

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PRINCIPALES
ECOTIPOS DE “OREGANO” (*Origanum* sp.) EN LA REGIÓN
TACNA”**

Presentada por:

Karla Katherine Villalobos Pineda

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima-Perú

2018

DEDICATORIA

A Dios

A mi familia

A mis amigos

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Proyecto de Denominación de Origen del orégano de Tacna que financió esta investigación, la cual fue ejecutada en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNALM.

A todos los miembros del jurado calificador por su valioso aporte. En especial, Al Mg. Sc. César López Bonilla por su asesoría, tiempo y consejos.

A mi familia y amigos, por su apoyo incondicional y constante motivación para el término de mi tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ORÉGANO	4
2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ORÉGANO	6
2.2.1. Según CRONQUIST (1981).....	6
2.2.2. Según APG IV (2016)	6
2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	7
2.4. CENTRO DE ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN	8
2.4.1. Tipos de orégano según distribución geográfica	9
2.5. PROPAGACIÓN.....	9
2.6. USOS.....	10
2.7. CONDICIONES DEL CULTIVO, SUELO Y CLIMA	11
2.7.1. Suelo y clima	11
2.7.2. Fertilización	12
2.7.3. Riego.....	12
2.7.4. Cosecha.....	13
2.8. CONCEPTO DE ECOTIPO.....	13
2.9. TACNA	14
2.9.1. Ubicación geográfica.....	14
2.9.2. Límites	14
2.9.3. Regiones naturales	15
2.9.4. Clima	15
2.9.5. División política	16
2.9.6. Producción agrícola	16
2.9.7. Producción de orégano	18
2.10. MARCADORES MOLECULARES.....	26
2.10.1. Marcadores basados en PCR.....	27
2.10.2. Marcadores AFLP	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	39

3.1.	MATERIAL VEGETAL.....	39
3.2.	MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO.....	43
3.2.1.	Materiales para la extracción y cuantificación del ADN.....	43
3.2.2.	Materiales para la electroforesis y detección de bandas.....	44
3.2.3.	Materiales para la amplificación por PCR.....	44
3.2.4.	Otros materiales.....	45
3.2.5.	Equipos.....	45
3.3.	METODOLOGIA.....	46
3.3.1.	Extracción del ADN.....	46
3.3.2.	Cuantificación y calidad del ADN.....	48
3.3.3.	Amplificación del ADN con marcadores AFLP.....	49
3.3.4.	Selección de iniciadores de combinaciones de AFLP.....	52
3.3.5.	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	53
3.3.6.	Fijación tinción y revelado de geles.....	54
3.3.7.	Análisis de datos.....	54
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	57
4.1.	EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN.....	57
4.2.	ANÁLISIS DE POLIMORFISMO CON MARCADORES AFLP.....	59
4.2.1.	Índice de Contenido Polimórfico (PIC).....	64
4.3.	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO.....	64
4.4.	ANÁLISIS GENÉTICO POBLACIONAL: FRECUENCIAS GÉNICAS EN LOS ECOTIPOS NIGRAS Y VARIOS ECOTIPOS.....	66
4.5.	ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	68
V.	CONCLUSIONES.....	72
VI.	RECOMENDACIONES.....	73
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
VIII.	ANEXOS.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Provincias y distritos del departamento de Tacna.....	16
Tabla 2: Producción de orégano Tacna – Perú.....	20
Tabla 3: Serie histórica del cultivo de orégano en Tacna.....	22
Tabla 4: Orégano regional y provincial - 2015	22
Tabla 5: Coordenadas UTM de las zonas de muestreo	40
Tabla 6: Datos de las muestras frescas del orégano de Tacna.....	41
Tabla 7: Reacción de digestión del ADN genómico	49
Tabla 8: Reacción de ligación de adaptadores	50
Tabla 9: Reacción de preamplificación	51
Tabla 10: Reacción de amplificación selectiva por PCR	52
Tabla 11: Secuencia de los iniciadores AFLP utilizados para el tamizado del análisis de la diversidad del orégano	53
Tabla 12: Concentración del ADN de las 32 muestras de orégano.....	57
Tabla 13: Combinaciones de iniciadores AFLP empleados y número de marcadores encontrados en 32 muestras de orégano	60
Tabla 14: Valores de PIC por combinación de iniciadores del orégano de Tacna.....	64
Tabla 15: Rangos de frecuencias génicas del alelo presente del ecotipo Nigra	67
Tabla 16: Rangos de frecuencias génicas del alelo presente de Varios Ecotipos	67
Tabla 17: Promedio y desviación estándar de los índices de Nei y Shannon para 198 loci AFLP en oréganos de Tacna.....	68
Tabla 18: Promedio y desviación estándar de los índices de Nei y Shannon para 198 loci AFLP en pampa orégano	69
Tabla 19: Número de loci polimórficos y porcentaje de polimorfismo en 198 Loci AFLP en oréganos de Tacna.....	70
Tabla 20: Número de loci polimórficos y porcentaje de polimorfismo para pampa orégano	70
Tabla 21: Número y desviación estándar de alelos observados para Varios Ecotipos y Nigra	70
Tabla 22: Número y desviación estándar de alelos esperados para para Varios Ecotipos y Nigra.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción de orégano según Región de procedencia	21
Figura 2: Producción de orégano según provincias de Tacna.....	23
Figura 3: Serie Histórica del volumen de exportación de orégano	24
Figura 4: Serie Histórica del volumen de exportación frente a la producción de Tacna	25
Figura 5: Exportaciones nacionales de orégano, según países de destino (2015).....	26
Figura 6: Representación esquemática de la técnica de los AFLP.....	31
Figura 7: Codificación de la matriz binaria.....	32
Figura 8: Mapa de la región Tacna con las zonas de muestreo.....	40
Figura 9: Fotografías de los esquejes de algunos ecotipos de orégano. De izquierda a derecha: A) Oreja de elefante; B) Nigra común; C) Chinito coposo.....	43
Figura 10: Fotografía de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown “pampa orégano”	43
Figura 11: Fotografías de los geles de calidad de las muestras de orégano de Tacna .	59
Figura 12: Gel de acrilamida de la Combinación AFLP E32-M47 (L1-L78).....	61
Figura 13: Gel de acrilamida de la Combinación AFLP E32-M48 (L79-L141).....	62
Figura 14: Gel de acrilamida de la Combinación AFLP E35-M50 (L142-L198).....	63
Figura 15: Dendograma de caracterización molecular de los 198 Loci AFLP del orégano de Tacna y pampa orégano	66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de Extracción con buffer CTAB establecido por Doyle & Doyle (1990), con algunas modificaciones	82
Anexo 2: Composición del CTAB-Buffer de lisis (AppliChem).....	84
Anexo 3: Componentes del Buffer TBE 10 X	84
Anexo 4: Componentes del tampón de carga.....	84
Anexo 5: Soluciones utilizadas para la elaboración de geles de acrilamida	85
Anexo 6: Reactivos para tinción de geles de poliacrilamida por el método de Nitrato de plata.....	85
Anexo 7: Datos de las muestras frescas del orégano de Tacna.....	87
Anexo 8: Principales ecotipos de orégano producidos en Tacna.....	89
Anexo 9: Matriz de Datos Binarios de 198 loci AFLP de 32 muestras de orégano y 4 muestras de pampa orégano.....	91
Anexo 10: Matriz de Similitud de 32 muestras de orégano y 4 muestras de pampa orégano	95

RESUMEN

El cultivo del orégano (*Origanum sp.*) presenta perspectivas favorables para el desarrollo del departamento de Tacna, región donde se produce en mayor volumen a nivel nacional y es la zona de mayor producción agroexportadora. Este cultivo es grandemente demandado en los mercados internacionales por su aroma y particular sabor. Para una mejora en el sistema de producción se requiere conocer sobre la diversidad del cultivo; por lo cual, en la presente investigación se estudió la diversidad genética del orégano, que permitirá entender el estado de la variación en el cultivo. Para ello, se utilizó marcadores moleculares AFLP en el análisis genético de los ecotipos de orégano; con la finalidad de comprender mejor el aporte genético a la diferenciación fenotípica. Se seleccionaron 3 combinaciones de iniciadores AFLP de un total de 12, con las que se generaron 198 loci. Se aplicó el análisis cladístico de taxonomía numérica, utilizando el programa NTSYS y el coeficiente de similitud genética Dice. Asimismo, se construyó el dendograma de caracterización molecular, que permitió apreciar índices de similitud altos entre los ecotipos de orégano, que van desde el 80 hasta el 95 por ciento. Se apreció que los ecotipos se agrupan sin un patrón según esta denominación; aunque, las tipo Nigras tienden a presentarse juntas. El grupo externo utilizado fue el “pampa orégano”, que se separa a una similitud de 0.23, es decir tiene 23 por ciento de similitud respecto a los ecotipos de orégano, con lo cual se comprueba que es una especie genéticamente diferente. Respecto a la estructura poblacional, analizada con el programa POP GENE, se determinó que los ecotipos estudiados tienen baja diversidad génica tanto de Nei como de Shannon, lo cual es predecible, debido principalmente al sistema reproductivo asexual, la rotación de los esquejes entre parcelas pequeñas, etc. También, se encontró que la especie presenta un bajo polimorfismo (36.87 por ciento). Respecto a las frecuencias génicas en los ecotipos, se encontró que alrededor del 70 por ciento de los alelos están fijados o perdidos. Finalmente, considerando la alta homogeneidad genética en los oréganos de Tacna, las variaciones fenotípicas presentes en los ecotipos, se podrían deber principalmente a factores medioambientales en donde son cultivados: altitud, temperatura, precipitaciones, humedad, etc.

Palabras clave: orégano, *Origanum sp.*; ecotipos, diversidad genética, marcadores moleculares AFLP.

ABSTRACT

The cultivation of oregano (*Origanum sp.*) presents favorable perspectives for the development of the department of Tacna, the region where it is produced in greater volume at a national level and is the area of greater agro-export production. This crop is highly demanded in international markets for its aroma and particular flavor. For an improvement in the production system, it is necessary to know about the diversity of the crop; therefore, in the present investigation the genetic diversity of oregano was studied, it will allow understanding the state of variation in the crop. For this, AFLP molecular markers were used in the genetic analysis of the oregano ecotypes; in order to understand more the genetic contribution to phenotypic differentiation. Three combinations of AFLP primers of a total of 12 were selected, with which 198 loci were generated. The cladistic analysis of numerical taxonomy was applied, using the NTSYS program and the coefficient of genetic similarity Dice. Likewise, the molecular characterization dendrogram was constructed, which allowed to appreciate high similarity indexes among oregano ecotypes, ranging from 80 to 95 percent. It was appreciated that the ecotypes are grouped without a pattern according to this denomination; although, the Nigras type tend to appear together. The external group used was "pampa oregano", which is separated to a similarity of 0.23, that is, it has 23 percent similarity to the oregano ecotypes, which shows that it is a different species, genetically. Regarding the population structure, analyzed with the POP GENE program, it was determined that the ecotypes studied have low genetic diversity of both Nei and Shannon, which is predictable, due mainly to the asexual reproductive system, the rotation of the cuttings between small plots, etc. Also, the species was found to have a low polymorphism (36.87 percent). About the gene frequencies in the ecotypes, it was found that about 70 percent of the alleles are fixed or lost. Finally, considering the high genetic homogeneity in the Tacna oregano, the phenotypic variations present in the ecotypes, could be mainly due to environmental factors where they are grown: altitude, temperature, rainfall, humidity, etc.

Key words: oregano, *Origanum sp.*; ecotypes, genetic diversity, molecular markers AFLP.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente en el Perú, el cultivo de hierbas aromáticas se encuentra en constante crecimiento, tanto en el mercado nacional como internacional, captando el interés de pequeños y medianos productores como una alternativa económica sustentable. Son cultivos versátiles que se adaptan a modalidades de mercado cambiantes por sus diversos usos, sea como hierbas frescas o secas, aceites esenciales u otros.

Dentro de las plantas aromáticas, de buena demanda y precio se encuentra el orégano (*Origanum sp.*). Esta especie crece en forma casi silvestre y su manejo tecnológico durante la producción no necesita de mucha inversión, es por ello que muchos pequeños agricultores han optado por la siembra de esta hierba. Otro factor importante es el no necesitar de mucha agua para desarrollarse. Asimismo, la incidencia de plagas es poco significativa en el cultivo.

En el Perú, el orégano se cultiva en los valles interandinos y, la región donde se produce en mayor volumen, es Tacna. Asimismo, esta es la zona de mayor producción agroexportadora.

La producción de orégano significa una gran posibilidad de desarrollo en la región Tacna; aunque existen varios problemas con los que se enfrenta el agricultor, agroexportador, procesador y comerciante. El principal problema a considerarse es el no reconocer el verdadero potencial que significa este cultivo para la región. Si bien hay varias asociaciones de productores, en algunas de ellas cada uno trabaja de forma independiente, afectando la asociatividad.

El orégano presenta perspectivas favorables para el desarrollo de la región, debido a que la transformación del producto en sus derivados generaría trabajo para los pobladores,

mejoraría la capacidad económica de la zona e involucraría a instituciones a realizar trabajos de investigación (Valdivia,2001). Por ello, sería muy beneficioso dar mayor importancia al desarrollo tecnológico para elevar la rentabilidad del agro, ya que actualmente, los productores de orégano no cuentan con los medios económicos ni el conocimiento técnico necesario para lograr una mejor competitividad en el mercado nacional e internacional; tal situación viene favoreciendo a los comerciantes intermediarios, quienes son los que incrementan sus utilidades.

Para dar solución a estos problemas, se debería empezar por identificar las ventajas competitivas del producto y establecer las bases para la formación de un *cluster* de orégano en la región, donde todos tendrán una participación activa y coordinada con el único fin de maximizar los beneficios obtenidos por este producto y sus derivados; esto favorecería a una mejor distribución de la riqueza en la zona (Valdivia, 2001).

Actualmente, la Dirección de Comercio Exterior y Turismo (DIRCETUR) viene fomentando la consolidación de la Mesa Técnica del Orégano, organización que formará parte del Consejo Regulador, en caso de que el producto “Orégano de Tacna” logre ser reconocido por INDECOPI (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual) como una Denominación de Origen, al igual que el Pisco, la Aceituna de Tacna, etc.

El cultivo del orégano adquiere particular connotación económico-social en el departamento de Tacna por su significativa participación en el valor bruto de producción, su incidencia en la agro-industria y la facilidad de incrementar el cultivo por la expectativa que ofrece su demanda en los mercados externos; además, se encuentra ligada a una tradición del cultivo desde hace decenas de años y ha constituido una de las principales fuentes de ingresos para los agricultores (DIRCETUR Tacna, 2012). Por otro lado, el orégano es una hierba culinaria importante en la industria gastronómica, farmacéutica y terapéutica.

Los ecotipos más comercializados de orégano en Tacna son principalmente: La “Nigra común” y en menor proporción “Oreja de Elefante”, “Chinito coposo”, “Mejorado”

entre otros.

Sin embargo, en este cultivo es común el uso del término “Ecotipo”, para referirse a las variantes del orégano de Perú; además, no cuenta con bases genéticas, que demuestren con claridad su identificación y certificación. Sin embargo, este es el material que se usa como semillero. En este cultivo los productores, acostumbran utilizar categorías para describir la variación como: ecotipos, morfotipos, variedades, etc; basándose sólo en el aspecto de las hojas y el hábito de crecimiento de la planta. Este hecho crea una gran confusión dentro de la diversidad de la especie, no existiendo por el momento información aclaratoria al respecto. En el presente trabajo sobre caracterización molecular, no se realizó la caracterización morfológica, ni taxonómica, de tal forma que los análisis se hicieron utilizando sólo los ecotipos.

En ese contexto el estudio de la diversidad genética del orégano, contribuirá a un mejor entendimiento de las variantes del cultivo. Se hará uso de marcadores moleculares AFLP en la evaluación genética de los ecotipos de orégano, lo cual proporcionará una idea del aporte del componente genético a la diferenciación fenotípica y podrá ayudar a entender mejor el estado de la diversidad varietal o de los conceptos empleados como ecotipos, variedades, morfotipos u otros. En esta investigación se tiene como objetivo principal: Evaluar el estado de la diversidad genética de los principales ecotipos de orégano (*Origamun sp.*) cultivados en la región Tacna y objetivos específicos : Caracterizar la diversidad genética de los principales ecotipos de orégano de Tacna mediante marcadores moleculares AFLP, estimar los parámetros genéticos de la estructura poblacional del orégano de Tacna y establecer el grado de semejanza o diferencia genética entre los ecotipos de orégano.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ORÉGANO

Como “orégano” se conocen a diversas especies del género *Origanum* e híbridos cultivados, entre ellos están: *Origanum vulgare*; *Origanum vulgare* ssp. *viride*, *Origanum majorana* y *Origanum x applii* (*O. majorana* x *vulgare* ssp. *vulgare*) y todas las subespecies de *Origanum vulgare*.

En un trabajo de identificación de los oréganos cultivados en Argentina (Xifreda ,1983) halló que el *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*, citado como el más cultivado en este país, no fue hallado en las muestras analizadas por la autora en los últimos 6 años.

El “orégano” (*Origanum sp.*); es una especie herbácea, perenne y rústica, perteneciente a la familia Lamiaceae. El nombre viene del griego “oros” (montaña) y “ganos” (ornamento): “El ornamento, decoración, o belleza de las montañas”. Las especies del género *Origanum* son ampliamente utilizadas en todo el mundo como una especia muy popular, bajo el nombre vernácula “orégano”.

El (*Origanum vulgare* L. 1753) es una planta originaria de Europa (región mediterránea) y de Asia occidental. Fue utilizado por los antiguos griegos y romanos. Es fuertemente olorosa y de gran sabor. En las zonas más cálidas el aroma es de mayor intensidad, el sabor más picante y el perfume más persistente. Se cultiva por su demanda en el sector farmacéutico y cosmético, además de la industria alimentaria y semillera.

El orégano contiene un aceite esencial que se compone principalmente de monoterpenos y sesquiterpenos, lo que da cuenta de sus cualidades aromáticas por excelencia en el uso práctico en la preparación de diversos platos culinarios. Entre los compuestos químicos que contribuyen al sabor son el carvacrol, timol, limoneno, pineno, ocimeno y cariofileno (EOL, 2005). También la herboristería lo consume ampliamente, por sus propiedades tónicas, digestivas, estomacales y antiasmáticas (ITDG, 2010).

Los mayores productores a nivel mundial de orégano son Turquía, Albania, Grecia, Marruecos, Egipto y México. (Limache, 2012). Su cultivo es muy difundido en Grecia, Italia, España, Turquía, Francia, Albania, Yugoslavia y Marruecos. En América, los principales productores son: México, Brasil, Chile y Costa Rica.

En el Perú, los centros de mayor producción se encuentran en el departamento de Tacna con 895 toneladas en el año 2015 y con una superficie cosechada de 1 845 hectáreas, seguida de Moquegua con 710 ha, Arequipa con 680 ha, y el resto del país con 146.08 ha, siendo la zona del sur la de mayor potencial productivo (SIEA, 2015).

Su introducción en el Perú es desconocida, posiblemente sea a través de Tacna por inmigrantes europeos (italianos), que se asentaron en Tacna y Arica, Prompex (1997) Se encuentra en los valles interandinos de la sierra peruana. El departamento de Tacna es el principal centro de producción seguido de Moquegua, Arequipa y Ancash, en lo que se refiere a superficie sembrada. Es resistente al frío, sin embargo a temperaturas menores a 5 °C afectan al cultivo retrasando su crecimiento y quemando los bordes de las hojas. Se adecua a cualquier tipo de suelo que no sea salino, los mejores rendimientos se obtienen en suelos franco - arenosos y francos. El orégano es una especie con amplia tolerancia en altitudes y temperaturas. Prospera bien entre los 2400 hasta los 4200 m.s.n.m.

Comercialmente el término “orégano” es utilizado para referirse, según INDECOPI, en su norma 209.190 (1982), a las hojas y botones florales desecados, picados o molidos de la especie *Origanum vulgare* L.

Di Fabio (2007), indicó que los oréganos que se producen en el Perú (“Zambito” y “Nigra”) son híbridos que provienen del cruzamiento de la mejorana (*Origanum majorana* L.) con las subespecies de *O. vulgare* L. subsp. *vulgare* y *O. vulgare* L. subsp. *virens*. Por lo tanto, el orégano “Zambito” sería *Origanum x aplii* (Domin) Boros, proveniente del cruzamiento de *Origanum majorana* con *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*; y el orégano “Nigra” sería el *Origanum x majoricum* Cambessedes, proveniente del cruzamiento de *Origanum majorana* con *Origanum vulgare* subsp. *virens*.

2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ORÉGANO

2.2.1. Según CRONQUIST (1981)

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Origanum*

Especie: *Origanum* sp.

Nombres comunes: “orégano”, “oreganín”, “Mejorana silvestre”

2.2.2. Según APG IV (2016)

Clado: Angiospermas

Clado: Eudicotiledoneas

Clado: Superastéridas

Clado: Astéridas

Clado: Lámidas

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Origanum* L.

Especie: *Origanum* sp.

2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El orégano es una planta perenne, alcanza entre 30 y 80 centímetros de altura en función a la calidad de sitio. Es de hábito de crecimiento matajoso, de porte bajo, cuyo desarrollo se caracteriza por la formación de muchas ramas primarias y secundarias, no habiendo una distinción entre ellas. La vida útil de la planta varía de 10 a 20 años según se trate de terrenos arcillosos o arenosos y del manejo del cultivo.

- Las hojas son opuestas, simples, pecioladas, aserradas, penninervias y de base cuneiforme o redondeada. Presentan tamaños muy diferentes, dependiendo de los ecotipos. Según se asciende por el tallo, las hojas presentan tamaños cada vez más pequeños. Estas hojas se presentan de color verde, por el haz, y más pálidas y pubescentes por el envés. Tienen forma aovada-oblonga, aovada o elíptica, con ápice agudo u obtuso y con los bordes pubescentes. Posee numerosos pelos glandulares tanto por el haz como por el envés.
- Posee el tallo recto, cuadrangular, erguido y de color verde o rojizo (dependiendo de la variante y subespecie). Se encuentran generalmente ramificados en su parte superior, y su parte inferior suele estar lignificada o endurecida. Presenta hasta diez pares de ramas por tallo, cuyas longitudes varían. Los tallos tienen capacidad de formar rizomas (Klauer, 2009).
- Su raíz es fasciculada, muy ramificada y alcanza hasta 40 cm de profundidad. Es susceptible a problemas fungosos cuando está expuesta a mucha humedad.
- Las inflorescencias están en cimas formando grupos de flores que se reúnen en verticillastos. Las flores son blanquecinas o purpuras y hermafroditas, son tubulares con cinco lóbulos. Corola gris-violeta de 5-7 mm, pubescente, ovada en la labio superior de 2.5 mm de diámetro, labio inferior con lóbulos subcirculares de 1.5 mm. (EOL, 2005).

- El androceo está formado por cuatro estambres didínamos erectos, divergentes de la base. Sus anteras también son divergentes.
- Gineceo de ovario súpero, bicarpelar, dos óvulos por lóculo, bilocular pero por formación de falsos tabiques se obtienen cavidades. Estilo ginobásico, largo y filiforme que acaba en un estigma bífido (Menéndez *et al.*, 2007).
- Cáliz tubular, 2.5 mm- 1 mm, de color púrpura, puberulentas, sépalos ovado-triangulars de 1mm, ápice subagudo. Las brácteas son semejantes a las hojas, bractéolas ausentes. Pedicelo de menos de 1 mm (EOL, 2005).
- El fruto es un tetraquenio, el cual se separa en cuatro núculas elipsoides-oblongas, de menos de 0.5 mm (Las semillas tienen endosperma escaso o nulo). Genera gran cantidad de semillas y mantiene su poder germinativo durante 4 a 5 años.

Toda la planta posee unas pequeñas glándulas donde está contenida las esencias aromáticas, de color amarillo limón, compuesta por un estearopteno y dos tipos de fenoles, como mayoritario el carvacrol y en menor proporción el timol. Las raíces contienen estaquiosa y los tallos sustancias tánicas (Palomino, 2011).

La propagación por esquejes es la práctica más usual en nuestro medio para la plantación de cultivos de orégano debido a que es fácil de obtener (directo de la misma planta), y fácil de instalar en el campo (Klauer, 2009).

2.4. CENTRO DE ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

El género *Origanum* (tribu Mentheae, familia Lamiaceae) se caracteriza por una gran diversidad morfológica y química. Cuarenta y nueve taxones divididos en 10 secciones pertenecen a este género, la mayoría de ellos tiene una distribución muy local alrededor del Mediterráneo. En particular, tres taxones están restringidos a Marruecos y el sur de

España, dos ocurren en Argelia y Túnez, tres son endémicas de la Cirenaica, nueve están restringidos a Grecia, Balcanes del Sur y Asia Menor (Seis son endémicas locales griegas), 21 se encuentran en Turquía, Chipre, Siria y el Líbano (21 son endémicas locales turcos), y ocho están distribuidos a nivel local en Israel, Jordania y la península del Sinaí.

Introducido por los seres humanos, esta especie también ha sido encontrada en América del Norte (Ietswaart, 1980).

2.4.1. Tipos de orégano según distribución geográfica

Subespecies de *Origanum vulgare* L. 1753 (IPGRI, 1996)

1. *O. vulgare* L. subsp. *vulgare* Europa, Irán, India y China.
2. *O. vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desfontaines) Ietswaart Argelia y Túnez .
3. *O. vulgare* L. subsp. *gracile* (Koch) Ietswaart Afganistán, Irán, Turquía y antigua URSS
4. *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Enlace) Ietswaart Albania, Croacia, Grecia y Turquía.
5. *O. vulgare* L. subsp. *viridulum* (Martrin- Donos) Nyman Afganistán, China, Croacia, Francia, Grecia, la India, Irán, Italia y Pakistán.
6. *O. vulgare* L. subsp. *virens* (Hoffmannsegg & Link) Ietswaart Azores, Islas Baleares, Islas Canarias, Madeira, Marruecos, Portugal y España.

2.5. PROPAGACIÓN

La multiplicación del orégano, se realiza mediante esquejes, que varía de 3 a 5 por golpe de siembra. Para poder calificar la calidad de los esquejes que se van a plantar es muy importante que éstos deban obtenerse de plantas provenientes de campos con 02 años de cultivo como mínimo, con un tamaño aproximado de 30 a 40 cm de altura, de buena consistencia: robustas y vigorosas; libres de plagas y enfermedades. El corte para la obtención de esquejes deberá hacerse cuando el cultivo tenga aproximadamente de 10 a 15 % de emisión de primordios florales, ya que el uso de esquejes con flores maduras

retarda el tiempo de rendimiento y ramificación.

La longitud del esqueje deberá ser de 15 a 20 cm. Los esquejes pequeños y delgados, sembrados en grupos de cinco a siete en zonas templadas y en buena época del año (de octubre a enero), prenden mucho más rápido que los esquejes gruesos, debido posiblemente a la gran acumulación energética que poseen (acumulación de fitohormonas reguladoras de crecimiento), y lo utilizan sólo para la emisión de raíces. En climas cálidos, los esquejes débiles no sirven, ya que la incesante luminosidad y radiación solar, terminan por quemarlos, siendo de mayor utilidad los esquejes más vigorosos (Limache, 2012).

En áreas grandes, donde la plantación no pueda realizarse en un sólo día y que se requieran más de dos o tres días para finalizarlo, los esquejes deberán ser colocados en lugares sombreados y provistos de humedad suficiente en el tercio inferior del esqueje, evitando de esta forma su deterioro o muerte.

Los esquejes se siembran directamente en campo definitivo (que es lo que normalmente se hace), o en camas preparadas adecuadamente para someterlas a un proceso de enraizamiento, para su posterior trasplante a campo definitivo; logrando prendimientos hasta en un 100 %. La instalación de esquejes enraizados, asegura no sólo un buen prendimiento, sino ahorro de material, ya que un solo esqueje representa una planta, y no 3 ó 5 como en el sistema común.

2.6. USOS

Del orégano mayormente se usan sus hojas ya sean frescas, secas, picadas y molidas para la elaboración de diversos productos. Su calidad es medida por el aceite volátil, la ceniza insoluble en ácido y el contenido de humedad.

- Su uso como condimento es muy popular en los diversos estratos sociales, en la elaboración de diversas comidas y platos culinarios: platos criollos (salsas, guisos, caldos y ensaladas), en la comida internacional (por ejemplo: pizzas) y

en la elaboración de embutidos.

- A escala industrial, es muy usado en perfumería por su gran contenido de aceites esenciales los que resaltan y fijan sus aromas, de igual forma es usado en la elaboración de jabones perfumados y en los diversos preparados de tocador (Trasmonte, 1993).
- En la industria farmacéutica se usa para preparar linimentos antirreumáticos, cremas para la dermatitis, como desinfectante y cicatrizante. También es indicado por sus propiedades terapéuticas en el tratamiento de trastornos digestivos (dispepsias, flatulencias), en accesos de tos, faringitis y bronquitis.

2.7. CONDICIONES DEL CULTIVO, SUELO Y CLIMA

El orégano es una especie de alta adaptabilidad a gran variedad de suelos y climas, lográndose cosechas de buena rentabilidad, tanto en deshidratados como en aceites esenciales. Los mejores resultados, tanto cualitativos como cuantitativos, se obtienen en las zonas cálidas (Choqueña, 2003).

2.7.1. Suelo y clima

Se desarrolla desde el nivel del mar hasta los 4 200 m.s.n.m., consiguiéndose mejores producciones en alturas comprendidas entre los 2 200 a 4 200 m.s.n.m.

El orégano, es considerado como un cultivo marginal, porque se puede desarrollar en suelos pobres y de topografía accidentada; e incluso puede vivir en condiciones de baja fertilidad. El cultivo del orégano tiene éxito en todos los tipos de terreno ricos en materia orgánica, sueltos, silíceos arcillosos, francos, humíferos, calcáreos, arcilloso – arenosos e incluso en lugares áridos. Prefiere suelos francoarenosos, en los que puede vivir hasta 10 años (Klauer, 2009).

A pesar de que se adapta a cualquier tipo de suelo, no es conveniente el cultivo en aquellos que presenten alta salinidad, ya que perjudica su normal desarrollo; sin embargo, en suelos con ligera salinidad, el cultivo no ha mostrado problemas.

El orégano, se adapta a cualquier clima, alcanzando sus mayores rendimientos en ambientes templados y soleados (de 7 a 8 horas de sol), donde alcanza los mayores rendimientos de aceite esencial.

2.7.2. Fertilización

Se recomienda una fertilización con una buena disponibilidad de fósforo y nitrógeno durante el 2° y 3° año luego de la siembra; y cuando se observe el crecimiento o prendimiento de las plantas, aplicar fuentes de nitrógeno en dosis de 50 kg/ha (2 sacos de urea o 3 sacos de nitrato de amonio por ha). Esta dosis se debe repetir después de cada corte o cosecha (Choqueña, 2003).

La fertilización con fósforo y potasio puede ser muy crítica en suelos de irrigación (costa) y suelos de la sierra, sobre todo en zonas de ladera (Morales, 1995).

El aporque sobre la planta se debe realizar con la finalidad de fertilizar y proteger las raíces del ataque de hongos; esta debe realizarse 2 semanas después de los cortes. Después del cuarto amontonamiento, la planta ya debe quedar en el lomo del surco.

2.7.3. Riego

Se requiere riegos frecuentes para un adecuado desarrollo de la planta, se debe evitar riegos pesados, ya que el exceso de humedad en la base del tallo y raíz es causa de enfermedades fungosas que originan pudriciones y muerte de las plantas. Después de la siembra, los riegos deben ser ligeros y frecuentes, para mantener húmeda la zona donde se encuentran las raíces o tallos enterrados (Montoya *et al.*, 2000).

2.7.4. Cosecha

La época ideal para la recolección es en plena floración (en general, durante el verano), no antes; cuando las plantas empiecen a florear entre un 15 a 20%, al alcanzar unos 40 a 50 cm de altura y cuando las hojas se encuentren bien desarrolladas de color verde oscuro y de un aroma intenso (Morales, 1995). Es preferible esperar a que algunas flores estén marchitas y no precipitarse cuando empiecen las primeras floraciones, pues la producción de esencia de las flores se incrementa cuando ya se han desarrollado totalmente.

a. Índice de madurez

El momento oportuno está determinado por la floración de las plantas. Se producen flores pequeñas, blancas con franjas moradas. Se debe cosechar cuando las flores cambian a color amarillo y se inicia la caída de los pétalos; esto ocurre en diciembre o primeros días de enero (Primer corte) y una segunda cosecha puede efectuarse a fines de verano (marzo-abril) (Mejía, 2012).

b. El deshidratado del orégano

Puede ser, artesanal en secaderos solares, en catres bajo red de media sombra, en tinglados, o industrial en hornos o túneles de aire caliente.

2.8. CONCEPTO DE ECOTIPO

Grupo subspecífico que se adapta genéticamente a un hábitat particular. En Biología, ecotipo es una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, un ambiente particular o un ecosistema definido, con unos límites de tolerancia a los factores ambientales. El ecotipismo es una forma de variación asociada al medio y no implica necesariamente la separación de poblaciones en áreas geográficas aisladas entre sí. Es una misma especie que en ambientes diferentes tienen una expresión fenotípica distinta por la interacción de los genes con el medio ambiente.

El concepto de ecotipo es fundamental para explicar el proceso evolutivo de las especies. Es decir, las especies que tienen un intervalo de distribución amplio, por lo que respecta a diversos niveles de sus factores limitantes (temperatura o altitud, intensidad de luz, tipo de suelo, pH, entre otras condiciones), a menudo difieren fisiológicamente y, en ocasiones, morfológicamente en distintas partes de dicho intervalo, formando ecotipos. Usualmente esto incluye cambios genéticos, pero también puede obtenerse una compensación de factores sin fijación genética mediante ajustes fisiológicos.

2.9. TACNA

2.9.1. Ubicación geográfica

La Región Tacna, es la más austral del Perú, se halla situado en el extremo sur del Perú, a 1,293 km de Lima, entre las coordenadas 16°58'00", 18°21'34.8" de latitud Sur y los 60°28'00" y los 71°00' 02" de longitud Oeste (Castagnino *et al.*,2017). La Región Tacna limita por el Noroeste, con el Departamento de Moquegua, por el Noreste, con el Departamento de Puno, por el Este con la República de Bolivia, por el Oeste con el Océano Pacífico (Mar de Grau).

Está ubicada en la cabecera del segundo desierto más grande del mundo (Atacama) cuya característica esencial es la hiperaridez, que resulta siendo una limitación grave en recursos hídricos para uso agropecuario y consumo humano. La capital del departamento es la ciudad de Tacna. Tiene una altitud de 562 m.s.n.m.

2.9.2. Límites

La Región Tacna políticamente está conformada por cuatro provincias y 27 distritos y limita por el Este con la República de Bolivia, por el Oeste con el Océano Pacífico, por el Sur con la República de Chile, por el Noroeste con la Región de Moquegua y por el Noreste con la Región de Puno.

2.9.3. Regiones naturales

La Región Tacna cuenta con dos regiones: La costa de clima seco, con variaciones de temperaturas de 12° a 30° C, y afluencia de cuatro ríos costeros que condicionan la formación de 3 valles aislados entre sí, facilitando para el caso de la sanidad agraria la aplicación de programas de control y erradicación de plagas y enfermedades. Presenta grandes ventajas para el cultivo de frutas, hortalizas y otros con un gran potencial de exportación (POI, 2016).

La sierra se caracteriza por la baja fertilidad de sus suelos y topografía accidentada, dependiendo básicamente de las precipitaciones pluviales, influyendo en los bajos niveles de productividad agrícola. Esta región presenta un gran potencial de desarrollo agrícola en los valles interandinos y un potencial pecuario en las zonas altoandinas, potencial desarrollo de cultivos andinos y de mejoramiento de pastos naturales, así como necesidades de reforestación.

2.9.4. Clima

La Región Tacna se encuentra ubicada en las zonas de vida: desierto desecano templado cálido (ds-tc). Su clima es templado entre 25 y 30°C en el verano y entre los 6 y 13°C en el invierno con una temperatura media anual es de 17°C y la precipitación total anual está por debajo de los 100 mm, con una humedad relativa de 75%. Su clima es templado entre 25 y 30°C en el verano y entre los 6 y 13°C en el invierno con una temperatura media anual es de 17°C y la precipitación total anual está por debajo de los 100 mm, con una humedad relativa de 75%.

La temperatura fluctúa entre los 12 y los 28 °C, en la costa, y los 0 y los 18 °C en la sierra. El clima es cálido y húmedo en la costa, templado y frío en la sierra, con la característica de contar con mayor número de horas de sol respecto de otras regiones, lo que favorece el ciclo vegetativo de los cultivos.

La sierra ocupa un área de 8308 km², o 51,7% de la superficie regional. Tiene dos áreas

definidas: la zona intermedia y la zona altoandina. La primera está comprendida entre los 2 mil y los 4 mil m. s.n.m. y está formada por valles interandinos y quebradas. Se caracteriza por presentar microclimas especiales con 12 383 hectáreas apropiadas para el cultivo de orégano, ajos, frutales exóticos, etcétera. La zona altoandina, a partir de los 4 mil m.s.n.m., está dedicada a la crianza de camélidos sudamericanos y, en menor proporción, ovinos. El cultivo del orégano puede hacerse entre los 100 y los 4200 m. s.n.m., específicamente en los valles de Candarave, Jorge Basadre y Tarata.

2.9.5. División política

La Región Tacna, políticamente está conformada por 4 provincias (Tacna, Jorge Basadre G, Tarata y Candarave) y 27 distritos, tal como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1: Provincias y distritos del departamento de Tacna

Provincias	Tacna	Jorge Basadre	Tarata	Candarave
Distritos	Tacna	Locumba	Tarata	Candarave
	Alto de la Alianza	Ilabaya	Estique	Cairani
	Ciudad Nueva	Ite	Estique-Pampa	Camilaca
	Lanchipa		Chucatamani	Curibaya
	Pocollay		Sitajara	Huanuara
	Calana		Susapaya	Quilahuani
	Pachía		Tarucachi	
	Palca		Ticaco	
	Sama			
	Coronel Gregorio A.L.			

FUENTE: INEI (2009).

2.9.6. Producción agrícola

La base productiva de la Región Tacna está sustentada fundamentalmente en el sector agropecuario: para la actividad agrícola cuenta con aproximadamente con 30,383 ha bajo riego, donde se cultivan diversos cultivos dentro de los que destacan el maíz

amiláceo, el maíz amarillo duro, papa, olivo, vid, peral, orégano, ají, manzano, zapallo, tomate; y dentro de los forrajes cultivados se cuenta con la alfalfa y el maíz forrajero y/o chalero. Sin embargo, esta actividad está supeditada a las limitaciones que le impone la escasa disponibilidad del recurso hídrico, factor restrictivo al desarrollo de la producción y productividad (POI, 2016).

Es importante señalar la irracional e ineficiente explotación de los recursos hídricos y edáficos, por el predominio de sistemas de riego tradicionales y el cultivo de especies altamente exigentes de agua, no se aprovecha este recurso hídrico tan valioso en su real dimensión para el desarrollo de cultivos que requieren menores niveles de agua y son altamente rentables (agro exportación) e industrializables, además dicha producción equilibrarán la oferta y la demanda del mercado interno (POI,2016).

La falta de planificación en la producción de cultivos, ocasiona un exceso en la diversificación de cultivos, la sobreproducción de determinados productos que rebasa la demanda del mercado local distorsiona el nivel de los precios. Esta problemática ha sido agravada por la progresiva parcelación y/o atomización de la tierra, profundizando la existencia del minifundio y la consecuente falta de organización en la producción. Las limitaciones para el desarrollo de la actividad agrícola además de la escasez del recurso hídrico son la limitada aplicación de tecnologías modernas disponibles en el medio, la escasa mecanización, la presencia del minifundio, así como el acceso al crédito agrario ofrecido por Agrobanco y la banca privada (POI,2016).

La actividad agropecuaria presenta bajos niveles de producción y productividad debido a la estructura de propiedad de minifundio, que no permite tener volúmenes de producción acorde con el mercado nacional e internacional, a la idiosincrasia del agricultor que responde a patrones culturales de sus lugares de origen y se manifiesta en la aversión al riesgo, al individualismo que limita la organización de productores y a una baja productividad por unidad de medida. Además del uso de sistemas de cultivo y riego no acordes con la vocación productiva de las zonas agrícolas específicas. Por otro lado, el efecto de la política económica recesiva que ha deprimido los precios, no ha superado los problemas de sobre costos y limitado acceso al crédito bancario y financiamiento, falta de maquinaria agrícola, limitaciones a las inversiones privadas por

la normatividad vigente y por último la sanidad agrícola que es deficiente no hace competitivos a nuestros productos, restringiendo el ingreso al mercado internacional por incumplimiento de la actividad fitosanitaria por parte de los agricultores.

a. Comercialización y Precios

En la Región Tacna y a nivel nacional existe un sistema ineficiente de comercialización que se caracteriza por la ausencia de una infraestructura adecuada donde se pueda ofertar la producción agrícola, lo cual ocasiona muchas pérdidas y mermas para el productor, dando lugar asimismo a una desproporcionalidad en los márgenes de intermediación entre productores, distribuidores, mayoristas; propiciando una menor relación precio-calidad de los productos agrícolas a nivel de consumidores.

2.9.7. Producción de orégano

La Región Tacna destaca como principal productor nacional, con más de 70% de la oferta, debido a las ventajas de su clima y su suelo. Existe una relación inversa entre los niveles de producción y los niveles de precio, lo que crea inestabilidad en la oferta pues carece de poder de negociación en los mercados internacionales. No existe un sistema de inteligencia comercial que alerte sobre las estrategias que desarrollan los países líderes en la producción de esta especia aromática. En su estudio sobre el orégano, Maximixe (2007) alerta sobre una alta dependencia de la asistencia técnica brindada por las ONG y otras instituciones como potencial riesgo para el crecimiento productivo.

La calidad de los procesos productivos según el informe de Sarmiento et al. (2006), realizado para la empresa Southern Perú Copper Corp., describe las causas del bajo precio del orégano; en la cual se refiere a cuatro elementos que provocan el deficiente procesamiento del orégano: financiamiento, comercialización, métodos y recursos. En el caso de los recursos, el factor está ligado al desconocimiento de las técnicas para mejorar el proceso productivo y una idiosincrasia poco emprendedora que mantiene costumbres heredadas. En el caso de la comercialización el problema es el poco acceso a la información para aplicar nuevas tecnologías a los procesos actuales. Respecto de los

métodos, se aplican métodos ancestrales en el tratamiento de los cultivos como el secado al sol, que perjudica los productos que necesitan técnicas alternativas para su tratamiento. Este nuevo contexto ha provocado escasa reinversión entre los pequeños agricultores, quienes la necesitan para tecnificar sus procesos productivos.

El orégano es una planta muy resistente, prácticamente carece de plagas, y es poco exigente en cuanto a fertilización. El SENASA (Servicio Nacional de Sanidad) clasifica los requisitos fitosanitarios por categoría de riesgo. El orégano está ubicado en la categoría de riesgo fitosanitario 1 (CRRF 1), que significa que está en el nivel mínimo y solo se necesita para su exportación una inspección/verificación fitosanitaria y únicamente en casos excepcionales un envío al laboratorio y tratamiento.

a. Historia

En la sierra de Tacna, el orégano fue introducido y cultivado a pequeña escala por comuneros de la zona de Camilaca. Ellos la utilizaban como condimentos para sus alimentos y como planta ornamental.

Con el paso del tiempo, en los años 50 los campesinos aumentaron el cultivo del orégano en vista de la necesidad y demanda de los pueblos aledaños. En la década del 70, se produce el primer lote de exportación por el puerto del Callao, lo que incentivo a los pobladores camilaqueños a que se dedicaran exclusivamente a cultivar el Orégano, logrando que más del 50% del área cultivada de Camilaca sea oreganera. En la década de 1980, continúa el aumento de la demanda de este producto y a partir de 1990, se conoce que la exportación del orégano se realiza a los países de Argentina, Chile, Brasil, Ecuador, Bolivia y Europa como España, Italia y Francia.

En 1995, los campesinos productores de orégano forman una empresa de exportaciones con el nombre de ECOMUSA y el Estado construye diversos Centros de Acopio en las zonas productoras y por primera vez empiezan a clasificar el producto, como primera, segunda y extra. La producción llegó a los 12 000 quintales por año o 6 000 quintales por cosecha semestral.

b. Producción Nacional

La data del Ministerio de Agricultura y Riego, a través del SIEA (Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias) registra información hasta el año 2015, dando cuenta una superficie cosechada de 3650 ha en el país, y 2048 ha en Tacna; y de producción 15 276 y 9895 t respectivamente, con una tendencia ascendente de 3.9 % en los últimos quince años.

Tabla 2: Producción de orégano Tacna – Perú

Años	Producción Nacional (t)	Producción de Tacna (t)
2001	5312	3964
2002	4857	4222
2003	4502	4136
2004	4907	4206
2005	5658	4560
2006	6134	4589
2007	7204	4748
2008	9631	5223
2009	11217	5674
2010	11421	5534
2011	12067	5508
2012	11552	5443
2013	14089	7731
2014	15701	10898
2015	15 276	9895

FUENTE: Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias (SIEA) (2015)

Las principales zonas de producción en Tacna se encuentran en las provincias de Candarave y Tacna, con 800 y 465 hectáreas para su cosecha, respectivamente. También son importantes zonas de cultivo las provincias de Jorge Basadre con 443 hectáreas y Tarata con 340 ha.

En la figura 1 se observa la distribución de la producción de orégano según la región de procedencia.

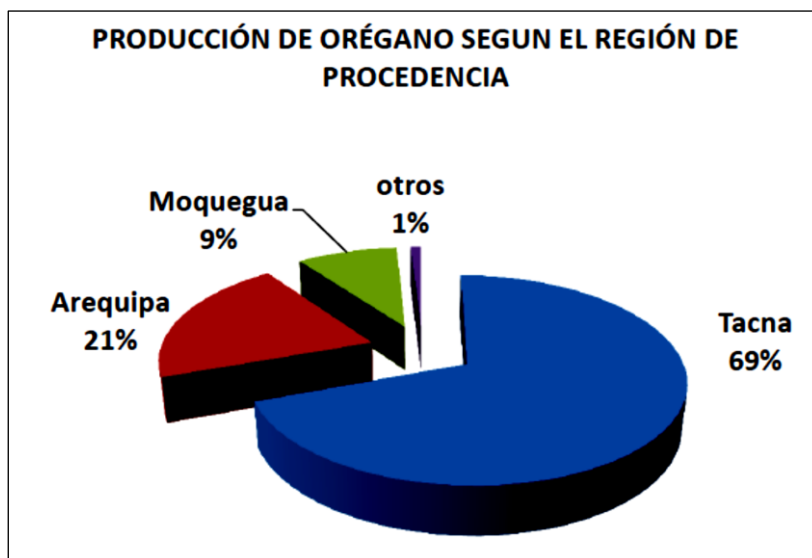


Figura 1: Producción de orégano según Región de procedencia

FUENTE: Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias (SIEA) (2015)

El orégano después de la aceituna, es uno de los productos agrarios más importantes de la Región de Tacna, sobre todo es base para la economía de los agricultores de las provincias de Tarata y Candarave. La producción ha venido en aumento desde al año 2001 en el que se registró 3.964 toneladas y para el año 2015 fue de 9.895 toneladas, también se observa una mejora en el rendimiento por hectárea cosechada, es así que en el año 2001 que era de 3921 kg/ ha., y en el año 2015 de 4832 kg/ ha.

Se observa en la tabla 3 hay un crecimiento en la producción, superficie cosechada así también en el rendimiento que se debe a la preferencia del orégano de Tacna en el mercado exterior, por su aroma exótico que se obtiene gracias a las condiciones naturales especiales que presenta el flanco oeste de la cordillera occidental que abarca el distrito de Palca y las provincias de Tarata y Candarave.

Tabla 3: Serie histórica del cultivo de orégano en Tacna

Años	Producción (t)	Sup. Cosechada	Rendimiento (kg/ha)	Precio de chacra (S/. Kg)
2001	3964	1011	3921	3.9
2002	4222	1078	3917	2.46
2003	4136	1074	3851	1.77
2004	4206	1067	3942	4.33
2005	4560	1091	4180	4.96
2006	4589	1093	4200	5.05
2007	4748	1145	4147	5.13
2008	5223	1281	4080	5.53
2009	5674	1302	4358	4.99
2010	5534	1305	4241	4.87
2011	5508	1355	4065	5.52
2012	5443	1528	3562	6.08
2013	7731	2033	3803	6.49
2014	10898	2050	3471	4.49
2015	9895	2048	4832	4.94

FUENTE: Dirección Regional de Agricultura -Tacna

c. Provincias productoras de orégano en la Región Tacna

La provincia de Candarave cuenta con la mayor superficie de cosecha de orégano y llega a 800 ha al 2015, su producción y comercialización constituye la principal fuente de ingresos de su población: En el siguiente cuadro se observa el orégano según sus provincias.

Tabla 4: Orégano regional y provincial - 2015

Variable	Región Tacna	Provincia Tacna	Provincia Candarave	Provincia Jorge Basadre	Provincia Tarata
Producción anual (t)	9895	3348	3520	1460	1567
Superficie cosechada (ha)	2048	465	800	443	340

Continuación...

Rendimiento año (kg/ha)	4832	7200	4400	3296	4609
Precio de chacra (S./Kg)	4.94	4.4	5.05	4.84	5.97

FUENTE: Dirección Regional de Agricultura de Tacna

Según el boletín informativo de la Southern e información de la Agencia Agraria Candarave; los ecotipos encontrados en la zona son: chinito, cocotea, floración temprana 1, floración temprana 2, italiano, mejorado, nigra común y oreja de elefante.

En la producción se observa una pequeña diferencia entre provincias, Candarave representa el 35% con 3 mil 520 toneladas anuales, acompañado con un rendimiento adecuado de 4 mil 400 kg /ha, es seguida por la provincia Tacna que ostenta un 34% generado por el cultivo indiscriminado de orégano en la costa, pero frente a su comercializa afronta bajos precios en chacra generado por su baja calidad y uso de pesticidas. También resaltar que el rendimiento por hectáreas tiene variaciones importantes ya que la provincia de Tacna registró 7 mil 200 kg/ha, evidentemente mayor en comparación a las demás provincias. En la siguiente figura se presenta la producción de orégano según porcentaje de participación en la provincias de Tacna.

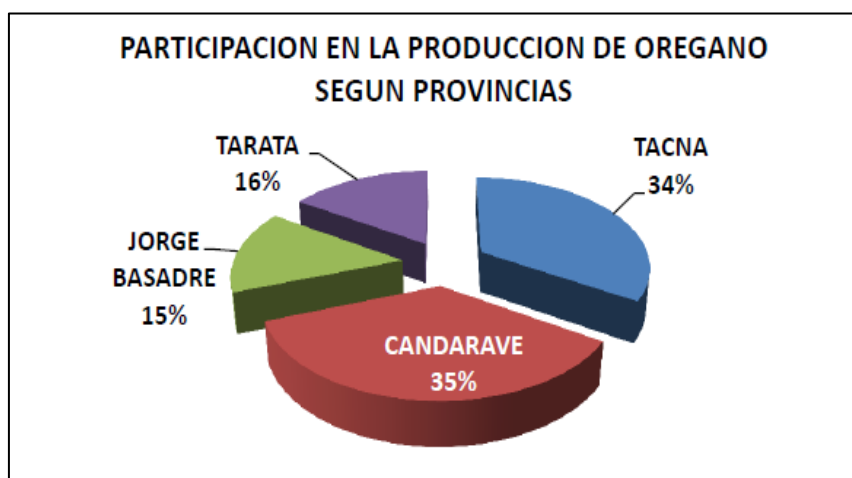


Figura 2: Producción de orégano según provincias de Tacna

FUENTE: Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias (SIEA) (2015)

d. Exportaciones de orégano

- **Serie histórica de las exportaciones nacionales**

Como se observa en la figura 3, el volumen de exportación se ha incrementado en los últimos quince años, ello refleja que el orégano peruano presenta una mayor importación en los mercados internacionales tanto en América del Sur como Europa. En el año 2014 se registró 6 096.13 toneladas que se exportaron del Perú siendo el punto más alto de los últimos quince años.

Sin embargo la participación del año 2015 presento un decremento a 5 586.47 toneladas de orégano en exportación, esta reducción fue aproximadamente de 500 toneladas, debido a una mayor incidencia del fenómeno “El Niño”, sin embargo históricamente se muestra que está en el rango de crecimiento y se confirma que en los últimos quince años la pendiente tiene tendencia positiva.

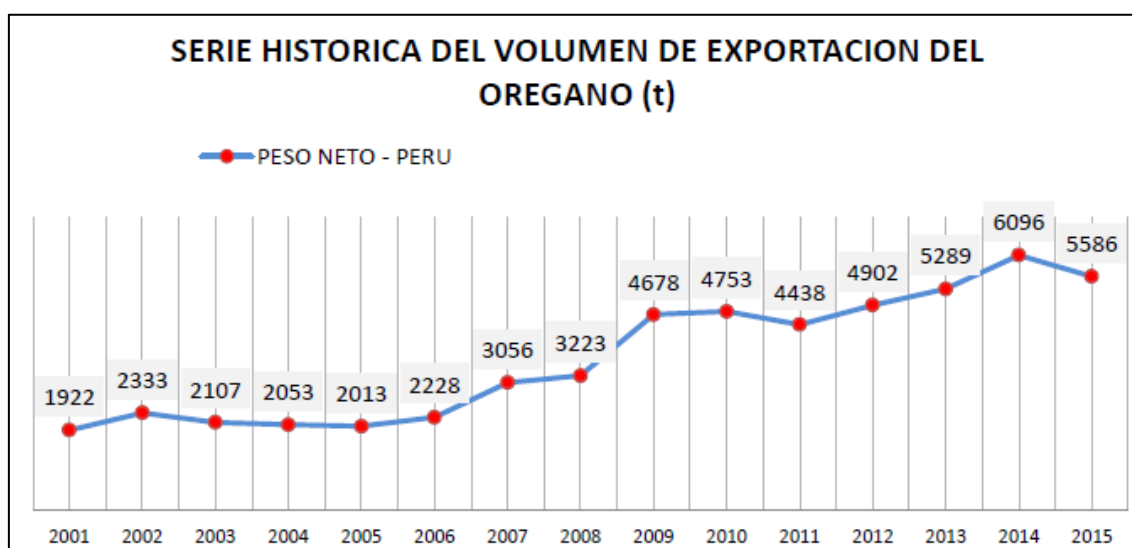


Figura 3: Serie Histórica del volumen de exportación de orégano

FUENTE: Dirección Regional de Agricultura de Tacna (2016)

- **Destino de las exportaciones de orégano**

Los países que tienen mayor aceptación en sus mercados con el producto y su calidad son Brasil con 45%, España 15%, Chile 11% y Argentina con 8% del total de exportaciones.

La exportación del orégano de Tacna ha tenido un crecimiento anual de 3.5 por ciento en los últimos 15 años, esto se puede observar en la figura 4, donde se compara con la producción de Tacna, durante el año 2009 se exportó más del 70 por ciento de la producción, siguiendo la tendencia hasta el año 2011 y en los años posteriores se reflejó un aumento en producción, pero la exportación se mantuvo con la constante de 3.5 por ciento.

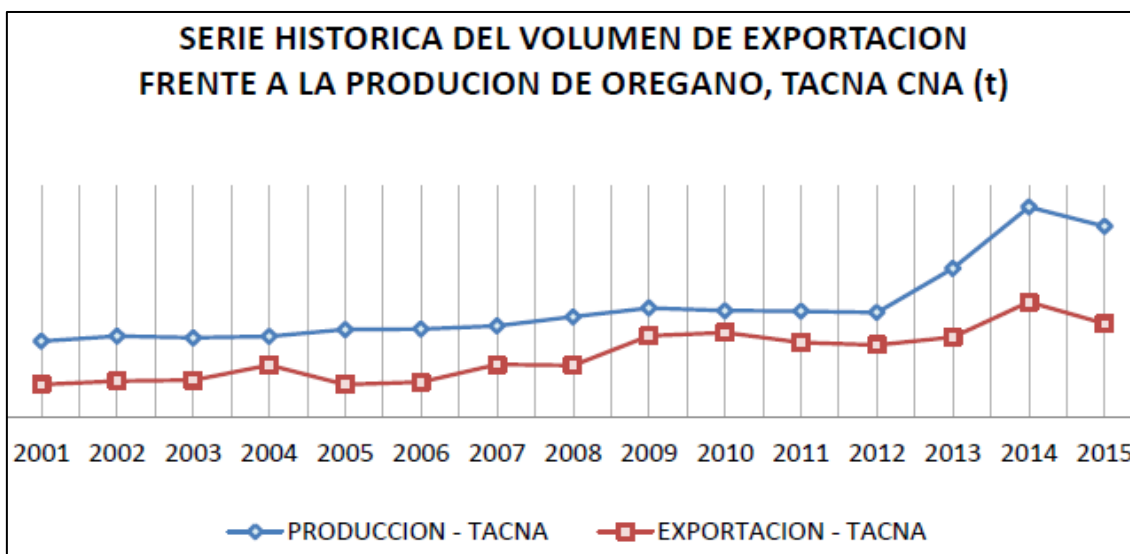


Figura 4: Serie Histórica del volumen de exportación frente a la producción de Tacna

FUENTE: Dirección Regional de Agricultura de Tacna (2016)

- **Exportación Actual de Tacna**

Las variedades más aceptadas en el mercado internacional es el orégano nigra y el cocotea, obtenidas gracias las condiciones climáticas favorables y a la buena calidad de las tierras de la sierra en las regiones del sur del Perú, así como la experiencia del agricultor que opta por nuevas tecnologías que se vienen implementando por parte del Gobierno Regional Tacna y el Ministerio de Agricultura y Riego, a través de Proyectos de Inversión y Programas Presupuestales.

En el año 2015 la exportación total de orégano fue de 4 691.02 t por un valor FOB de 8 millones 658 688.54 US\$, destacando a los países de América del Sur

como los principales consumidores. Brasil se muestra como el principal consumidor con 2 313.46 t, anuales representando 3 millones 969 867.80 US\$ en precio FOB.

En Europa encontramos a España importando el producto bandera de Tacna en un volumen de 712.97 t, en el año 2015 que presenta en precio FOB 1 millón 610 153.75 US\$ de según la obtenida de la Cámara de Comercio de Tacna y la información de Aduanas de Tacna.

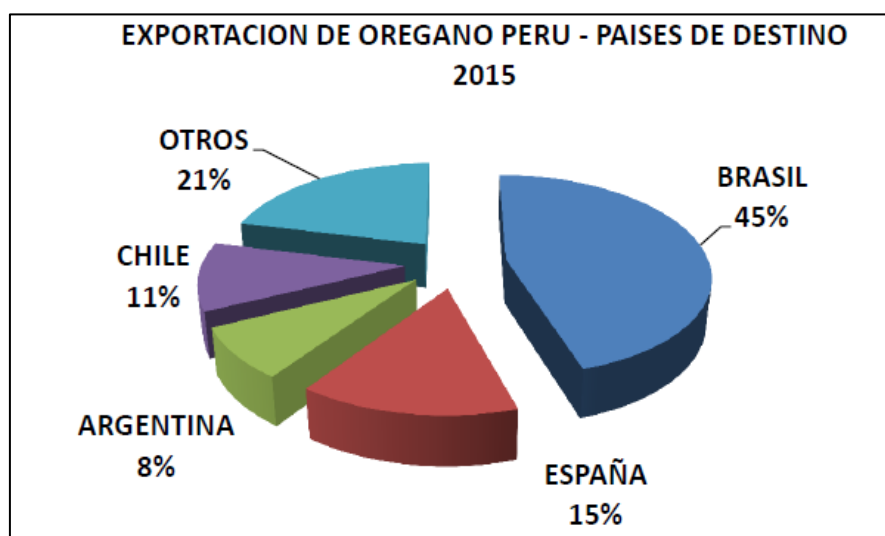


Figura 5: Exportaciones nacionales de orégano, según países de destino (2015)

FUENTE: Superintendencia Nacional de Aduanas y Administración de Tributaria – MINAGRI

2.10. MARCADORES MOLECULARES

Por su alto grado de resolución, versatilidad y reproducibilidad, así como su costo relativamente bajo, los marcadores moleculares generados por AFLP son empleados con mayor frecuencia en diversas áreas, incluyendo estudios sistemáticos, tipificación, genética de poblaciones, huella genética y mapeo de rasgos cuantitativos o fenotípicos.

Los marcadores moleculares revelan sitios de variación a nivel de secuencia de ADN. A diferencia de los marcadores controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, las variaciones en los marcadores de ADN no se muestran por sí mismas en el fenotipo,

porque pueden ser diferencias en un solo nucleótido del gen o en un pedazo de ADN repetitivo. Los marcadores moleculares relacionados a una característica específica son de particular interés porque permiten identificar individuos que contengan esa característica y diferenciarlos de los que no la posean, es decir que dan información sobre la diversidad genética (Velasco, 2005). Un gran número de técnicas moleculares pueden ser utilizadas para obtener marcadores de diversidad mediante la detección de polimorfismo a nivel de ADN (Tautz, 1989). Estas técnicas moleculares pueden dividirse en dos grupos: Las técnicas que emplean sondas para la detección de los marcadores y las que necesitan la amplificación del ADN mediante PCR para identificar a los marcadores.

2.10.1. Marcadores basados en PCR

La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa “*Polymerase Chain Reaction*” fue concebida por Kary Mullis a mediados de la década del 80 (Mullis & Faloona, 1987). La PCR es una técnica que comprende la síntesis enzimática *in vivo* de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima ADN polimerasa. La reacción de PCR se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos utilizados como *primers* que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena, “blanco” de la amplificación. Estos *primers* son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias a las secuencias específicas que flanquean la región “blanco” (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Muchos métodos tradicionales de clonación, secuenciación y análisis de polimorfismos de ADN fueron acelerados o sustituidos por el uso de numerosas derivaciones de la técnica de PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998). La introducción de esta tecnología permitió nuevas posibilidades para la detección del polimorfismo genético que se observa debido a que la variación en la secuencia del genoma altera los sitios de reconocimiento del primer (Mullis et al., 1994).

Un ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización, apareamiento y elongación o polimerización. En la primera, el ADN de doble cadena es desnaturalizado mediante el aumento de la temperatura que puede variar de 92 °C a 95 °C. En la segunda etapa, la temperatura es rápidamente reducida entre 35 °C y 60 °C, dependiendo esencialmente del tamaño y la secuencia del *primer* utilizado, permite la hibridación ADN-ADN de cada *primer* con las secuencias complementarias que flanquean la región “blanco”. Enseguida la temperatura es elevada a 72 °C para que la enzima ADN polimerasa realice la extensión de la cadena a partir de cada terminal 3' de los *primers* mediante la incorporación de nucleótidos utilizando como molde “secuencia-blanco”. Este ciclo se repite algunas decenas de veces. Una vez que la cantidad de ADN de la secuencia-blanco se duplica en cada ciclo, la amplificación sigue una progresión geométrica de manera que, después de unos 20 ciclos, se produce más de un millón de veces la cantidad inicial de la “secuencia-blanco” (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Las técnicas basadas en la PCR permiten la generación de grandes números de marcadores, su uso no es técnicamente difícil y solo requiere de mínimas cantidades de material genético. Estas técnicas difieren entre sí en la longitud y secuencia de los cebadores empleados, condiciones de la PCR y en el método de separación y detección de los fragmentos. Los marcadores de PCR emplean cebadores de secuencia arbitraria, semiarbitraria o específica (Velasco, 2005). Las técnicas más usuales en las que se usan la amplificación de ADN son las de RAPD (Polimorfismo de ADN amplificado arbitrariamente), SSR (Secuencia simple repetida), ISSR (Inter secuencias simples repetidas) y AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados).

2.10.2. Marcadores AFLP

Los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados, mejor conocidos como AFLP por sus siglas del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*, pertenecen al grupo de marcadores moleculares multi-locus que permiten analizar al azar regiones de ADN distribuidas en todo el genoma sin tener conocimiento previo de este (Simpson, 1997; Simpson et al. 1999).

La técnica AFLP se basa en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción a partir de una digestión total de ADN genómico. Consiste en cuatro etapas: (1) de digestión del ADN, (2) de ligación de adaptadores de oligonucleótidos, (3) la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción, y (4) análisis en gel de los fragmentos amplificados.

El método consiste en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN genómico digerido con enzimas de restricción. En forma general, el ADN genómico es incubado con dos endonucleasas o enzimas de restricción que producen fragmentos de diferentes tamaños.

Para el desarrollo de marcadores se usan las enzimas: *EcoRI*, *AseI*, *HindIII*, *ApaI* y *PstI*, las cuales requieren 6-8 bases en secuencia específica para poder hidrolizar, lo que genera fragmentos muy grandes debido a la baja frecuencia de estos sitios de corte. Para aumentar el número de cortes, por otro lado, la digestión se lleva a cabo en combinación con otra enzima (*MseI* ó *TaqI*) que solamente necesita 4 bases y que, por lo tanto, genera mayor número de fragmentos. En ambos casos, las enzimas tienen alta especificidad, garantizando la reproducibilidad del patrón de fragmentos de ADN.

A los fragmentos generados se les acopla unos "adaptadores" (oligonucleótidos sintéticos) de doble cadena, de 10-30pb, en los extremos, utilizando la enzima T4 ADN ligasa. Estos "adaptadores" de secuencia conocida, son utilizados para la amplificación por PCR, utilizando primers complementarios. Los primers contienen además una extensión de 1 a 3 nucleótidos en el extremo 3' y, si es necesario para su detección, una marca radioactiva o fluorescente. Con estos primers, solamente se amplificarán los fragmentos que contengan los nucleótidos extras, además de aquellos del "adaptador".

La amplificación selectiva por PCR se logra mediante el uso de cebadores que se extienden dentro de los fragmentos de restricción, amplificando sólo aquellos fragmentos en los que las extensiones del cebador coinciden con los nucleótidos que flanquean los sitios de restricción. Esto permite llevar a cabo la amplificación dándole selectividad y reproducibilidad al método. Los productos amplificados son separados en

un gel de poliacrilamida y el polimorfismo se identifica por la presencia o ausencia de una banda determinada (Vos *et al.*, 1995).

Aunque existe una correlación casi lineal entre el número de fragmentos amplificados y el tamaño del genoma (Vos *et al.*, 1995), también influye la complejidad de éste, las enzimas seleccionadas y el número y tipo de nucleótidos selectivos de los *primers*. La técnica permite probar diferentes *primers* que se diferencian solamente por los nucleótidos extras del extremo 3', los cuales dan diferente número de bandas. En algunos casos el número de bandas es muy grande y no permite el análisis, o no es confiable. Por eso, se ha propuesto que lo ideal es amplificar entre 50 y 100 fragmentos por cada juego de *primers* (Bleas *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 1995).

Debido a la posibilidad de usar diferentes combinaciones de iniciadores selectivos y diferentes enzimas de restricción, los AFLP constituyen una herramienta poderosa en la detección de polimorfismos a lo largo del genoma (Vos *et al.* 1995).

En la Figura 6 se muestra el diagrama del método de AFLP. Las etapas de la técnica se indican a la izquierda y los componentes a la derecha. Con negro se simbolizan las enzimas de restricción (triángulos), adaptadores e iniciadores para *EcoRI* (enzima de corte raro) y con gris los de *MseI* (enzima de corte frecuente). La estrella representa la marca (fluoróforo o radiactividad) en el extremo 5' (modificado de protocolo, Applied Biosystems, 2005)

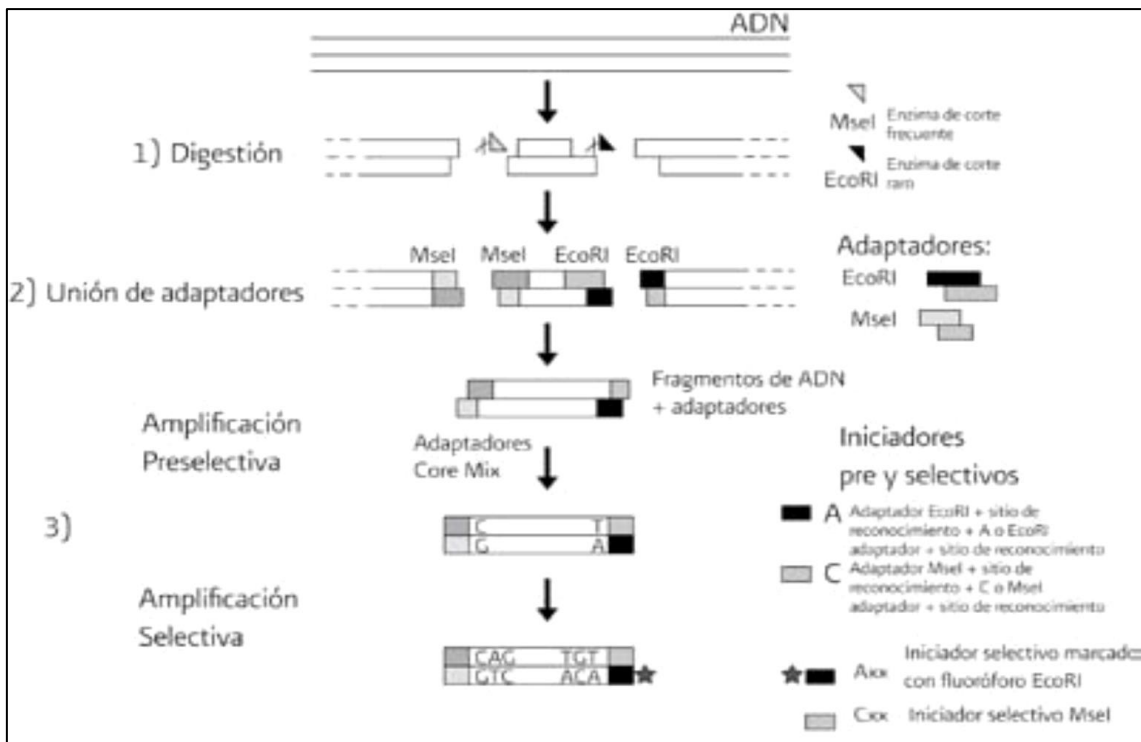


Figura 6: Representación esquemática de la técnica de los AFLP

FUENTE: (Serrato y Ramos, 2014)

a. Métodos de análisis

Los tipos de análisis que se pueden realizar con marcadores multilocus dominantes, se pueden separar en dos grupos principales: los poblacionales y los filogenéticos (Meudt y Clarke 2007). Pero, independientemente del análisis que se desee realizar, el primer paso es construir una matriz binaria con los datos obtenidos.

– Construcción de la matriz binaria

Cada uno de los fragmentos es considerado como un carácter y la presencia o ausencia de ellos son los estados de carácter (Figura 7).

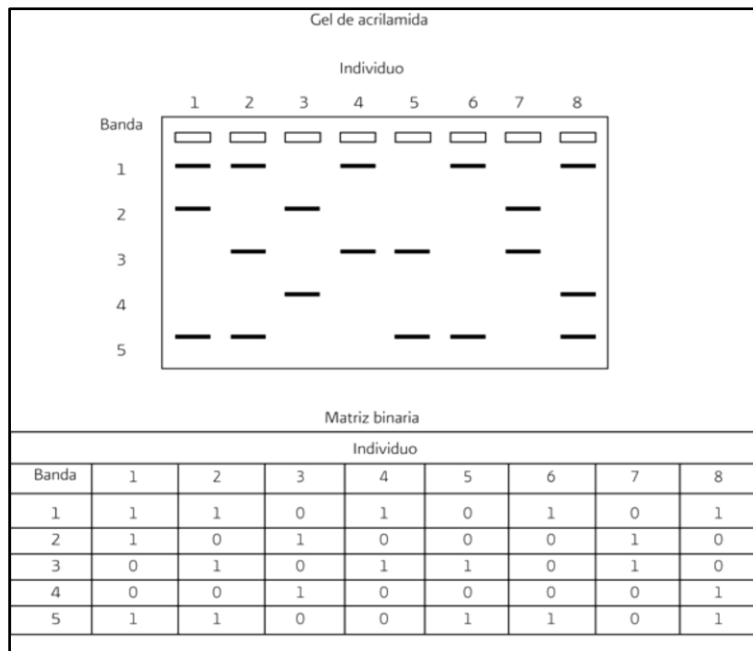


Figura 7: Codificación de la matriz binaria

FUENTE: Serrato y Ramos (2014)

Cuando la electroforesis se realiza en capilar, cada uno de los fragmentos amplificados es representado como un pico. Cuando se realiza en geles, se observa como una banda. En la matriz binaria se codifica la presencia del fragmento como 1 y la ausencia como 0 (Figura 7).

- **Análisis poblacional**

En este tipo de estudios, se busca principalmente estimar y analizar la diversidad genética dentro y entre poblaciones. Sin embargo, el cálculo de la frecuencia de alelos con marcadores dominantes es limitado debido a que la presencia de una banda (fragmento de ADN) o pico indica la condición dominante homocigota y heterocigota. Sin embargo, existen métodos de análisis que se pueden aplicar en numerosos paquetes computacionales, lo cual permite estimar diferentes parámetros de la genética de poblaciones a partir de este tipo de marcador.

- Métodos de análisis

Entre los principales métodos se encuentran:

Análisis de varianza molecular (AMOVA). Este modelo, estima y compara la variación genética dentro y entre poblaciones directamente de datos moleculares y prueba hipótesis evolutivas acerca de esa diferenciación, de esta manera se puede inferir como se encuentra repartida la variación genética dentro de la especie (Excoffier 2001).

Análisis de coordenadas principales (ACP). Este análisis permite encontrar y visualizar los patrones dentro de una matriz de datos multivariados. El propósito general es interpretar las similitudes y las disimilitudes entre los individuos de manera simple.

- **Análisis filogenéticos**

El uso de AFLP para reconstrucciones filogenéticas se ha vuelto cada vez más frecuente debido a que en diferentes estudios se ha encontrado que las bases de datos generadas con AFLP proporcionan señal filogenética (Meudt y Clarke 2007). Existen varios métodos de análisis que permiten hacer inferencias filogenéticas, a continuación se mencionan algunos de ellos.

- Métodos de análisis

Entre los principales métodos se encuentran:

Métodos basados en distancia: Las medidas de divergencia pueden usarse para estimar el número de cambios evolutivos y estos se pueden representar en un árbol filogenético (Martínez 2007). Los análisis se pueden realizar con la matriz binaria directamente o se puede convertir en una matriz de distancia usando medidas de disimilitud, dependiendo del análisis que se realice y del paquete que se utilice.

UPGMA: El UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) método no ponderado de grupos de pares con media aritmética) es el método de reconstrucción filogenética más sencillo, inicialmente se usaba para construir arboles taxonómicos que reflejaban las similitudes fenotípicas entre los pares de

unidades taxonómicas operativas (OTUs por sus siglas en inglés), en función del promedio de sus distancias. Sin embargo, puede ser utilizado para construir árboles filogenéticos si las tasas de evolución de los marcadores usados son aproximadamente constantes entre linajes, de tal forma que exista una relación aproximada entre la distancia evolutiva y el tiempo de divergencia (Hedrick 2000, Martínez 2007).

Neighbor joining: Otro criterio de análisis de distancias es el de neighbor joining (Saitou y Nei 1987) (“vecino más cercano”). El principio de este método es encontrar pares de OTUs que reducen al mínimo la longitud total de la rama en cada etapa de agrupamiento. El análisis inicia con un árbol en forma de estrella en el que todos los OTUs están enlazados a un nodo central y se insertan las ramas entre el par de vecinos más cercanos. Por lo tanto, este método permite obtener las longitudes de las ramas y la topología del árbol parsimonioso rápidamente, además permite manejar un gran número de OTUs (Martínez 2007).

Métodos basados en caracteres: Estos métodos tienen como objetivo encontrar los árboles que optimizan la distribución de los patrones observados para cada carácter (Martínez 2007).

Modelo de parsimonia: Busca postular una historia de ancestría y descendencia al construir el árbol más corto (con el número mínimo de cambios de estados de carácter) que se ajuste a los datos. El problema es que es frecuentemente se encuentra más de un árbol con el mismo número mínimo de pasos (Goloboff 1997, Nixon 1999, Swofford 2002, Martinez 2007).

Modelos probabilísticos: Examinan que tan bien un árbol explica los datos. Se pueden llevar a cabo con los métodos de:

Máxima verosimilitud (*maximum likelihood*): Es un método eficiente y poderoso que se basa en modelos probabilísticos de evolución de caracteres, estima la

probabilidad de que un conjunto de datos represente un proceso que realmente ocurre. Busca el modelo y las longitudes de ramas de un árbol que maximice la probabilidad de observar los datos (De Luna *et al.* 2005, Lou y Larget 2009).

Método bayesiano: Calcula las probabilidades posteriores de los árboles. Es un método rápido que representa la probabilidad de la hipótesis filogenética dados los datos, es decir, produce probabilidades para las hipótesis de interés (De Luna *et al.* 2005, Luo y Larget 2009).

b. Aplicaciones de los AFLP

En 1995, Vos y colaboradores estaban interesados en generar con los AFLP mapas genéticos de alta densidad. Sin embargo, debido al alto polimorfismo revelado y por su reproducibilidad, se ha hecho uso de ellos en muchos campos de investigación como:

- Caracterización genética

Por la gran cantidad de bandas reproducibles que generan, son una herramienta muy importante en la caracterización molecular de especies de importancia económica y sobre todo, de organismos difíciles de determinar a nivel morfológico (Picardeau *et al.* 1997).

- Escaneo genómico y expresión de genes

Son una herramienta importante para evaluar la presencia o expresión de genes bajo ciertas condiciones. En este tipo de estudios es necesario analizar el patrón de bandeo del cDNA en los grupos que se desean comparar (por ejemplo: exposición de algunos individuos a sustancias tóxicas en diferentes tiempos o concentraciones, o en especies con variabilidad en resistencia a alguna plaga, o con diferencias en fecundidad y morfología floral, etc.) las bandas que son exclusivas del sistema de estudio se aíslan y se caracterizan por secuenciación. De esta manera se ha determinado la expresión de genes conocidos, genes de función desconocida y genes nuevos (Chen y Yang 2009, Baldo *et al.* 2010, Piessens *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010, Zheng *et al.* 2010).

- Transferencia horizontal de genes

Se han utilizado también para analizar el movimiento de los genes incluso entre organismos de especies diferentes, como en la evaluación de transferencia de genes de arroz transgenico hacia microorganismos del suelo (Paoletti *et al.* 2006, Kim *et al.* 2010).

- Diversidad genética

Desde sus inicios, la técnica ha sido ocupada principalmente para determinar la diversidad genética de las poblaciones en una amplia variedad de grupos, principalmente en plantas, bacterias y hongos, y en menor grado en algunos invertebrados, en peces, aves y mamíferos (Mueller y Wolfenbarger 1999, Bonin *et al.* 2007, Franklin *et al.* 2010). Este tipo de datos ha sido muy útil en trabajos de agricultura y conservación de la diversidad genética (Zhang *et al.* 2010).

- Estructura genética

El objetivo de muchas investigaciones en ecología molecular es conocer cuál es la estructura genética de las poblaciones, pues a partir de esta, se puede estimar la migración, identificar unidades de conservación, estimar patrones filogeográficos e inferir eventos y patrones como la fragmentación del hábitat, restricción de flujo génico, endogamia y aislamiento por distancia (Franklin *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2010). Por lo tanto, los AFLP han sido particularmente útiles para evaluar la estructura poblacional de muchos grupos a pequeñas y grandes escalas (Bonin *et al.* 2007).

- Introgresión e hibridación

La identificación de individuos híbridos y de cruza entre especies diferenciadas es importante en investigaciones que abordan tópicos como especiación, zonas híbridas y biología de la conservación.

Los AFLP permiten diferenciar entre especies muy relacionadas como en el caso de híbridos, así como identificar eventos de hibridación e introgresión (Gonzalez-Rodriguez *et al.* 2004).

– Estudios filogenéticos

A pesar de que no son los marcadores más idóneos para inferir filogenias, se han aplicado en diferentes grupos debido a la cantidad de información que proporcionan, sobre todo de grupos de organismos estrechamente relacionados y en especies que han radiado recientemente. Generalmente se utilizan en combinación con otros marcadores moleculares como secuencias de ADN o marcadores morfológicos (Hongtrakul *et al.* 1997, Barret *et al.* 1998, Kardolus *et al.* 1998, Breyne *et al.* 1999, Mace *et al.* 1999, Loh *et al.* 2000, Roldan-Ruiz *et al.* 2000, Xu *et al.* 2000, Ramos-Ortiz 2007, Serrato 2007).

En general, los AFLP son marcadores muy útiles en los siguientes casos:

- Cuando no se tiene información sobre el genoma del organismo a estudiar
- Para estudios intra-específicos
- Cuando la variabilidad genética entre los grupos de estudio es baja
- En organismos poliploides
- En eventos de hibridación
- Cuando se necesita generar datos de manera rápida
- Cuando se tiene ADN de alta calidad
- Cuando se tiene acceso al equipo y material requerido

c. Ventajas y desventajas

Los AFLP proporcionan muchas ventajas, entre las que se pueden mencionar: 1) son un marcador neutral (no están sujetos a presión de selección), 2) proveen información de todo el genoma del organismo, 3) no requieren información previa del genoma que se estudia por lo que se puede aplicar a cualquier especie, 4) podrían producir un gran número de bandas polimórficas, 5) son altamente reproducibles debido a que las amplificaciones se realizan bajo condiciones de alta selectividad (alta astringencia), 6) utilizan grandes cantidades de ADN, 7) una vez estandarizados pueden ser generados a gran velocidad, 8) pueden ser usados para análisis genéticos de poblaciones, análisis de genética cuantitativa tipo QTL (*quantitative trait loci*) y filogenéticos, 9) el nivel de resolución es bueno tanto en electroforesis como con métodos automatizados como la electroforesis capilar (Mueller y Wolfenbarger 1999).

Las desventajas incluyen: 1) el número de pasos es mayor en comparación con otros marcadores dominantes como ISSR y RFLP, 2) no pueden analizarse en geles de agarosa como otros métodos basados en PCR, 3) el costo es alto, comparada con otras técnicas, 4) son marcadores dominantes que no permiten distinguir a los heterocigotos de los homocigotos dominantes (Martínez 1997).

d. Perspectivas

Debido a las amplias ventajas que presentan los AFLP, se pensaba que desplazarían a otras técnicas como los RFLP, al menos en algunas aplicaciones. Pero, a pesar de que en la última década han sido ampliamente utilizados, esta predicción no se ha cumplido y otras técnicas como SNPs y microsatélites han sido más aceptadas y aplicadas en muchas áreas de investigación. Por otro lado, la era genómica ha generado enormes avances en la obtención habitual y rentable de secuencias completas de genomas de especies de los tres dominios, lo cual tiene el potencial de sustituir y superar a este tipo de marcadores (Meudt y Clarke 2007).

A pesar de lo mencionado, continuamente surgen nuevas aplicaciones de los AFLP para poner a prueba hipótesis evolutivas, por ejemplo, analizar el papel de la selección natural en la configuración de patrones de divergencia en poblaciones silvestres de animales y plantas, en las que se han encontrado valores de F_{ST} (diferenciación genética) más altos que los esperados bajo neutralidad (Meudt y Clarke 2007).

Finalmente, se puede esperar que esta técnica siga siendo útil para muchos biólogos que trabajan con especies que son de baja prioridad para la secuenciación completa del genoma y en estudios poblacionales, pues la técnica de AFLP ofrece una manera rápida de genotipificar a un gran número de individuos con un alto grado de resolución y sin información genética previa. Por lo tanto, la técnica de AFLP es muy útil y adaptable, y de ser favorecida por el desarrollo paralelo de los nuevos métodos de análisis, seguirá vigente para responder a importantes preguntas científicas en una gran variedad de disciplinas (Meudt y Clarke 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se ejecutó en las instalaciones del Instituto de Biotecnología (IBT), Área de Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima-Perú.

3.1. MATERIAL VEGETAL

Con el apoyo de la Dirección de Comercio Exterior y Turismo (DIRCETUR-Tacna) y las Agencias Agrarias de Candarave y Jorge Basadre (Locumba e Ilabaya) del departamento de Tacna, se tomaron 32 esquejes con hojas de los diferentes ecotipos de orégano (detallados según procedencia en el cuadro 6), se colocaron y rotularon en bolsas de papel y trasladándose hacia el Laboratorio, donde se colocaron a 4°C para posteriormente proceder con la extracción de ADN y el análisis molecular, la Figura 9 contiene las fotografías de 3 ecotipos que se cultivan en Tacna. Además, para este estudio se utilizó como especie externa (grupo externo), 4 muestras de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown “pampa orégano” (T35, T36, T37, T39), procedentes de Tarapoto, las cuales poseen la cualidad de olor y uso semejante al orégano, en la región amazónica (Figura 10).

El mapa de la región Tacna con las 4 provincias estudiadas se muestran en la Figura 8:

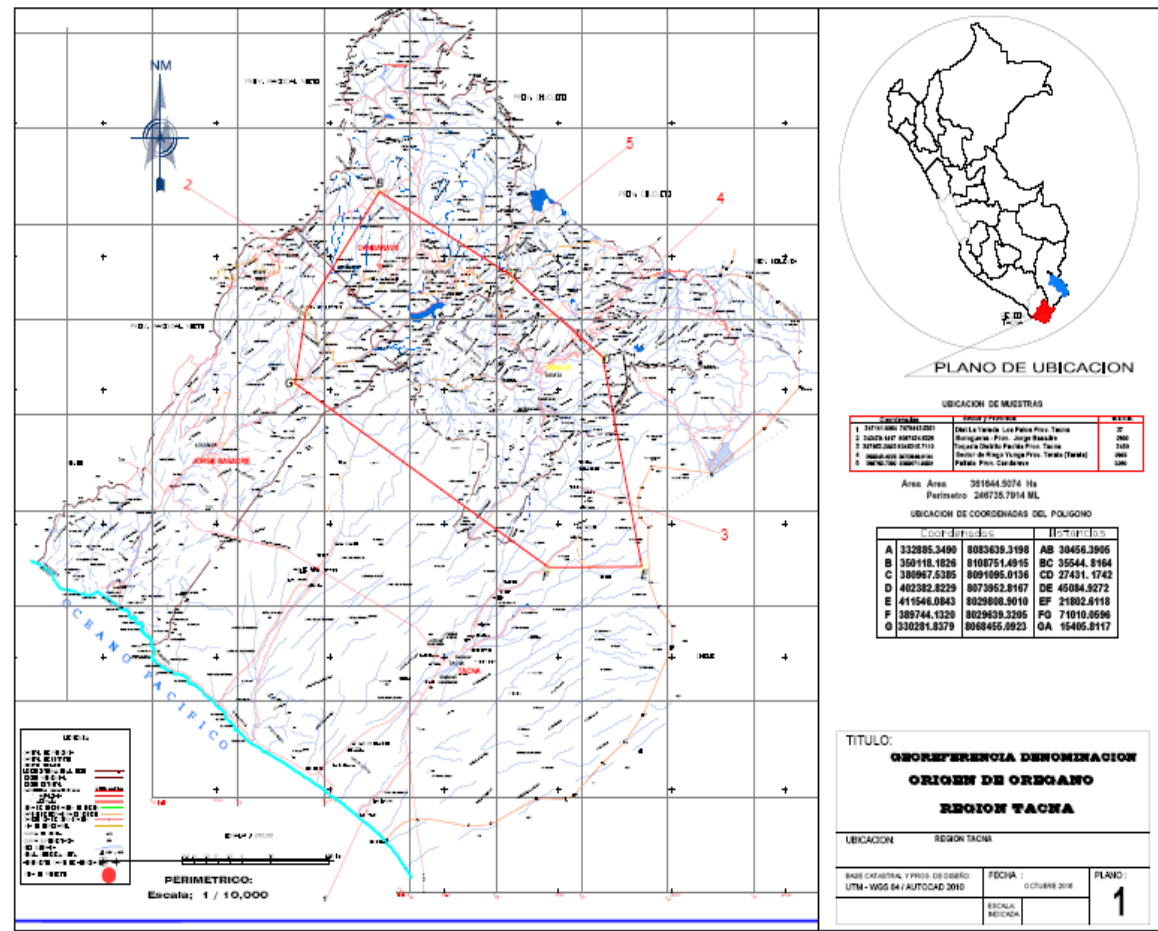


Figura 8: Mapa de la región Tacna con las zonas de muestreo.

Las coordenadas de las zonas de muestreo fueron medidas en el sistema de coordenadas universal transversal de Mercator (en inglés *Universal Transverse Mercator*, UTM) y se presentan en la tabla 5, e incluye a las provincias de Candarave, Tarata, Jorge Basadre, Tacna con sus respectivos distritos. La zona delimitada en la figura 8 comprende una superficie total de 361644.5074 ha y un perímetro de 246735.7914 metros lineales.

Tabla 5: Coordenadas UTM de las zonas de muestreo

PUNTO	Hemisferio	UTM		Huso
		X	Y	
A	S	332885.349	8083639.32	18
B	S	350118.183	8108751.49	18
C	S	380967.539	8091095.01	18
D	S	402382.823	8073952.82	18

Continuación...

E	S	411546.084	8029808.9	18
F	S	389744.132	8029639.32	18
G	S	330281.838	8068455.09	18

Sistema

WGS 84

El material vegetal usado en esta investigación fue colectado dentro del proyecto: “Denominación de Origen del Orégano de Tacna” empezado en el año 2014 coordinado por DIRCETUR-Tacna, Dirección Regional Agraria de Tacna y el Instituto de Biotecnología-Área de Biología Molecular (IBT)- UNALM.

En el Anexo 7 se encuentran los datos completos de las muestras de Orégano, utilizadas en esta investigación.

Tabla 6: Datos de las muestras frescas del orégano de Tacna

Número	Código	Provincia	Distrito	Ecotipo
1	OE1	Candarave	Quilahuani	Oreja Elefante
2	N2	Candarave	Huanuara	Nigra común
3	OE3	Candarave	Candarave	Oreja Elefante
4	N4	Candarave	Candarave	Nigra común
5	N5	Candarave	Cairani	Nigra común
6	N6	Candarave	Huanuara	Nigra común
7	I7	Candarave	Huanuara	Italiano
8	N8	Candarave	Cairani	Nigra común
9	N9	Tarata	Tarata	Nigra común
10	M10	Tarata	Tarata	Mejorado
11	M11	Tarata	Chucatamani	Mejorado
12	M12	Tarata	Chucatamani	Mejorado

Continuación...

13	N13	Tarata	Tarata	Nigra común
14	N14	Tarata	Susapaya	Nigra común
15	M15	Tarata	Ticaco	Mejorado
16	N16	Tarata	Susapaya	Nigra común
17	N17	Tarata	Tarata	Nigra común
18	CH18	Tarata	Tarata	Chinito o coposo
19	N19	Jorge Basadre	Coraguaya	Nigra común
20	CH20	Jorge Basadre	Camilaca	Chino cocotea
21	N21	Jorge Basadre	Tasacirsa	Nigra común
22	N22	Jorge Basadre	Coraguaya	Nigra común
23	A23	Jorge Basadre	Borogueña	Alamo
24	N24	Jorge Basadre	Borogueña	Nigra común
25	N26	Jorge Basadre	-	Nigra común
26	CH27	Jorge Basadre	Ilabaya	Coposo cocotea
27	N29	Tacna	Pachía	Nigra común
28	N30	Tacna	Pachía	Nigra común
29	N31	Tacna	Pachía	Nigra común
30	N32	Tacna	Pachía	Nigra común
31	N33	Tacna	Pachía	Nigra común
32	N34	Tacna	Pachía	Nigra común

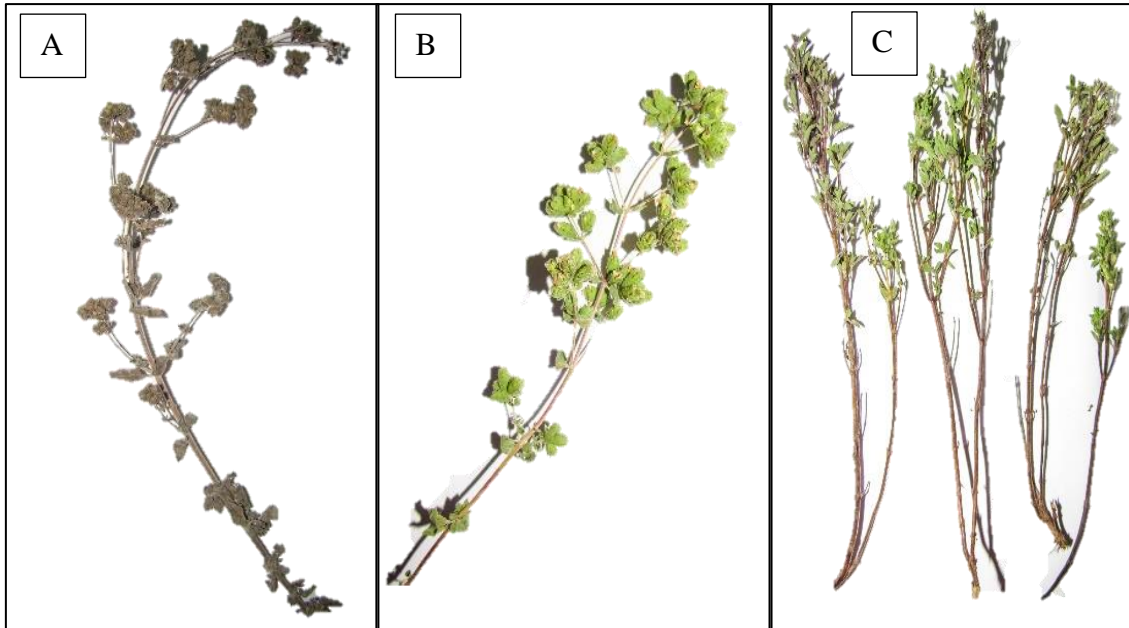


Figura 9: Fotografías de los esquejes de algunos ecotipos de orégano. De izquierda a derecha: A) Oreja de elefante; B) Nigra común; C) Chinito coposo



Figura 10: Fotografía de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown “pampa orégano”

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

3.2.1. Materiales para la extracción y cuantificación del ADN

- CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio)-Buffer de Lisis. Anexo 2
- β -mercaptoetanol
- Cloroformo- Alcohol isoamílico (24:1)

- Isopropanol
- Tampón Tris – EDTA (TE) pH=8
- Etanol Absoluto y alcohol 70 %
- RNAsa tipo A (Bovino) 10 mg/ml

3.2.2. Materiales para la electroforesis y detección de bandas

- Agarosa y Acrilamida
- Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).
- Marcador de peso molecular 100 bp DNA fago Lambda λ
- Azul de Bromofenol
- Xilencianol
- Buffer TBE 10x. Anexo 3
- Trizma Base
- EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
- Ácido Bórico
- Bromuro de etidio
- Tampón de carga. Anexo 4
- TEMED (N,N, N' N' – Tetra – metil etilen diamina)
- DYE
- APS (persulfato de amonio) 10 %
- Solución adherente (Anexo 5) y repelente Repel Silane
- Soluciones de fijación, tinción y revelado. Anexo 6

3.2.3. Materiales para la amplificación por PCR

- Set de Desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)
- Enzima Taq ADN Polimerasa y buffer de PCR 10X
- Kits de iniciadores AFLP
- Enzimas de restricción (EcoRI y MseI)
- Buffer Tango 10X

- MgCl₂ y BSA (Albúmina de suero bovino)
- Aceite mineral
- Agua molecular

3.2.4. Otros materiales

- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Morteros y pilones
- Tubos para PCR
- Puntas para micropipetas de 0,5 a 10 µl, de 10 a 100 µl y de 100 a 1000 µl
- Guantes de nitrilo
- Papel toalla
- Papel aluminio
- Probetas de 50, 100 y 1000 ml
- Erlenmeyers de 125, 250 y 500 ml
- Papel bond
- Cinta masking tape
- Peines
- Espaciadores laterales

3.2.5. Equipos

- Micropipetas graduables de 0,5 a 10 µl, de 2 a 20 µl, de 20 a 200 µl y de 100 a 1000 µl
- Baño María
- Potenciómetro
- Congeladora (-20 °C)
- Centrífuga
- Refrigeradora
- Espectrofotómetro UV/Visible
- Termociclador Applied Biosystems Modelo Veriti

- Balanza analítica
- Cámaras de electroforesis horizontales y verticales.
- Termoblock
- Horno Microondas
- Fuente de poder
- Fotodocumentador de geles, Gel Doc 2000 (Bio-Rad)
- Autoclave

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. Extracción del ADN

El procedimiento de extracción del ADN se realizó mediante un protocolo con buffer CTAB establecido por Doyle y Doyle (1990), con algunas modificaciones, resumidas en el Anexo 1.

Este protocolo fue estandarizado en el laboratorio de Biología Molecular del IBT y utilizado en estudios previos con buenos resultados.

Para cada muestra se realizó lo siguiente:

1. Se utilizó el material vegetal refrigerado a (4 °C). Se trituraron aproximadamente 100 mg de hojas de orégano en un mortero estéril, previamente enfriado, con ayuda de nitrógeno líquido para lograr la ruptura de las paredes y membranas celulares.
2. Se colocó el tejido vegetal triturado un un microtubo autoclavado de 1.5 ml con 700 µl de buffer de extracción CTAB (CTAB 2 %, 1.4 mM NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8.2, 20 mM EDTA pH 8) y 2 µL de β-mercaptoetanol, se mezcla bien agitando los tubos por inversión.

3. Posteriormente, el tubo fue incubado a 65 °C durante 45 minutos, agitándose cada 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente por 2 -5 minutos.
4. Luego se agregó al tubo 700 µl de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1), mezclándose por inversión. Esta mezcla fue centrifugada a 14000 rpm por quince minutos.
5. El sobrenadante resultante de la centrifugación fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf.
6. Luego, al nuevo tubo se le añadió 500 µl de etanol absoluto frío y se mezcló suavemente hasta ver el pellet o “medusa” de ADN.
7. Esta mezcla fue llevada a una temperatura de -20 °C por unos 30 minutos y luego se centrifugó el contenido del tubo a 14000 rpm por 20 minutos.
8. Posteriormente se eliminó el sobrenadante, dejando secar invirtiendo los tubos abiertos por 2 minutos. El precipitado fue lavado dos veces con un mililitro de etanol de 70 por ciento centrifugado a 14000 rpm por tres minutos. El etanol del lavado fue descartado y se agregó nuevamente al tubo un mililitro de etanol absoluto.
9. El contenido del tubo fue centrifugado a 14000 rpm durante 30 minutos y se eliminó el etanol. Después se dejó que el precipitado seque a temperatura ambiente durante toda la noche.
10. Se diluyó el DNA precipitado en 100µl de TE (10Mm Tris HCl ph8.0, 0.1 mM EDTA pH= 8.0). Por último, se agregó la enzima RNAsa 10mg/ml agitando suavemente y se incubó a 37 C° por un periodo de 1 hora en un termoblock.

3.3.2. Cuantificación y calidad del ADN

- **Cuantificación**

Se utilizó una dilución de cada muestra (2 µl de muestra con 198 µl de agua de grado molecular, para medir su concentración en un espectrofotómetro UV/visible BioPhotometer plus (Eppendorf). Este equipo proporcionó la concentración en ng/µl y la relación A260/A280 (tasa de absorbancias a 260 nm sobre 280 nm), considerada como indicador de la pureza del ADN, la cual debe de estar entre 1.8-2 para una óptima calidad.

Luego de este procedimiento se prepararon diluciones de las muestras de ADN a una concentración de 100 ng/µl necesaria para las reacciones de digestión.

- **Calidad**

La calidad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v). Para ello, se disolvió 1 g de agarosa en 100 ml de buffer TBE 1X, luego se llevó a hervir la solución en el microonda, se dejó enfriar por una hora hasta aproximadamente 40 °C y se colocó en la bandeja de la cámara electroforética.

El gel se sumerge con la bandeja dentro de la cámara electroforética horizontal conteniendo buffer TBE 1X. Se procedió a cargar en los pocillos con 10 µl, correspondientes a 2 µl de muestra y se aplicó un voltaje de 90 V por 60 min. Se utilizaron patrones C1, C2 Y C3 (1000, 2000, 3000 ng/µl) y se realizó una repetición de las 3 últimas muestras para corroborar los resultados. Luego, se realizó la tinción de los geles sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio al 0,5 mg/ml durante 20 minutos. Finalmente, el ADN fue visualizado en un transiluminador y se capturó la imagen con el fotodocumentador de geles por medio del programa Quantity One.

La determinación de la calidad del ADN se basa en comparar la intensidad de la banda que se produce a través de la fluorescencia producida por el complejo

bromuro de etidio-ADN. El bromuro de etidio se intercala entre las bases apiladas del ADN lo que permite visualizarlo con luz ultravioleta (UV).

Para la cuantificación de la concentración de las bandas se utilizó el marcador de peso molecular Fago Lambda, el cual permite comparar las bandas obtenidas de las muestras con las bandas con las bandas que produce el marcador. La primera banda mide 14 800 pares de bases y la intensidad corresponde a una concentración de 280 ng/μl.

3.3.3. Amplificación del ADN con marcadores AFLP

Los marcadores AFLP fueron generados siguiendo el procedimiento descrito por Vos et al.; (1995) con algunas modificaciones.

La técnica consta de cuatro etapas:

a. Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción:

La digestión del ADN genómico se realizó con dos enzimas de restricción, una de corte raro y otra de corte frecuente, con lo cual se generaron tres tipos de fragmentos que difieren en sus extremos. Las enzimas usadas fueron EcoRI y MseI.

La reacción de digestión se muestra en la tabla 7.

Tabla 7: Reacción de digestión del ADN genómico

500 ng ADN
2.0 μl EcoRI (10μ/μl)
0.5 μl MseI (10u/μl)
4 μl Buffer Tango10X
agua destilada hasta completar 20 μl

Luego se incubaron las muestras a una temperatura de 37°C por un periodo de 16 horas en un termoblock. Después de ese tiempo, se incubó a 70°C por 15 minutos para la desactivación de las endonucleasas; seguidamente, se colocó en hielo para realizar la ligación de los adaptadores.

b. Ligación:

Se ligaron los adaptadores que poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción EcoRI y MseI. La reacción se muestra en la tabla 8. A cada 20 µl de digestión se le agregó 5 µl del mix de ligación:

Tabla 8: Reacción de ligación de adaptadores

1 µl EcoRI adapter (10 µM)
1 µl MseI adapter (100 µM)
2.5 µl T4 ligase Buffer 10X
0.2 µl T4 ligase (5µ/µl)
0.3 µl agua destilada

El volumen total de reacción de ligación fue de 25 µl y se dejó a temperatura ambiente por 16 horas. Luego se verifica el proceso de digestión-ligación tomando 5 µl de la muestra y se coloca en un gel de agarosa al 1%, para observar un arrastre electroforético de apariencia tenue a lo largo del gel.

Finalmente se diluyeron las muestras digeridas y ligadas en una proporción de 1 en 5 en buffer TE.

c. Preamplificación de los fragmentos del ADN digeridos y ligados

En la reacción de pre-amplificación, los iniciadores utilizados no contienen un nucleótido adicional (+0).

La reacción de pre- amplificación se muestran en la tabla 9.

Tabla 9: Reacción de preamplificación

5 µl RL diluída (1:5) en buffer T.E.
1.0 µl Eco RI+ 0 primer (10µM)
1.0 µl MseI + 0 primer (10µM)
0.2 µl Taq
1.5 µl MgCl ₂ (25 mM)
2.5 µl dNTPs (2.5 mM)
2.5 µl buffer 10X
11.3 µl agua destilada

Volumen de reacción de preamplificación: 25 µl. El programa de PCR utilizado en el termociclador Applied Biosystems Modelo Veriti fue el siguiente:

- 1: 72°C por 2min.
 - 2: 94°C por 4min.
 - 3: 94°C por 30seg.
 - 4: 56°C por 1min.
 - 5: 72°C por 1min.
 - 6: 72°C por 5min.
 - 7: 4°C por ∞
- } Repetir 22 ciclos

Almacenar las reacciones de preamplificación a -20°C.

d. Amplificación selectiva:

En esta etapa los iniciadores utilizados tienen tres nucleótidos adicionales arbitrarios (EcoRI+3/ MseI +3), con lo cual la amplificación de fragmentos de ADN se hará más selectiva.

La reacción de amplificación selectiva empleada se muestra en la tabla 10.

Tabla 10: Reacción de amplificación selectiva por PCR

2.0 µl preamplificación diluída (1:20)
2.0 µl Eco RI+ 3 primer (50ng/µl)
0.3 µl MseI + 3 primer (50ng/µl)
0.2 µl Taq
1.5 µl MgCl ₂ (25 mM)
1.2 µl dNTPs (2.5 mM)
1.1 µl buffer 10X
1.7 µl agua destilada

El volumen de la reacción selectiva es 10 µl. El programa de PCR utilizado en el termociclador fue el siguiente:

- 1: 94°C por 4min.
 - 2: 94°C por 20seg.
 - 3: 66°C por 30seg bajando 1°C por ciclo
 - 4: 72°C por 2min.
 - 5: 94°C por 20seg.
 - 6: 56°C por 30seg.
 - 7: 72°C por 2min.
 - 8: 60°C por 30min.
 - 9: 4°C por ∞.
- } Repetir 10 ciclos
} Repetir 20 ciclos

Luego el producto amplificado fue almacenado a -20°C hasta la electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%.

3.3.4. Selección de iniciadores de combinaciones de AFLP

Se realizó un tamizado, utilizando 12 combinaciones de iniciadores AFLP, con el propósito de obtener aquellas que detecten mayor polimorfismo así como mejor intensidad y nitidez de banda. La combinaciones fueron las siguientes: E32-M50 / E32-M47 / E32-M48 / E41-M48 / E32-M62 / E38-M62 / E40-M50 / E41-M60 / E36-M61 / E37-M61 / E32-M50 y E38-M50. De acuerdo a lo anterior, se seleccionaron 3 combinaciones de iniciadores para el análisis molecular de los ecotipos de orégano (E32-M47 / E32-M48 y E35-M50)

Tabla 11: Secuencia de los iniciadores AFLP utilizados para el tamizado del análisis de la diversidad del orégano

Iniciador	Secuencia	Iniciador	Secuencia
E32	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C AC A- 3	M47	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A CAA- 3
E35	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C AC A- 3	M48	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A CAC- 3
E36	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C AC C- 3	M50	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A CAT- 3
E37	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C AC G- 3	M60	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A CTC- 3
E38	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C AC T- 3	M61	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A CTG- 3
E40	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C AG C- 3	M62	5 -GAT GAG TCC TGA GTA A CTT- 3
E41	5 -GAC TGC GTA CCA ATT C AG G- 3		

3.3.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los productos de amplificación selectiva fueron separados en un equipo de electroforesis vertical para geles denaturantes de poliacrilamida al 6 %, conteniendo buffer TBE 0.5x. Estos geles estuvieron compuestos por 60 ml de acrilamida 19:1 al 6 % (Anexo 5), 42 µl de TEMED y 420 µl de APS al 10 %. El gel de poliacrilamida se prepara entre dos placas de vidrio, una placa con solución adherente (Anexo5) y la otra con solución repelente Repel Silane.

Se realizó una pre-corrída a 100 V por 35 minutos para eliminar el exceso de úrea y proceder al cargado de las muestras en el gel. Luego, al producto de la amplificación se le agrego 5µl de tampón de carga para geles de poliacrilamida. Posteriormente las muestras fueron denaturadas a 94° por 5 minutos.

Finalmente, se cargaron las muestras en el gel de poliacrilamida. Luego la corrida por un tiempo de 16 h aproximadamente y voltaje de 300V. Para determinar el peso aproximado de las bandas, se empleó el marcador de peso 100pb DNA Ladder.

3.3.6. Fijación tinción y revelado de geles

Para visualizar los productos de amplificación se utilizó la técnica de tinción con nitrato de plata. La cual tiene los siguientes pasos: fijación, tinción y revelado.

Después de la electroforesis, el vidrio fue desmontado y el vidrio con el gel adherido fue sumergido en solución de fijación (ácido acético al 10 %) por 20-25 minutos en agitación constante. Transcurrido el tiempo se escurrió y secó el exceso de la solución para proceder a la siguiente etapa. Posteriormente se sumergió en solución de tinción por otros 20 minutos. Luego de este tiempo, fue enjuagado con agua de grado molecular, por 10 segundos y luego en solución de revelado, en agitación constante, hasta que los fragmentos se hagan visibles. Finalmente, se detuvo la reacción sumergiendo el gel en la solución de fijación por 10 minutos y lavándolo con abundante agua destilada durante 5 minutos.

El gel se dejó secar de un día para otro antes de proceder a escanearlo y leerlo.

3.3.7. Análisis de datos

a. Lectura de geles y matiz de datos binarios

La lectura de las bandas se realizó en un transiluminador de luz blanca. Cada banda o fragmento de ADN de un individuo, representó el genotipo en un mismo locus bialélico. Para este análisis, previamente se han elegido como OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas) a las muestras correspondientes a los ecotipos de orégano, y como caracteres, al dato doble-estado (presencia o ausencia del fragmento de ADN).

Los perfiles AFLP obtenidos fueron analizados mediante la cuidadosa inspección visual de los geles, se registró la presencia o ausencia de bandas polimórficas de ADN, anotándose el número uno o cero, respectivamente, y a los datos inciertos o perdidos le correspondió el número nueve para el programa NTSYS y un punto para el programa POP GENE. De esta manera se logró construir una matriz de datos binarios para 32 muestras de orégano y un total 198 loci AFLP, como se observa en el Anexo 9.

b. Selección del coeficiente de similitud

En base a la matriz de datos binarios, se utilizó el coeficiente de similitud de DICE, que confiere mayor peso a las coincidencias. Los valores de este coeficiente varían entre 0 y 1, que corresponden a los valores de mínima y máxima similitud, respectivamente. Este coeficiente se expresa como sigue:

$$SD = \frac{2a}{2a + b + c}$$

a: número de bandas presentes en ambos individuos

b: número de bandas presentes en el primer individuo, pero no en el segundo.

c: número de bandas presentes en el segundo individuo, pero no en el primero.

c. Análisis de Agrupamiento

Luego, mediante la matriz de datos binarios se realizó el análisis de agrupamiento (*Cluster analysis*) con la técnica de ligamento promedio o *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average* (UPGMA) y la opción SAHN (Sequential agglomerative hierarchical nested cluster analysis), para elaborar un dendograma, el cual es presentado en la figura 15.

Para la construcción de la Matriz de Similitud (Anexo 10), el análisis de agrupamiento y la construcción del dendograma se utilizó el programa de taxonomía numérica NTSYSpc2.2.

d. Índice de Contenido Polimórfico (PIC)

El PIC (Botstein et al. 1980): es un indicador de calidad de un marcador en estudios de cartografía génica. Es muy usado en la actualidad para reflejar el polimorfismo detectado. El problema principal del uso de este parámetro se basa en su dependencia del número de alelos y de sus frecuencias, la información que aporta no es suficiente para basar en ella la elección entre uno u otros marcadores. En este caso, $PIC = 1 - p^2 - q^2$, donde p = frecuencia de banda, q = frecuencia de ausencia de banda. Los valores van de 0 - 1.

e. Análisis de diversidad genética y estructura poblacional

Para los análisis genéticos, dividimos todos los individuos de orégano en 2 subpoblaciones: Nigras y Varios ecotipos. Además, con el fin de estimar la estructura genética de los principales ecotipos de orégano (Anexo 8) y de la planta externa pampa orégano, se analizó la matriz de datos binarios con el programa POP GENE versión 1.31 (Yeh et al, 1999).

Se estimaron los índices de diversidad genética de Nei's o heterocigosis esperada y el índice de Shannon, los cuales nos proporcionarían información sobre la diversidad de los ecotipos analizados. Asimismo se midieron el porcentaje de polimorfismo y se construyó una tabla donde se presentó a los alelos según sus rangos de frecuencias. Todos los cálculos suponen que la población se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN

Las concentraciones de ADN obtenidas para las 32 muestras de orégano fueron muy variables, encontrándose en un rango de 800 - 3000 ng/μl; además, la calidad de ADN obtenido en el presente estudio fue óptima para todas las muestras de orégano, estos resultados se muestran en la tabla 12.

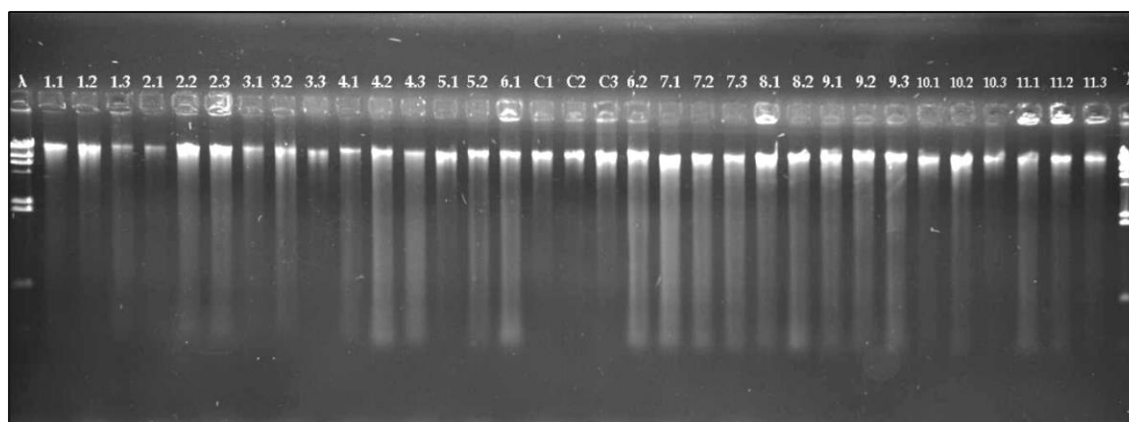
Tabla 12: Concentración del ADN de las 32 muestras de orégano

N°	Código de Muestra	Concentración (ng/ul)
1	OE 1	1000
2	N2	2000
3	OE3	800
4	N4	1000
5	N5	2000
6	N6	2000
7	I7	3000
8	N8	3000
9	N9	3000
10	M10	2000
11	M11	1000
12	M12	1000
13	N13	1000
14	N14	1000
15	M15	2000
16	N16	2000

Continuación...

17	N17	2000
18	CH18	1000
19	N19	2000
20	CH20	2000
21	N21	3000
22	N22	800
23	A23	3000
24	N24	2000
25	N26	2000
26	CH27	3000
27	N29	3000
28	N30	3000
29	N31	3000
30	N32	1000
31	N33	1000
32	N34	1000

Para observar la calidad del ADN extraído, se fotografiaron los geles de agarosa, que se presentan en la figura 11, donde la presencia de una banda definida indica una buena calidad y que el ADN está íntegro.



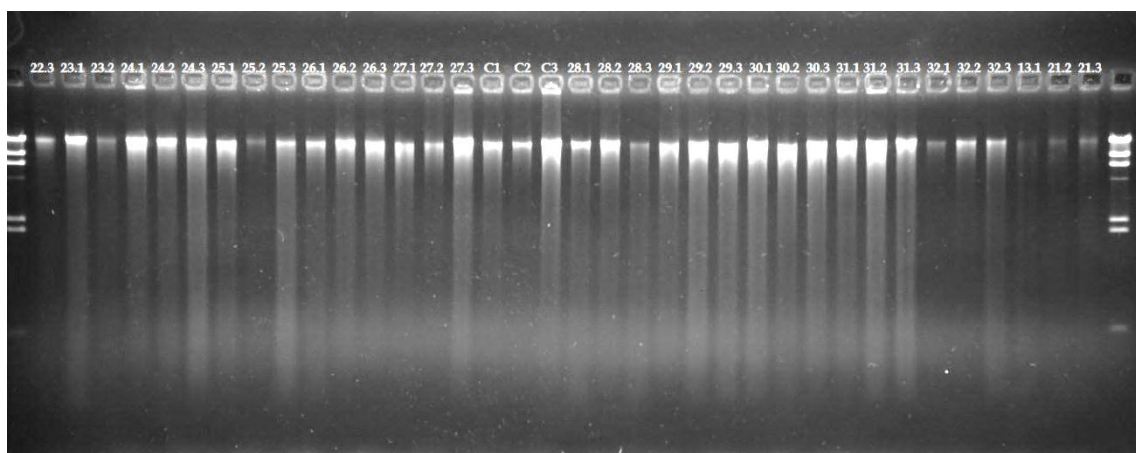
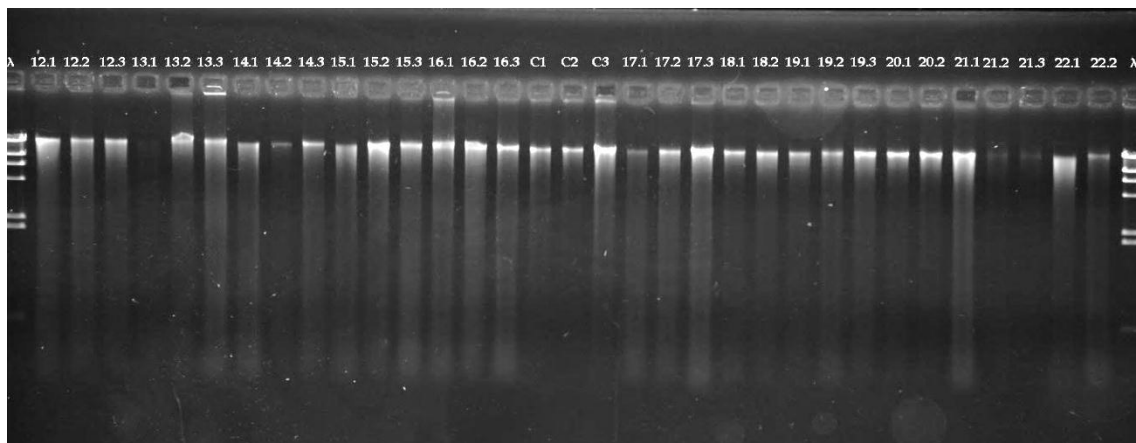


Figura 11: Fotografías de los geles de calidad de las muestras de orégano de Tacna

4.2. ANÁLISIS DE POLIMORFISMO CON MARCADORES AFLP

Inicialmente se evaluaron 12 combinaciones de iniciadores diferentes de AFLP en muestras de orégano escogidas al azar, de las cuales se escogieron 3 combinaciones de iniciadores por brindar mayor información polimórfica y por su capacidad de resolución de bandas. El número y porcentaje de fragmentos polimórficos se presentan en la tabla 13, donde se aprecia que con las 3 combinaciones de iniciadores utilizados se obtuvo un total de 198 fragmentos amplificados, de los cuales 73 fueron fragmentos informativos (36.87% de polimorfismo), con un promedio de 24,3 bandas informativas por iniciador.

La combinación más informativa fue E32-M48, con un total de 63 bandas de las cuales 29 fueron polimórficas (46.03% de polimorfismo y el resto monomórficas). La

combinación menos informativa fue E35-M50 con un total de 57 bandas de las cuales sólo 14 bandas fueron polimórficas (24.56%).

En base al análisis de las tres combinaciones en los geles que se presentan en las figuras, se puede deducir que las muestras presentan un bajo nivel de polimorfismo.

Tabla 13: Combinaciones de iniciadores AFLP empleados y número de marcadores encontrados en 32 muestras de orégano

Combinación de Iniciadores	Número de bandas monomórficas	Número de bandas polimórficas	Número total de bandas	% de polimorfismo
E32-M47	48	30	78	38.46
E32-M48	34	29	63	46.03
E35-M50	43	14	57	24.56
Total	125	73	198	36.87

Las siguientes figuras (12, 13 y 14) corresponden a los geles de poliacrilamida conteniendo a los fragmentos monomórficos (Fecha B) y polimórficos (flecha A), con sus respectivas combinaciones de iniciadores AFLP.

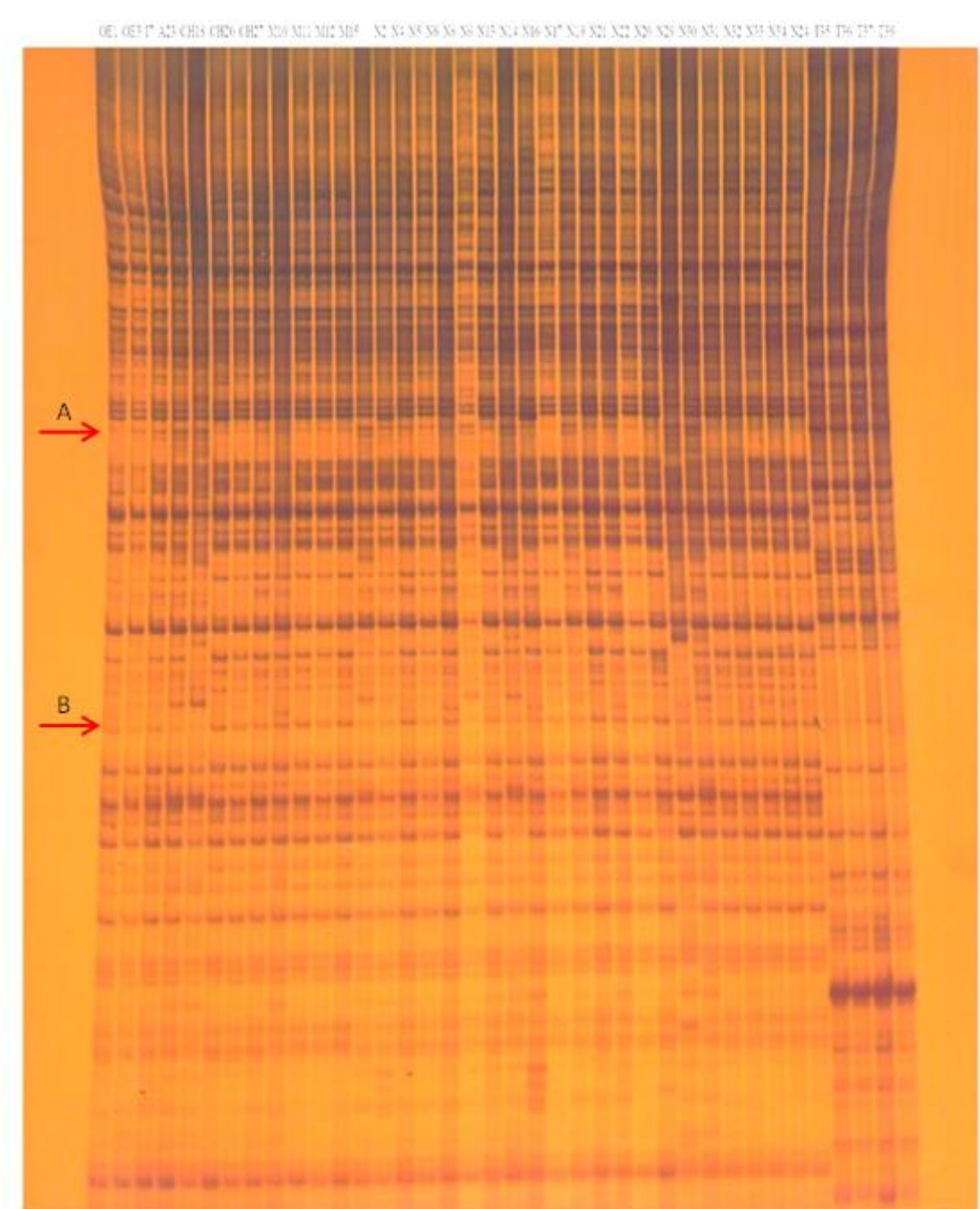


Figura 12: Gel de acrilamida de la Combinación AFLP E32-M47 (L1-L78)

- A: Fragmento polimórfico
- B: Fragmento monomórfico

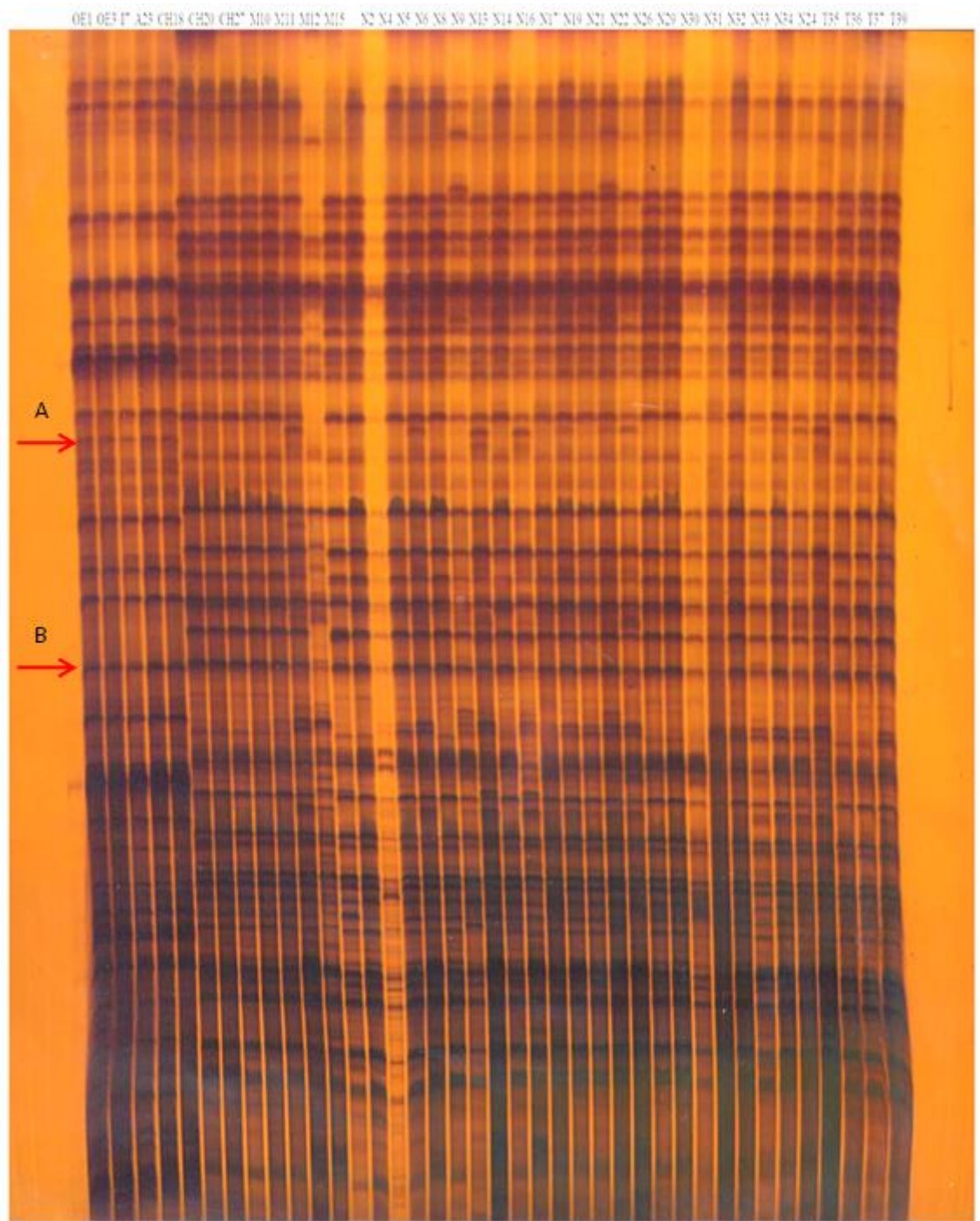


Figura 13: Gel de acrilamida de la Combinación AFLP E32-M48 (L79-L141)

- A: Fragmento polimórfico
- B: Fragmento monomórfico

OE1 OE3 I7 A23 CH18 CH20 CH27 M10 M11 M12 M15 N2 N4 N5 N6 N8 N9 N13 N14 N16 N17 N19 N21 N22 N26 N29 N30 N31 N32 N33 N34 N24 T35 T36 T37 T39

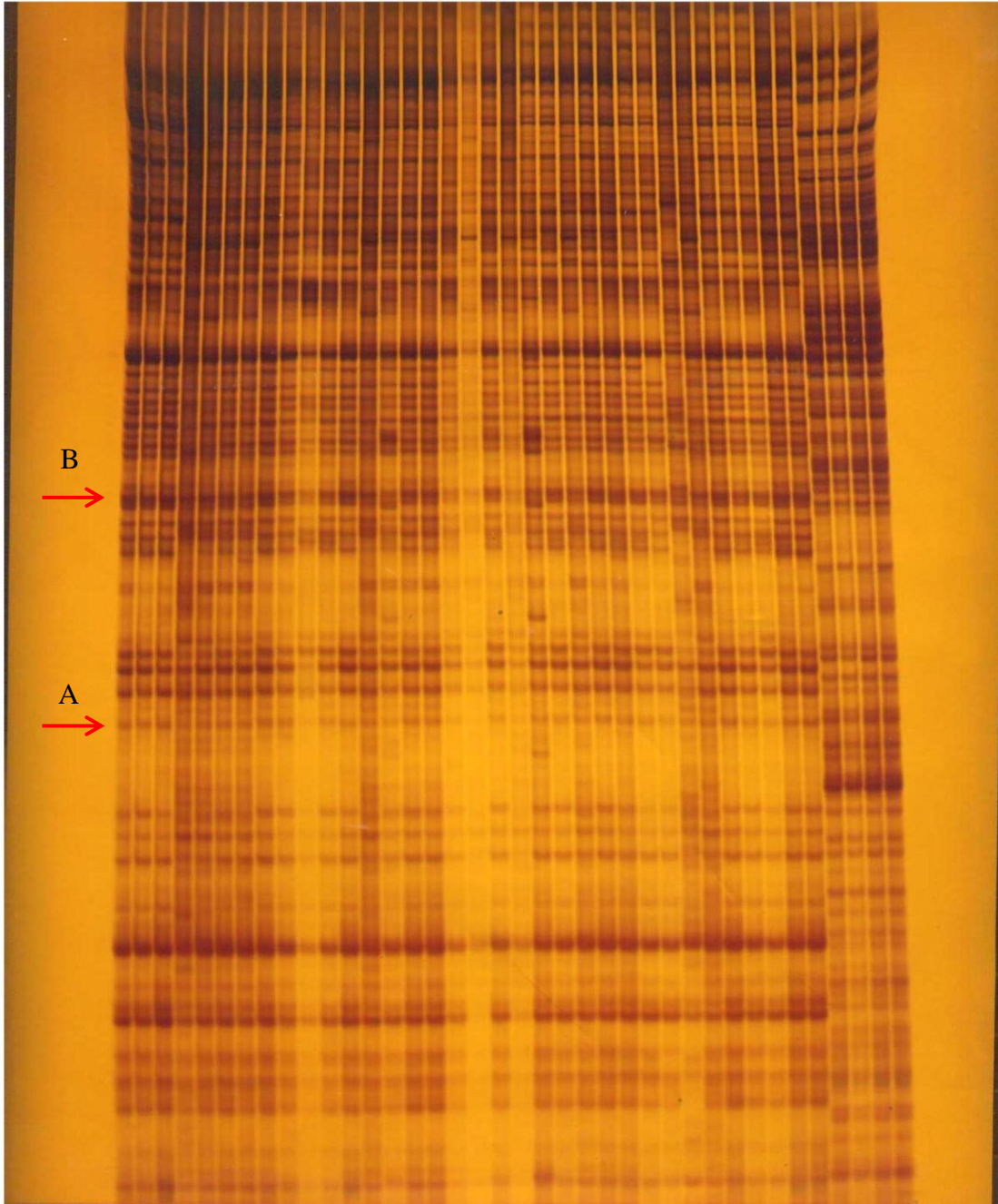


Figura 14: Gel de acrilamida de la Combinación AFLP E35-M50 (L142-L198)

- A: Fragmento polimórfico
- B: Fragmento monomórfico

4.2.1. Índice de Contenido Polimórfico (PIC)

Haciendo uso de los datos de la matriz binaria de presencias (1) y ausencias (0), se estimó el contenido de información polimórfica (PIC) por combinación de iniciador de AFLP. Según el cuadro 14 se observa los valores de PIC por combinación de iniciadores.

Se aprecia que los valores del PIC varían desde 0.212 hasta 0.2249. La combinación más informativa es E32-M48, con un valor de PIC = 0.2781 y la menos informativa E35-M50, con un valor =0.212, es decir que esta combinación presenta una baja capacidad para detectar polimorfismos.

Tabla 14: Valores de PIC por combinación de iniciadores del orégano de Tacna

Combinación AFLP	PIC
E32-M47	0.2249
E32-M48	0.2781
E35-M50	0.212

4.3. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

A partir de los 198 fragmentos de ADN o loci y con la matriz de datos binarios, se aplicó el análisis cladístico de taxonomía numérica, utilizando el coeficiente de similitud genética DICE. Luego se construyó el dendograma de caracterización molecular (Figura 15) donde se observa al grupo externo (Pampa orégano) que se separa marcadamente en un cluster de los diferentes tipos de oréganos. De esta manera se muestra con claridad que se trata de otra especie genéticamente muy alejada del orégano.

Los diferentes ecotipos de orégano presentan una similitud alta que va desde el 80 por ciento hasta el 95 por ciento aproximadamente, a pesar que se acostumbra denominarlos de distinta manera según su aspecto morfológico. El dendograma y la matriz de similitud indican que este tipo de cultivo es altamente homogéneo; sin

embargo, cuando se compara con la especie externa *Lippia alba* “pampa orégano”, se observa un distanciamiento que llega a 0.23, es decir tiene 23 por ciento de similitud con respecto a los ecotipos de orégano.

Se observa que el ecotipo Chinito Coposo (CH18) se separa del resto; posiblemente, se trató de material introducido, quizá de Argentina, de dónde, según manifiestan los productores, han ocurrido ingresos e introducciones de nuevos materiales vegetales.

En cuanto al tipo Nigra, se observa gran homogeneidad entre ellas puesto que tienden a agruparse frecuentemente juntas. También, se observa un alto coeficiente de asociación con el ecotipo “mejorado” así como con los otros.

Estos resultados nos sugieren que todos estos ecotipos de orégano corresponderían a una población homogenizada y con un alto grado de mezclas entre ellas; por lo tanto se requiere establecer un proceso de mejora genética para resaltar ciertas características productivas.

Las variaciones fenotípicas que presentan los diferentes ecotipos de orégano analizados muchas veces se deben a factores medioambientales donde son cultivados, por ejemplo la altitud, la precipitación, etc., que pueden afectar su crecimiento morfológico. Se sabe que cuando las plantas crecen cercanas a 4000 msnm, tienden a mostrar un hábito de crecimiento más ramificado y rastrero.

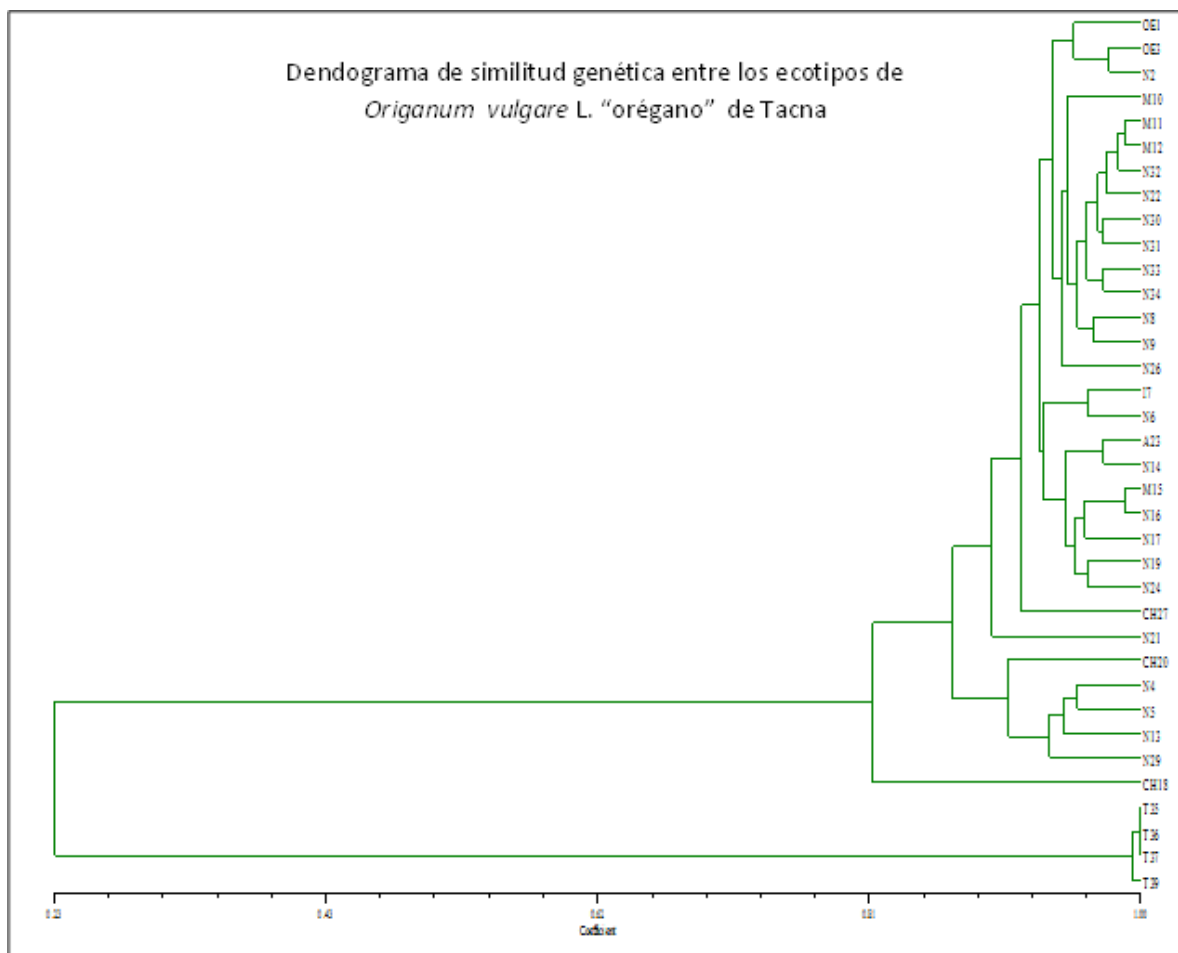


Figura 15: Dendrograma de caracterización molecular de los 198 Loci AFLP del orégano de Tacna y pampa orégano

4.4. ANÁLISIS GENÉTICO POBLACIONAL: FRECUENCIAS GÉNICAS EN LOS ECOTIPOS NIGRAS Y VARIOS ECOTIPOS

Se elaboraron los cuadros 15 y 16 con rangos de frecuencias alélicas para los 198 loci AFLP obtenidos en las subpoblaciones Nigras y Varios ecotipos. Para el caso de la subpoblación Nigra, los alelos presentes en los 198 loci se agruparon en rangos de frecuencias génicas, según se muestra en la tabla 15. Se muestra que el estado de los alelos perdidos (con frecuencia génica igual a 0) están en un 24,24 %, mientras que los alelos están en estado fijado en un 47,47 %; en los rangos medios, el porcentaje de alelos presentes es bajo. Esta distribución de las frecuencias génicas corresponde a una población que experimenta intensa deriva génica. En este caso es explicado por el uso de los mismos esquejes como medio de reproducción (asexual).

Tabla 15: Rangos de frecuencias génicas del alelo presente del ecotipo Nigra

Rango frecuencias génicas	Alelo Presente	
	Número	Porcentaje
Alelo no fijado [0]	48	24.24
Bajo]0;0.2]	25	12.63
Medio]0.2;0.4]	13	6.57
Alto]0.40;0.60]	4	2.02
Muy alto]0.6;1[14	7.07
Alelo fijado [1]	94	47.47
Total	198	100.00

Para el caso del grupo Varios Ecotipos, los alelos de los diferentes loci analizados, se agruparon según sus rangos de frecuencias génicas y se muestran en el cuadro 16, donde se observa que el estado de los alelos perdidos (con frecuencia génica igual a 0) están en un 41.41 %, mientras que los alelos que están fijados en un 27.78 %; en los rangos de frecuencias intermedias, el porcentaje de alelos presentes es bajo.

De acuerdo al análisis en las dos subpoblaciones, podemos evidenciar que en el ecotipo Nigra la fijación es más la que la pérdida de alelos y ocupan un 71.71 %, en la otra subpoblación “Varios Ecotipos”, la fijación más la pérdida representa 69.19 %. Por lo tanto, se puede afirmar que este cultivo está altamente homogenizado a nivel genético.

Tabla 16: Rangos de frecuencias génicas del alelo presente de Varios Ecotipos

Rango frecuencias génicas	Alelo Presente	
	Número	Porcentaje
Alelo no fijado [0]	55	27.78
Bajo]0;0.2]	17	8.59
Medio]0.2;0.4]	12	6.06
Alto]0.40;0.60]	12	6.06
Muy alto]0.6;1[20	10.10
Alelo fijado [1]	82	41.41
Total	198	100.00

4.5. ANALISIS DE LA DIVERSIDAD GENETICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL

En base al análisis de la taxonomía numérica y el dendograma de la figura 15, el material vegetal para el análisis genético, se separó en 2 subpoblaciones: El tipo Nigra, Otros Ecotipos y un grupo externo Pampa Orégano. Se estimaron los parámetros genéticos poblacionales como: índice de diversidad génica de Nei (h) para cada locus y el promedio, índice de diversidad de Shannon (I); asimismo el porcentaje de polimorfismo.

De acuerdo a la tabla 17, se aprecia que el tipo Nigra presentó menor índice de diversidad génica de Nei ($h = 8.66 \%$). La razón de observar baja diversidad génica de Nei en el tipo Nigra y mayor en los otros ecotipos, se debería a la preferencia de cultivar el Nigra en más áreas y estar utilizando los mismos esquejes en cada campaña de siembra; mientras que, los otros ecotipos han sido introducidos de diferentes lugares, explicando así ese mayor nivel de diversidad ($h = 11.31$).

En el siguiente cuadro se muestra el promedio y desviación estándar de los índices de Nei y Shannon para 198 loci AFLP en Oréganos de Tacna:

Tabla 17: Promedio y desviación estándar de los índices de Nei y Shannon para 198 loci AFLP en Oréganos de Tacna

Ecotipo	Índice de diversidad génica de Nei (h)		Índice de diversidad de Shannon (I)	
	Promedio	Desv. St.	Promedio	Desv. St.
Varios Ecotipos	0.1131	0.1843	0.1674	0.266
Nigra	0.0866	0.1563	0.1331	0.2315
Total	0.1122	0.1682	0.1729	0.2492

En general, se puede decir que el orégano de Tacna (todos los ecotipos) tienen baja diversidad génica (tanto de Nei y Shannon), esto es predecible debido principalmente al tipo de sistema de reproductivo que presenta (asexual por esquejes) durante el proceso de cultivo y producción.

La heterocigosidad esperada de una población (H_e) ó índice de Nei es la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población. Cuando las poblaciones están bajo equilibrio Hardy-Weinberg, la heterocigosidad puede ser calculada a partir de la frecuencia alélica. Por lo tanto, la heterocigosidad esperada cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en los loci (Hoelzel, 1998; Sosa et al., 2002).

El índice de Shannon se representa normalmente como H' y se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 0,5 y 5, aunque su valor normal está entre 2 y 3; valores inferiores a 2 se consideran bajos en diversidad y superiores a 3 son altos en diversidad de especies. Por otra parte, este índice subestima la diversidad específica si la muestra es pequeña.

Para el grupo externo (Pampa orégano) se muestran los índices de Nei y Shannon en la tabla 18:

Tabla 18: Promedio y desviación estándar de los índices de Nei y Shannon para 198 loci AFLP en pampa orégano

	Índice de diversidad génica de Nei (h)		Índice de diversidad de Shannon (I)	
	Promedio	Desv. St.	Promedio	Desv. St.
Pampa Orégano	0.0012	0.0169	0.0021	0.0287

Se observa, que los índices para Pampa Orégano también son valores muy bajos y menores respecto al orégano de Tacna, al tratarse de una especie con reproducción asexual mediante esquejes y por el número pequeño de individuos estudiados.

En la tabla 19 se observa el número y el porcentaje de polimorfismo en 198 Loci AFLP en oréganos de Tacna.

Tabla 19: Número de loci polimórficos y porcentaje de polimorfismo en 198 Loci AFLP en oréganos de Tacna

ECOTIPO	Número de loci polimórficos	Porcentaje de polimorfismo (%)
Varios Ecotipos	61	30.81
Nigra	56	28.28
Total	73	36.87

Respecto al porcentaje de polimorfismo, se aprecia que corresponde a un valor bajo tanto para los ecotipos Nigra y Varios Ecotipos así como en toda la población de Orégano (36.87 %).

Por otro lado, en la tabla 20 se presenta el número de loci polimórficos y porcentaje de polimorfismo para el grupo externo “Pampa orégano”. Se observa sólo 1 locus polimórfico, representando el 0.51 % de polimorfismo.

Tabla 20: Número de loci polimórficos y porcentaje de polimorfismo para pampa orégano

Pampa Orégano	Número de loci polimórficos	Porcentaje (%)
	1	0.51

Otro parámetro que se estimó es el número promedio de alelos observados y esperados (n° efectivo de alelos) para ambas subpoblaciones de ecotipos: Nigra y Varios Ecotipos, estos resultados se presentan en las tablas 21 y 22:

Tabla 21: Número y desviación estándar de alelos observados para Varios Ecotipos y Nigra

Ecotipo	Número observado de alelos (na)	
	Promedio	Desviación estándar
Varios ecotipos	1.3096	0.4635
Nigra	1.2843	0.4522
Total	1.3706	0.4842

Tabla 22: Número y desviación estándar de alelos esperados para para Varios Ecotipos y Nigra

Ecotipo	Número esperado de alelos (ne)	
	Promedio	Desviación estándar
Varios ecotipos	1.1961	0.3341
Nigra	1.1404	0.2706
Total	1.1804	0.2899

Se nota que en el tipo Nigra, el número promedio observado de alelos es 1.2843, mientras que el número esperado es 1.1404, es decir se espera un alelo aproximadamente, debido a la baja diversidad y bajo polimorfismo.

Para el grupo Otros Ecotipos, se aprecia valores mayores en los números promedios de alelos observados y esperados. Esto refuerza la explicación que el tipo Nigra está muy homogenizado genéticamente mientras que los Otros Ecotipos tienen una ligera mayor diversidad, posiblemente por la forma cómo ingresaron a Tacna.

V. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los análisis moleculares no se evidencian diferencias significativas a nivel genético entre los ecotipos del orégano de Tacna, puesto que presentan un alto coeficiente de asociación (80-95 por ciento). Además, los ecotipos se agrupan sin un patrón según su denominación; aunque, las Nigras tienden a presentarse en un mismo *cluster*. Por lo tanto, no hay una correlación clara entre el aspecto morfológico y el nivel genético molecular.
- Se determinó que el grado de diversidad genética del orégano de Tacna es bajo, debido principalmente al sistema de reproducción asexual, que utiliza para la siembra y cultivo (Se siembran por esquejes de las mismas plantas cultivadas)
- Respecto a las frecuencias génicas en los ecotipos de orégano de los 198 loci alrededor del 70 por ciento de los alelos están fijados o perdidos. Esto corresponde a una población que ha experimentado intensa deriva génica, por partir de un semillero de pocos individuos.
- Se afirma que considerando la alta homogeneidad genética en los oréganos de Tacna, las variaciones fenotípicas presentes en los ecotipos, se deberían principalmente a factores medioambientales en donde son cultivados: altitud, temperatura, precipitaciones, humedad, etc.

VI. RECOMENDACIONES

- Establecer las bases para la mejora genética de los diferentes ecotipos de orégano, resaltando las características productivas de modo que se obtenga un producto de mayor productividad y que pueda ser certificado para la producción de esquejes como fuente de semilla asexual.
- Utilizar otros marcadores moleculares como microsatélites o SNPs en los ecotipos de orégano para así tener los estimadores de los parámetros genéticos para loci codominantes.
- Invertir en investigación y desarrollo así como mejorar la tecnología de cultivo del orégano para llegar a un nivel competitivo y de esta manera mejorar la rentabilidad y así aportar al desarrollo de la región.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acha, F. 2010. Diseño, instalación y evaluación técnica de una parcela de riego por goteo en Quillahuani, Candarave, Tacna. Tesis Ing., Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 73 p
- Angiosperm Phylogeny Group. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181 (1): 1–20
- Blears, M.J.; De Grandis, S.A.; Lee, H.; Trevors, J.T. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 99-114.
- Baldo, A.; Norelli, J.L.; Farrell Jr, R.E.; Bassett, C.L.; Aldwinckle, H.S.; Malnoy, M. 2010. Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (*Malus x domestica*) with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology* 10: 1.
- Bonin, A.; Ehrich, D.; Manel, S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionist. *Molecular Ecology* 16: 3737-3758.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, H.; Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331.
- Castagnino, A.; Cueva, G.; Risco, J. 2017. Planeamiento Estratégico para la Región Tacna. Tesis Mg. Sc. Lima, Perú, PUCP. 173 p. Consultado oct 2017. Disponible en: <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/123456789/8030>
- Chen, L.; Yang, G. 2009. A genomic scanning using AFLP to detect candidate loci under selection in the finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*). *Genes & Genetic Systems* 84: 307-313.

- Choqueña, J. 2003. Efecto de la fertilización nitrogenada y fosforada en el rendimiento de aceite esencial del orégano (*Origanum vulgare*) en condiciones del distrito de Candarave. Tesis Ing. UNJBG. Tacna. 70 p.
- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, ME). 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. 3 ed. México, D.F.
- Comisión para la promoción de exportaciones PROMPEX. Octubre 1997. Módulo informativo: Orégano. Lima, Perú.
- Cooperación Peruano-Alemana. Secado Solar. Centro de Energía Renovable. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima. Perú, 1983.
- Crisci, J.; López, M. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la Taxonomía Numérica. Serie de biología N° 26, Secretaria General de La Organización de los Estados Americanos (OEA). Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico Washington, D.C.: 132.
- Cronquist, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, Nueva York.
- De Luna E.; Guerrero, J.A.; Chew, T.T. 2005. Sistemática Biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica* 15: 351-370.
- Luo, R.; Larget, B. 2009. Modeling substitution and indel processes for AFLP marker evolution and phylogenetic inference. *The Annals of Applied Statistics* 3: 222–248.
- Di Fabio, A. 2007. ACTA-Tercera reunión del Foro Federal de Hierbas Aromáticas y Especies. Comisión Nacional de Alimentos (CONAL). Mendoza-Argentina.
- DIRCETUR TACNA (Dirección Regional de Comercio Exterior y Turismo de Tacna, Perú). 2012. Expediente para la denominación de Origen del Orégano de Tacna. INDECOPI.
- Dirección Regional de Agricultura-Tacna. 2016. Producción y Exportación de la región Tacna. (en línea). Consultado oct 2017. Disponible en http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/oregano/produccion_exportacion_oregano.pdf

- Dirección Regional de Agricultura de Tacna. (s.f.). Dirección Regional de Agricultura - DEA. Consultado feb 2016. Disponible en <http://www.agritacna.gob.pe/node/10>
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1990. Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. BRL Focus. 12: 13-15.
- El Plan Operativo Institucional (POI). 2016. Dirección Regional de Agricultura-Tacna (En línea). Consultado oct 2017. Disponible en http://www.agritacna.gob.pe/gestores/normas/normas_publicos/acuerdos/9050264474_7857541292.pdf
- EOL. 2005. (en línea). Enciclopedia of life - *Origanum vulgare* L.(en línea). Consultado 14 Abr. 2015. Disponible en <http://eol.org/pages/579367/details>
- Excoffier, L. 2001. Analysis of population subdivision. In: D.J. Balding, M. Bishop y C. Cannings (eds). *Handbook of statistical genetics*. John Wiley & Sons, Chichester, United King.
- Franklin, M.T., Ritland, C.E. Myers, J.H. 2010. Spatial and temporal changes in genetic structure of greenhouse and field populations of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Molecular Ecology* 19: 1122-1133.
- Ferreira, M.; Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa - cenargen. Brasilia: 220.
- Fleisher, A.; Fleisher, Z. 1988. Identification of Biblical hyssop and origin of the traditional use of oregano group herbs in the Mediterranean region. *Econ. Bot.*42:232-241.
- Fleisher, A.; Sneer, N. 1982. Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *J. Sci.Food Agric.* 33:441-446.
- González, A.; Arias, D.M.; Valencia, S.; Oyama, K. 2004. Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Quercus laurina* (Fagaceae), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany* 91: 401-409.
- Goloboff, P.A. 1997. NONA (NO NAME) ver. 2. Published by the author, Tucuman, Argentina.
- Hedrick, P.W. 2000. *Genetics of populations*. 2 ed. Jones y Bartlett Publishers, Nueva York, Estados Unidos de América.
- Hongtrakul, V.; Huestis, G.M.; Knapp, S.J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sun-flower germplasm: genetic

- diversity among oilseed inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 400-407.
- Hoelzel, A.R. 1998. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Second Edition. IRL Press at Oxford University Press. New York, USA. 445 p.
 - INDECOPI. 1982. Norma Técnica Peruana – Itintec 209.190 Orégano. Lima-Perú
 - INEI. 2009. PERÚ: Estimaciones y Proyecciones de Población por Sexo, según Departamento, Provincia y Distrito, 2000-2015 (en línea). Lima-Perú. Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2009-15501. Consultado nov 2017. Disponible en <http://proyectos.inei.gob.pe/web/biblioineipub/bancopub/Est/Lib0842/libro.pdf>
 - Ietswaart, J.H. 1980. A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). PhD thesis. Leiden Botanical Series 4. Leiden University Press, The Hague.
 - IPGRI - International Workshop on Oregano (14, 1996, Valenzano (Bari), Italy).1997. Oregano- Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Padulosi, S., editor. Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute.182 p
 - Klauer, D. 2009. Manual técnico del cultivo ecológico del orégano (*Origanum sp* L.). El Taller Asociación de Promoción y Desarrollo. Arequipa, Perú. 56 p.
 - Lawrence, B.M. 1984. The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfumer and Flavorist* 9:41-51.
 - Mejía, N. 1992. Extracción y caracterización del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.). Tesis UNJBG. 110 p
 - Limache, H. 2012. Efecto del nitrógeno y fósforo en el rendimiento de hoja seca y aceite esencial en el orégano (*oríganum vulgare* l.) Ecotipo peruano mejorado. Tesis UNJBG. 91 p.
 - Martínez, M. 1997. Sistemática Molecular: Comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 123-136.
 - Martínez, C. L. 2007. Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres 87-160. *En: L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps.). Ecología Molecular*. Secretaria de Medio ambiente y Recursos Naturales, Instituto de

- Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.
- Maximixe. 2007. Informe de mercado: orégano. Lima. Consultado oct 2017. Disponible en <http://www.maximixe.com/>
 - Menéndez, J.L. 2007. Asturnatura.com (en línea). Num.116. España. Consultado 1 Jun. 2015. Disponible en <http://www.asturnatura.com/especie/origanum-vulgare.html.ISSN 1887-5068>
 - Meudt, H.M.; Clarke, A.C. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *TRENDS in Plant Science* 12:106-117.
 - Montoya, M.P.; Montoya, C.; Verástegui L.A. 2000. Evaluación técnico-agro económica y financiera de la producción y transformación del orégano con fines de exportación. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 166 p.
 - Morales, L. 1995. Estudio in vitro de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de tres plantas del Perú. Tesis. UNMSM. Fac. Biología. 108 pp.
 - Morales, R. 2007. Flora Ibérica- *Origanum L.* [21-VIII]. Consultado Nov. 2017. Disponible en http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/borradores/vol_XII/12_140_22_Origanum.pdf
 - Mueller, G.U.; Wolfenbarger, L. L. R. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree*
 - 10: 389-394
 - Mullis, K.; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335–350.
 - Mullis, K.; Ferré, F.; Gibbs, R. 1994. *The polymerase chain reaction*. Birkhauser, Boston: 550.
 - Muñoz, M. 2002. Plantas Medicinales Españolas: *Origanum vulgare L* (en línea). *Acta Botánica Malacitana*. 27(119).273-280. Consultado 4 jun. 2015. Disponible en http://www.biolveg.uma.es/abm/volumenes/vol27/27_munozcenteno.pdf
 - Nixon, K.C. 1999. *Winclada, program and documentation*. Published by the author, Ithaca, New York.

- Ojeda, J.; Tello, R.; Hernández, B. 2006. *Análisis y propuesta para el fortalecimiento de cadenas productivas en las zonas de influencia de Southern Perú*.
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtualData/publicaciones/indata/vol9_n2/a11.pdf>.
- Palomino, K. 2011. Diseño de una planta procesadora de hierbas aromáticas (orégano, romero, tomillo) en el distrito de Sihuas del departamento de Ancash. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrícola, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 214p
- Paoletti, M.; Buck, K. W.; Brasier, C. M. 2006. Selective acquisition of novel mating type and vegetative incompatibility genes via interspecies gene transfer in the globally invading eukaryote *Ophiostoma novo-ulmi*. *Molecular Ecology* 15: 249-62.
- Picardeau, M.; Prod'Hom, G.; Raskine, L.; LePenec, M.P.; Vincent, V. 1997. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 25-32.
- Piessens, V.; Supre, K.; Heyndrickx, M.; Haesebrouck, F.; De Vliegheer, S.; Van Coillie, E. 2010. Validation of amplified fragment length polymorphism genotyping for species identification of bovine associated coagulase-negative staphylococci. *Journal of Microbiological Methods* 80: 287-294.
- Serrato, A.; Ramos, S. 2014. AFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. Consultado en octubre de 2017. Disponible en <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/aflp.pdf>
- SIEA. 2015. Anuario de Producción agrícola .Dirección General de políticas Agrarias. Lima-Perú. 324 pp
- Simpson, J. 1997(a). Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 119-122.
- Simpson, J. 1997(b). Molecular markers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 73-76.
- Simpson, J.; Martínez, O.; Mendoza-Herrera, A.; Sánchez, M.; Hernández, F.; Hernández-Delgado, S. 1999. AFLP analysis of plant genomic DNA. p. 85-97.

- En: 4o Internacional Course on Analysis and manipulation of plant genome. Irapuato CINVESTAV.
- Soluciones prácticas - ITDG (Intermediate Technology Development Group, UK).2010.Ficha técnica del cultivo de orégano. (En línea).Perú. Consultado 1 de abr. 2014. Disponible en <http://www.solucionespracticas.org.pe/Descargar/597/5230>
 - Sosa, P.; Batista, F.; González, M.A. y N. Bouza. 2002 La Conservación Genética de las Especies Amenazadas en: Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación. Bañares, A. (Ed.). Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España. p. 133-160.
 - SOUTHER COPPER PERU. (s.f.). Cultivo del Orégano en la Provincia de Candarave. Tacna
 - Superintendencia Nacional de Aduanas y Administración de Tributaria. (s.f.). Operaciones Aduaneras - SUNAT. Consultado feb 2016. Disponible en <http://www.sunat.gob.pe/operatividadaduanera/index.html>
 - Swofford, D.L. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) ver. 4. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, United States of America.
 - Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research. 17(16): 6463-6471.
 - Trasmonte, W. 1993. Deshidratación de Orégano (*Origanum vulgare*) por el método de Flujo de Aire Caliente. Tesis Ing., Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. p. 121.
 - Valdivia, G. 2001. Identificación y evaluación de las ventajas competitivas del orégano para apoyar el desarrollo de la Región Arequipa. Tesis Mg. Sc. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.127 p.
 - Velasco, R. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Facultad de Ciencias Agropecuarias-Universidad del Cauca, Colombia. 3(1): 14-18.
 - Vos, P.; Högers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes , H.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper , M.; Zabeau, M.1995.AFLP: A new technique for DNA fingerprinting.Nucleic Acids Reserch 23:4407-4414.

- Wang, X.; Liu, W.; Chen, X.; Tang, C.; Dong, Y.; Ma, J.; Huang, X.; Wei, G.; Han, Q.; Huang, L.; Kang, Z. 2010. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. *BMC Plant Biology* 10:9
- Xifreda, C. 1983. Oréganos cultivados en Argentina. *Kurtziana* 16:133-148
- Yeah, F.; Yang, R.; Boyle, T. 1999. Pop Gene 10 (En línea). Consultado en mayo 2015. Disponible en <http://cc.oulu.fi/~jaspi/popgen/popgen.htm>.
- Zhang, X.M.; Wen, J.; Dao, Z.L.; Motley, T. J.; Long, C. L. 2010. Genetic variation and conservation assessment of Chinese populations of *Magnolia cathcartii* (Magnoliaceae), a rare evergreen tree from the South-Central China hotspot in the Eastern Himalayas. *Journal of Plant Research* 123: 321-331.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de Extracción con buffer CTAB establecido por Doyle & Doyle (1990), con algunas modificaciones

1. Pesar 100 mg de tejido, triturar en morteros pre-enfriados con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
2. En un tubo eppendorf de 1,5 ml colocar material vegetal pulverizado hasta la marca de 500 μ l y resuspender con 700 μ l de buffer CTAB (2X), Adicionando 2 μ l de b-mercaptoetanol. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 °C.
3. Retirar de la incubadora y dejar reposar por espacio de 2 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 700 μ l cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo .Mezclar suavemente, por inversión, para evitar dañar el ADN.
5. Centrifugar durante 5 min a 14 000 rpm. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo. Tener cuidado de no absorber la interfase. Descartar el cloroformo: alcohol isoamílico remanente en contenedores debidamente etiquetados.
7. Adicionar 50 μ l de CTAB (10X), agitar suavemente para homogenizar todo el líquido.
8. Adicionar 700 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
9. Agregar $\frac{3}{4}$ partes del volumen final (500 μ l aprox.) de Isopropanol helado para precipitar el ADN. Incubar a -20 °C durante 30 min.

9. Centrifugar 20 min a 14 000 rpm y descartar el sobrenadante cuidando de no perder el pellet.
10. Lavar dos veces con 1 ml de etanol de 70 por ciento a 14000 rpm por 3 minutos, descartar el etanol del lavado y agregar nuevamente 1 ml de etanol absoluto
11. Centrifugar a 14000 rpm durante 30 minutos y eliminar el etanol. Dejar que el precipitado se seque toda la noche dejando los tubos abiertos invertidos.
12. Disolver el precipitado de ADN en 80 μ l de buffer T10E1 o agua estéril, agregar 1-2 μ l de ARNasa 10mg/ml (libre de ADNasa) agitar suavemente e incubar las muestras a 37°C por 1 h
13. Almacenar las muestras a 4°C ó -20 °C.

Anexo 2: Composición del CTAB-Buffer de lisis (AppliChem)

Componentes	Para 500 ml	Concentración final
CTAB	10,00 g	(2% W/V)
Cloruro de sodio	40,91 g	1,4 M
Tris Ultrapuro	6,055 g	100 mM
EDTA-Na ₂ -2H ₂ O	3,72 g	20 mM
Ácido clorhídrico	18,23 g	1M

Ajustar a pH 8,0

Anexo 3: Componentes del Buffer TBE 10 X

Componentes	Para 1 Litro
Trizma Base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 0,5M pH 8,0	40 ml

Llevar a pH 8,3 y autoclavar.

Anexo 4: Componentes del tampón de carga

Componentes	Para 10 ml
Azul de Bromofenol	0,025 g
Xilencianol	0,025 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	4 ml
Glicerol (87%)	5,75 ml
Agua destilada	Hasta 10 ml

Anexo 5: Soluciones utilizadas para la elaboración de geles de acrilamida

Acrilamida: Bis- acrilamida (19:1) al 6%

Componentes	Concentración Stock	Para 1 litro
Urea	-	420 g
Acribis	30 %	200 ml
TBE	5 x	200 ml
Agua miliQ		Enrasar a 1 litro

Adherente

Componentes	Concentración Stock	Volumen utilizado
Silano		3 μ l
Ácido acético glacial	17 M	3 μ l
Etanol	96%	1 ml

Preparar la solución en campana extractora de gases

Anexo 6: Reactivos para tinción de geles de poliacrilamida por el método de Nitrato de plata

-Soluciones de fijación, tinción y revelado

Solución de fijación

Componentes	Concentración Stock	Para 1 litro
Etanol absoluto	100 %	100 ml
Ácido acético glacial	17 M	8 ml
Agua molecular		Enrasar a 1 litro

Solución de tinción

Componentes	Concentración Stock	Para 500 ml
Nitrato de plata	-	1 g
Solución de fijación	-	500 ml

Para reutilizar la solución agregar 0.3 g de nitrato de plata

Solución de revelado

Componentes	Concentración Stock	Para 1 litro
NaOH	-	30 g
Agua molecular		1 litro

Agregar antes de usar 2.4 ml de formaldehído por cada 900 ml de solución, si se reutiliza la solución agregar 1.5 ml de formaldehído

Anexo 7: Datos de las muestras frescas del orégano de Tacna

Número	Código	Provincia	Distrito	Zona	Organización	Ecotipo
1	OE1	Candarave	Quilahuani	C.C. Pallata	Asociación de Productores San Juan Bautista de Pallata	Oreja Elefante
2	N2	Candarave	Huanuara	C.C. Pallata	Asociación de Productores San Juan Bautista de Pallata	Nigra común
3	OE3	Candarave	Candarave	Talaca	Asociación de Productores Agropecuarios	Oreja Elefante
4	N4	Candarave	Candarave	Talaca	Asociación de Productores Agropecuarios	Nigra común
5	N5	Candarave	Cairani	Ancocala	Asociación de Productores Agropecuarios 10 de Agosto de Ancocala	Nigra común
6	N6	Candarave	Huanuara	Sausini	Asociación de Productores Orégano Muralla	Nigra común
7	I7	Candarave	Huanuara	Sausini	Asociación de Productores Orégano Muralla	Italiano
8	N8	Candarave	Cairani	Cairani	Asociación de Productores Agropecuarios	Nigra común
9	N9	Tarata	Tarata	Lupaja	Asociación Retamal	Nigra común
10	M10	Tarata	Tarata	Lupaja	Asociación de Retamal	Mejorado
11	M11	Tarata	Chucatamani	Chapine	Asociación de Productores Múltiples Chucatani	Mejorado
12	M12	Tarata	Chucatamani	Para	Asociación de Productores Múltiples Chucatani	Mejorado
13	N13	Tarata	Tarata	Lupaja	Asociación Retamal	Nigra común
14	N14	Tarata	Susapaya	Quebrada	Asociación de Productores Agrarios Susapaya	Nigra común
15	M15	Tarata	Ticaco	Culata	Asociación Agraria Tarata Ticaco	Mejorado
16	N16	Tarata	Susapaya	Charcalani	Productores Agropecuarios Yabroco	Nigra común
17	N17	Tarata	Tarata	Yunga	Asociación Virgen de Lurdes	Nigra común
18	CH18	Tarata	Tarata	Yunga	Asociación Virgen de Lurdes	Chinito coposo

19	N19	Jorge Basadre	Coraguaya	Coraguaya	Asociación Producción Orégano Orgánico Coraguaya	Nigra común
20	CH20	Jorge Basadre	Camilaca	Pagre - Borogueña	Asociación de Productores De Cultivos Múltiples de Borogueña	Chino cocotea
21	N21	Jorge Basadre	Tasacirsa	Borogueña	Asociación Productores Ramales de Borogueña	Nigra común
22	N22	Jorge Basadre	Coraguaya	Coraguaya	Asociación de Productores Agroindustriales de Coraguaya	Nigra común
23	A23	Jorge Basadre	Borogueña	Borogueña	Asociación de Productores De Cultivos Múltiples de Borogueña	Alamo
24	N24	Jorge Basadre	Borogueña	Campiña Cambaya	Asociación Productores De Orégano de Catarata de Panina	Nigra común
26	N26	Jorge Basadre	-	Mora Pujovilalaca	Asociación Productores De Hierbas Aromáticas y cultivos Agroindustriales de Vilalaca	Nigra común
27	CH27	Jorge Basadre	Ilabaya	Borogueña	Productores Rurales de Borogueña	Coposo cocotea
29	N29	Tacna	Pachía	Anexo Toquela	Asociación de Productores Múltiples de Toquela - APromt	Nigra común
30	N30	Tacna	Pachía	Comunidad de Caplina-Pachía	Asociación Productores de Orégano de Caplina	Nigra común
31	N31	Tacna	Pachía	Challaviento Pachía	Fundo Paucañani	Nigra común
32	N32	Tacna	Pachía	Ancoma Pachía	Sector Chacra Ancoma	Nigra común
33	N33	Tacna	Pachía	Anexo Toquela	Asociación Productores Múltiples de Toquela - A Promt	Nigra común
34	N34	Tacna	Pachía	Ancoma Pachía	Sector Chacra Ancoma	Nigra común

Anexo 8: Principales ecotipos de orégano producidos en Tacna

<i>Nigra Común</i>
Hojas: medianas, de color verde claro
Tallos: delgado, de color rojizo a blanquecino y con presencia de poca pilosidad (53 tallos por planta)
Inflorescencia: el tamaño de inflorescencia es de 2.7 cm de largo, poca compacta y de flor de color blanco.
Propósito: ecotipo de un solo propósito, es decir se puede utilizar para la producción de hoja seca
Aroma: característico y persistente
Cosecha: A los seis meses
Otras características: sensible al ataque de oídium, fusarium y alternaría. Este ecotipo es el más difundido en la región
<i>Italiano</i>
Hojas: el tamaño mediano y color verde intenso
Tallos: delgado y abundantes (54 tallos por plantas) y de color rojo claro.
Inflorescencia: el tamaño de inflorescencia es de 4.5 cm de largo, no compacta con flores de color blanco.
Propósito: ecotipo de doble propósito, se produce tanto hojas secas como flor seca.
Aroma: aroma característico no muy persistente.
Cosecha: a los cinco meses las hojas secas y los seis meses las flores
Otras características: susceptible al ataque de oídium
<i>Chinito</i>
Hojas: medianas, de color verde intenso, y sin presencia de pilosidad
Tallos: delgados, de color marrón y sin presencia de pilosidad (48 tallos por planta)
Inflorescencia: el tamaño de la inflorescencia es de 1.0 cm de largo, de color blanco, poco compacta y tarda más de seis meses para aparecer.
Propósito: ecotipo de un solo propósito, es decir solo para la cosecha de las hojas de los 5 meses.
Aroma: aroma muy suave, agradable al gusto.
Cosecha: a los cinco meses.
Otras características: sensible al ataque de oídium. A diferencia del ecotipo de floración temprana I, las flores de esta tiene menor peso y su inflorescencia es rala.
<i>Mejorado</i>
Hojas: el tamaño grande y color verde oscuro

Tallos: gruesos y abundantes (70 tallos por planta) y de color rojo claro)
Inflorescencia: el tamaño de la inflorescencia es de 4.5 cm de largo, no compacta con flores color blanco
Propósito: ecotipo de doble propósito, produce tanto hoja seca como flor seca.
Aroma: aroma característico muy persistente
Cosecha: a los cinco meses se cosecha las hojas y a los seis meses las flores
Otras características: resistente al ataque de oídium, pero no soporta las bajas temperaturas.
<i>Cocotea</i>
Hojas: pequeños de color verde claro, con poca presencia de pilosidades
Tallos: delgados, de color verde claro, como poca presencia de pilosidad (55 tallos por planta)
Inflorescencia: el tamaño de inflorescencia es de 0.9 cm de largo, poco compacta y tarde más de seis meses para aparecer
Propósito: ecotipo con un solo propósito, es decir solo para la cosecha de hojas a los seis meses; se comercializa en mayor cantidad en fresco
Aroma: aroma característico y suave
Cosecha: a los seis meses
Otras características: sensible al ataque de oídium y muy resistente a la falta de agua.

FUENTE: Producción y exportación de orégano de la región Tacna (2016)

Anexo 10: Matriz de Similitud de 32 muestras de orégano y 4 muestras de pampa orégano

	OE1	OE3	I7	A23	CH18	CH20	CH27	M10	M11	M12	M15	N2
OE1	1.00											
OE3	0.95	1.00										
I7	0.94	0.93	1.00									
A23	0.96	0.94	0.96	1.00								
CH18	0.83	0.81	0.84	0.87	1.00							
CH20	0.88	0.87	0.89	0.93	0.88	1.00						
CH27	0.91	0.92	0.92	0.91	0.81	0.89	1.00					
M10	0.92	0.92	0.95	0.93	0.81	0.86	0.92	1.00				
M11	0.95	0.95	0.95	0.93	0.80	0.87	0.94	0.96	1.00			
M12	0.95	0.96	0.95	0.93	0.80	0.87	0.94	0.96	0.99	1.00		
M15	0.97	0.95	0.96	0.97	0.84	0.91	0.92	0.92	0.95	0.96	1.00	
N2	0.97	0.98	0.92	0.94	0.83	0.86	0.91	0.92	0.95	0.96	0.95	1.00
N4	0.91	0.90	0.90	0.93	0.88	0.92	0.85	0.86	0.87	0.88	0.91	0.90
N5	0.91	0.91	0.93	0.95	0.88	0.93	0.87	0.89	0.88	0.88	0.91	0.90
N6	0.93	0.91	0.97	0.96	0.86	0.88	0.89	0.92	0.93	0.93	0.94	0.91
N8	0.95	0.95	0.96	0.94	0.81	0.88	0.93	0.94	0.96	0.96	0.95	0.95
N9	0.94	0.94	0.96	0.93	0.80	0.88	0.94	0.96	0.96	0.96	0.94	0.95
N13	0.92	0.91	0.92	0.96	0.88	0.93	0.87	0.89	0.89	0.90	0.94	0.91
N14	0.96	0.94	0.94	0.98	0.83	0.90	0.90	0.90	0.92	0.93	0.97	0.93
N16	0.96	0.95	0.96	0.97	0.85	0.90	0.92	0.92	0.95	0.96	0.99	0.95
N17	0.95	0.93	0.95	0.96	0.84	0.90	0.91	0.94	0.94	0.94	0.97	0.94
N19	0.95	0.94	0.94	0.96	0.82	0.90	0.93	0.94	0.96	0.96	0.97	0.94
N21	0.93	0.90	0.93	0.94	0.82	0.89	0.86	0.89	0.90	0.90	0.93	0.90
N22	0.96	0.96	0.95	0.95	0.82	0.87	0.95	0.97	0.98	0.98	0.95	0.96
N26	0.93	0.95	0.93	0.93	0.79	0.85	0.93	0.94	0.95	0.95	0.94	0.94
N29	0.91	0.89	0.90	0.94	0.86	0.92	0.85	0.86	0.87	0.88	0.92	0.90
N30	0.94	0.95	0.96	0.93	0.80	0.88	0.95	0.95	0.97	0.97	0.94	0.94
N31	0.95	0.96	0.95	0.94	0.79	0.87	0.94	0.95	0.97	0.97	0.95	0.96
N32	0.94	0.95	0.96	0.94	0.81	0.88	0.95	0.97	0.99	0.99	0.95	0.96
N33	0.95	0.96	0.95	0.93	0.79	0.86	0.94	0.94	0.97	0.97	0.94	0.96
N34	0.92	0.94	0.94	0.91	0.79	0.85	0.93	0.94	0.96	0.96	0.92	0.93
N24	0.96	0.95	0.95	0.96	0.81	0.90	0.94	0.93	0.95	0.95	0.97	0.94
T35	0.28	0.29	0.29	0.30	0.32	0.36	0.30	0.27	0.30	0.31	0.33	0.28
T36	0.28	0.29	0.29	0.30	0.32	0.36	0.30	0.27	0.30	0.31	0.33	0.28
T37	0.28	0.29	0.29	0.30	0.32	0.36	0.30	0.27	0.30	0.31	0.33	0.28
T39	0.29	0.30	0.30	0.31	0.32	0.36	0.31	0.28	0.31	0.32	0.33	0.29

	N4	N5	N6	N8	N9	N13	N14	N16	N17	N19	N21	N22	N26
OE1													
OE3													
I7													
A23													
CH18													
CH20													
CH27													
M10													
M11													
M12													
M15													
N2													
N4	1.00												
N5	0.97	1.00											
N6	0.91	0.93	1.00										
N8	0.89	0.90	0.94	1.00									
N9	0.89	0.89	0.93	0.97	1.00								
N13	0.95	0.96	0.93	0.91	0.90	1.00							
N14	0.91	0.93	0.93	0.92	0.91	0.94	1.00						
N16	0.91	0.91	0.95	0.95	0.94	0.93	0.96	1.00					
N17	0.90	0.91	0.92	0.95	0.96	0.94	0.94	0.96	1.00				
N19	0.88	0.89	0.93	0.96	0.95	0.92	0.93	0.96	0.96	1.00			
N21	0.90	0.90	0.92	0.92	0.93	0.93	0.93	0.92	0.94	0.92	1.00		
N22	0.87	0.90	0.93	0.96	0.96	0.89	0.93	0.95	0.94	0.96	0.90	1.00	
N26	0.85	0.87	0.91	0.94	0.94	0.87	0.93	0.93	0.93	0.94	0.88	0.97	1.00
N29	0.96	0.95	0.91	0.89	0.89	0.96	0.93	0.91	0.92	0.91	0.92	0.88	0.87
N30	0.88	0.90	0.93	0.96	0.96	0.90	0.93	0.94	0.93	0.95	0.91	0.97	0.94
N31	0.86	0.89	0.92	0.96	0.97	0.89	0.93	0.94	0.94	0.96	0.91	0.98	0.95
N32	0.86	0.89	0.94	0.97	0.97	0.89	0.93	0.95	0.94	0.96	0.90	0.99	0.97
N33	0.87	0.89	0.92	0.96	0.97	0.88	0.92	0.94	0.93	0.95	0.91	0.97	0.95
N34	0.85	0.87	0.91	0.94	0.95	0.87	0.91	0.92	0.91	0.94	0.89	0.96	0.94
N24	0.88	0.90	0.92	0.96	0.96	0.92	0.95	0.96	0.96	0.97	0.93	0.95	0.95
T35	0.36	0.34	0.32	0.29	0.27	0.34	0.32	0.32	0.32	0.34	0.34	0.26	0.31
T36	0.36	0.34	0.32	0.29	0.27	0.34	0.32	0.32	0.32	0.34	0.34	0.26	0.31
T37	0.36	0.34	0.32	0.29	0.27	0.34	0.32	0.32	0.32	0.34	0.34	0.26	0.31
T39	0.37	0.34	0.32	0.30	0.28	0.35	0.32	0.33	0.33	0.35	0.34	0.27	0.31

	N29	N30	N31	N32	N33	N34	N24	T35	T36	T37	T39
OE1											
OE3											
I7											
A23											
CH18											
CH20											
CH27											
M10											
M11											
M12											
M15											
N2											
N4											
N5											
N6											
N8											
N9											
N13											
N14											
N16											
N17											
N19											
N21											
N22											
N26											
N29	1.00										
N30	0.88	1.00									
N31	0.87	0.98	1.00								
N32	0.88	0.98	0.98	1.00							
N33	0.88	0.98	0.97	0.97	1.00						
N34	0.86	0.96	0.96	0.96	0.98	1.00					
N24	0.90	0.96	0.97	0.96	0.95	0.94	1.00				
T35	0.39	0.26	0.29	0.29	0.27	0.30	0.31	1.00			
T36	0.39	0.26	0.29	0.29	0.27	0.30	0.31	1.00	1.00		
T37	0.39	0.26	0.29	0.29	0.27	0.30	0.31	1.00	1.00	1.00	
T39	0.40	0.27	0.30	0.30	0.28	0.31	0.31	1.00	1.00	1.00	1.00