

**Estudio de la diversidad y estructura genética de poblaciones de *Lippia origanoides* en el
Cañón del Chicamocha de la cordillera oriental de Colombia**

Liliana Santamaría Acevedo

Trabajo de Investigación para optar al título de Magíster en Biología

Director

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

PhD. en ciencias agrícolas

Co-Director

Fernando Rondón González

PhD. en Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Maestría en Biología

Bucaramanga

2017

Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Materiales y métodos	14
1.1 Material Vegetal.....	14
1.2 Extracción de ADN.....	16
1.3 Evaluación de cebadores microsatélites.....	17
1.4 Evaluación de loci microsatélites en las poblaciones de <i>Lippia origanoides</i>	18
1.5 Análisis de Diversidad y Estructura Genética	19
1.6 Capacidad de las secuencias microsatélites para distinguir diferentes especies del genero <i>Lippia</i>	20
2. Resultados.....	21
2.1 Evaluación y caracterización de loci microsatélites de <i>Lippia origanoides</i>	21
2.2 Diversidad y Estructura Genética de <i>Lippia origanoides</i>	23
2.3 Transferibilidad de loci microsatélites entre especies del género <i>Lippia</i>	30
2.4 Capacidad de las secuencias microsatélites para distinguir diferentes especies del genero <i>Lippia</i>	32
3. Discusión.....	34
3.1 Evaluación y caracterización de loci microsatélites de <i>Lippia origanoides</i>	34

3.2 Análisis de la diversidad y estructura genética de las localidades de <i>Lippia origanoides</i> en la Cuenca baja del cañón del río Chicamocha.	35
3.3 Evaluación de cebadores microsatélites y su transferibilidad entre especies del género <i>Lippia</i>	37
3.4 Utilidad de secuencias microsatélites de <i>L. origanoides</i> para el estudio de relaciones genéticas de especies del género <i>Lippia</i>	39
4. Conclusiones	41
5. Recomendaciones.	42
Referencias Bibliográficas	43
Apéndices.....	52

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Localidades de la cuenca baja del cañón del río Chicamocha, en el departamento de Santander, Colombia, donde se desarrolló el muestreo del presente estudio.	15
<i>Figura 2.</i> Valores de F_{ST} entre parejas de localidades. Los valores más altos están en colores oscuros, valores negativos se visualizan en tonos cercanos al blanco.....	26
<i>Figura 3.</i> Estructura de la diversidad Genética estimada mediante el software Structure. a) Cada individuo está representado por una única línea vertical dividida en K (K=5) segmentos de colores, con tamaños proporcionales a su contribución al individuo. b) Estructura poblacional	

para 103 muestras de *Lippia origanoides*. Los números 1-10 representan las 10 localidades denominadas Los Santos, La Mina, La Laguna, Umpalá-La Torre, Umpalá, Paloblanco, K6+700, Jordán1, Jordán2 y Jordán3, respectivamente..... 28

Figura 4. ΔK calculado como $\Delta K = m|L''(K)|/s[L(K)]$. El valor modal de esta distribución corresponde al verdadero K (*) o el nivel más alto de estructura..... 29

Figura 5. Transferibilidad de cebadores entre especies de *Lippia*. Los nodos representan las especies de *Lippia* y su tamaño es proporcional al número de cebadores específicos que amplificaron. Las flechas indican la dirección de la transferibilidad de los cebadores 31

Figura 6. Árboles de Agrupamiento basados en datos de marcadores SMR (izquierda) y microsatélites (derecha). Ambos árboles fueron construidos usando el método de vecino más próximo según se indica en materiales y métodos..... 33

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Localidades de muestreo agrupadas por municipio. También se incluyen las coordenadas geográficas y la altitud por localidad así como el número de individuos colectados en cada una.</i>	15
Tabla 2. <i>Porcentaje de amplificación de loci microsatélites en la población total de L. origanoides.</i>	21

Tabla 3. Número y tipos de alelos, valores de Heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) y contenido de información polimórfica (PIC) para cada marcador microsatélite polimórfico. Se presentan el número total de alelos (A_T) y de alelos frecuentes (A_F), raros (A_R) y únicos (A_U)......	23
Tabla 4. Valores de diversidad génica (H_s) y coeficiente de endogamia (F_{IS}) para cada localidad.	24
Tabla 5. Valores de N_M (por encima de la diagonal) y F_{ST} (por debajo de la diagonal), para cada pareja de poblaciones calculados usando el software Arlequin. Los valores en negrilla destacan los valores más altos en cada caso. Los valores sombreados en la diagonal indican el promedio de diferenciación genética (F_{ST}) de una localidad respecto a las demás.	24
Tabla 6. Análisis jerárquico de Varianza Molecular (AMOVA) de la variación genética de <i>L. origanoides</i>	27
Tabla 7. Probabilidades <i>a priori</i> y <i>a posteriori</i> del mejor K.	28
Tabla 8. Contribución de los diferentes grupos ancestrales a las bases genéticas de las poblaciones de <i>L. origanoides</i> en cada localidad estudiada Los valores en negrilla destacan aquellos valores mayores a 0,100.	30

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Información sobre las secuencias cebadores para <i>loci microsatélites</i> usadas en el presente estudio.	52
Apéndice B. Variantes alélicas de los loci estudiados en <i>Lippia organoides</i>	55
Apéndice C. Haplotipos de <i>Lippia</i> definidos al 100% de identidad a partir de secuencias del gen RNAr 18S.	56
Apéndice D. Transferibilidad (%) de loci microsatélites entre especies del género <i>Lippia</i>	57

Resumen

Título: Estudio de la diversidad y estructura genética de poblaciones de *Lippia origanoides* en el Cañón del Chicamocha de la cordillera oriental de Colombia*

Autor: Liliana Santamaría Acevedo**

Palabras Claves: SSR, Neotrópico, diversidad genética.

Descripción

Lippia origanoides es una especie silvestre de interés agrícola, cosmético y farmacéutico. Conocer su grado de diversidad genética, es requisito indispensable para soportar esfuerzos dirigidos al mejoramiento y establecimiento de cultivos comerciales. Se evaluó la diversidad y el grado de estructura genética en poblaciones de *L. origanoides* de la cuenca baja del cañón del río Chicamocha, usando 23 secuencias microsatélites desarrolladas para la especie mediante análisis de secuenciación de alta cobertura. Se detectó el polimorfismo microsatélite en 103 especímenes colectados, en diez localidades de la cuenca baja del río Chicamocha. A partir de los alelos detectados, se estimaron parámetros que permitieron evaluar la diversidad genética a nivel de locus y poblacional. De igual manera, se realizaron diferentes análisis dirigidos a conocer el grado de estructura genética en la población total. De los 23 pares de cebadores microsatélites desarrollados, 21 mostraron amplificación robusta del correspondiente locus en *L. origanoides* y varios de ellos estuvieron representados en especies relacionadas como: *L. graveolens* (20), *L. alba* (11), *L. micromera* (11), *L. americana* (9) y *L. canescens* (4). Quince (15) loci microsatélites polimórficos, se mostraron en desequilibrio HW ($p \leq 0,05$) con una heterocigosidad promedio (H) de 0,403 (0,021–0,945). La diversidad genética promedio (H_T) en *L. origanoides* para las diez localidades fue de 0,45 (0,36–0,51). El análisis de estructura genética mostró la existencia de cinco grupos ancestrales, un bajo pero significativo nivel de diferenciación genética y flujo genético entre localidades. En conclusión, los loci microsatélites estudiados son útiles para el estudio del polimorfismo genético de poblaciones de *L. origanoides* y de especies relacionadas. La población de *L. origanoides* de la cuenca baja del cañón del río Chicamocha, muestra moderada diversidad genética y baja estructura poblacional.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Maestría en Biología. Director: Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Codirector: Dr. Fernando Rondón González.

Abstract

Title: Study of the genetic diversity and population structure of *Lippia Origanoides* in the Chicamocha Canyon of the eastern cordillera of Colombia*

Author: Liliana Santamaría Acevedo**

Keywords: SSR, Neotropics genetic diversity.

Description

Lippia origanoides is a wild species of agricultural, cosmetic and pharmaceutical interest. Knowing their degree of genetic diversity is an indispensable requirement to support efforts aimed to the improvement and establishment of commercial crops. The diversity and the degree of genetic structure in populations of *L. origanoides* of the low basin of the Chicamocha river cane were evaluated, using 23 microsatellite sequences developed for the species, through a high coverage sequencing analysis. Microsatellite polymorphism was detected in 103 specimens collected at ten locations in the lower basin of the Chicamocha River, from PCR amplification. From the detected alleles, parameters were estimated that allowed the evaluation of the genetic diversity at the locus and population level. In the same way, different analyzes were conducted aimed to knowing the degree of genetic structure in the global population. Of the 23 pairs of microsatellite primers developed, 21 showed robust amplification of the corresponding locus in *L. origanoides* and some were represented in related species such as *L. graveolens* (20), *L. alba* (11), *L. micromera* (11), *L. americana* (9) and *L. canescens* (4). Fifteen (15) polymorphic microsatellite loci in *L. origanoides* were shown to be in HW disequilibrium ($p \leq 0.05$) with an average heterozygosity (H) of 0.403 (0.021-0.945). The average genetic diversity (H_T) for the ten localities was 0.45 (0.36-0.51). The analysis of genetic structure showed the existence of five genetic ancestral groups, a low but significant level of genetic differentiation and genetic flow between locations. In conclusion, the microsatellite loci studied are useful in the study of the genetic polymorphism of populations of *L. origanoides* and related species. The population of *L. origanoides* from the lower basin of the Chicamocha river canyon shows a moderate genetic diversity and low population structure.

* Research Work

** Science Faculty. Biology School. Master in Biology. Director: Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Codirector: Dr. Fernando Rondón González

Introducción

Lippia origanoides H.B.K., es una especie de planta aromática perteneciente a la familia Verbenaceae que habita en zonas áridas y semiáridas del norte de Sur América. En Colombia, se conoce comúnmente como “Orégano de monte” y ha sido identificada en los departamentos de La Guajira, Magdalena, Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Cauca y Nariño (Albesiano et al., 2003). Existe un creciente interés por la especie *L. origanoides*, debido a que sus aceites esenciales muestran un amplio espectro de bioactividad entre las que se encuentran: antibacteriana y antimicótica (Dos Santos et al., 2004; Méndez et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Bueno-Sánchez et al., 2009), antiviral (Meneses et al., 2009), antiparasitaria (Escobar et al., 2010), antioxidante (Stashenko et al., 2008), antigenotóxica (Vicuña et al., 2010) y repelente de insectos (Nerio et al., 2009). Estos hallazgos, y la importante diversidad química de sus aceites esenciales (Stashenko et al., 2010; Stashenko et al., 2013), soportan a *L. origanoides* como una especie de alto potencial para las industrias cosmética y farmacéutica.

Pese a lo anterior, el conocimiento sobre la biología reproductiva, grado de diversidad y estructuración genética de las poblaciones de *L. origanoides* es limitado. Conocer sobre su biología reproductiva y el sistema de dispersión de semillas es importante porque estos influyen directamente sobre la diversidad genética y su distribución espacial (Wright, 1946). Con base en estudios de especies relacionadas como *Lippia graveolens* Kunth (Oregano mexicano), se cree que *L. origanoides* sea una especie monoica con producción de flores hermafroditas; sin embargo, un sistema de reproducción dioico, ya identificado en otras especies del género *Lippia*,

no puede ser descartado (Ocampo-Velázquez et al., 2009). Adicionalmente, dos trabajos previos han estudiado la diversidad y estructura genética de esta especie en el Cañón del Río Chicamocha de Colombia (Suárez et al., 2008; Vega-Vela y Chacón-Sánchez, 2012). El primero (Suárez et al. 2008), mostró que las poblaciones en la cuenca baja del cañón del río Chicamocha en el departamento de Santander exhiben una relativamente alta diversidad genética y un bajo nivel de diferenciación genética entre localidades. El segundo trabajo (Vega-Vela y Chacón-Sánchez, 2012), indicó que la diversidad y estructura genética de las poblaciones de la especie es muy influenciada por el gradiente de altitud formado en la cuenca del cañón. A pesar de que este estudio constituye una útil aproximación a la estructura y distribución espacial de las poblaciones de *L. origanoides* en el oriente colombiano, se requiere estudiar nuevas poblaciones en nuevos municipios y localidades para conocer mejor la diversidad y dinámica poblacional de esta especie. Vale destacar, que el mencionado estudio fue desarrollado con marcadores multi-locus de tipo dominantes como los AFLP (Vos et al., 1995); los cuales reflejan solo parcialmente la diversidad alélica contenida en las poblaciones y por ende su real diversidad (Nei, 1973; Nei y Li, 1979). Recientemente, se desarrollaron marcadores tipo microsatélites de naturaleza co-dominante para especies silvestre relacionadas como *Phyla canescens* y *Lippia alba* (Fatemi y Gross, 2008; Santos et al., 2012); sin embargo, el uso de tales marcadores en estudios poblacionales de *L. origanoides* requerirán evaluar su diversidad alélica y transferibilidad a la especie.

La deforestación y la degradación del hábitat generan un impacto negativo sobre la diversidad genética de las poblaciones de plantas silvestres (Ledig, 1992). Si disminuye la diversidad genética de una especie, se reduce su capacidad de respuesta en el ecosistema frente a cambios climáticos y enfermedades (Hartl y Clark, 1997; Hamilton, 1999; Schaberg et al., 2008). Aunque

no hay indicativo de que la especie *L. origanoides* esté actualmente amenazada en algún grado (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2013), sí existe preocupación por la creciente intervención humana con fines turísticos y por la erradicación de parches silvestres para sembrar cultivos comerciales (tabaco, lulo, habichuela y frijol entre otros) en el área geográfica del cañón del Chicamocha. Estos factores podrían conducir a un deterioro gradual de su hábitat natural y a una reducción del tamaño de las poblaciones de esta especie y por ende de su diversidad genética.

Las oportunidades para mejorar el germoplasma de la especie *L. origanoides* para nutrición, resistencia a enfermedades y valor adquirido; requieren un mejor entendimiento de las complejidades de su diversidad y estructura poblacional. Nuestro grupo de investigación en colaboración con investigadores de la Universidad de Purdue, secuenció recientemente el genoma de esta especie usando tecnología Illumina. La información generada permitió la identificación *in silico* de nuevos loci microsatélites para la especie *L. origanoides* y el diseño de cebadores específicos para estudios genéticos de las poblaciones de la especie mediante técnicas de PCR y de secuenciación genómica (Fuentes y Levy, 2014). Dado que el conocimiento sobre la diversidad genética y estructura poblacional de las especies vegetales, es requisito para soportar su continuo mejoramiento y sostenibilidad (Aggarwal et al., 2002; Fuentes et al., 2004; Arteché et al., 2005; Jayamani et al., 2007; Stępień et al., 2007; Glaszmann et al., 2010; Huang et al., 2002), el presente proyecto tiene como objetivo estudiar la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *L. origanoides* en la cuenca baja del cañón del río Chicamocha, usando marcadores microsatélites. Al evaluar la información de trabajos previos con la especie (Suárez et al., 2008; Vega-Vela y Chacón-Sánchez, 2012), donde se establece que la diversidad de las poblaciones de *L. origanoides* es más alta en la cuenca baja del Cañón del río Chicamocha, se

espera encontrar una alta diversidad genética y estructura poblacional para esta especie usando marcadores microsatélites.

Son objetivos específicos del presente proyecto los siguientes:

- 1) Evaluar la diversidad genética y estructura de las poblaciones de *L. origanoides* en la cuenca baja del cañón del río Chicamocha, usando marcadores microsatélites
- 2) Evaluar si los mencionados marcadores microsatélites pueden ser usados en estudios genéticos de otras especies de *Lippia* presente en Colombia.

1. Materiales y métodos

1.1 Material Vegetal.

El material vegetal de estudio consistió en 103 especímenes de la especie *L. origanoides* colectados en diez localidades diferentes de la cuenca baja del cañón del río Chicamocha (Tabla 1; Figura 1). Las colectas fueron realizadas durante los meses de septiembre del 2011 (Localidades LS, LM, LL, ULT, U, P y K) y octubre del 2013 (Localidades J1, J2 y J3); considerando la información sobre la ubicación de parches o poblaciones de la especie identificadas en expediciones previas desarrolladas por el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales - CENIVAM. De cada espécimen fueron tomadas aproximadamente 15-20 hojas y se tuvo precaución de no tomar muestras de especímenes contiguos. Estas hojas fueron guardadas en

bolsas zip-lock con gel de sílice y conservadas a -80°C hasta el momento de la extracción de ADN, según se indica en el siguiente acápite.

Tabla 1. *Localidades de muestreo agrupadas por municipio. También se incluyen las coordenadas geográficas y la altitud por localidad así como el número de individuos colectados en cada una.*

Municipio	Localidad	Coordenadas	Altitud (msnm)	N
Los Santos	Los Santos (LS)	N $06^{\circ}45.324'$ W $073^{\circ}05.672$	1408	7
	La Mina (LM)	N $06^{\circ}47.871'$ W $073^{\circ}10.862$	904	10
	La Laguna (LL)	N $06^{\circ}46.585'$ W $073^{\circ}07.411$	1352	3
Piedecuesta	Umpalá - La Torre (ULT)	N $06^{\circ}51.264'$ W $072^{\circ}59.009$	1077	12
	Umpalá (U)	N $06^{\circ}50.597'$ W $072^{\circ}58.635$	791	10
Aratoca	Paloblanco K38 (P)	N $06^{\circ}46.151'$ W $073^{\circ}00.227$	1471	9
	K6 + 700 (K)	N $06^{\circ}46.258'$ W $072^{\circ}59.350$	952	14
	Jordán (J3)	N $06^{\circ}43.043'$ W $073^{\circ}05.920$	724	13
Jordán	Jordán (J1)	N $06^{\circ}42.295'$ W $073^{\circ}05.880$	1282-98	5
	Jordán (J2)	N $06^{\circ}42.792'$ W $073^{\circ}05.967$	858-63	20

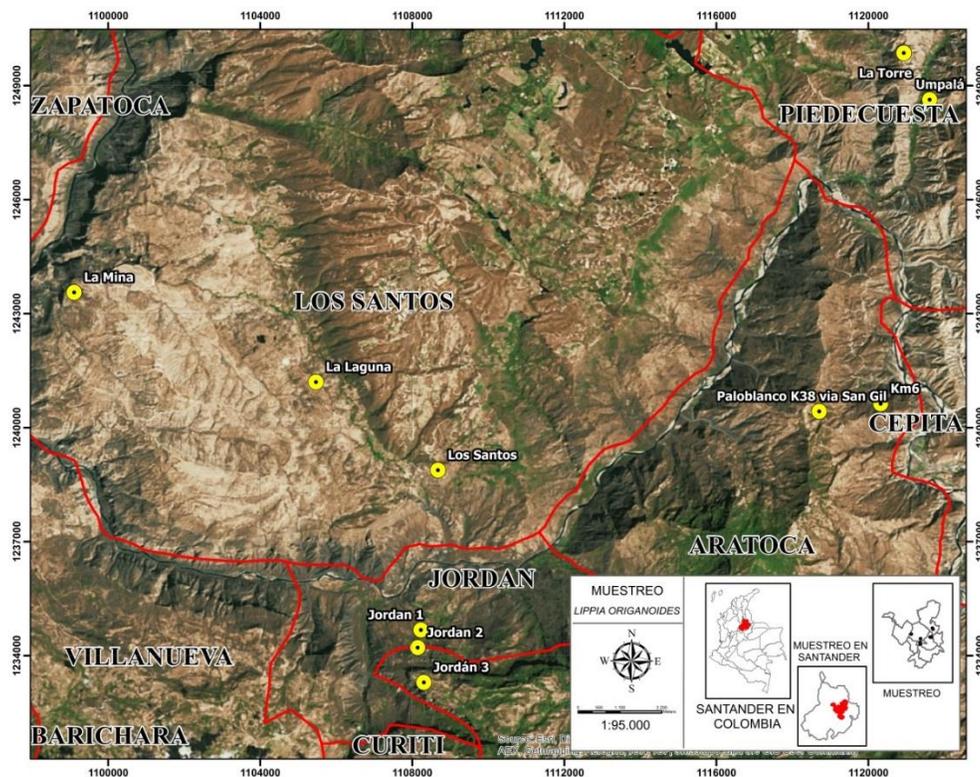


Figura 1. Localidades de la cuenca baja del cañón del río Chicamocha, en el departamento de Santander, Colombia, donde se desarrolló el muestreo del presente estudio.

Adicionalmente, y con el fin de evaluar la utilidad de las secuencias microsatélites en especies relacionadas del género *Lippia*, se usaron ocho muestras identificadas por el Herbario Nacional de Colombia (HNC, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá); las cuales fueron cultivadas en las instalaciones del CENIVAM. Estas son: *L. alba* (COL512272), *L. americana* (COL578970), *L. canescens* (COL578969), *L. graveolens* (COL555839), *L. micromera* (COL516924) y tres (3) quimiotipos de la especie *L. origanoides* (COL519799, COL512075 y COL519798) definidos con base en la composición de sus aceites esenciales (Stashenko et al., 2008).

1.2 Extracción de ADN.

Se realizaron extracciones de ADN de los 103 especímenes de *L. origanoides* y de los ocho especímenes provenientes del CENIVAM usando el procedimiento descrito por Dellaporta et al. (1983) con pequeñas modificaciones como se describe a continuación:

- 1) Pesar 1 g de tejido fresco de la planta y pulverizar con Nitrógeno líquido en un mortero previamente enfriado.
- 2) Añadir 8 ml de Buffer de Extracción (50mM TRIS pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 20mM β -Mercaptoetanol; 10% SDS), mezclar bien e incubar a 65°C durante 1 hora.
- 3) Añadir 2 mL de (5M) Acetato de Potasio, agitar vigorosamente, e incubar en hielo durante 30 minutos.
- 4) Centrifugar a 14000 rpm durante 30 minutos.
- 5) Filtrar el sobrenadante por malla Miracloth hacia un tubo con 8 ml de isopropanol frio, mezclar suavemente.
- 6) Incubar a -20°C, 30 minutos.
- 7) Colectar el ADN precipitado con micropipeta con puntas cortadas y pasar a tubo de eppendorff con 300 μ L de buffer TE.
- 8) Añadir 2 μ L de RNAasa (10mg/mL) e incubar 1 hora a 37°C.
- 9) Adicionar 30 μ L de Acetato de Sodio (3M) y

250 μ L de isopropanol frío. 10) Incubar a -20°C , durante 1 hora. 11) Centrifugar a 14 000 rpm, 0°C , 10 minutos. Descartar el sobrenadante. 12) Resuspender el ADN en 200 μ L de TE.

Con el fin de eliminar cualquier impureza que quedara presente en el ADN, este fue purificado mediante el método de Fenol:Cloroformo (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). La calidad y concentración de los ADN extraídos fueron comprobadas mediante los métodos espectrofotométricos y electroforéticos descrito por Sambrook et al. (1989).

1.3 Evaluación de cebadores microsatélites.

En el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presenta información sobre los cuarenta (40) pares de cebadores microsatélites que fueron estudiados en la presente tesis. Nueve (9) de estos, fueron previamente identificados en la especie *L. canescens* (Fatemi y Gross, 2008), ocho (8) fueron descritos en la especie *L. alba* (F. R. C. Santos et al., 2012). Los veintitrés (23) restantes, fueron desarrollados por el grupo de investigación para la especie *L. origanoides* (Fuentes y Levy, 2014). Los 40 pares de cebadores fueron evaluados en los 103 especímenes provenientes de diez localidades diferentes de la cuenca baja del cañón del río Chicamocha y en las ocho (8) muestras de referencia del CENIVAM.

Los diferentes loci microsatélites fueron amplificados usando una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y los correspondientes cebadores descritos para cada locus (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La composición de la mezcla de reacción (30 μ l) fue la siguiente: Buffer 1X, 0,2mM de dNTPs, 0,23 μ M de *forward primer* y 0,23 μ M de *reverse primer*, 2U de DreamTaq™ DNA Polimerasa (Fermentas, USA) y 10 ng de ADN molde. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador MasterCycler® Nexus (Eppendorf,

Alemania) usando un programa tipo “touchdown PCR” (Korbie y Mattick, 2008) como sigue: 94°C/1min seguido de 15 ciclos de 94°C/30s, 64°C/45s (-1°C/ciclo), 72°C/45s seguido de 20 ciclos de 94°C/30s, 49°C/20s, 72°C/45s y una fase final de extensión de 72°C/10min.

Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de alta resolución (3:1 HRB™, AMRESCO, USA) preparados al 3% y usando el colorante fluorescente EZ-VISION (AMRESCO, USA). El tamaño de los fragmentos amplificados se determinó por interpolación usando un DNA patrón (ADN GeneRuler 50 pb, Thermo Scientific, USA) con un rango de tamaños entre 50 y 1000 pb. Los geles fueron documentados usando un Sistema de Foto-documentación de Geles (Syngene, USA). La determinación de las bandas fue realizada con el software GeneTools (Syngene, USA) y posteriormente corroborada visualmente. Dado la naturaleza co-dominante del marcador usado, los microsatélites por especímenes fueron anotados como genotipos homocigóticos y heterocigóticos, distinguiendo los diferentes patrones o combinaciones alélicas y posteriormente anotando los alelos. Con todos los datos anotados, se construyó una plantilla Microsoft Excel que sirvió de base a los diferentes análisis desarrollados en el trabajo.

1.4 Evaluación de loci microsatélites en las poblaciones de *Lippia origanoides*

Para cada locus microsatélite estudiado en la población total (103 especímenes) se calculó: i) el número total de alelos, ii) el número de alelos frecuentes o alelos presentes en más del 10% de los individuos analizados, iii) el número de alelos raros o alelos presentes entre el 2 y 10% de los individuos analizados, iv) el número de alelos únicos o alelos presentes en un solo espécimen, v) la heterocigosidad observada (H_o), vi) la heterocigosidad esperada (H_E) con ayuda del programa

GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) y, vii) el contenido de información polimórfica (PIC, de sus siglas en inglés) con ayuda del programa MolKin 3.0 (Gutiérrez et al., 2005)

1.5 Análisis de Diversidad y Estructura Genética

Para las localidades estudiadas se calcularon los índices de diversidad génica para una población subdividida (Nei, 1973): Diversidad génica o heterocigosidad en la población total (H_T), Diversidad génica para cada población (H_s) y el índice de diferenciación génica entre poblaciones ($G_{ST} = 1 - (H_s/H_T)$). En la evaluación de la estructura genética poblacional se desarrolló un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) según lo propuesto por Excoffier et al. (1992). Dicho análisis, se basó en los índices de fijación F de Wright (Wright, 1949): diferenciación genética entre poblaciones (F_{ST}), coeficiente de endogamia de poblaciones (F_{IS}) y coeficiente de endogamia total (F_{IT}). Para cada par de localidades se calcularon y compararon el número efectivo de migrantes (N_M) y el índice de diferenciación genética (F_{ST}) entre parejas de localidades usando el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Con el fin de inferir estructura poblacional se desarrolló un análisis bayesiano utilizando el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para ello, se desarrollaron 20 corridas de 150.000 repeticiones bajo el modelo de Ancestría con mezcla y de frecuencias alélicas independientes, evaluando el número de poblaciones (K) de 1 a 10 (en correspondencia con el número de localidades estudiadas). Los modelos implementados se escogieron ya que son más razonables para manejar con muchas de las complejidades de poblaciones naturales. La mezcla es una característica común de datos reales. De igual manera, el modelo de frecuencias independientes supone que se espera que las frecuencias alélicas sean diferentes entre ellas en

diferentes poblaciones (Pritchard, Wen y Falush, 2010). Para determinar el número de grupos o poblaciones ancestrales, se consideró el mayor valor DeltaK o aquel valor de K con mayor probabilidad (Zeisset y Beebee, 2001; Ciofi et al., 2002; Vernesi et al., 2003; Hampton et al., 2004).

1.6 Capacidad de las secuencias microsatélites para distinguir diferentes especies del género *Lippia*.

Se evaluó el potencial de los 40 marcadores microsatélites para estudios genéticos de especies estrechamente relacionadas del género *Lippia*, midiendo el porcentaje de transferibilidad de los marcadores entre las especies. Adicionalmente, se evaluó su capacidad de discriminar especies del género *Lippia* en relación con un marcador genético (gen ribosomal 18S) de amplio uso en estudios taxonómicos de plantas. Para ello, usamos la base de datos del gen ribosomal 18S de especies de *Lippia* disponibles en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Escuela de Biología de la UIS. A tales fines, se construyeron matrices de distancias a partir de datos de secuencias de la subunidad menor del ribosoma (SMR) o gen ribosomal 18S y de los microsatélites usando los programas Mega 6.0 (Tamura et al., 2013) y Windist (Yap y Nelson, 1996), respectivamente. Las matrices de distancia fueron usadas para construir árboles de agrupamiento mediante el Método del Vecino más Próximo (Saitou y Nei, 1987) en el programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013).

2. Resultados.

2.1 Evaluación y caracterización de loci microsatélites de *Lippia origanoides*

En el presente estudio, se evaluó la utilidad de cuarenta (40) cebadores microsatélites desarrollados en las especies *L. alba* (8), *L. canescens* (9) y *L. origanoides* (23), para los estudios genéticos en la especie *L. origanoides*. De estos cebadores microsatélites, solo 23 cebadores amplificaron adecuadamente en las muestras de 103 especímenes de *L. origanoides* de la cuenca baja del cañón del río Chicamocha (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

El porcentaje de amplificación de estos loci microsatélites en la muestra poblacional estuvo entre el 3% en Lo33 y el 89% en Lo5 (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de amplificación de loci microsatélites en la población total de *L. origanoides*.

Cebadores	% de Amplificación
Lo 2a (AG)	76,984127
Lo 2b (AG)	81,7460317
Lo 2c (AG)	69,8412698
Lo 2d (TA)	80,952381
Lo 2e (TA)	81,7460317
Lo 3a (CT)	65,0793651
Lo 3b (CT)	87,3015873
Lo 5a (GAA)	88,8888889
Lo 5b (GAA)	72,2222222
Lo 9 (TA)	79,3650794
Lo 11a (AG)	84,1269841
Lo 11b (TA)	81,7460317

Cebadores	% de Amplificación
Lo 11c (TC)	87,3015873
Lo 13 (TAT)	86,5079365
Lo 16 (CAATAG)	89,6825397
Lo 19 (TA)	73,015873
Lo 20 (TA)	80,952381
Lo 25 (TA)	80,1587302
Lo 26 (AT/TA)	88,0952381
Lo 33 (GGGTTG)	3,1746032
Lo 37 (AG)	54,7619048
La 02 (TTAAT)	45,2380952
Phc 17 (TC)	81,7460317

Los tipos de repeticiones microsatélites más frecuentes en la población fueron di-nucleótidos del tipo TA (35%) y AG (22%); aunque en menor porcentajes también están presente las repeticiones di-nucleótidos del tipo CT (9%) y TC (9%), tri-nucleótidos del tipo GAA (9%) y TAT (4%), penta-nucleótidos del tipo TTAAT (4%), y hexa-nucleótidos del tipo CAATAG (4%) y GGGTTG (4%).

De los 23 cebadores indicados anteriormente, 15 marcadores microsatélites (Lo2, Lo3, Lo5, Lo9, Lo11, Lo13, Lo16, Lo19, Lo20, Lo25, Lo26, Lo33, Lo37, La02 y Phc17) que se encuentran en desequilibrio Hardy-Weinberg (valores de $p < 0,0001$, datos no presentados), resultaron polimórficos en la muestra poblacional. Para estos 15 marcadores se detectaron un total de 58 alelos (Tabla 3, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), con un valor promedio de 3,87 alelos por marcador. Como promedio, 2,27 de estos alelos estuvieron presentes en más del 10% de los especímenes (alelos frecuentes), 0,8 de estos estuvieron presente entre el 2–10% de los especímenes (alelos raros), 0,7 de estos estuvieron presentes en un individuo (alelos únicos). La heterocigosidad observada (H_o) estuvo entre 0,021 en el marcador Lo5b y 0,945 en Lo3b, con un valor promedio (H_{AV}) de 0,403; mientras que la heterocigosidad esperada (H_E) estuvo entre

0,101 en Lo2a y 0,693 en Lo2e con valor promedio (H_{AV}) de 0,45. Los valores de PIC para cada marcador microsatélite indicaron que los marcadores más informativos fueron Lo2b, Lo2e, Lo5a, Lo11b y Lo20.

Tabla 3. Número y tipos de alelos, valores de Heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_E) y contenido de información polimórfica (PIC) para cada marcador microsatélite polimórfico. Se presentan el número total de alelos (A_T) y de alelos frecuentes (A_F), raros (A_R) y únicos (A_U).

Marcadores microsatélites (Largo del fragmento en pb)	A_T	A_F	A_R	A_U	H_O	H_E	PIC (%)
Lo 2a (AG) (200-228)	3	1	2	0	0,062	0,101*	15,33
Lo 2b (AG) (311-350)	4	3	0	1	0,607	0,626*	62,69
Lo 2c (AG) (275-304)	3	1	2	0	0,172	0,241*	28,50
Lo 2e (TA) (GA) (78-128)	8	4	3	1	0,398	0,693*	74,63
Lo 3b (CT) (274-313)	2	2	0	0	0,945	0,494*	37,38
Lo 5a (GAA) (213-438)	7	2	1	3	0,935	0,627*	59,65
Lo 5b (GAA) (254-434)	4	1	0	3	0,021	0,030*	3,31
Lo 11a (AG) (362-410)	4	3	0	1	0,238	0,305*	40,97
Lo 11b (TA) (N) (196-210)	4	2	2	0	0,153	0,497*	57,28
Lo 11c (TC) (N) (375-424)	2	2	0	0	0,620	0,373*	32,02
Lo 13 (TAT) (132-185)	4	3	0	1	0,287	0,479*	47,51
Lo 16 (CAATAG) (426-447)	2	2	0	0	0,606	0,429*	35,44
Lo 19 (TA) (N) (211-230)	2	2	0	0	0,094	0,168*	17,65
Lo 20 (TA) (165-278)	7	4	2	1	0,699	0,639*	72,95
Lo 25 (TA) (N) (300-323)	2	2	0	0	0,207	0,181*	17,94

2.2 Diversidad y Estructura Genética de *Lippia origanoides*

El análisis de los índices de diversidad génica para una población subdividida (Nei, 1973) mostró valores de diversidad génica en la población total (H_T) de 0,45. Los valores de diversidad génica para cada población (H_S) estuvo entre 0,36 en Paloblanco y 0,51 en K6+700 y Jordán3 (Tabla 4). Estos resultados indican que la diversidad está contenida dentro de las localidades; existiendo

muy poca diversidad entre estas localidades. Por su parte, el índice de diferenciación génica entre poblaciones, el cual fue calculado a partir de la fórmula $G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$ fue de 0,03; indicando la existencia de flujo genético entre las localidades.

Tabla 4. *Valores de diversidad génica (H_S) y coeficiente de endogamia (F_{IS}) para cada localidad.*

	H_S	F_{IS}
Los Santos	0,45±0,26	-0,214
La Mina	0,42±0,24	-0,031
La Laguna	0,48±0,30	-0,063
Umpalá - La Torre	0,50±0,27	0,065
Umpalá	0,39±0,22	0,088
Paloblanco	0,36±0,20	0,008
K6+700	0,51±0,27	-0,058
Jordán1	0,41±0,25	-0,025
Jordán2	0,50±0,30	0,006
Jordán3	0,51±0,28	0,024

Dicho flujo, se evidencio además mediante el número de migrantes entre pares de localidades (Tabla 5) según lo indicado por Whitlock y McCauley (1999); el cual fue relativamente alto entre: Paloblanco–Umpala ($N_M = 48,87$), K6+700–Umpalá La Torre ($N_M = 21,23$), Jordán1–Jordan 2 ($N_M = 20,48$), Jordan2–Jordan 3 ($N_M = 15,19$) y Jordán2–Los Santos ($N_M = 16,37$).

Tabla 5. *Valores de N_M (por encima de la diagonal) y F_{ST} (por debajo de la diagonal), para cada pareja de poblaciones calculados usando el software Arlequin. Los valores en negrilla destacan los valores más altos en cada caso. Los valores sombreados en la diagonal indican el promedio de diferenciación génica (F_{ST}) de una localidad respecto a las demás.*

	Los Santos	La Mina	La Laguna	Umpalá - La Torre	Umpalá Paloblanco	K6+700	Jordan1	Jordan2	Jordan3	
Los Santos	0,060	9,61	6,81	7,33	10,36	4,81	7,25	9,84	16,37	6,33
La Mina	0,049	0,080	8,24	5,19	4,10	3,10	7,36	6,99	10,16	4,62
La Laguna	0,068	0,057	0,047	INF	7,55	4,41	INF	8,60	6,39	7,57
Umpalá - La	0,064	0,088	-0,048	0,053	11,36	4,10	21,23	8,78	5,98	7,05

	Los Santos	La Mina	La Laguna	Umpalá - La Torre	Umpalá	Paloblanco	K6+700	Jordan1	Jordan2	Jordan3
Torre										
Umpalá	0,046	0,109	0,062	0,042	0,051	48,87	12,55	INF	8,98	3,34
Paloblanco	0,094	0,140	0,102	0,109	0,010	0,093	3,79	12,56	6,91	2,66
K6+700	0,064	0,064	-0,009	0,023	0,038	0,117	0,045	INF	9,80	6,58
Jordan1	0,048	0,067	0,055	0,054	-0,030	0,038	-0,011	0,037	20,48	4,93
Jordan2	0,030	0,047	0,073	0,077	0,053	0,068	0,049	0,024	0,050	15,19
Jordan3	0,073	0,098	0,062	0,066	0,130	0,158	0,071	0,092	0,032	0,087

Al menos cuatro estimados del N_M dieron valores con tendencia a infinito (Tabla 5). Dichos estimados no fueron considerados en el análisis dado que estos se interpretaron como una sobreestimación por diferentes factores como: la alta tasa de mutación de los microsatélites (Hedrick, 1999), la existencia de loci sujetos a selección (Whitlock y McCauley, 1999) y por las diferencias en el número de individuos de cada localidad.

Por su parte, el índice de diferenciación genética (F_{ST}) mostró diferencias en su magnitud para diferentes pares de localidades. Los resultados muestran que la localidad Paloblanco resultó la más diferenciada respecto a las restantes localidades (0,093). En menor medida, las localidades Jordán 3 (0,087) y La Mina (0,080), también mostraron clara diferenciación respecto a las restantes localidades (Diagonal Tabla 5). En general, los valores de F_{ST} entre pares de localidades (Tabla 5, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) resultaron bajos; indicando una baja tasa de diferenciación genética en las localidades de *L. organoides* de la cuenca baja del cañón del Río Chicamocha. Sin embargo, son excepción las siguientes: Umpalá–La mina ($F_{ST} = 0,109$), Paloblanco–La Laguna ($F_{ST} = 0,102$), Paloblanco–Umpalá La Torre ($F_{ST} = 0,109$), Paloblanco–K6+700 ($F_{ST} = 0,117$), Jordán3–Umpalá ($F_{ST} = 0,130$) y Jordán3–Paloblanco ($F_{ST} = 0,158$); donde se evidenciaron niveles relativamente mayores de diferenciación genética (Tabla 5, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En

general, los índices de fijación F de Wright, y especialmente el índice de diferenciación genética entre poblaciones o F_{ST} , proporcionan una idea de los procesos evolutivos que están influenciando la estructura de la variación genética dentro y entre poblaciones.

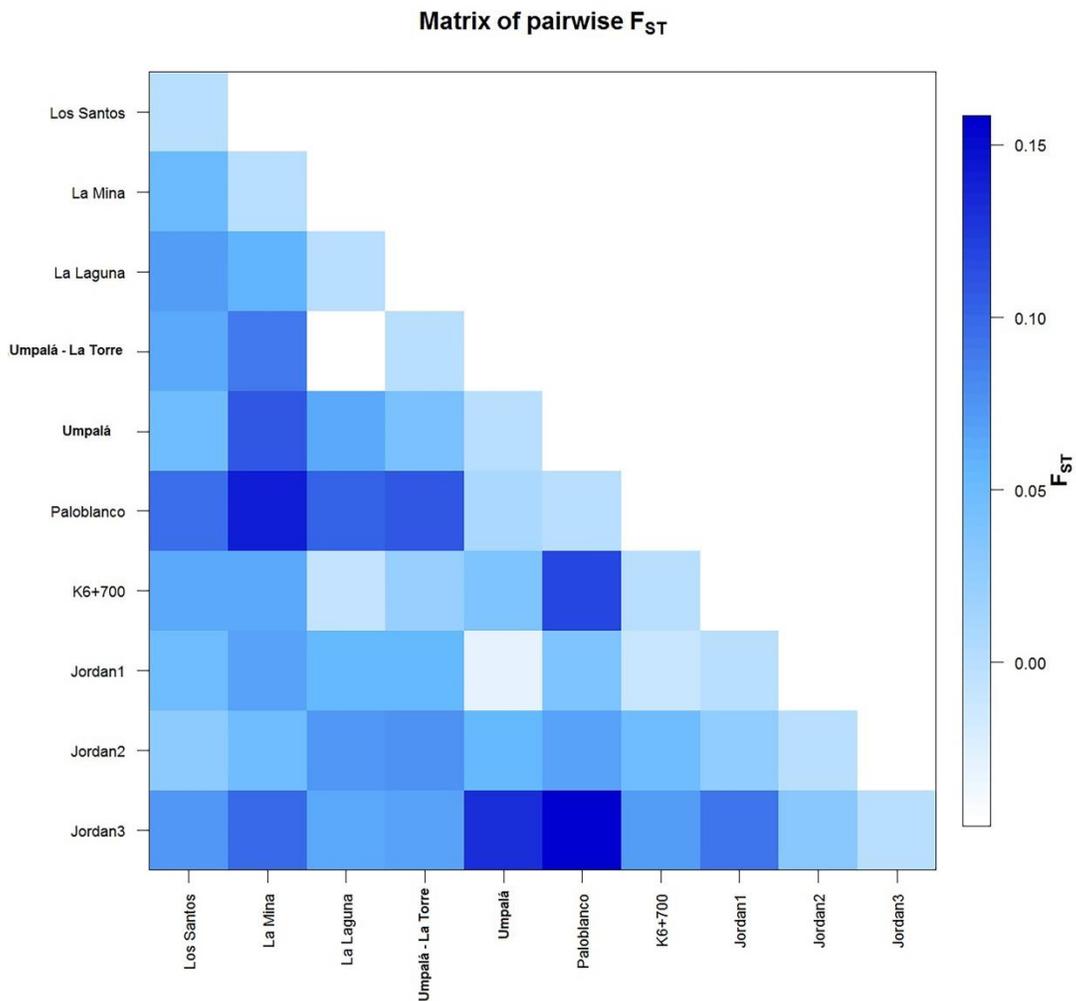


Figura 2. Valores de F_{ST} entre parejas de localidades. Los valores más altos están en colores oscuros, valores negativos se visualizan en tonos cercanos al blanco.

Un AMOVA basado en los índices de fijación F de Wright (Wright, 1949): F_{ST} , F_{IS} y F_{IT} , mostró los componentes de varianza y porcentajes de variación en cada caso; resultando significativo solo el coeficiente de diferenciación genética entre localidades (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis jerárquico de Varianza Molecular (AMOVA) de la variación genética de *L. origanoides*.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índice de Fijación
Entre localidades	9	58,59	0,18764	6,39	F _{ST} : 0,06390*
Dentro de localidades	93	253,96	-0,01811	-0,62	F _{IS} : -0,00659
Población total	103	285,00	2,76699	94,23	F _{IT} : 0,058
Total	205	597,55	2,93652		

gl: grados de libertad. F_{ST}: coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones; F_{IS}: coeficiente de endogamia dentro de poblaciones; F_{IT}: coeficiente de endogamia total.

* p < 0.05

La mayor parte de la varianza se concentró en la población total (94,23%, F_{IT} = 0,058) y muy poca entre localidades (6,39%, F_{ST} = 0,064, p ≤ 0,05). La varianza dentro de las localidades dio valores negativos (-0,62%, F_{IS} = -0,006). Los valores negativos del coeficiente de endogamia o F_{IS} se deben, posiblemente, al alto número de individuos heterocigotos dentro de las localidades (Tabla 4).

Con el fin de definir los grupos genéticos o poblaciones ancestrales contribuyendo a la diversidad de *L. origanoides* en la cuenca baja del cañón del Río Chicamocha, se desarrolló un análisis bayesiano basado en la información del polimorfismo microsatélite en 103 especímenes usando el programa STRUCTURE 2.3.4. Considerando el valor de K que mostró mayor probabilidad *a posteriori* (p = 0,625), se definieron 5 grupos genéticos o poblaciones ancestrales para la población total (Tabla 7, Figura 3a). Dicho resultado (K = 5), fue corroborado mediante el valor modal de la distribución ΔK (valor máximo en la distribución de la Figura 4). Dicho valor se basa en el método propuesto por Evanno et al. (2005) y fue computado usando el programa Structure Harvester (Earl y vonHoldt, 2012).

Tabla 7. Probabilidades *a priori* y *a posteriori* del mejor K.

K	Ln P(D)	P valor
K=1	-2496,44	2,44E ⁻¹⁰⁰
K=2	-2384,28	1,254E ⁻⁵¹
K=3	-2347,61	1,057E ⁻³⁵
K=4	-2303,205	2,036E ⁻¹⁶
K=5	-2269,545	0,6248063
K=6	-2270,055	0,0751601
K=7	-2284,03	4,329E ⁻⁰⁸
K=8	-2295,025	7,267E ⁻¹³
K=9	-2301,865	7,776E ⁻¹⁶
K=10	-2310,21	1,847E ⁻¹⁹

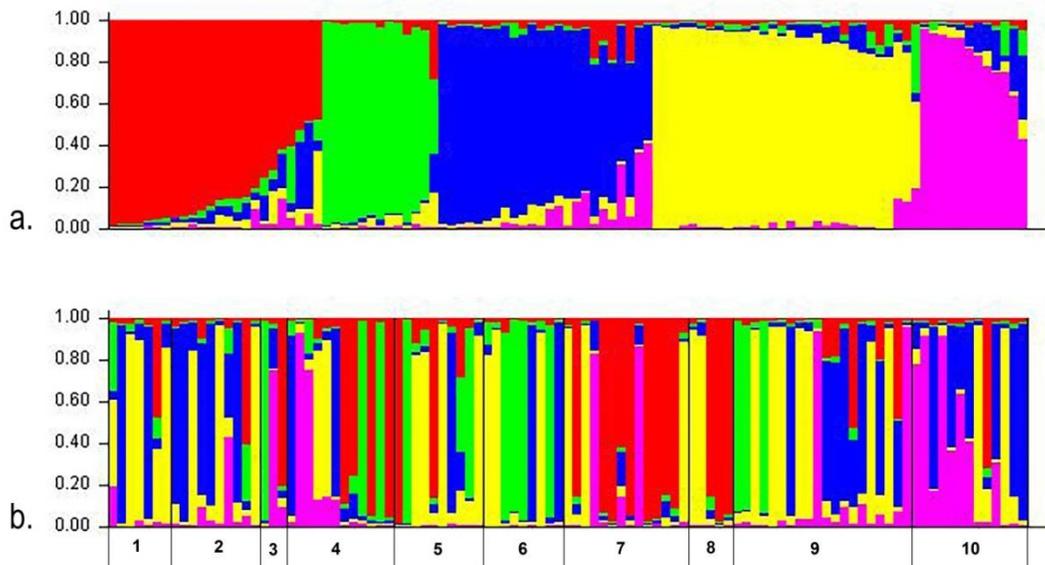


Figura 3. Estructura de la diversidad Genética estimada mediante el software Structure. a) Cada individuo está representado por una única línea vertical dividida en K (K=5) segmentos de colores, con tamaños proporcionales a su contribución al individuo. b) Estructura poblacional para 103 muestras de *Lippia origanoides*. Los números 1-10 representan las 10 localidades denominadas Los Santos, La Mina, La Laguna, Umpalá-La Torre, Umpalá, Paloblanco, K6+700, Jordán1, Jordán2 y Jordán3, respectivamente.

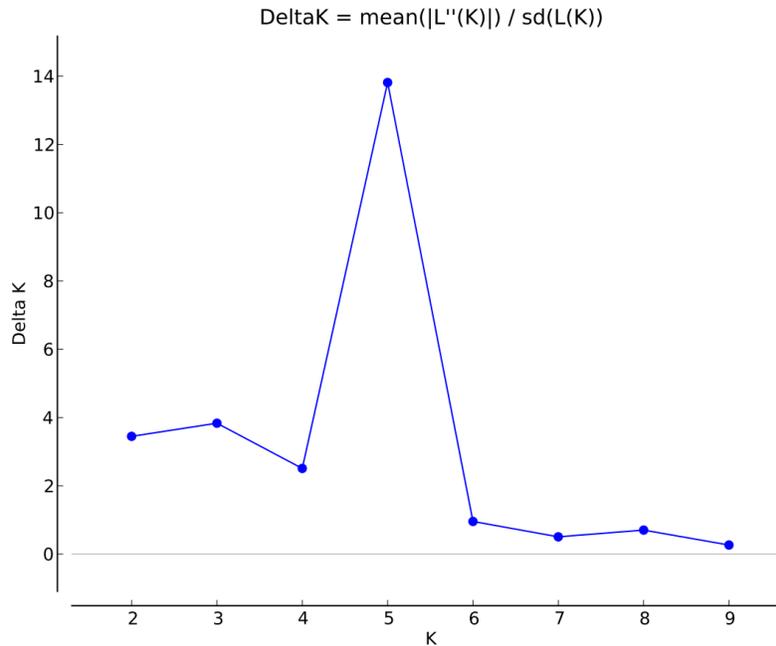


Figura 4. ΔK calculado como $\Delta K = \text{mean}(|L''(K)|) / \text{sd}(L(K))$. El valor modal de esta distribución corresponde al verdadero K (*) o el nivel más alto de estructura.

Cada localidad, contienen información ancestral de los cinco grupos genéticos; por tanto, no se evidenció correspondencia directa entre grupos genéticos ancestrales y localidad (Figura 3b). Sin embargo, algunas localidades tienen alta representación de poblaciones ancestrales específicas (Tabla 8). Por ejemplo, las localidades Los Santos y La Mina tienen alta representación de las bases ancestrales 3 y 4; mientras que, Jordan1 tiene alta contribución de las bases ancestrales 1 y 4. Por el contrario, las restantes localidades tienen contribuciones de tres (3) o más bases genéticas ancestrales distintas. La localidad Umpalá- La Torre fue la mejor representada por todas las bases genéticas ancestrales; conteniendo contribuciones más o menos equilibradas de los 5 grupos genéticos o poblaciones ancestrales. En general, podemos decir que la variación genética está representada a lo largo de todas las localidades estudiadas de la cuenca baja del cañón del Río Chicamocha (Figura 3b).

Tabla 8. Contribución de los diferentes grupos ancestrales a las bases genéticas de las poblaciones de *L. origanoides* en cada localidad estudiada. Los valores en negrilla destacan aquellos valores mayores a 0,100.

Localidad	Grupo Genético				
	I	II	III	IV	V
Los Santos	0,084	0,073	0,311	0,490	0,042
La Mina	0,085	0,049	0,476	0,319	0,071
La Laguna	0,281	0,331	0,082	0,021	0,285
Umpalá - La Torre	0,315	0,194	0,169	0,140	0,183
Umpalá	0,241	0,235	0,123	0,393	0,008
Paloblanco	0,021	0,433	0,225	0,313	0,008
K6+700	0,583	0,015	0,046	0,214	0,141
Jordán1	0,559	0,024	0,028	0,381	0,008
Jordán2	0,090	0,151	0,281	0,351	0,128
Jordán3	0,071	0,013	0,376	0,186	0,355

2.3 Transferibilidad de loci microsatélites entre especies del género *Lippia*.

En el presente estudio, se evaluó la utilidad de los cuarenta (40) cebadores desarrollados para el estudio de loci microsatélites en las especies *L. alba* (8), *L. canescens* (9) y *L. origanoides* (23), en especies del género presentes en Colombia (Figura 5). De los ocho cebadores microsatélites de la especie *L. alba*, solo tres (La02, La03 y La04) amplificaron en la muestra de *L. alba*, dos (La02 y La04) en *L. micromera* y uno (La02) en *L. americana*, *L. origanoides* y *L. graveolens*.

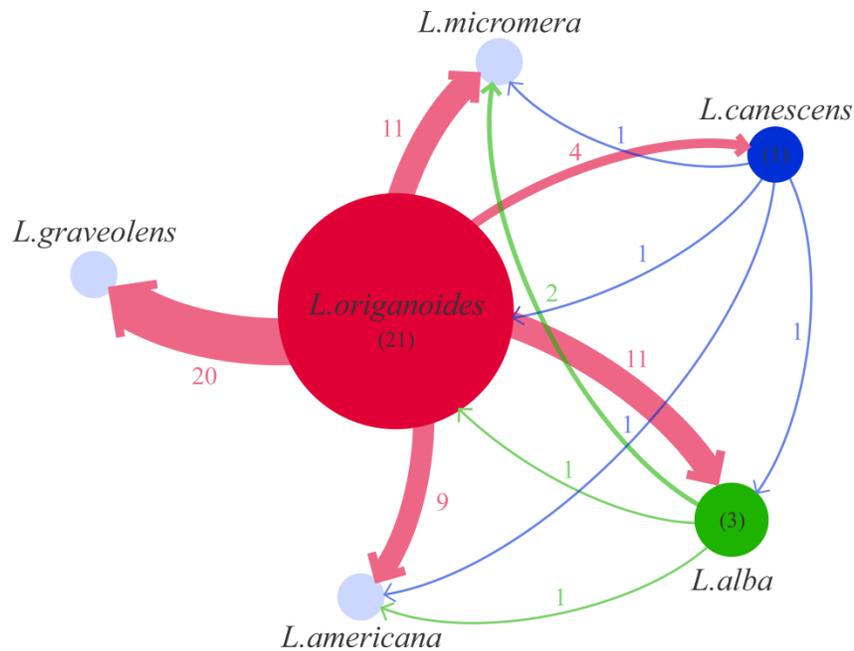


Figura 5. Transferibilidad de cebadores entre especies de *Lippia*. Los nodos representan las especies de *Lippia* y su tamaño es proporcional al número de cebadores específicos que amplificaron. Las flechas indican la dirección de la transferibilidad de los cebadores

De los nueve cebadores correspondientes a los loci microsatélites de *L. canescens*, solo uno (Phc17) fue útil para amplificar loci homólogos en las muestras de *L. alba*, *L. americana*, *L. canescens*, *L. micromera* y *L. origanoides*. Como muestran estos resultados, la utilidad de los cebadores microsatélites desarrollados previamente en *L. alba* y *L. canescens*, para el estudio de especímenes colombianos de estas especies fue limitada. Al menos bajo las condiciones de amplificación aquí usadas, no se logró una amplificación efectiva de los loci indicados en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, en estas especies. Adicionalmente, la transferibilidad de los cebadores microsatélites desarrollados en *L. alba* y *L. canescens* hacia otras especies de *Lippia*, fue consistentemente baja; limitando su uso como marcadores heterólogos dentro del género.

Por el contrario, de los veintitrés (23) cebadores microsatélites de *L. origanoides*, solo dos (Lo8 y Lo10) no amplificaron en los especímenes de *L. origanoides* por lo que veintiuno (21)

amplificaron adecuadamente, veinte (20) amplificaron en *L. graveolens*, once (11) en *L. alba*, once (11) en *L. micromera*, nueve (9) en *L. americana* y cuatro (4) en *L. canescens*. Estos resultados muestran la utilidad de los cebadores microsatélites desarrollados para estudios genéticos de la especie *L. origanoides* en Colombia. La alta transferibilidad de estos cebadores microsatélites a la especie *L. graveolens* (20 cebadores), confirma el alto grado de parentesco genético observado entre las especies *L. origanoides* y *L. graveolens* usando marcadores SMR (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Adicionalmente, la transferibilidad de los cebadores microsatélites desarrollados para *L. origanoides* hacia las especies *L. alba*, *L. micromera* y *L. americana* estuvo entre el 39 y 48% (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**); sugiriendo que estos cebadores podrían ser útiles para complementar estudios taxonómicos del género *Lippia*.

2.4 Capacidad de las secuencias microsatélites para distinguir diferentes especies del genero *Lippia*.

Las relaciones filogenéticas dentro de clado *Lantana/Lippia* ha sido poco estudiado usando información molecular. Su taxonomía no ha sido resuelta aún, debido a que sus especies muestran caracteres morfológicos muy similares. Con el fin de evaluar la utilidad de las secuencias microsatélites de *L. origanoides* para estudios taxonómicos de *Lippia*, aquí comparamos las semejanzas genéticas de las especies de *Lippia* usando secuencias SMR (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y datos microsatélites (presente estudio).

Los árboles de agrupamiento basados en secuencias SMR y microsatélites mostraron diferentes topologías para los agrupamientos de las especies de *Lippia*; lo cual fue soportado por

un análisis de correlación (test de Mantel) aplicado a las matrices co-fenéticas correspondientes a cada árbol ($R = 0.2567$; $p < 0.001$). El agrupamiento basado en secuencias SMR, mostró a *L. americana* como la especie más diferente, genéticamente hablando, con respecto a las otras especies analizadas, un grupo que contiene las especies *L. canescens* y *L. micromera* y un segundo grupo con politomía que contiene las especies *L. alba*, *L. graveolens* y todos los haplotipos de *L. origanoides* definidos por especímenes que muestran 100% de homología en su secuencia SMR. Contrariamente, el agrupamiento basado en microsatélites mostró dos grupos genéticamente diferentes: Un primer grupo que contiene las especies *L. alba*, *L. americana*, *L. micromera* y dos haplotipos raros (D y E) de *L. origanoides*; y un segundo grupo que contiene las especies *L. canescens*, *L. graveolens* y los restantes haplotipos (A-C, F) de *L. origanoides* (Figura 6). Es posible que la presencia de *L. canescens* en este grupo se deba al sesgo por el bajo número de cebadores que amplificaron y aportaron información. En general, y a juzgar por la discriminación de especies lograda dentro de estos grupos, los marcadores microsatélites permitieron detectar más eficazmente diferencias genéticas entre las especies estudiadas que el marcador SMR.



Figura 6. Árboles de Agrupamiento basados en datos de marcadores SMR (izquierda) y microsatélites (derecha). Ambos árboles fueron construidos usando el método de vecino más próximo según se indica en materiales y métodos.

3. Discusión

3.1 Evaluación y caracterización de loci microsatélites de *Lippia origanoides*

Al momento de evaluar los 23 juegos de cebadores funcionales en 103 muestras colectadas en el cañon del Chicamocha, se obtuvo que aproximadamente el 78% de las muestras amplificaban. Al eliminar del estudio aquellos marcadores monomórficos, se detectaron 58 alelos con un número promedio de alelos por locus de 3,87. A partir de estos amplificados, se exhibió un alto porcentaje de loci polimórficos (81,33%; Tabla 2), dicho valor es menor al reportado por otros autores con marcadores de tipo dominante en la misma zona de muestreo (Suárez et al., 2008; Vega-Vela y Chacón Sánchez, 2012) pero mayor al reportado por Meléndez et al. (2010) en el desierto de Chihuahua, México y por Martínez-Natarén et al. (2013) también en México (*L. graveolens* y *L. berlandieri* son considerados como *L. origanoides* de acuerdo con el Missouri Botanical Garden, 2017). El PIC de los 15 loci que mostraron polimorfismo estuvo entre el rango de 15-75%. Solo un locus mostró un PIC menor al 5% (Lo5b), que al mismo tiempo fue un locus que mostró cuatro alelos totales de los cuales tres fueron alelos raros.

3.2 Análisis de la diversidad y estructura genética de las localidades de *Lippia origanoides* en la Cuenca baja del cañón del río Chicamocha.

Con base en los índices de diversidad génica para una población subdividida (Nei, 1973) y los índices de fijación F de Wright (Wright, 1949), las poblaciones de *L. origanoides* de la cuenca baja del cañón de río Chicamocha se puede tipificar como sigue: Poblaciones con moderada diversidad genética ($H_T = 0,45$) dentro de sus localidades, donde existe flujo genético ($G_{ST} = 0,03$) y una baja pero significativa diferenciación genética ($F_{ST} = 0,063$; $p < 0,05$) entre ellas. La existencia de flujo genético se pudo constatar además mediante los valores del número de migrantes entre pares de localidades. Adicionalmente, el análisis bayesiano utilizando el programa STRUCTURE 2.3.4, indicó cinco grupos o poblaciones ancestrales contribuyendo a la base genética de la población total; donde, en general, no existe relación entre base genética o población ancestral y localidad. Por el contrario, estas poblaciones ancestrales están representadas en los especímenes a lo largo de todas las localidades (Figura 3b; Tabla 8); en correspondencia con el hallazgo de flujo genético entre localidades. En tal sentido, nuestros resultados sugieren que la población total muestra una pobre estructuración en correspondencia con lo observado por Suárez et al. (2008).

Los valores de heterocigosidad esperada promedio para las localidades de *L. origanoides*, fue consistentemente alta ($H = 0,45$). Este hallazgo, estuvo en correspondencia con lo encontrado en estudios previos con esta especie (Suárez et al., 2008; Vega-Vela y Chacón Sánchez, 2012), donde se mostraron valores altos de heterocigosidad independientemente del tipo de marcador usado como sigue: ISSR ($H = 0,48$) y AFLP ($H = 0,32$). Por el contrario, la diversidad alélica de *L. graveolens* ($H = 0,17$ en Yucatán y $H = 0,22$ en Chihuahua), una especie estrechamente

relacionada a *L. origanoides* (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) fue consistentemente menor (Meléndez Rentería et al., 2010; Martínez-Natarén et al., 2014). Asumiendo que *L. graveolens* y *L. origanoides* son la misma especie (ver acápite 0), la diversidad de esta especie en Colombia es mayor a la encontrada en México; soportando la hipótesis que plantea que la especie mexicana *L. graveolens* es una introducción de *L. origanoides* en este país. El nivel de variación alélica de las secuencias microsatélites en *L. origanoides* fue mayor al encontrado en la especie *Phyla scaberrima* ($H = 0,33$); pero ligeramente inferior al encontrado en otras especies relacionadas como *L. canescens* ($H = 0,65$), *Lantana cámara* ($H = 0,61$) and *L. alba* ($H = 0,53$) (Fatemi y Gross, 2008; Ray et al., 2012; Santos et al., 2012; Chaves et al., 2014).

Un análisis poblacional previo de esta especie en el Cañón del Chicamocha usando marcadores tipo ISSR (Suárez et al., 2008), mostró que la diversidad genética se concentró dentro de las localidades y no entre localidades. Adicionalmente, ellos indicaron un bajo nivel de diferenciación genética entre localidades ($\theta = 0,032 \pm 0,021$); sugiriendo que en la región estudiada (localidades Cepitá y Pescadero) existe una única población donde ni el río ni la actividad antropogénica actúan como barrera para el flujo génico. Vega-Vela y Chacón Sánchez (2012), usando marcadores AFLP, además indicaron que la diversidad genética de *L. origanoides* dentro de la población fue relativamente alta ($H_T = 0,32$) y mostraron estructura poblacional ($F_{ST} = 0,18$, $p < 0,0000$) asociada con el gradiente altitudinal de la cuenca del cañón del río Chicamocha: dos poblaciones en la cuenca baja, una población en la cuenca media y una población en la cuenca alta; con bajo nivel de mezclas entre ellas.

En este trabajo, nosotros extendimos el estudio a un número mayor de localidades de la cuenca baja del cañón del río Chicamocha; por lo que los resultados obtenidos complementan los

estudios previos y aportan nueva información sobre la diversidad de esta especie y su estructura poblacional. Aquí se confirma que la especie *L. origanoides* en la cuenca baja del cañón del río Chicamocha, presenta un alto nivel de diversidad genética caracterizado por un bajo, pero significativo nivel de diferenciación genética entre localidades. Los nuevos hallazgos son los siguientes: Primero, existen cinco poblaciones ancestrales aportando a la diversidad de la metapoblación de la especie *L. origanoides* en la cuenca baja del cañón del río Chicamocha. Esta metapoblación no muestra relación con la geografía de la cuenca baja del cañón del río Chicamocha. En este sentido, no encontramos asociación entre poblaciones ancestrales y localidades. Segundo, aunque limitado a unas pocas localidades, existe flujo genético entre las localidades de la cuenca baja y un bajo, pero significativo, nivel de diferenciación genética.

Dado por la alta representación de las poblaciones ancestrales en las localidades Umpalá-Latorre, Umpalá y Jordán 2, estas localidades pueden ser de utilidad para ensamblar una colección de especímenes representativos de la diversidad genética de la especie en la cuenca baja del cañón del Chicamocha; esto, pensando en futuros trabajos de conservación, propagación y mejoramiento genético de la especie.

3.3 Evaluación de cebadores microsatélites y su transferibilidad entre especies del género *Lippia*.

En el presente trabajo se evaluó la utilidad de diferentes pares de cebadores microsatélites para estudios genéticos de poblaciones naturales de *L. origanoides* y de especies relacionadas del género (*L. alba*, *L. americana*, *L. canescens*, *L. graveolens* y *L. micromera*). Los nuevos cebadores, comparando con cebadores desarrollados previamente para las especies *L. alba* y *L.*

canescens (Fatemi y Gross, 2008; Santos et al., 2012), mostraron un mayor potencial para el estudio de especies relacionadas con porcentajes de transferibilidad consistentemente mayores (Figura 5, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En nuestro estudio, estos valores de porcentaje de transferibilidad fueron como promedio del 48%; valor superior al encontrado por Chaves et al. (2014), estudiando la transferibilidad de marcadores microsatélites de *Phyla scaberrima* a especies de *Lippia* relacionadas. Estos hallazgos indican que los loci microsatélites aquí identificados para la especie *L. origanoides*, tienen una alta representación en especies genéticamente relacionadas. Esto contrastó con lo observado en otros estudios que han desarrollado secuencias microsatélites para especies de la tribu Lantaneae; las cuales resultaron especie-específicos (Fatemi y Gross, 2008; Ray et al., 2012; Santos et al., 2012; Rocha et al., 2015).

Al menos una razón podría explicar los contrastes observados en nuestro estudio respecto a los publicados previamente. Todos los trabajos mencionados usaron métodos convencionales para generar librerías genómicas que contenían las secuencias microsatélites; que finalmente identificaron y evaluaron. Estos involucran los siguientes pasos: *i*) enriquecer las secuencias de ADN genómico que contienen microsatélites; *ii*) clonar el ADN enriquecido de microsatélites; *iii*) extraer los plásmidos; *iv*) secuenciar los insertos por medio de la secuenciación de Sanger; *v*) diseñar los cebadores; *vi*) y evaluar los loci individuales (Dutech et al., 2007; Zalapa et al., 2012). El presente estudio, por el contrario, se realizó con marcadores generados a partir de tecnología de secuenciación genómica de alta cobertura (e.i.: Illumina technologies, San Diego, CA), para generar las nuevas secuencias microsatélites (ver Mardis, 2008; Shendure y Ji, 2008; Shokralla et al., 2012; Sims et al., 2014). Esta tecnología puede producir millones de secuencias con un alto rendimiento y un simultáneo ensamblaje de genoma (Egan et al., 2012; Lee et al.,

2012). El uso de estrategias *in silico* para la identificación de secuencias microsatélites, definitivamente simplifica el proceso de identificación *a priori* de loci polimórficos entre las líneas secuenciadas y, por ende, garantiza el éxito *a posteriori* durante la fase de evaluación al nivel de laboratorio. En este sentido, nuestros resultados fueron consistentes con los obtenidos por otros autores usando similares procedimientos para la identificación de secuencias microsatélites en otras especies de plantas (Wang et al., 2010; Jun et al., 2011; Wei et al., 2011; Zalapa et al., 2012; Wang et al., 2013).

3.4 Utilidad de secuencias microsatélites de *L. origanoides* para el estudio de relaciones genéticas de especies del género *Lippia*.

La alta transferibilidad de los marcadores microsatélites desarrollado en este estudio, abre la posibilidad de aplicación de estos marcadores para estudiar las relaciones genéticas de especies estrechamente relacionadas del género *Lippia*.

Perteneciente a la familia Verbenaceae, el género *Lippia* está constituido por cerca de 200 especies (Atkins, 2004); las cuales muestran un escenario taxonómico complejo. Entre los principales problemas taxonómicos que se identifican para el género se encuentra los sinónimos y la similitud fenotípica entre especies; en algunos casos, distinguibles solamente por caracteres del fruto (Rotman y Múlgura, 2010; O’Leary y Múlgura, 2012; O’Leary et al., 2012a; Lu-Irving y Olmstead, 2013). Una clasificación filogenética basada en marcadores de DNA plastídico agrupa el género *Lippia* con los géneros *Lantana*, *Phyla*, *Nashia*, and *Burroughsia* dentro del clado *Lantana/Lippia*; soportando las similitudes morfológicas de estos géneros (Marx et al., 2010). Sin embargo, las relaciones al nivel de especies dentro del clado permanecen aún sin

resolverse (Lu-Irving y Olmstead, 2013). En este sentido, los loci microsatélites aquí descritos podrían resultar de utilidad en el estudio de las relaciones genéticas entre especies como se indica en la Figura 6.

Nótese, que los marcadores microsatélites, incluso los SMR, permitieron discriminar especies genéticamente relacionadas como es el caso de *L. alba*, *L. americana*, *L. canescens*, *L. graveolens*, *L. micromera* y *L. organoides*. Se requerirá ampliar estos estudios con un mayor número de especies de la tribu Lantanae y de secuencias microsatélites con el fin de establecer agrupamientos genéticos confiables dentro de este género. Adicionalmente, el uso combinado de diferentes tipos de descriptores moleculares podría ser una mejor aproximación al estudio de las relaciones entre especies con fines taxonómicos. Por ejemplo, de Sena Filho et al. (2012) han indicado la utilidad de descriptores químicos para el análisis de relaciones taxonómicas; específicamente en la identificación/separación de las especies *Lippia* y *Lantana* que no son fácilmente separables. Otros autores (Viccini et al., 2004), han indicado la utilidad de los marcadores tipo RAPD con el fin de establecer relaciones genéticas entre especies del género *Lippia*.

Uno de los hallazgos de la presente tesis es la demostración con datos moleculares de una estrecha relación genética entre las especies *L. organoides* y *L. graveolens*. Otros autores (O'Leary et al., 2012b; Hammel et al., 2015), han planteado que *L. organoides* y *L. graveolens* son la misma especie. Estas dos especies muestran composición química muy similar en sus aceites esenciales (Stashenko et al., 2010; Martínez-Natarén et al., 2014). Según O'Leary et al. (2012b), *L. graveolens* es el nombre frecuentemente usado para los especímenes mesoamericanos de la especie *L. organoides*, presente en Suramérica. Una revisión reciente (Rueda, 2015), sugiere que *L. graveolens* y *L. organoides* son sinónimos. Los resultados aquí

presentados, soportan la hipótesis que plantea que *L. origanoides* y *L. graveolens* son la misma especie.

4. Conclusiones

Primero, la diversidad genética de las poblaciones de *L. origanoides* de la cuenca baja del cañón del río Chicamocha es moderada y existe flujo genético y una baja diferenciación genética entre ellas. La metapoblación muestra una baja estructura poblacional y a su base genética tributan 5 poblaciones ancestrales; pero no se encontró relación entre base genética o población ancestral y localidad. Por el contrario, estas poblaciones ancestrales están representadas en los especímenes a lo largo de todas las localidades en correspondencia con el hallazgo de flujo genético entre localidades.

Segundo, los loci microsatélites identificados en la especie *L. origanoides* muestran altos niveles de transferibilidad; indicando que estos loci microsatélites tienen una alta representación en especies del género *Lippia* genéticamente relacionadas. En este sentido, los loci microsatélites aquí descritos muestran potencial para estudiar las relaciones genéticas entre especies de este género.

5. Recomendaciones.

Evaluar la utilidad de las secuencias microsatélites aquí estudiada para estimar relaciones de parentesco dentro de la tribu Lantanae.

Hacer extensivo el actual estudio de diversidad genética de la *Lippia origanoides* a otras zonas del país, e incluso de América.

Referencias Bibliográficas

- Aggarwal, K., Shenoy, V., Ramadevi, J., Rajkumar, R., & Singh, L. (2002). Molecular characterization of some Indian Basmati and other elite rice genotypes using fluorescent-AFLP. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 105(5), 680–690.
- Albesiano, S., Rangel-Ch, J. O., & Cadena, A. (2003). LA VEGETACIÓN DEL CAÑÓN DEL RÍO CHICAMOCHA (SANTANDER, COLOMBIA). *Caldasia*, 25(1), 73–99.
- Arteche, J., Fuentes, J. L., Cornide, M. T., & Borges, E. (2005). Crop Genetic Diversity (CROPDIVER): Un programa de computación para optimizar la composición genética. *Cultivos Tropicales*, 26(3), 45–50.
- Atkins, S. (2004). Verbenaceae. In K. Kubitzki (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants, Vol VII*. (pp. 449–468).
- Bueno-Sánchez, J. G., Martínez-Morales, J. R., Stashenko, E. E., & Ribón, W. (2009). Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. *Biomédica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 29(1), 51–60.
- Chaves, C. L., Ruas, E. A., Ruas, C. F., Delfini, J., Bejatto, N. C., Góes, B. D., & Ruas, P. M. (2014). Isolation and characterization of simple sequence repeat markers for the herbaceous species *Phyla scaberrima* (Verbenaceae). *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 7864–7868.
- Ciofi, C., Milinkovitch, M. C., Gibbs, J. P., Caccone, A., & Powell, J. R. (2002). Microsatellite analysis of genetic divergence among populations of giant Galapágos tortoises. *Molecular Ecology*, 11, 2265–2283.
- de Sena Filho, J. G., Carregosa Rabbani, A. R., Santos Silva, T. R., Cruz da Silva, A. V., Azevedo Souza, I., Araujo Santos, M. J. B., Romario de Jesus, J., de Lima Nogueira, P.C. &

- Duringer, J. M. (2012). Chemical and molecular characterization of fifteen species from the *Lantana* (Verbenaceae) genus. *Biochemical Systematics and Ecology*, *45*, 130–137.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, *1*(4), 19–21.
- Dos Santos, F. J. B., Lopes, J. A. D., Cito, A. G. L., De Oliveira, E. H., De Lima, S. G., & Reis, F. D. A. (2004). Composition and Biological Activity of Essential Oils Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia organoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*, *16*, 504–506.
- Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barrès, B., Carlier, J., Tharreau, D., & Giraud, T. (2007). Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, *44*, 933–949.
- Earl, D. A., & VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, *4*, 359–361.
- Egan, A. N., Schlueter, J., & Spooner, D. M. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American Journal of Botany*, *99*(2), 175–185.
- Escobar, P., Milena Leal, S., Herrera, L. V., Martinez, J. R., & Stashenko, E. (2010). Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *105*(2), 184–190.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, *14*(8), 2611–2620.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, *10*(3), 564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, *131*, 479–491.

- Fatemi, M., & Gross, C. L. (2008). Development and characterization of microsatellite markers for lippia (*Phyla canescens*: Verbenaceae). *Molecular Ecology Resources*, 8, 1338–1339.
- Fuentes, J. L., Arteché, J., Suárez, E., Gómez, P. J., Borges, E., & Cornide, M. T. (2004). Genetic base and commercial utilization of rice varieties in Cuba. *Journal of Genetics and Breeding*, 58, 329–338.
- Glaszmann, J. C., Kilian, B., Upadhyaya, H. D., & Varshney, R. K. (2010). Accessing genetic diversity for crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 167–173. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.01.004>
- Gutiérrez, J. P., Royo, L. J., Álvarez, I., & Goyache, F. (2005). MolKin v2.0: A computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *Journal of Heredity*, 96(6), 718–721.
- Hamilton, M. B. (1999). Tropical tree gene flow and seed dispersal. *Nature*, 401, 129–130.
- Hammel, B. E., Grayum, M. H., Herrera, C., & Zamora, N. (2015). Manual de Plantas de Costa Rica: Volumen VIII: Dicotiledoneas (Sabiaceae - Zygophyllaceae). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 131, 1–657.
- Hampton, J. O., Spencer, P. B. S., Alpers, D. L., Twigg, L. E., Woolnough, A. P., Doust, J., Higgs, T., & Pluske, J. (2004). Molecular techniques, wildlife management and the importance of genetic population structure and dispersal: a case study with feral pigs. *Journal of Applied Ecology*, 41, 735–743.
- Hartl, D. L., & Clark, A. G. (1997). *Principles of Population Genetics* (Third edit).
- Hedrick, P. W. (1999). Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, 53(2), 313–318.
- Huang, X. Q., Börner, A., Röder, M. S., & Ganai, M. W. (2002). Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(1), 699–707.

- Jayamani, P., Negrão, S., Martins, M., Maças, B., & Oliveira, M. M. (2007). Genetic Relatedness of Portuguese Rice Accessions from Diverse Origins as Assessed by Microsatellite Markers. *Crop Science*, 47(2), 879.
- Jun, T.-H., Michel, A. P., & Mian, M. a R. (2011). Development of soybean aphid genomic SSR markers using next generation sequencing. *Genome*, 54(5), 360–367.
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452–1456.
- Ledig, F. T. (1992). Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos*, 63(1), 87–108.
- Lee, S., Emond, M. J., Bamshad, M. J., Barnes, K. C., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., Christiani, D. C., & Lin, X. (2012). Optimal unified approach for rare-variant association testing with application to small-sample case-control whole-exome sequencing studies. *American Journal of Human Genetics*, 91(2), 224–237.
- Lu-Irving, P., & Olmstead, R. G. (2013). Investigating the evolution of Lantaneae (Verbenaceae) using multiple loci. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(1), 103–119.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387–402.
- Martínez-Natarén, D. A., Parra-Tabla, V., Ferrer-Ortega, M. M., & Calvo-Irabién, L. M. (2014). Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. *Plant Systematics and Evolution*, 300, 535–547.
- Marx, H. E., O’Leary, N., Yuan, Y.-W., Lu-Irving, P., Tank, D. C., Múlgura, M. E., & Olmstead, R. G. (2010). A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. *American Journal of Botany*, 97(10), 1647–63.
- Meléndez Rentería, N. P., Silva-Vázquez, R., Nevárez Morrillón, G. V., Aguilar, C. N., & Rodríguez Herrera, R. (2010). Genetic Diversity of Mexican Oregano *Lippia berlandieri* Schauer, from the Chihuahuan desert area. *Plant Breeding and Seed Science*, 62, 85–96.

- Méndez, R., Serrano, J., Chataing, B., Jimenez, D., Mora, D., Rojas, L., Usubillaga, A., & O'Callaghan, J. (2007). Estudio Comparativo de la Actividad Biológica del Aceite Esencial *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March y el Aceite Esencial *Lippia origanoides* Hbk Sobre Tres Especies de *Nocardia* sp., 49–52.
- Meneses, R., Torres, F. Á., Stashenko, E., & Ocazonez, R. E. (2009). Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. *Salud UIS*, 41(3), 236–243.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12), 3321–3.
- Nei, M., & Li, W.-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–73.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. E. (2009). Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *Journal of Stored Products Research*, 45(3), 212–214.
- O'Leary, N., Calviño, C. I., Martínez, S., Lu-Irving, P., Olmstead, R. G., & Múlgura, M. E. (2012). Evolution of morphological traits in Verbenaceae. *American Journal of Botany*, 99(11), 1778–1792.
- O'Leary, N., Denham, S. S., Salimena, F., & Múlgura, M. E. (2012). Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) usgin the phylogenetic species concept. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 170, 197–219.
- O'Leary, N., & Múlgura, M. E. (2012). A Taxonomic Revision of the Genus *Phyla* (Verbenaceae)¹. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 98(4), 578–596.
- Ocampo-Velázquez, R. V., Malda-Barrera, G. X., & Suárez-Ramos, G. (2009). BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens*) en tres condiciones de aprovechamiento. *Agrociencia*, 43(5), 475–482.
- Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Bizzo, H. R., Lopes, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Leitão, S. G. (2007). Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides*

- H.B.K. *Food Chemistry*, 101(1), 236–240.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Pritchard, J. K., Wen, X., & Falush, D. (2010). *Documentation for structure software : Version 2.3*.
- Ray, A., Sumangala, R. C., Ravikanth, G., Uma Shaanker, R., & Quader, S. (2012). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from the invasive plant *Lantana camara* L. *Conservation Genetics Resources*, 4, 171–173.
- Rocha, D. S., Santos, C. P., Bajay, M. M., Campos, J. B., Blank, A. F., Pinheiro, J. B., & Zucchi, M. I. (2015). Development of a novel set of microsatellite markers for *Lippia alba* (Verbenaceae). *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 971–974.
- Rotman, A. D., & Múlgura de Romero, M. E. (2010). Novedades nomenclaturales en los géneros *Lippia* y *Lantana* (Verbenaceae). *Darwiniana*, 48(1), 97–99.
- Rueda, R. M. (2015). Verbenaceae. In B. E. Hammel, M. H. Grayum, C. Herrera, & N. Zamora (Eds.), *Manual de Plantas de Costa Rica. Vol. VIII*. (pp. 538–592). Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–25.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Editio). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, F. R. C., Lima, P. F., Priolli, R. H. G., Siqueira, W. J., & Colombo, C. A. (2012). Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci in *Lippia alba* (Verbenaceae). *American Journal of Botany*, 99(8), e301–e303.

- Schaberg, P. G., DeHayes, D. H., Hawley, G. J., & Nijensohn, S. E. (2008). Anthropogenic alterations of genetic diversity within tree populations: Implications for forest ecosystem resilience. *Forest Ecology and Management*, 256, 855–862.
- Serrato Álvarez, P. K. (2007). *Los Cañones Colombianos: Una Síntesis Geográfica*. (IGAC, Ed.) (Primera Ed). Bogotá, Colombia.
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21(8), 1794–1805.
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews. Genetics*, 15(2), 121–32.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Cala, M. P., Durán, D. C., & Caballero, D. (2013). Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal of Separation Science*, 36, 192–202.
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. a, Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of Separation Science*, 33(1), 93–103.
- Stashenko, E. E., Ruiz, C., Muñoz, A., Castañeda, M., & Martínez, J. R. (2008). Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K. grown in Colombia. *Natural Product Communications*, 3(4), 563–566.
- Stępień, Ł., Mohler, V., Bocianowski, J., & Koczyk, G. (2007). Assessing genetic diversity of Polish wheat (*Triticum aestivum*) varieties using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(7), 1499–1506.
- Suárez G, A., Castillo, G., & Chacón S, M. I. (2008). Genetic diversity and spatial genetic structure within a population of an aromatic shrub, *Lippia organoides* (Verbenaceae), in the Chicamocha Canyon, northeastern Colombia. *Genetics Research Cambridge*, 90, 455–465.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Vega-Vela, N. E., & Chacón Sánchez, M. I. (2012). Genetic structure along an altitudinal gradient in *Lippia origanoides*, A promising aromatic plant species restricted to semiarid areas in northern South America. *Ecology and Evolution*, 2(11), 2669–2681.
- Vernesi, C., Crestanello, B., Pecchioli, E., Tartari, D., Caramelli, D., Hauffe, H., & Bertorelle, G. (2003). The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): A microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 12, 585–595.
- Viccini, L. F., Souza da Costa, D. C., Machado, M. a., & Campos, a. L. (2004). Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD Markers. *Plant Systematics and Evolution*, 246(1–2), 1–8.
- Vicuña, G. C., Stashenko, E. E., & Fuentes, J. L. (2010). Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*, 81(5), 343–9.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., ... Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–14. Retrieved from
- Wang, H., Jiang, J., Chen, S., Qi, X., Peng, H., Li, P., Song, A., Guan, Z., Fang, W., Liao, F., & Chen, F. (2013). Next-Generation Sequencing of the *Chrysanthemum nankingense* (Asteraceae) Transcriptome Permits Large-Scale Unigene Assembly and SSR Marker Discovery. *PLoS ONE*, 8(4), 1–10.
- Wang, Z., Fang, B., Chen, J., Zhang, X., Luo, Z., Huang, L., Chen, X., & Li, Y. (2010). De novo assembly and characterization of root transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *BMC Genomics*, 11(1), 726.
- Wei, W., Qi, X., Wang, L., Zhang, Y., Hua, W., Li, D., Lv, H., & Zhang, X. (2011). Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. *BMC Genomics*, 12(1), 451.

- Whitlock, M. C., & McCauley, D. E. (1999). Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal to $1/(4Nm + 1)$. *Heredity*, 82, 117–125.
- Wright, S. (1946). Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics*, 31(1), 39–59.
- Wright, S. (1949). The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323–354.
- Yap, I. V., & Nelson, R. J. (1996). WinBoot: A program for performing bootstrap of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. *IRRI Discussion Paper Series*, 14.
- Zalapa, J. E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., McCown, B., Harbut, R., & Simon, P. (2012). Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany*, 99(2), 193–208.
- Zeisset, I., & Beebee, T. J. (2001). Determination of biogeographical range: an application of molecular phylogeography to the European pool frog *Rana lessonae*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 268, 933–938.

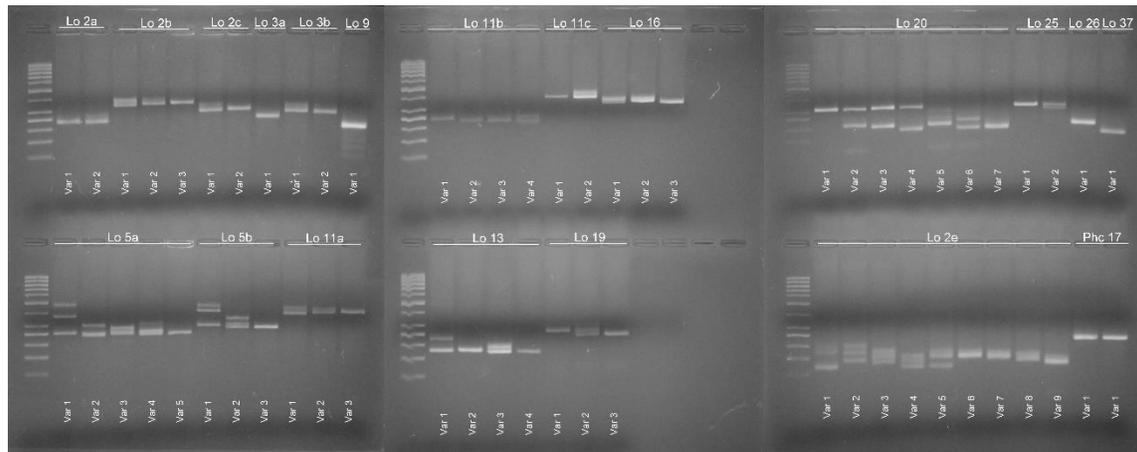
Apéndices

Apéndice A. Información sobre las secuencias cebadores para *loci microsatélites* usadas en el presente estudio.

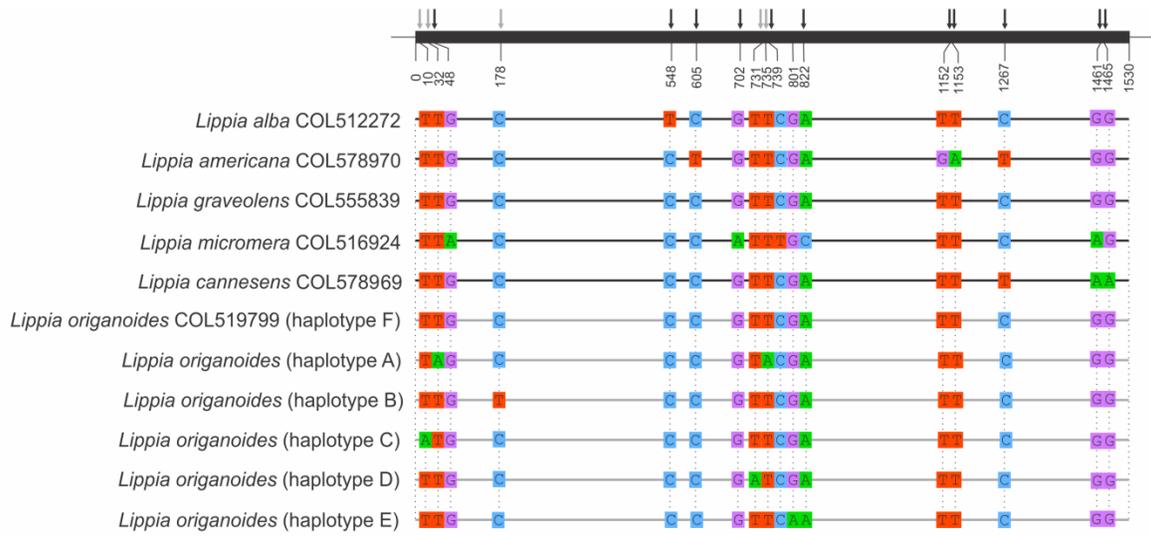
Espece	Locus	Motivo repetido	Secuencia del cebador 5'-3'	Tamaño (pb)
<i>L. canescens</i>	Phc07	(GT) ₈	F: TCCGAGGATGCAAGAGTTGA R: CCAAAAATGCAATCCCAATC	162
<i>L. canescens</i>	Phc12	(TG) ₇	F: CGGGGTTATCCTTGTTGATG R: GCTTCCCCTCAGAATCCAAT	208
<i>L. canescens</i>	Phc13	(AT) ₈	F: AAGAACTTTACTCTGGCGTACCA R: CCACCTACAGGTGAAGAATTGG	244
<i>L. canescens</i>	Phc15	(TC) ₁₂	F: TTTAATGCGGCTTCCTTCTG R: TTGCACGGCCAAATTACAG F: GGAGGCCGTTTCTTTGTTTT	241
<i>L. canescens</i>	Phc17	(TC) ₁₄	R: CAAAGAATATGCTGATCAAAGAG	245
<i>L. canescens</i>	Phc18	(ATG) ₆	F: TGGTCCTTGATGGCATT R: CCCAGAGCGAGCTTAATCAG	227
<i>L. canescens</i>	Phc20	(AC) ₆	F: TTGTCCTTTTCCTGCTCCTG R: GGCGACTTTTCCATCGTTA	217
<i>L. canescens</i>	Phc21	(GT) ₆	F: CAATTTGTAAGGCAGAAGATGC R: GCAGAATCACCAAATCTCTCC	177
<i>L. canescens</i>	Phc22	(GA) ₂₂	F: AAAAATGGCTCCTTCCCTTC R: GGGTCCCCAAAATACCAAAT	296
<i>L. alba</i>	La01	(CT) ₅	F: CAGATTAGGGGGTGGACAAA R: TGA CTCTAGGGATGTCTGGAA	140–156
<i>L. alba</i>	La02	(TTAAT) ₂	F: TGTTCTGTGCTAGTGTGTGA	222–227

Especie	Locus	Motivo repetido	Secuencia del cebador 5'-3'	Tamaño (pb)
<i>L. alba</i>	La03	(GT) ₇	R: CCAATTTACCCGATTTTTGG	154-175
			F: GTCAGAACCTAGAGTCAGTGTG	
<i>L. alba</i>	La04	(AC) ₆	R: AATCCCGGGTAAAAATCC	200-224
			F: GCTTATGTTGCCAGTCATGG	
<i>L. alba</i>	La05	(AC) ₅	R: TCGTGTGAGATCGCGTAGAT	230-260
			F: ACACACTCACGCACACAACA	
<i>L. alba</i>	La06	(TC) ₉	R: CTCAAAGCTGCAAACCCTTT	164-184
			F: ACACAAAGGGTTTGCAGCTT	
<i>L. alba</i>	La07	(C) ₁₃ TTT(TG) ₅	R: CCCTGCTTCTAGTTGTTGTGG	128-150
			F: AGGCGCTCTCTCCCAAAT	
<i>L. alba</i>	La08	(TA) ₅ C(GT) ₁₀	R: AAGAAAAGGCGTGGGTGT	160-210
			F: TCCTGTTTCATGGCTTTGATG	
<i>L. origanoides</i>	Lo 2a	(AG) ₇₋₉	R: TGTGGGGCAAACCTTTC	215-221
			F: AGTCGTGTGAGTGGATAGCC	
<i>L. origanoides</i>	Lo 2b	(AG) ₇₋₉	R: TCCTTTCCTGATGCATTTGAGA	318-324
			F: CTGCTGTTGGTTTCTACACGAG	
<i>L. origanoides</i>	Lo 2c	(AG) ₇₋₉	R: TGATCTTTTCCTTTCCTGATGC	268-274
			F: GGATGATTTAGTGGAAGCAAGG	
<i>L. origanoides</i>	Lo 2d	(TA) _n (GA) _n	R: TGATCTTTTCCTTTCCTGATGC	123-218
			F: TGTGTAACAGACAGTGACCTTG	
<i>L. origanoides</i>	Lo 2e	(TA) _n (GA) _n	R: CACCCTTCTTTTGTCGCCTC	123-218
			F: GTGACCTTGATTTGTCATCACC	
<i>L. origanoides</i>	Lo 3a	(CT) ₁₃₋₁₆	R: ACAGCGTGATTTACACCCTTCT	229-235
			F: GGCTCCGTATACAGCTACAGT	
<i>L. origanoides</i>	Lo 3b	(CT) ₁₃₋₁₆	R: AGCAACAAATGATGGGGATTGA	274-280
			F: GGCCTTTTCACCAGCTAA	
<i>L. origanoides</i>	Lo 5a	(GAA) ₁₂₋₁₃	R: CATAAAGCAACAAATGATGGGG	255-305
			F: TGGGGCCAAATACGCAATAAG	
<i>L. origanoides</i>	Lo 5b	(GAA) ₁₂₋₁₃	R: CAATTGAGGTGGATTCTGAAGGC	284-334
			F: GGAAAGTTAGGGTGTAAAGTGC	
			R:	

Especie	Locus	Motivo repetido	Secuencia del cebador 5'-3'	Tamaño (pb)
<i>L. origanoides</i>	Lo 8	(AG) ₇ (N) _n	TCGTTCCACCAGAATTAGGGATT F: TGCATGAATGGAATGGTTGT R: CATATGTATTCATGTTTCTTGA	223-259
<i>L. origanoides</i>	Lo 9	(TA) ₆₋₇ (N) _n	F: GGTTTCGACCGGTGTGATGTA R: TCACACAAGTTCGAGTTCTGT F: GTTCTTCATTGGAGCGGGAC	199-201
<i>L. origanoides</i>	Lo 10	(TAA) ₈₋₉	R: CCGGCCACTATAACTCCATAAG F: TGTCTTCCTGCATATTTGGACA	150-153
<i>L. origanoides</i>	Lo 11a	(AG) ₁₁₋₁₃	R: CGCACACCCACAGATAGATAAA F: CGTGCGTAAGTCTCCCTCTATC	212-222
<i>L. origanoides</i>	Lo 11b	(TA) ₅ (N) _n	R: TCTTGACATTCACAACCAAACC F: TCAACCAAGTACGATTTTCATGC	349-363
<i>L. origanoides</i>	Lo 11c	(TC) ₅ (N) _n	R: AAGGAACTTTTCACATAGCGAGG F:	386-393
<i>L. origanoides</i>	Lo 13	(TAT) ₈₋₁₀	GGAACCGGCATAAATATAGCGA R: GCAAGCGGAGGAAATAGTACA F:	178-184
<i>L. origanoides</i>	Lo 16	(CAATAG) ₃₋₇	AGCAATAGTAACAGCAGCACCA R: ACTCAATTCCAGATCAGCTTCC F: TGTGCGAGATATGTGCCATT	318-342
<i>L. origanoides</i>	Lo 19	(TA) ₅₋₈ (N) _n	R: TAAACAAACACACCCCAAGACA F: TGGTCACACAATCCCTTATTTG	270-276
<i>L. origanoides</i>	Lo 20	(TA) ₅₋₈	R: CGATCTCATCATAAAACCCC F: TGTGGCATTACTCGTTTGA	318-320
<i>L. origanoides</i>	Lo 25	(TA) ₅₋₇ (N) _n	R: AGAAGAGGCAAATCTGTGGAG F: ATTGAGTGGATGTGTGTGTCT	329-333
<i>L. origanoides</i>	Lo 26	(AT/TA) ₅₋₆	R: CTTGATGAGGATCGCGTGTG F: TGGGAAATGGAAAAGGATGCC	212-214
<i>L. origanoides</i>	Lo 33	(GGGTTG) ₄₋₅	R: CCCAACTTTTACCCTTCTACCC F: TCTTCAGTGGATTGGCAATGG	187-274
<i>L. origanoides</i>	Lo 37	(AG) ₅₋₆ (N) _n	R: ATCCGTTTACCCAAATCACATTT	172-174

Apéndice B. Variantes alélicas de los loci estudiados en *Lippia organoides*.

Apéndice C. Haplotipos de *Lippia* definidos al 100% de identidad a partir de secuencias del gen RNAr 18S



Apéndice D. Transferibilidad (%) de loci microsatélites entre especies del género *Lippia*.

	Cebadores		
	<i>L. organoides</i>	<i>L. alba</i>	<i>L. canescens</i>
<i>L. organoides</i>	91.3	12.5	11.1
<i>L. graveolens</i>	87.0	0.0	0.0
<i>L. alba</i>	48.0	37.5	11.1
<i>L. americana</i>	39.1	12.5	11.1
<i>L. micromera</i>	48.0	25.0	11.1
<i>L. canescens</i>	17.4	0.0	11.1