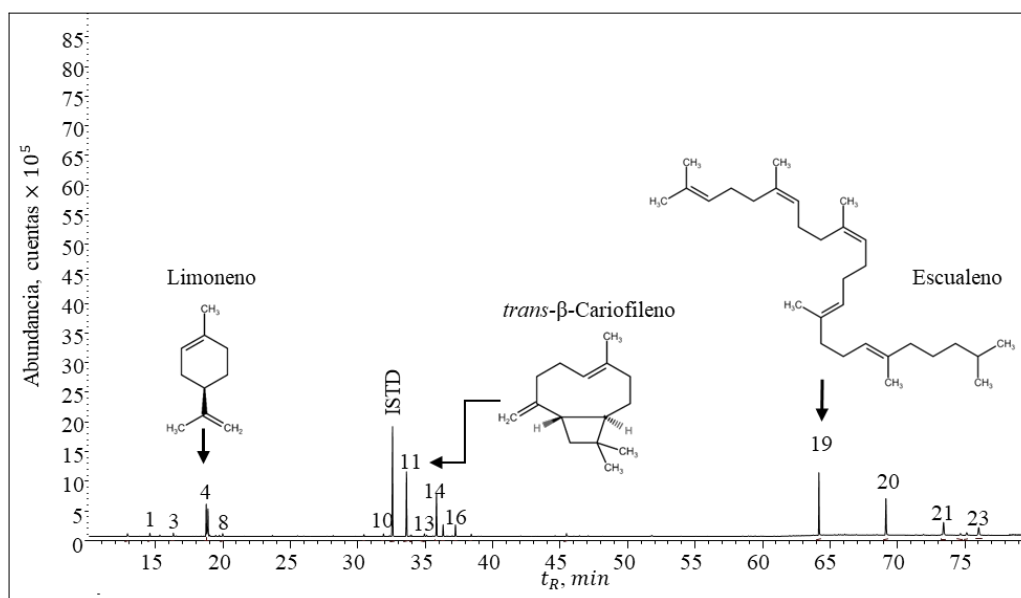
Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de los extractos MSPD de hojas de *Lippia origanoides* quimiotipo Timol.



Nota. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la Tabla 2.

Figura 8

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los extractos MSPD de hojas de *Lantana canescens*.



Nota. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la Tabla 2.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

En el extracto de *Lippia alba* quimiotipo Citral prevalecen monoterpenos oxigenados (>65%), en el extracto de *Lippia origanoides* quimitiotipo Timol prevalecen fenoles monoterpénicos (>70%), mientras que en el extracto de *Lantana canescens* dominan sesquiterpenos, y diterpenos (>50%) (Tabla 2).

Tabla 2

Identificación por GC/MS de compuestos mayoritarios en los extractos MSPD, obtenidas de hojas de plantas parentales estudiadas.

Código	Nombre científico	Componentes mayoritarios (áreas relativas, %)
LA	<i>Lippia alba</i>	Geranial ($51,34 \pm 0,03$ %), neral ($16,110 \pm 0,002$ %), β -elemeno ($15,30 \pm 0,04$), <i>trans</i> - β -cariofileno ($6,00 \pm 0,01$ %), germacreno D ($2,72 \pm 0,01$ %), α -humuleno ($1,250 \pm 0,002$).
LO	<i>Lippia origanoides</i>	Timol ($67,80 \pm 0,03$ %), p-cimeno ($3,40 \pm 0,01$ %), γ -sitosterol (1,6 %), α -tocoferol ($3,370 \pm 0,004$ %), <i>trans</i> - β -cariofileno ($2,813 \pm 0,003$ %), γ -terpineno ($2,30 \pm 0,01$ %).
LC	<i>Lantana canescens</i>	<i>trans</i> - β -Cariofileno ($13,90 \pm 0,05$ %), escualeno ($12,30 \pm 0,01$ %), limoneno ($8,50 \pm 0,03$ %), germacreno D ($8,10 \pm 0,01$ %), eucaliptol ($5,0 \pm 0,1$ %), γ -sitosterol ($2,90 \pm 0,05$ %).

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

3.2.5. Caracterización morfológica de plantas híbridas

Lantana canescens Kunth x *Lippia origanoides* Kunth quimiotipo Timol es una planta aromática que alcanzó los 85 cm (desde su germinación hasta el momento que se realizó la caracterización, seis meses); cada rama presentó una distancia entre nodos de 3 a 6 cm, hojas opuestas y ovadas (Figura 9A). Hojas de 1.5 a 4 cm de largo y de 1 a 2.7 cm de ancho, con margen serrado, ápice atenuado, base atenuada, tomentosas, con peciolo de 4 a 10 mm de largo y color verde oscuro en el haz (Figura 9B). En el envés exhibía un color verde claro y penninervia (Figura 9C).

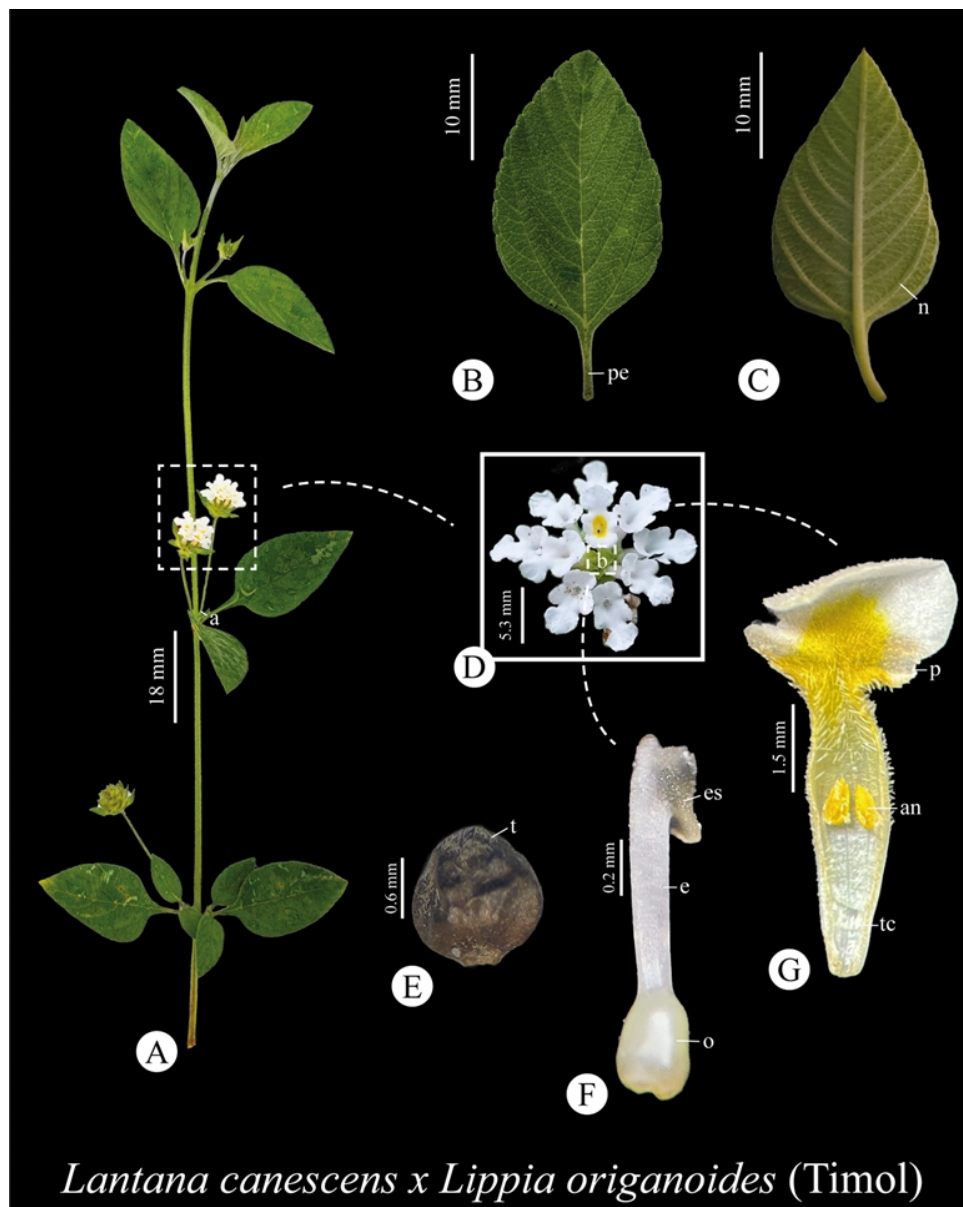
Sus inflorescencias capituliformes axilares, pedúnculos de 1 a 2.3 cm de largo y brácteas ovadas pubescentes (Figura 9D). Su flor es hermafrodita y zigomorfa de 7 mm de longitud, corola color blanco, tubo corolino o cáliz tubuloso color blanco levemente pubescente y con una longitud de 3 mm (Figura 9G); presentó cuatro estambres didínamos. El gineceo compuesto por un estigma color amarillo claro, un estilo de 0.8 mm de largo color blanco a transparente y un ovario supero (Figura 9F).

Su fruto presentaba forma de cápsula bicarpelar color café oscuro con presencia de tricomas color blanco y 2 mide mm de diámetro (Figura 9E).

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Figura 9

Caracterización morfológica del híbrido de Lantana canescens x Lippia origanoides qimiotipo Timol.



Nota. A) Morfología general; B) Haz de la hoja; C) Envés de la hoja; D) Inflorescencia; E) Fruto; F) Gineceo. G) flor. (a) axila; (an) anteras; (b) bráctea; (e) estilo; (es) estigma; (n) nervadura; (o) ovario; (p) pétalo; (pe) peciolo; (t) tricomas; (tc) tubo corolino.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex Britton y *P. Wilson* (Citrál) x *Lippia origanoides* Kunth quimiotipo Timol, es una planta aromática que alcanzó los 105 cm (desde su germinación hasta el momento que se realizó la caracterización, seis meses), cada rama presentó una distancia entre nodos de 2 a 3.5 cm, tiene hojas opuestas de 1 a 4 cm de largo y de 1 a 2 cm de ancho, lanceoladas, con un ápice obtuso-agudo, margen serrado y base atenuada (Figura 10A). En el haz se exponía un color verde pino oscuro (Figura 10B). En el envés su color se torna a verde claro, tomentoso, sus peciolos miden de 4 mm a 1 cm de largo y debido a su nervadura es penninervia (Figura 10C).

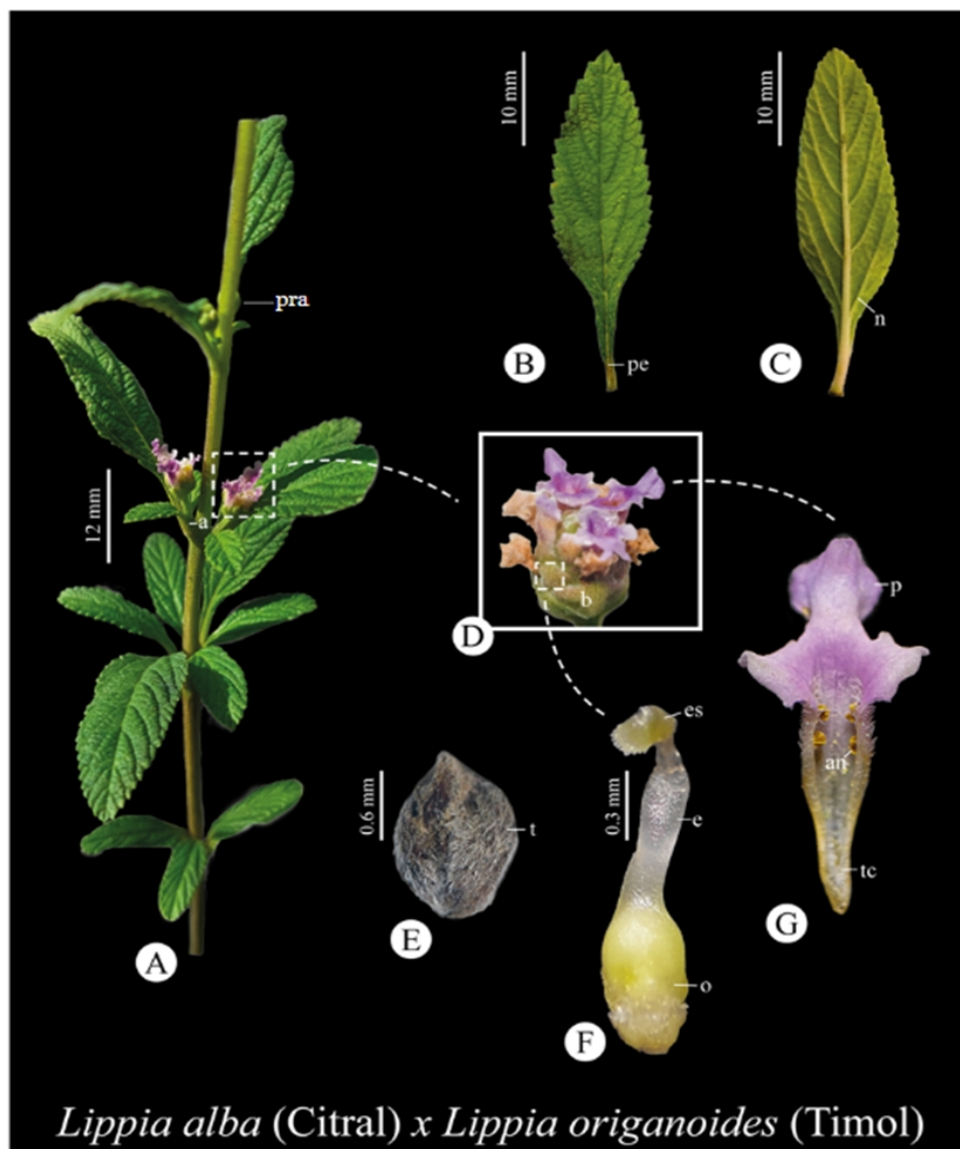
Su inflorescencia situada en las axilas de las hojas tenía forma de espigas capituliformes, brácteas color verde claro y pubescentes, así como, pedúnculos de 6 mm (Figura 10D). Sus flores son hermafroditas y zigomorfas de 5 mm de longitud, su corola es de color lila a morado, presentó cuatro estambres, dos pares didínamos, tubo corolino color blanco y pubescente de 2 mm de largo (Figura 10G). Gineceo con ovario supero, estilo transparentoso de 1 mm y estigma color verde (Figura 10F).

Su fruto presentaba forma de cápsula seca color grisáceo oscuro con presencia de tricomas blancos y con 1 mm de diámetro (Figura 10E).

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Figura 10

Caracterización morfológica del híbrido de Lippia alba quimiotipo Citral x Lippia origanoides quimiotipo Timol.



Nota. A) Morfología general. B) Haz de la hoja. C) Envés de la hoja. D) Inflorescencia. E) Fruto. F) Gineceo. G) flor. (a) axila; (an) anteras didínamas; (b) bráctea; (e) estilo; (es) estigma; (n) nervadura; (o) ovario; (p) pétalo; (pe) peciolo; (pra) primordio raíz; (t) tricomas; (tc) tubo corolino

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

3.2.6. Extracción por dispersión de matriz en fase sólida de hojas de plantas híbridas

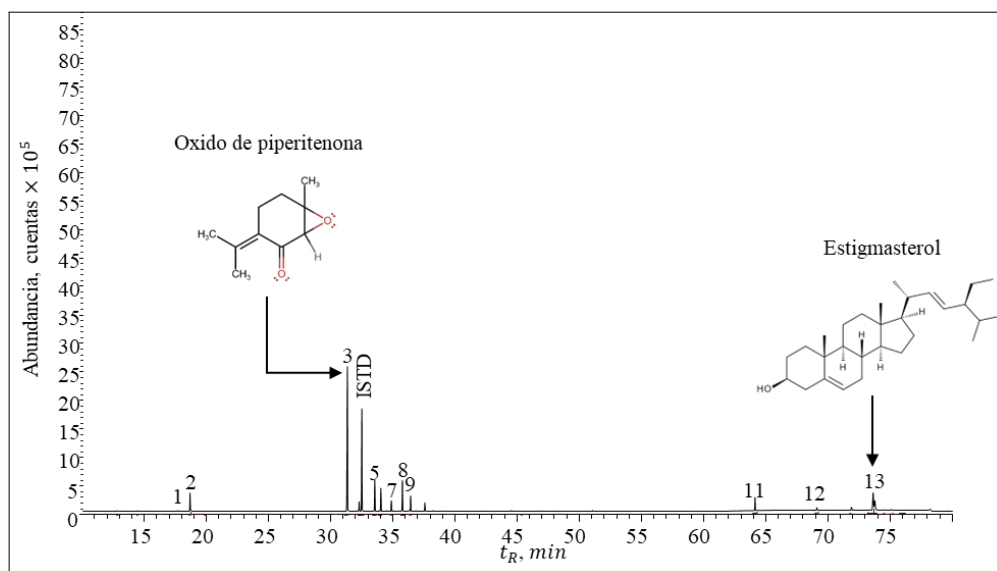
Se obtuvieron tres tubos Falcon con 5 mL de extracto *Lippia alba* x *L. origanoides* y 27 tubos igualmente con 5 mL de extracto de *Lantana canescens* x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol. Para este último se logró extraer mayor cantidad de extracto, ya que es el híbrido con mayor número de plantas. Los tubos se rotularon de la siguiente manera: LAXLO, LCxLO-1, LCxLO-2, LCxLO-3, LCxLO-4, LCxLO-5, LCxLO-6, LCxLO-7.

3.2.7. Análisis de datos por GC/MS/FID de los híbridos

En las figuras 11 y 12 se observan los perfiles cromatográficos de los extractos MSPD obtenidos de hojas de los híbridos, junto con las estructuras químicas de los componentes mayoritarios, que se exponen con sus cantidades relativas en porcentaje en la Tabla 3.

Figura 11

Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de los extractos MSPD obtenidos de hojas de *Lippia alba* x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol.

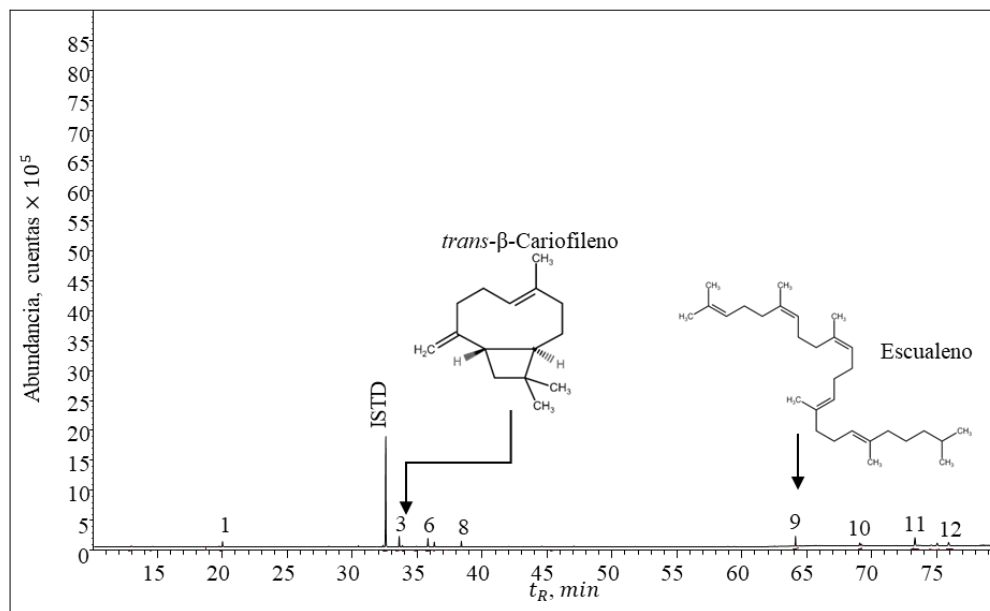


Nota. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la Tabla 3.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Figura 12

Perfil cromatográfico obtenido por GC/FID de los extractos MSPD obtenidos de hojas *Lantana canescens* x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol.



Nota. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la Tabla 3.

Los compuestos mayoritarios extraídos mediante MSPD e identificados por GC/MS de la planta híbrida *Lippia alba* quimiotipo Citral x y *L. origanoides* quimiotipo Timol (LxLO) son monoterpenos oxigenados, aunque contiene mayor cantidad de sesquiterpenos pero presentan menor cantidad de área relativa.

Mientras que los compuestos identificados en plantas híbridas de *Lantana canescens* x y *Lippia origanoides* quimiotipo Timol desde la (LCxLO-1 hasta LCxLO-7) fueron: *trans*-β-cariofileno, germacreno, palmitato de capril, α-humuleno, γ-sitosterol, escualeno, limoneno, entre otros; donde dominando los sesquiterpenos (>60 %).

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Tabla 3

Identificación por GC/MS de compuestos mayoritarios de los extractos MSPD, obtenidos de hojas de plantas híbridas estudiadas.

Código	Nombre científico	Componentes mayoritarios (áreas relativas, %)
LAxLO	<i>L. alba</i> C x <i>L. origanoides</i> T	Oxido de piperitenona ($36,40 \pm 0,07$ %), <i>trans</i> - β -cariofileno ($7,050 \pm 0,008$ %), germacreno D ($6,00 \pm 0,02$ %), limoneno ($4,90 \pm 0,06$ %), α -guaieno ($4,310 \pm 0,004$ %), β -elemeno ($3,010 \pm 0,009$).
LCxLO-1	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> T	<i>trans</i> - β -cariofileno ($6,0 \pm 0,2$ %), Escualeno ($5,50 \pm 0,02$ %), germacreno D ($5,11 \pm 0,01$ %), α -tocoferol ($5,11 \pm 0,03$), γ -sitosterol ($5,0 \pm 0,1$ %), γ -terpineno ($3,1 \pm 0,3$ %).
LCxLO-2	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> T	<i>trans</i> - β -Cariofileno ($18,2 \pm 0,1$ %), palmitato de capril ($11,71 \pm 0,09$ %), α -humuleno ($6,30 \pm 0,03$ %), γ -terpineno ($6,1 \pm 0,1$ %), γ -sitosterol ($3,40 \pm 0,02$ %), biciclogermacreno ($3,33 \pm 0,08$ %).
LCxLO-3	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> T	<i>trans</i> - β -Cariofileno ($19,16 \pm 0,04$ %), γ -terpineno ($7,30 \pm 0,03$ %), α -humuleno ($7,21 \pm 0,02$ %), germacreno D ($6,00 \pm 0,06$ %), escualeno ($3,90 \pm 0,04$ %), γ -sitosterol ($3,32 \pm 0,01$ %).
LCxLO-4	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> T	<i>trans</i> - β -cariofileno ($9,10 \pm 0,01$ %), limoneno ($3,81 \pm 0,07$ %), eucaliptol ($3,20 \pm 0,05$ %), γ -Sitosterol ($3,00 \pm 0,09$ %), germacreno D ($2,30 \pm 0,03$ %), biciclogermacreno ($1,83 \pm 0,02$ %).
LCxLO-5	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> T	<i>trans</i> - β -Cariofileno ($15,0 \pm 0,02$ %), germacreno D ($6,90 \pm$ %), γ -terpineno ($5,0 \pm$ %), biciclogermacreno ($3,32 \pm 0,01$ %) γ -sitosterol ($3,3 \pm 0,1$ %), α -tocoferol

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

		(2,73 ± 0,03).
LCxLO-6	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> T	<i>trans</i> -β-Cariofileno (5,390 ± 0,006 %), α-humuleno (3,80 ± 0,01 %), γ-sitosterol (1,71 ± 0,03 %), γ-terpineno (1,60 ± 0,01 %), escualeno (1,592 ± 0,009 %), limoneno (1,22 ± 0,02 %).
LCxLO-7	<i>L. canescens</i> x <i>L. origanoides</i> T	<i>trans</i> -β-Cariofileno (24,22 ± 0,03 %), α-humuleno (11,10 ± 0,02 %), γ-terpineno (7,20 ± 0,05 %), limoneno (3,54 ± 0,2 %), germacreno D (2,80 ± 0,04 %), α-tocoferol (2,60 ± 0,01).

Nota. (C) Quimiotipo Citral; (T) Quimiotipo Timol.

3.3. Discusión

En Colombia, *Lippia origanoides* se encuentra distribuida en altitudes que varían de 500 a 800 m.s.n.m., en entornos secos (Álvarez-Sánchez et al., 2018). Por su parte, *L. alba*, conocida como "pronto alivio", prospera en ambientes caracterizados por una alta intensidad lumínica (Henao et al., 2011), y se desarrolla especialmente bien en suelos arenosos (Sánchez et al., 2004). Estas observaciones se respaldan con lo evidenciado durante la germinación y crecimiento de las semillas híbridas, las cuales presentaron un mejor crecimiento en suelos arenosos. Además, se observó un rápido crecimiento en la altura del tallo cuando las plantas fueron expuestas a una mayor cantidad de luz solar al ser extraídas del invernadero.

Los factores hereditarios transmitidos de padres a hijos y la combinación de estos factores en la generación híbrida F1, determinan que un individuo de esta generación herede los caracteres dominantes de uno de los progenitores, al mismo tiempo que oculta los caracteres recesivos del mismo par alelomorfo (Vidal & Ruíz, 2010). Desde una perspectiva morfológica, los híbridos resultantes *Lantana canescens* x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol que se muestran en la Figura 9, y de *Lippia alba* quimiotipo Citral x *Lippia origanoides* quimiotipo

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Timol que se observan en la Figura 10, presentan una notable similitud con sus parentales femeninos. Esta similitud se refleja en aspectos como la forma de las hojas, los tipos de inflorescencias, el color y la forma de las flores. Es importante destacar que, a pesar de tratarse de plantas jóvenes, sus medidas coinciden con las plantas parentales ya maduras.

En el híbrido *Lippia alba* quimiotipo Citral x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol que se muestra en la Figura 10 A, se observaron unos abultamientos a lo largo de la rama, los cuales son primordios de raíces adventicias, que funcionan como un método de adaptación, porque, si un pedazo de la rama se desprende, a partir de ellos, se forman las nuevas raíces del esqueje. Esto muestra la capacidad de las plantas híbridas para adaptarse y sobrevivir.

La ausencia de plantas híbridas intraespecíficas que se evidencia en la Tabla 1, se ha atribuido a problemas en el proceso de polinización de la flor de *Lippia origanoides* quimiotipo Felandreno. Esta dificultad se debe, en gran medida, a la pequeñez de la flor, lo que obstaculiza la extracción e inserción precisa del polen, utilizando la técnica de la pluma de pavo, Almanza en 1992 afirma la existencia de unas barreras para la hibridación en nuestro caso es una barrera morfológica, para esto, también se ensayó utilizar una aguja para la inserción del polen, ya que posee una punta mucho más fina, pero este procedimiento condujo a daños en el órgano femenino de la flor, por ende, no se logró una polinización exitosa.

Los compuestos químicos que presentó el híbrido de *Lippia alba* quimiotipo Citral x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol que se muestran en la Tabla 3, son muy similares a los de sus parentales, específicamente, a su parental femenino *Lippia alba* quimiotipo Citral como se muestra en la Tabla 2. Compuestos como *trans*- β -cariofileno ($7,050 \pm 0,008$ %) posee actividad citotóxica Zapata et al., 2009), el β -elemeno ($3,010 \pm 0,009$) y germacreno D ($6,00 \pm 0,02$ %) presentan actividades antimicrobianas, e insecticidas frente a los mosquitos y áfidos (Araque et

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

al., 2018) (Devia et al., 2020). El compuesto mayoritario fue óxido de piperitenona ($36,40 \pm 0,07$ %), que no apareció en ninguno de sus dos parentales, y tampoco ha sido registrado en la literatura para estas especies, pero coincide con los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *Lippia juveliana*, *L. integrifolia* y *L. turbinata* (Duschatzky et al., 1998), lo que hace pensar que es un compuesto típico y frecuente en este género.

Los metabolitos secundarios de los híbridos de *Lantana canescens* x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol que se observan en la Tabla 3, poseen como componente mayoritario el γ -sitosterol, común para ambos parentales como se muestra en la Tabla 2. Este esteroide posee una actividad antihiper glucémica (Balamurugan et al., 2011), el γ -terpineno funciona como antioxidante (Grassmann et al., 2005) y es muy utilizado en la industria de alimentos y cosmética. Aunque en el extracto obtenido del parental de *Lantana canescens* que se muestra en la Tabla 2, no se encontró el biciclogermacreno, éste fue un compuesto mayoritario de los híbridos (LCxLO-2, LCxLO-4, LCxLO-5) y, basándose en lo reportado por (da Costa et al., 2009) es un compuesto mayoritario de los aceites esenciales de *Lantana* sp.

Para este último híbrido *Lantana canescens* x *Lippia origanoides* quimiotipo Timol, se logró obtener una mayor cantidad de plantas. En la Tabla 3, se observa que no todos los extractos tienen los mismos compuestos mayoritarios. Esto se debe a que las plantas pueden inducir la síntesis activa de metabolitos secundarios, según los diversos factores, entre el estrés ambiental, el ataque de organismos (como insectos, hongos o bacterias), la falta o el exceso de luz (Camacho-Escobar et al., 2020), el tipo del sustrato y la altura en la que se desarrollen. Las plantas híbridas, obtenidas en este estudio, crecieron en dos sustratos diferentes: 100% arena y 70% arena - 30% materia orgánica, sin embargo, a la hora de los análisis cromatográficos, no se

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

observa un cambio drástico a la hora de la obtención de los metabolitos secundarios, es decir, las plantas para esta hibridación contenían similitud en sus compuestos.

4. Conclusiones

El presente estudio confirma la viabilidad de llevar a cabo la polinización manual de plantas Verbenáceas y de crear híbridos entre sus diferentes especies. Estos híbridos se caracterizan por una diversidad de metabolitos secundarios, para la hibridación interespecífica *Lippia alba* quimiotipo Citral x *Lippia organoides* quimiotipo Timol, se encontraron óxido de piperitenona, *trans*- β -cariofileno, germacreno D, limoneno, β -elemeno, β -bisaboleno. Para la hibridación intergenérica, *Lantana canescens* x *Lippia organoides* quimiotipo Timol, se detectaron γ -sitosterol, *trans*- β -cariofileno, neofitadieno, germacreno D, γ -terpineno, biciclogermacreno, α -humuleno y limoneno. La formación de nuevos metabolitos secundarios o sustancias podría convertirse en un potencial interesante para aportar beneficios significativos a las industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica, gracias a sus propiedades y diversa actividad biológica.

5. Recomendaciones

Cuando las plantas híbridas desarrollen un follaje abundante, se recomienda llevar a cabo la extracción de sus aceites esenciales y su posterior análisis.

Se recomienda comprobar también la existencia de la hibridación entre estas especies, usando marcadores moleculares.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

Referencias Bibliográficas

- Albrecht, M., Schmid, B., Hautier, Y., y Müller, C. (2012). Diverse pollinator communities enhance plant reproductive success. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1748), 4845–4852. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1621>.
- Almanza, S. G., Moya, E. G., Wendt, T. L., & Cossio, F. V. G. (1992). Potencial de hibridación natural en el mezquite (*Prosopis laevigata* y *P. glandulosa* var. *torreyana*, Leguminosae) de la altiplanicie de San Luis Potosí. *Acta Botánica Mexicana*, (20), 101-117.
- Álvarez-Sánchez, D., Hurtado-Benavides, A., Chaves-Morillo, D., y Andrade-Díaz, D. (2018). Actividad biocida del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. (Verbenaceae) sobre *Rhizoctonia solani*: in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(3), 668–676. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i3.7801>.
- Araque, E., Urbina, D., Morillo, M., Rojas-Fermín, L., y Carmona, J. (2018). Estudio de la composición química de los aceites esenciales de las hojas y flores de *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. (Lamiaceae). *Revista de La Facultad de Farmacia*, 60(2), 25–30. https://www.academia.edu/87072783/Estudio_de_la_composici%C3%B3n_qu%C3%ADmica_de_los_aceites_esenciales_de_las_hojas_y_flores_de_Leonotis_nepetifolia_L_R_Br_Lamiaceae_.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

- Balamurugan, R., Duraipandiyan, V., y Ignacimuthu, S. (2011). Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 667(1), 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.025>.
- Barker, S. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.06.005>
- Barrett, S. (2010). Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537), 99–109. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0199>.
- Beentje, H. (2010). *El glosario de plantas de Kew: un diccionario ilustrado de términos de plantas*. Real Jardín Botánico.
- Camacho-Escobar, M., Ramos-Ramos, D., Ávila-Serrano, N., Sánchez-Bernal, E., y López-Garrido, S. (2020). Las defensas físico-químicas de las plantas y su efecto en la alimentación de los rumiantes. *Revista Terra Latinoamericana*, 38(2), 443–453. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.629>.
- Cooper, M., Powell, O., Voss-Fels, K., Messina, C., Gho, C., Podlich, D., Technow, F., Chapman, S., Beveridge, C., Ortiz-Barrientos, D., y Hammer, G. (2021). Modelling selection response in plant-breeding programs using crop models as mechanistic gene-to-phenotype (CGM-G2P) multi-trait link functions. *In Silico Plants*, 3(1), 1–41. <https://doi.org/10.1093/insilicoplants/diaa016>.
- Cox, P. (1991). Abiotic pollination: an evolutionary escape for animal-pollinated angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 333(1267), 217–224. <https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0070>.
- Da Costa, J., de Sousa, E., Rodrigues, F., de Lima, S., y Braz-Filho, R. (2009). Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara*

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

L. e *Lantana* sp. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(3), 710–714.
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000500010>.

Dawidowicz, A., Wianowska, D., y Rado, E. (2011). Matrix solid-phase dispersion with sand in chromatographic analysis of essential oils in herbs. *Phytochemical Analysis*, 22(1), 51–58.
<https://doi.org/10.1002/pca.1250>.

Devia, B., Mahecha, Y., Franco, M., y Matulevich, J. (2020). Composición química de aceites esenciales de hojas de *Fridericia florida* DC. y *Fridericia chica* (Bonpl.). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(1), 63–70. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3676>.

Duschatzky, C., Bailac, P., y Firpo, N. (1998). Composición de los aceites esenciales de *Lippia juneliana*, *Lippia integrifolia* y *Lippia turbinata* de la provincia de San Luis (Argentina). *Revista Colombiana de Química*, 27(2), 9–16.
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/30721/16998-54275-1-PB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Ettiene, G., Bauza, R., Medina, D., Silva, N., Raga, J., Sandoval, L., Quiros, M., Petit, Y., Dorado, I., y Poleo, N. (2013). Validación de un método para la determinación de imidacloprid en frutos de guayabo (*Psidium guajava* L.) empleando dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía líquida de alta resolución. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 30(2), 193–216.
<https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/27123/27745>.

García-Lara, S., y Serna-Saldivar, S. (2019). Corn History and Culture. In *Corn* (pp. 1–18). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00001-2>.

Ghorbanpour, M., Hadian, J., Nikabadi, S., y Varma, A. (2017). Importance of Medicinal and Aromatic Plants in Human Life. In *Medicinal Plants and Environmental Challenges* (pp. 1–23). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_1.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

- Grassmann, J., Hippeli, S., Spitzenberger, R., y Elstner, E. (2005). The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and β -carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytomedicine*, 12(6), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.10.005>.
- Grob, R. (2004). Introduction. In *Modern Practice of Gas Chromatography* (pp. 1–21). John Wiley & Sons, Inc. http://ead2.ctgas.com.br/a_rquivos/inspecao_sistemas_de_gas/Cromatografia/Biblioteca/Modern_Practice_of_Gas_Chromatography_Handbook.pdf.
- Henao, S., Martínez, J., Pacheco, N., y Marín, J. (2011). Actividad bactericida de extractos acuosos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown contra *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 26(2), 82–87. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-99572011000200002&script=sci_arttext.
- Hovick, S., y Whitney, K. (2014). Hybridisation is associated with increased fecundity and size in invasive taxa: meta-analytic support for the hybridisation-invasion hypothesis. *Ecology Letters*, 17(11), 1464–1477. <https://doi.org/10.1111/ele.12355>.
- Karasová, G., Branšterová, E., y Lachová, M. (2003). Matrix solid phase dispersion as an effective preparation method for food samples and plants before HPLC analysis - a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 21(6), 219–234. <https://doi.org/10.17221/3501-CJFS>.
- Kempe, K., y Gils, M. (2011). Pollination control technologies for hybrid breeding. *Molecular Breeding*, 27(4), 417–437. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9555-0>.
- Kiani, S., Minaei, S., y Ghasemi-Varnamkhasi, M. (2016). Application of electronic nose systems for assessing quality of medicinal and aromatic plant products: A review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.12.002>.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

- Kumar, A. (2018). Significance of medicinal plants in human life. In *Synthesis of Medicinal Agents from Plants* (pp. 1–24). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102071-5.00001-5>.
- Kutka, F. (2011). Open-Pollinated vs. Hybrid Maize Cultivars. *Sustainability*, 3(9), 1531–1554. <https://doi.org/10.3390/su3091531>.
- Llorens-Molina, J. (2021). Los aceites esenciales y su actividad biológica. Una propuesta didáctica. *Anales de Química de La RSEQ*, 117(2), 165–170. <https://analesdequimica.es/index.php/AnalesQuimica/article/view/1670>.
- Mayfield, E. (2021). *Illustrated Plant Glossary*. CSIRO Publishing. <https://www.publish.csiro.au/book/7373#preview>.
- Mitchell, N., Campbell, L., Ahern, J., Paine, K., Giroldo, A., y Whitney, K. (2019). Correlates of hybridization in plants. *Evolution Letters*, 3(6), 570–585. <https://doi.org/10.1002/evl3.146>
- Mitchell, N., y Holsinger, K. (2018). Cryptic natural hybridization between two species of *Protea*. *South African Journal of Botany*, 118, 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.12.002>.
- Paternina, G. (2018). *Estudio de los caracteres anatómicos e histoquímicos de especies de Verbenacea presentes en el Departamento de Sucre, Colombia* [Tesis de pregrado, Universidad de Sucre]. <https://repositorio.unisucre.edu.co/handle/001/607>.
- Payseur, B., y Rieseberg, L. (2016). A genomic perspective on hybridization and speciation. *Molecular Ecology*, 25(11), 2337–2360. <https://doi.org/10.1111/mec.13557>.
- Salamanca, M., y Sánchez, M. (2009). *Extracción y caracterización de la oleorresina del orégano (Origanum vulgare)* [Tesis de pregrado, Universidad Tecnológica de Pereira]. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/1ba541a0-4f34-4714-a57c-7d35aed1a179/content>.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

- Salomón-Torres, R., Krueger, R., García-Vázquez, J. P., Villa-Angulo, R., Villa-Angulo, C., Ortiz-Uribe, N., Sol-Uribe, J. A., y Samaniego-Sandoval, L. (2021). Date Palm Pollen: Features, Production, Extraction and Pollination Methods. *Agronomy*, 11(3), 504. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030504>.
- Sánchez, M., Bonilla, C., y Guzmán, S. (2004). *El Cultivo de Pronto Alivio Lippia alba (Miller.) N.E. Brown ex Britton and Wilson*. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8727>.
- Sena, J., Xavier, H., Barbosa, J., y Durringer, J. (2010). A Chemical Marker Proposal for the *Lantana* genus: Composition of the Essential Oils from the Leaves of *Lantana radula* and *L. canescens*. *Natural Product Communications*, 5(4), 635–640. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500429>.
- Shukla, K., Sbrizzi, S., Laursen, A., Benavides, J., y Campbell, L. (2020). Hybridization Slows Rate of Evolution in Crop-Wild Compared to Wild Populations of Weedy *Raphanus* Across a Moisture Gradient. *Frontiers in Agronomy*, 2, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fagro.2020.600346>.
- Silva, P., Viccini, L., Singulani, J., Pessoa, E., Zani, C., y de Almeida, T. (2010). Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 843–849. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000040>.
- Stashenko, E., Martínez, J., Durán, D., Córdoba, Y., y Caballero, D. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38, 89–105. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.156>.

HIBRIDACIÓN ENTRE ESPECIES DE VERBENACEAE

- Stearn, W. (1983). *Botanical Latin* (3rd edition). British Library.
<https://archive.org/details/BOTANICALLATINWILLIAMSTEARN/mode/2up>
- Taylor, S., y Larson, E. (2019). Insights from genomes into the evolutionary importance and prevalence of hybridization in nature. *Nature Ecology & Evolution*, 3(2), 170–177.
<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0777-y>.
- Tofiño, A. (2017). Vigilancia tecnológica de plantas aromáticas: de la investigación a la consolidación de la agrocadena colombiana. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 353–377.
https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:636.
- Van der Veen, M. (2014). The materiality of plants: plant–people entanglements. *World Archaeology*, 46(5), 799–812. <https://doi.org/10.1080/00438243.2014.953710>.
- Vidal, E., y Ruíz, Y. (2010). Caracteres fenotípicos de la f1 y f2 de híbridos de cruzamientos recíprocos entre seis líneas de frijol común. *Investigación Valdizana*, 4(1), 16–21.
<https://www.redalyc.org/pdf/5860/586061881004.pdf>.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Correa-Royero, J., & Betancur-Galvis, L. (2009). Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 215–222.
<http://www.scielo.org.co/pdf/suis/v41n3/v41n3a02.pdf>