

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE DIFERENTES GENOTIPOS DE ORÉGANO (*Lippia* sp.)

MOLECULAR DESCRIPTION AND ESSENTIAL OIL PRODUCTION OF *Lippia* sp. GENOTYPES

Norma Patricia Cazares Alonso ¹, Eulalia Edith Villavicencio Gutiérrez ², Julia Verde Star ¹, Víctor Pecina Quintero ³
e Isidro Humberto Almeyda León ⁴

RESUMEN

Con el fin de conservar y aprovechar los recursos genéticos de las zonas áridas y semiáridas de México se realizó la caracterización molecular de 35 genotipos silvestres y seis cultivados de orégano, los cuales se recolectaron en los municipios de Parras de la Fuente, Ramos Arizpe, General Cepeda y Matamoros, del estado de Coahuila. En el análisis se utilizaron marcadores tipo RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar, por sus siglas en inglés) y SSR (Secuencias Repetidas). Además, se determinó la cantidad y calidad de los aceites esenciales mediante la técnica de arrastre por vapor y cromatografía líquida de alta resolución. Los marcadores RAPD y SSR permitieron detectar un alto nivel de polimorfismos en el orégano. Sin embargo, no se logró diferenciar el total de las recolectas evaluadas y tampoco fue posible agruparlas por su ubicación geográfica. En contraste, la diversidad genética fue moderada (47%) y mayor entre poblaciones. Algunas muestras presentaron valores altos en la producción de carvacrol; mientras que los porcentajes de timol resultaron muy heterogéneos entre las poblaciones muestreadas. Se concluye que existe variación suficiente en el orégano del sureste del estado de Coahuila y es posible seleccionar aquellos con potencial para incrementar la producción de aceites esenciales.

Palabras clave: Aceites esenciales, carvacrol, orégano, RAPD, SSR, timol.

ABSTRACT

In order to preserve and use the genetic resources of the arid and semi-arid and arid lands of Mexico, 35 wild and 6 cultivated samples of *Lippia* sp. (oregano) from General Cepeda, Ramos Arizpe, Parras de la Fuente and Matamoros in Coahuila State were analyzed. The molecular description was made through Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Simple Sequences Repeated (SSR). In addition, the quantity and quality of essential oils was determined by means of the drag technique by steam and high resolution liquid chromatography. RAPD and SSR markers were able to detect a high level of polymorphism in oregano. However, it was not possible to differentiate the whole assessed collections as well as to gather them in regard to location. In contrast, it was determined that the genetic diversity was mild (47%) and higher among populations. Some samples showed high values of carvacrol while thymol was very heterogeneous among populations. It is concluded that there is enough variation in the oregano from Southeast Coahuila and it is feasible to select those materials that can increase the essential oil production.

Key words: Essential oils, carvacrol, oregano, RAPD, SSR, thymol.

Fecha de recepción: 09 de octubre de 2008

Fecha de aceptación: 12 de mayo de 2010

INTRODUCCIÓN

Lippia graveolens HBK. (orégano) es una especie forestal no maderable que se desarrolla en las zonas áridas y semiáridas de México. Por sus características aromáticas es referida comercialmente en el mercado internacional como orégano mexicano (Infoagro, 2006). Es una planta aromática perenne de tipo arbustivo de la que se obtiene, a nivel nacional, una producción anual de hoja seca de 6,500 ton, de ellas 90% se destina al mercado de exportación. El principal producto derivado de la hoja de esta planta es el aceite esencial, el cual tiene usos en las industrias de alimentos procesados, licorerías, refresqueras, farmacéuticas y cosmetológicas.

Al igual que la hoja seca, el principal mercado del aceite esencial son los Estados Unidos de América, Italia y Japón (Gaby *et al.*, 2003). Este último se vende a un precio promedio de 170 dólares el litro, en función de su calidad, la cual se mide por la presencia de carvacrol y timol (Dagne, 2001; Licón, 2003). En un estudio comparativo entre el orégano de Grecia y Turquía con el de México (*L. graveolens* y *L. berlandieri* Schauer), se demostró que el producto mexicano es superior por su contenido de aceites esenciales y características aromáticas (Martínez *et al.*, 2003).

Las perspectivas económicas de este recurso, a través de su proceso agroindustrial, son muy promisorias siempre y cuando se garantice una producción uniforme, tanto en calidad como en cantidad (Huerta, 2002 y 2005). En la región semiárida de Coahuila, el aprovechamiento de *L. graveolens* se realiza en ocho municipios de la región centro y sureste del estado; sin embargo, los municipios de Parras de la Fuente, General Cepeda y Ramos Arizpe son las localidades donde la recolecta es mayor (INAFED, 2005; Villavicencio *et al.*, 2007).

La colecta y caracterización de genotipos de orégano, es de primordial importancia para la conservación y explotación de la diversidad genética de ésta y otras especies de las zonas áridas y semiáridas del país. Además, la selección de genotipos con alto potencial productivo puede mejorar la economía y promover la sustentabilidad de los recursos en dichas áreas.

¹ Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

² Campo Experimental Saltillo, Centro de Investigación Regional Noreste (CIRNE), INIFAP. Correo-e: villavicencio.edith@inifap.gob.mx

³ Campo Experimental Bajío, Centro de Investigación Regional Centro (CIRCE), INIFAP.

⁴ Campo Experimental General Terán, Centro de Investigación Regional Noreste (CIRNE), INIFAP.

Los primeros trabajos para la caracterización de germoplasma se realizaron con técnicas de marcadores de proteínas (isoenzimas), dichos trabajos contribuyeron al estudio de diversos organismos, cuando la tecnología del ADN aún no contaba con los avances actuales (Loxdale y Lushai, 1998). Steiner y Joslyn (1979) y Loxdale *et al.*, (1985) refieren que los patrones electroforéticos de aloenzimas detectados en geles de poliacrilamida han sido útiles para identificar diferentes alelos de un gen específico y en el estudio de la variación genética entre y dentro de poblaciones. El desarrollo de los marcadores moleculares de ADN revolucionó la investigación genética, ya que las mutaciones en los intrones y codones de un gen aportan mayor variación a nivel del ADN que de las proteínas (Richardson *et al.*, 1986). Así mismo, las muestras de ADN son más estables y no cambian con el tejido de origen, en un mismo organismo.

Las técnicas moleculares más destacadas son las basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); las cuales amplifican secuencias específicas o al azar del ADN y requieren pequeñas cantidades del mismo (Litt y Luty 1989). Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar a nivel molecular germoplasma silvestre y cultivado de orégano colectado en el estado de Coahuila y establecer su relación con la producción de aceites esenciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético.- En el sureste de Coahuila se realizó un estudio agroecológico de orégano, que incluyó los municipios de General Cepeda, Parras de la Fuente y Ramos Arizpe. Se consideraron aspectos del medio físico tales como: precipitación, temperatura, pendiente, orientación de la pendiente, textura, fase física y química del suelo, así como la vegetación asociada. Aspectos morfológicos de la planta: altura, cobertura del arbusto y rendimiento (Figura 1).

En las localidades de los municipios referidos, mediante un muestreo sistemático, se recolectaron muestras de hoja de los arbustos "aprovechables", mismos que presentaron una altura y diámetro de copa superior a 50 cm. También se obtuvieron muestras de una plantación comercial en la localidad de La Laguna, que pertenece al municipio de Matamoros, Coahuila, para un total de 41 materiales diferentes (Cuadro 1).

Extracción de ADN.- Se utilizó la metodología descrita por Almeyda *et al.* (2001), que consiste en triturar 200 mg de tejido en nitrógeno líquido. A la muestra macerada se le agrega una solución de extracción 2-ME/CTAB precalentada a 65°C (2% p/v CTAB, 100 mM Tris - HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1% p/v polivinipirrolidona 40,000), con β mercaptoetanol a una concentración final de 0.2% y se incuba durante 30 minutos a 65°C. Posteriormente, se adiciona un volumen (p/v con base en el peso del tejido inicial) de cloroformo y centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se recupera la fase acuosa (superior); se le incorpora 1 volumen de cloroformo y se centrifuga a 10,000 rpm, durante 5 min a temperatura ambiente.

La fase acuosa se recupera y agrega medio volumen de acetato de amonio (7.5 M), dejar por 10 min en hielo para después centrifugar por 10 min a 14,000 rpm, a temperatura ambiente. La precipitación de los ácidos nucleicos se obtiene cuando al volumen recuperado se le agregan 0.7 volúmenes de isopropanol, se mantiene 45 min a temperatura ambiente y después se centrifuga a 10,000 rpm por 15 min. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se lava con etanol frío al 70%, se seca a temperatura ambiente y resuspende en 150 μ L de agua mQ estéril para su posterior almacenamiento a 4°C, hasta su uso.

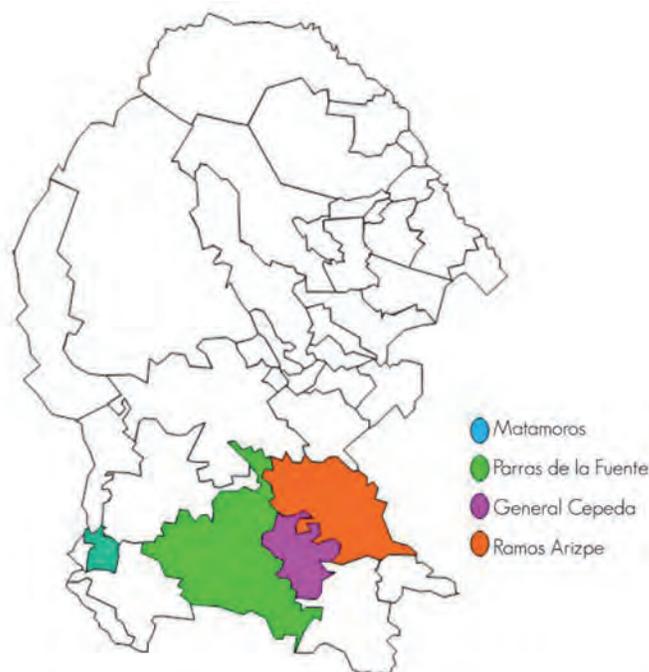


Figura 1. Distribución de los municipios del estado de Coahuila, donde se localizan poblaciones naturales de orégano (*Lippia graveolens* HBK.) en la región sureste del estado de Coahuila.

Cuadro 1. Localización y origen geográfico de las poblaciones naturales de orégano y simbología de los muestras de *Lippia graveolens* recolectadas en diferentes municipios de la región sureste del estado de Coahuila.

Municipio	Localidad	Altitud (msnm)	Genotipos			
Matamoros (M)	Laguna	1,096	LA1			
			LA2			
			LA3			
			LA4			
			LA5			
			LA6			
Ramos Arizpe (RA)	Sauceda	1,101	SAU1			
			SAU2			
			SAU3			
			SAU4			
			SAU5			
			SAU6			
			SAU7			
General Cepeda (GC)	Independencia	1,179	IND1			
			IND2			
			IND3			
			IND4			
			IND5			
	Narigua	1,408	NA1			
			NA2			
			NA3			
			NA4			
	San Rafael	1,365	SR1			
			SR2			
			SR3			
			SR4			
			BO1			
			BO2			
Parras de la Fuente (PF)	Boquillas	1,226	BO3			
			BO4			
			BO5			
			BO6			
				4 de Marzo	1,136	4M1
						4M2
4M3						
4M4						
4M5						
	San Isidro	1,452	SI1			
			SI2			
			SI3			
			SI4			
			SI5			

Reacción RAPD.- Se evaluaron 40 iniciadores con diferente contenido de Guanina-Citosina (G-C) como nucleótidos selectivos, finalmente, con base en el número de fragmentos amplificados y la reproducibilidad de los patrones electroforéticos obtenidos se eligió el iniciador 2-60% (5'-GTGCGATCTC-3') para evaluar todos los materiales colectados. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ L compuesto por: 2 μ L de ADN (50 ng), 2.5 μ L de solución amortiguadora (1X), 1 μ L de MgCl₂ (2mM), 2 μ L de DNTP's (200 μ M), 0.5 μ L de Taq ADN polimerasa (2.5 U), 2 μ L de cada iniciador (0.5 μ M) y se aforó a 25 μ L con agua mQ estéril. Las condiciones de temperaturas para la reacción de PCR fueron: un ciclo de 3 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 2 min de alineación a 37°C, 1 min de polimerización a 72°C y un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min.

Reacción SSR.- Se evaluaron seis pares de iniciadores (Ashkenazi *et al.*, 2000; Ghislain *et al.*, 2000). Con base en el número de fragmentos amplificados y la reproducibilidad de los patrones electroforéticos obtenidos, se seleccionó

el par M5F/M6R (5'-AACATTACAACACATTAGCA-3' y 5'-AACTTATCTGAACTCTCT-3'). Las reacciones se conformaron en un volumen final de 25 μ L compuesto por: 2.5 μ L de solución amortiguadora (1X), 2 μ L de MgCl₂ (2mM), 2 μ L de DNTP's (200 μ M), 0.5 μ L de Taq ADN polimerasa (2.5 U), 2 μ L de cada iniciador (0.5 μ M) y se aforó a 25 μ L con agua mQ estéril. Las condiciones de temperaturas se establecieron en: un ciclo de 3 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 2 min de alineamiento a 47°C, 1.5 min de polimerización a 72°C y un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C. Las muestras se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y se tiñeron con nitrato de plata y bromuro de etidio, para su análisis.

Análisis estadístico.- Las relaciones genéticas entre genotipos para cada sistema de marcador (RAPD y SSR) se calcularon mediante la matriz de distancia propuesta por Nei y Li (1979), con el paquete de software S-Plus versión 4.0. A partir de la matriz de distancias se realizaron dendrogramas por medio del método Agrupamiento de Unidades de Distancias Mínimas y Promedios Aritméticos (UPGMA).

Se utilizó la fórmula de Powell *et al.* (1996) para calcular el índice de diversidad genética de la población en general. Con la información generada se llevó a cabo un análisis de varianza y un análisis de componentes principales (ACP), para lo cual se utilizó el software INFO-GEN (Balzarini y Di Rienzo, 2004). La determinación de las diferencias genéticas entre las poblaciones, se estimó con el índice de contenido polimórfico (PIC) (Botstein *et al.*, 1980).

Extracción y calidad del aceite.- Para estimar la producción de aceite del material vegetal procedente de todas las localidades, se usaron hojas de diversos estratos de "plantas aprovechables" que presentaron la misma madurez fisiológica y que se cosecharon en la misma época (verano). La extracción del aceite esencial, se hizo por la técnica de destilación por arrastre de vapor, de acuerdo a la Norma AOAC (1990); para ello se colocaron en un matraz de fondo plano 10 g de muestra y 75 mL de agua destilada, calentándose a temperatura constante por un lapso de dos horas. El aceite se separó de la fase acuosa, se recolectó y se conservó en refrigeración.

Las diluciones de los aceites (1:10) se analizaron con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución y acetonitrilo como diluyente. De cada una se colocaron 20 μ L en el cromatógrafo, por un tiempo de 30 min bajo las siguientes condiciones: presión de 160 bar; λ = 254 nm y flujo = 1.7 mL min⁻¹; fase móvil = 60% agua + 40% acetonitrilo. Con las áreas cromatográficas generadas de cada muestra, se obtuvo la concentración en miligramos de timol y carvacrol mediante la fórmula:

$$y = 2.9693x - 2.6052$$

$$r^2 = 0.9168$$

$$x = (y + 2.6052) / 2.9693$$

Donde:

y = área o superficie obtenida en el cromatograma

x = concentración en mg de timol o carvacrol

r^2 = coeficiente de determinación, que por su valor representa baja dispersión de valores.

RESULTADOS

Análisis RAPD

La técnica RAPD diferenció 15 de los 41 materiales de orégano incluidos en este trabajo. El dendrograma que muestra las relaciones entre genotipos conformó cuatro grupos distintivos (Figura 2).

El grupo A es el más homogéneo con 46% del germoplasma analizado, con distancias genéticas que varían de 0.03 a 0.12; además, sus integrantes presentaron los menores contenidos de aceites esenciales. En los materiales agrupados en B y C se obtuvo la mayor producción de esos compuestos, lo anterior se refleja en los valores promedios de estos dos grupos (Cuadro 2). El

grupo D se formó con dos genotipos, SI1 y SI2, los que destacaron por el alto porcentaje de carvacrol; ambos pertenecientes a la localidad de San Isidro. También se observaron tres genotipos completamente divergentes con el resto de los materiales evaluados, dos de ellos muy similares entre sí (NA2, LA2) (Cuadro 2). Los valores más grandes de carvacrol se determinaron en las colectas: LA2, SAU4, SR1, BO1, BO3, BO4, BO5, 4M1, 4M5, SI2 y SI4, la mayoría de ellas ubicadas en los grupos A y C. Los materiales con porcentajes superiores de timol fueron: LA2, LA5, LA6, SAU1, SAU2, SAU5, IND1, IND3, IND4, NA1, SR4, BO1, BO2, 4M3, 4M4 y SI4. De igual manera que en la producción de carvacrol, la mayor proporción de los materiales con registros sobresalientes de timol pertenecieron a los grupos A y C.

Análisis SSR

La técnica de microsatélites diferenció 21 recolectas de orégano en 10 grupos de acuerdo al dendrograma generado (Figura 3). El promedio más alto en la producción de aceite se observó en el grupo I (BO3, BO4, BO5 y BO6) (Cuadro 3); en tanto que para el carvacrol, correspondieron a los grupos F y G, los dos con un solo material; por esa razón sus valores promedios resultaron superiores a los grupos A, B, C e I, que incluyen genotipos con alta producción de carvacrol, como es el caso de la colecta SI2 del grupo A, cuyo porcentaje fue de 8.66. Se determinó una banda de 100 pb en los materiales SR1, SR3, SI3, 4M5, con rendimientos de 6.2 a 7.6 mL de carvacrol.

El promedio mayor de timol se obtuvo en el grupo D, que integra las recolectas IND4, IND5, 4M3 y 4M4, en ellas se observó un fragmento de 600 pb que pudiese relacionarse con la producción de timol (25.33 a 72.57 mL), excepto la muestra IND5 que tuvo un registro de 0.7 mL. Mediante los microsatélites se determinaron niveles más grandes de polimorfismo que con los RAPD, por lo que algunos de los materiales analizados bajo esta última técnica se integraron en un mismo grupo; mientras que con la técnica de SSRs formaron parte de otros, tal es el caso de LA5, LA6 y BO2.

El análisis conjunto de los resultados de las dos técnicas de amplificación de ADN generó un tercer dendrograma, con seis grupos; pero se mantuvo la estrecha relación observada entre los materiales, con los dos métodos por separado. Al igual que con la técnica RAPD, se distinguieron tres genotipos completamente divergentes con el resto de las muestras evaluadas, dos de ellas muy similares entre sí (NA2, LA2) (Figura 4); razón por la cual ambas pueden pertenecer a una misma recolecta.

En términos generales, los ejidos Boquillas (BO) e Independencia (IND) fueron las localidades con los genotipos de mayor producción de aceites esenciales. Los dos ejidos mostraron una estrecha relación cuando se usó la técnica de RAPD's; mientras que con la de SSR se separaron, pero se observa una relación entre ellos.

En cuanto a la calidad de aceite expresada en los porcentajes de carvacrol y timol, los contenidos más altos de carvacrol se observaron en los materiales procedentes de los ejidos, Boquilla, San Rafael, 4 de Marzo y San Isidro, municipio Parras de la Fuente.

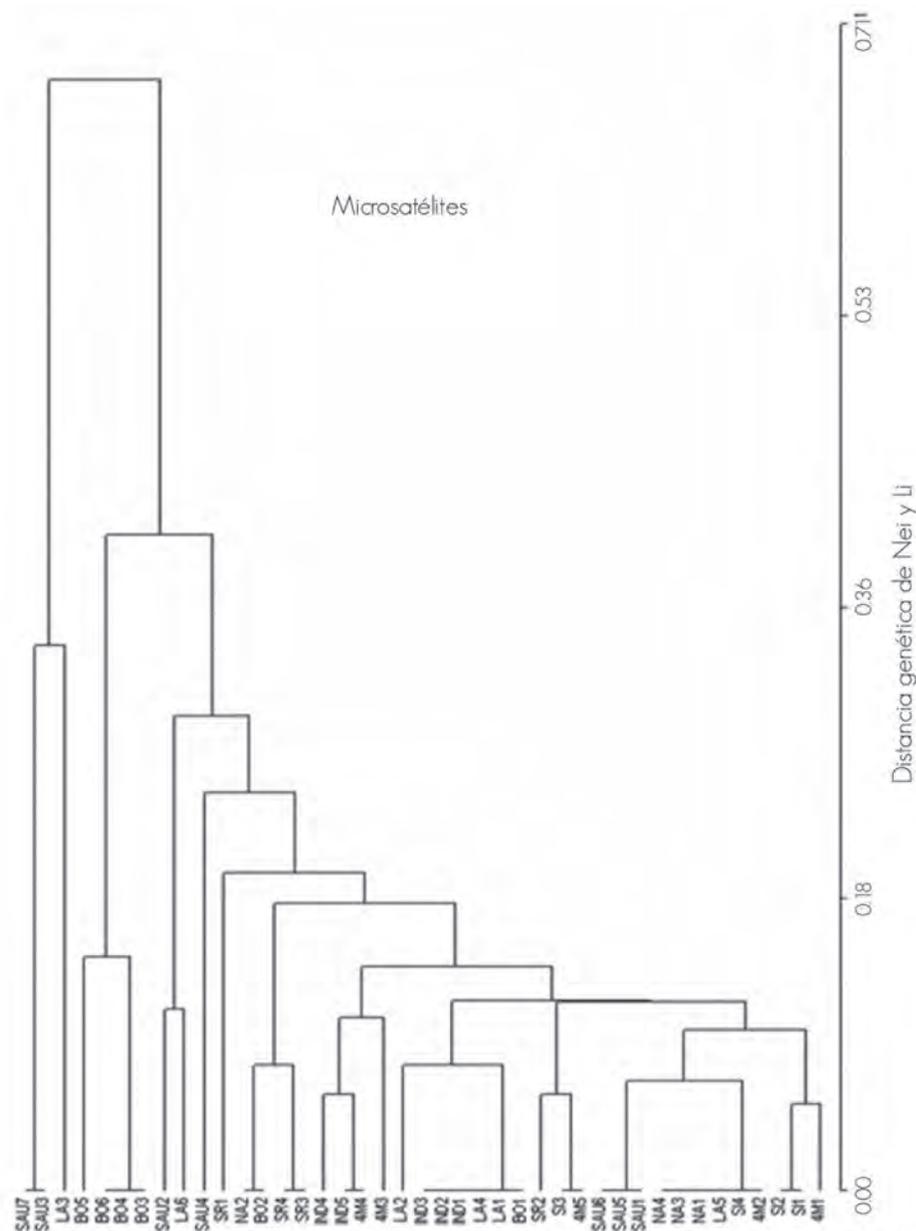


Figura 2. Relaciones genéticas obtenidas mediante la técnica de RAPD's, entre recolectas de orégano de distintas localidades del estado de Coahuila.

Cuadro 2. Producción promedio de aceite, carvacrol y timol de los grupos formados por los genotipos de orégano mediante el dendrograma generado por el análisis de las frecuencias de bandas de ADN por la técnica RAPD's.

Grupo	Materiales	Promedios		
		Aceite mg	Carvacrol %	Timol %
	LA3	0.50	3.42	6.36
	(NA2, LA2)	0.50	4.75	7.30
D	SI2 y SI1	0.50	4.99	8.34
C	(BO4, BO6), (LA1, LA4, LA5, LA6) y (BO1, BO2, BO3 y BO5)	0.55	4.72	14.36
B	IND5, (IND1, IND4), (IND2, IND3) y (SI3, SR2)	0.58	3.36	11.31
A	SI4, (SAU1, SAU2, SAU3, SAU4, SAU5, SAU6, NA1, NA3, NA4, SRI, SR3, SR4, 4M2, 4M3), SAU7 y (4M1, 4M4, 4M5)	0.45	3.24	13.87

() = Materiales que no se pudieron diferenciar entre sí.

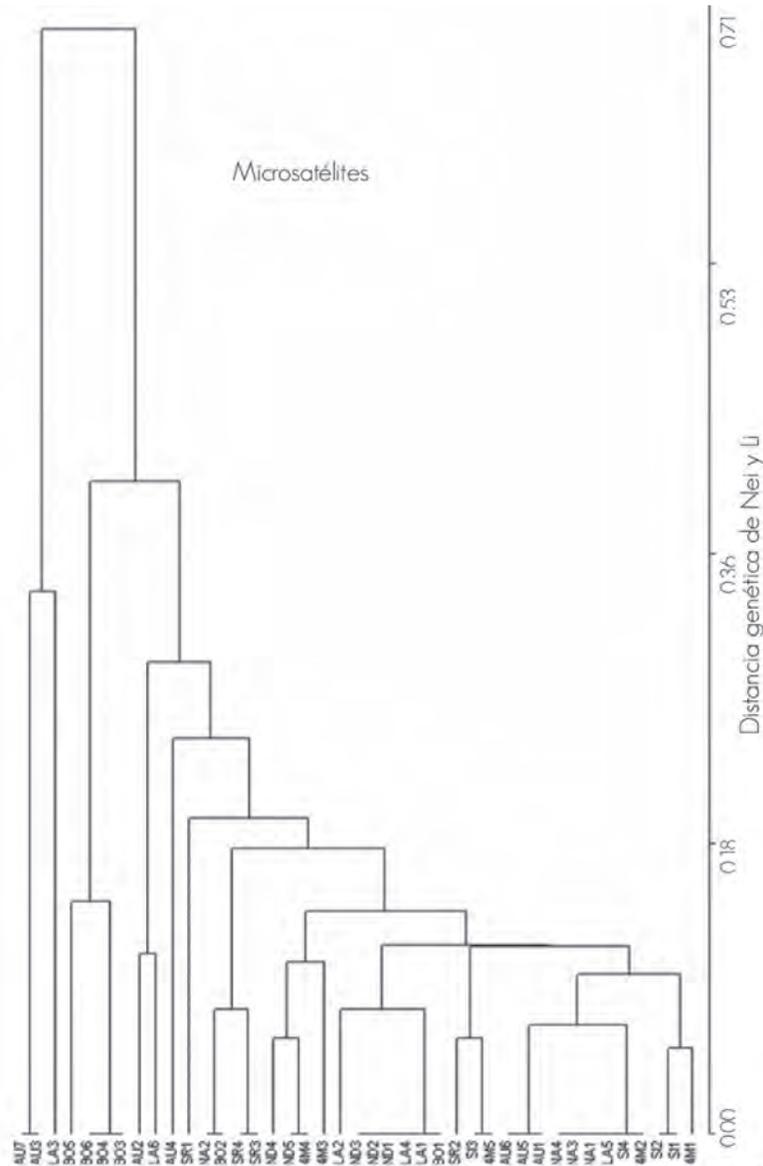


Figura 3. Relaciones genéticas obtenidas mediante la técnica de microsatélites, entre recolectas de orégano de distintas localidades del estado de Coahuila.

Cuadro 3. Producción promedio de aceite, carvacrol y timol de los grupos formados por los materiales de orégano mediante el dendrograma usando las frecuencias de bandas de ADN obtenidas por medio de la técnica microsatélites.

Grupos obtenidos por Microsatélites		Promedios		
Grupo	Materiales	Aceite mg	Carvacrol %	Timol %
J	(SAU3 y SAU7) y LA3	0.43	1.90	8.48
I	BO5 y (BO3, BO4, BO6)	0.60	5.06	8.01
H	SAU2 y LA6	0.50	2.65	18.63
G	SAU4	0.50	5.49	5.10
F	SR1	0.50	6.60	7.79
E	(NA2, y BO2) y (SR3 y SR4)	0.52	3.68	16.03
D	IND4, (IND5 y 4M4) Y 4M3	0.52	3.69	31.34
C	LA2 y (IND1, IND2, IND3, LA1, LA4, BO1)	0.54	4.31	10.54
B	SR2 y (SI3 y 4M5)	0.53	4.33	6.52
A	(SAU1, SAU5 y SAU6), (NA1, NA3, NA4, LA5, SI4, 4M2), (SI2 y SI1) y 4M1	4.20	3.27	11.10

() = Materiales que no se pudieron diferenciar entre sí.

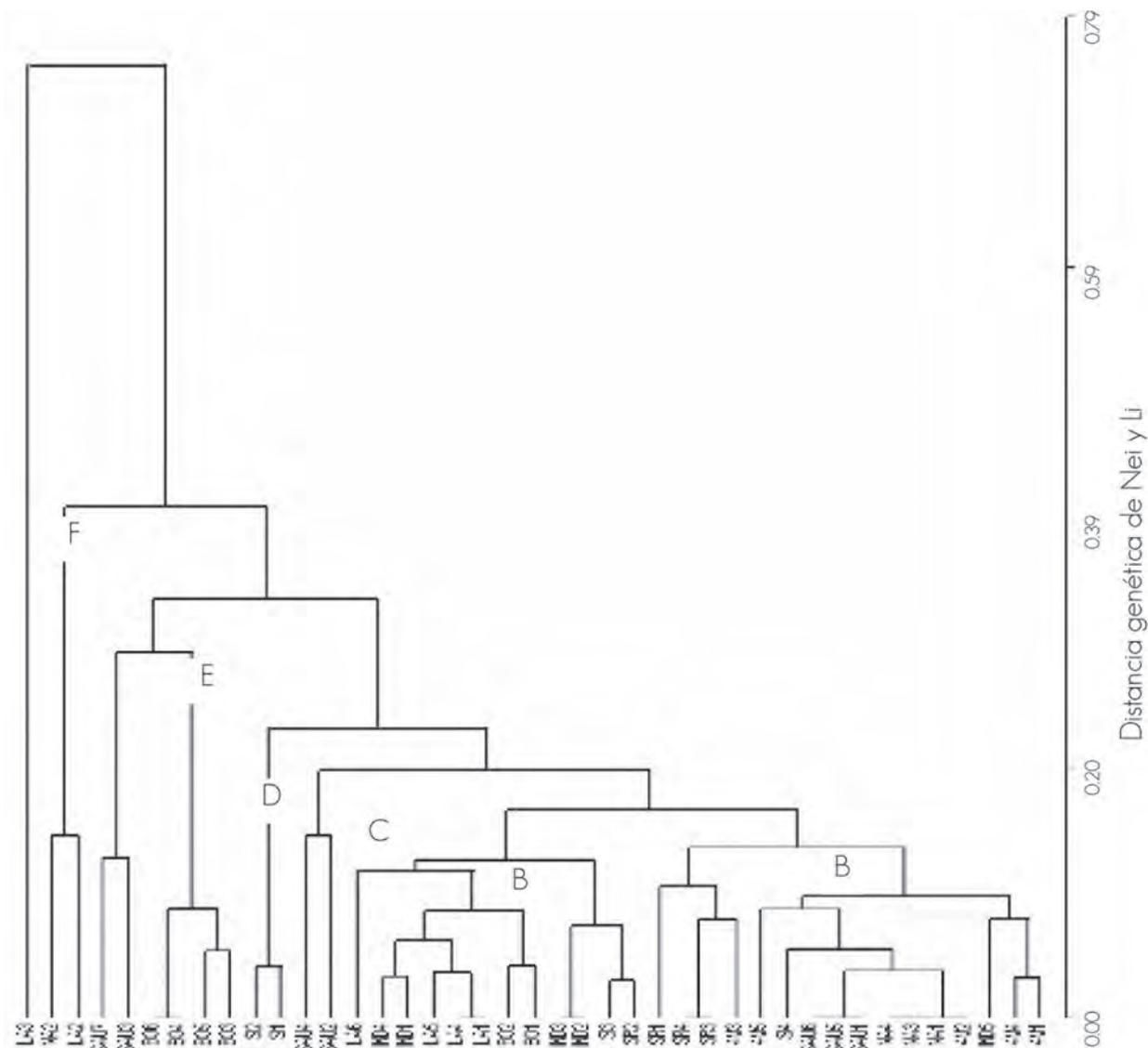


Figura 4. Relaciones genéticas obtenidas mediante la combinación de las técnicas RAPD's y Microsatélites, entre recolectas de orégano de distintas localidades del estado de Coahuila.

Respecto al timol sobresalió el germoplasma de los ejidos 4 de Marzo, San Isidro y Boquilla. En relación a los municipios, resaltaron por sus contenidos de aceite; así como por sus porcentajes de timol y carvacrol las recolectas de Parras de la Fuente.

Análisis genético

El análisis RAPD amplificó 10 marcadores, todos polimórficos (100% de polimorfismo); el análisis SSR amplificó 11 bandas, 10 de ellas polimórficas (91% de polimorfismo). En cuanto al índice de diversidad, este fue de 48 y 47%, respectivamente. Resultados que indican la existencia de diversidad genética en las poblaciones de orégano que se desarrollan en el estado de Coahuila y evidenciaron una estrecha relación entre los materiales evaluados. Así mismo el análisis de varianza (Cuadro 4) indicó la presencia de diversidad genética dentro y entre poblaciones. El análisis de componentes principales (ACP) mostró claras diferencias genéticas a nivel de poblaciones; ya que los municipios se dispersaron en los dos primeros componentes (ACP1 y ACP2) (Figura 4). Aunque, el RAPD presentó el máximo polimorfismo, la técnica de microsatélites diferenció un mayor número de materiales,

pues resultaron más informativos los marcadores SSR; ya que cinco de estos presentaron valores de PIC en un intervalo de 0.265 a 0.363 y con RAPD sólo tres marcadores tuvieron un PIC de 0.330 a 0.397.

DISCUSIÓN

Con respecto a la situación geográfica no hubo agrupación de genotipos, tampoco se observó concordancia del agrupamiento entre los materiales con las dos técnicas utilizadas, lo que coincide con lo citado para papa y cebada (Milbourne *et al.*, 1997; Russell *et al.*, 1997). Así mismo, hay estudios que indican que a mayor polimorfismo entre marcadores (SSR, RAPD y ALFP), existe una correlación más alta entre datos y por lo tanto, la coincidencia en la formación de los grupos es grande (Powell *et al.*, 1996; Pecina *et al.*, 2001). En este trabajo, aunque el polimorfismo es alto (80 y 90), es insuficiente para agrupar a los genotipos de manera similar por las dos técnicas. Es probable que lo anterior responda al bajo número de iniciadores empleados, por lo que es recomendable el empleo de un mayor número de reacciones RAPD y SSR para la discriminación entre genotipos y aumentar la robustez de los resultados.

En la presente investigación sólo se observó consistencia de agrupación para los materiales BO3, BO4, BO5 y BO6 y entre IND3, IND2, IND1, LA4 LA1, BO1 SR2 y SI3, los cuales tienen los valores más altos del contenido de aceite. Pese a que no existe diferencia significativa en la producción de aceites esenciales en los materiales revisados, sí se manifiesta consistencia en los valores obtenidos en dos localidades: el ejido Boquillas del Refugio municipio de Parras de la Fuente y el ejido Independencia, municipio General Cepeda.

La variabilidad genética y su distribución dentro y entre poblaciones vegetales es importante para comprender su origen y evolución en condiciones naturales, determinarla en parientes silvestres es útil para los fitomejoradores y genetistas. En el presente trabajo, la diversidad genética mostrada por la técnica de RAPD y SSR fue muy similar (48 y 47%) y es superior a la de otros cultivos (Powell *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2006).

Cuadro 4. Resultados estadísticos del análisis de varianza conjunta (RAPD y SSR).

F.V.	gl	SC	CM	p-valor
Población	3	20.58	6.86	<0.0001
Dentro	37	91.52	2.47	<0.0001
Total	40	112.10	2.80	

F.V. = Fuente de variación; gl = Grados de libertad; SC = Suma de cuadrados; CM = Cuadrado medio.

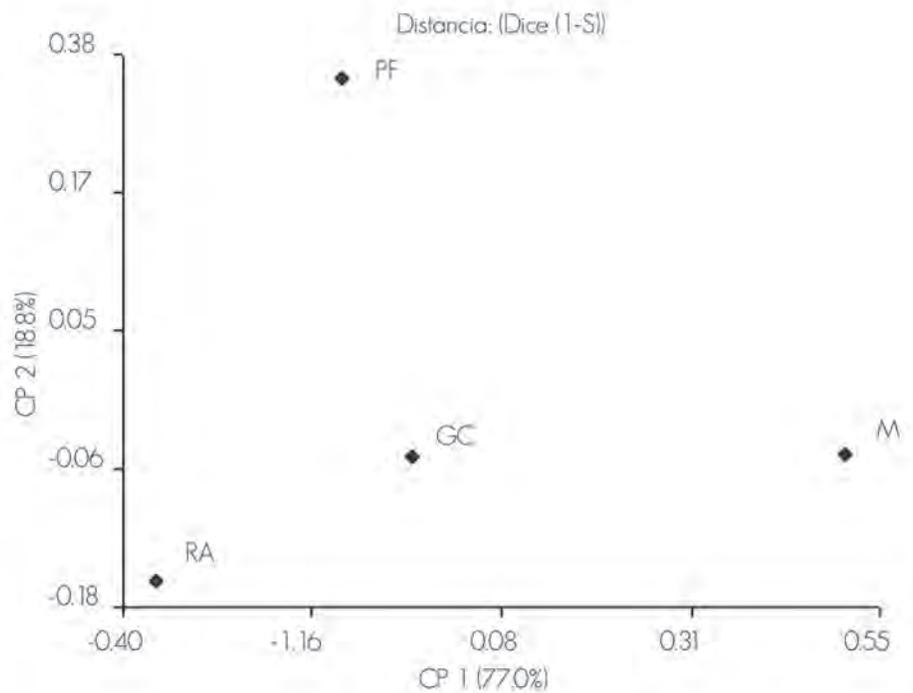


Figura 5. Análisis de componentes principales con datos conjuntos de RAPD y SSR.

Los materiales colectados en la localidad de La Laguna, no producen la mayor cantidad de aceite, pero sí muestran consistencia en los valores obtenidos; cabe señalar que los genotipos de esta localidad son cultivados, a diferencia de los colectados en los otros sitios, que son materiales 100% silvestres, sin ningún tipo de manejo agronómico.

La diferencia en la producción de aceites esenciales; así como, en la concentración de carvacrol y timol, probablemente se asocia a la variabilidad genética del germoplasma evaluado y a los factores abióticos; no obstante que las regiones son geográficamente muy cercanas, los pequeños cambios climáticos (temperatura) afectan la producción de los aceites esenciales, como ocurre en las oleaginosas (Oliva *et al.*, 2006), ya que se reconocieron zonas específicas donde se localizan las plantas con mayor producción de aceites esenciales.

En las poblaciones de orégano estudiadas la variación genética es moderada y concuerda con la diferencia en la producción de aceites esenciales; sin embargo, es más coincidente con la variación en los porcentajes de timol en los materiales analizados. Así mismo pueden considerarse mayores a los resultados de la clasificación taxonómica tradicional, ya que se estableció que todos los materiales de orégano evaluados pertenecen a la especie *L. graveolens* HBK. Además, el nivel de diversidad genética indica que aunque hay sobreexplotación del recurso, existe suficiente variación entre los materiales de orégano procedentes del sureste de Coahuila; ya que los municipios de Matamoros y Parras de la Fuente se dispersaron en los dos primeros componentes principales. Por lo tanto es posible seleccionar individuos con potencial para incrementar la producción de aceites esenciales, sobre todo si se les aplica algún tipo de manejo agronómico.

Las dos técnicas utilizadas diferenciaron a la mayoría de los genotipos incluidos en el estudio y coinciden en algunos aspectos, como establecer que el germoplasma de la localidad La Laguna es el más divergente en relación con los otros sitios de muestreo. Lo anterior se explica por el hecho de que las colectas del municipio de Matamoros son materiales cultivados, en los que ya se realizó una selección y manipulación del germoplasma. La técnica de microsatélites resultó más sensible y permitió observar un mayor número de marcadores SSR, medianamente informativos, en comparación con RAPD, al mostrar valores de entre 0.25 y 0.5 de PIC (Botstein et al., 1980). Con base en la reproducibilidad de los resultados, se recomiendan las condiciones descritas en el presente trabajo para llevar a cabo estudios de caracterización molecular de un número más grande de material genético de orégano, con cualquiera de las dos técnicas, lo cual incidirá en un mejor uso, aprovechamiento y conservación eficiente de este recurso forestal no maderable de gran importancia, sobre todo en zonas áridas y semiáridas del país.

CONCLUSIONES

Los marcadores RAPD y SSR permitieron detectar un alto nivel de polimorfismos en orégano. Sin embargo, no se logró diferenciar el total de las colectas evaluadas y no fue posible agruparlas por su situación geográfica.

La diversidad genética fue moderada (47%) y mayor entre poblaciones. Sin embargo, se establece que existe variabilidad suficiente entre los genotipos de orégano y es posible seleccionar germoplasma con potencial para incrementar la producción de aceites esenciales, sobre todo si a estos materiales se les da algún tipo de manejo agronómico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su reconocimiento al fondo sectorial CONAFOR-CONACYT y a la Fundación Produce Coahuila A. C., por el financiamiento del proyecto CO3-10569 que dio origen al presente trabajo. También agradecen a la Asociación de Productores de Oréganos de México S.P.R. de R.L. por su colaboración y facilidades brindadas en los trabajos de campo. 

REFERENCIAS

- Almeyda L., I. H., M. A. Rocha P., J. Piña R. and J. P. Martínez. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:1-9.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 1990. Official methods of analysis of AOAC international. 15th Ed. AOAC International. Arlington, VA, USA. pp. 920.39; 920.62; 920.67; 923.03; 925.10; 962.09.
- Ashkenazi, V., E. Chant, U. Lavi, D. Levy, J. Hillel and R. E. Veilleux. 2000. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analysis. *Genome* 44:50-62.
- Balzarini, M. y Di Rienzo, J. A. (2004). Info-Gen. Software estadístico para análisis de datos genéticos. Arg. <http://www.info-gen.com.ar>
- Botstein, D., R. L. White, H. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32:314-331.
- Dagne, E. 2001. Essential Oil Database. African Laboratory for Natural Products (ALNAP) Garden, Addis Ababa. Ethiopia. <http://www.ictrieste.it/essentialoils>. (10 de marzo 2006).
- Gaby, R. A., J. Wright and F. Batz. 2003. Orégano/ Marjoram Wild. <http://www.pccnaturalmarkets.com/health/2140005> (16 de Julio de 2007).
- Ghislain, M., F. Rodríguez, F. Villamón, J. Núñez, R. Waugh and M. Bonierbale. 2000. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. CIP Program Report 1999-2000. Lima, Perú. pp. 167-174.
- Gil L., H. R., V. Pecina Q., M. Maldonado N., S. J. Hernández D. y N. Mayek P. 2006. Caracterización morfoagronómica y genética de germoplasma mejorado de soya. *Agricultura Técnica en México* 32 (3):281-294.
- Hernández V., S., A. González R., P. Sánchez P., A. Casas y K. Oyama. 2006. Estructura y Diferenciación genética de Poblaciones Silvestres y Domesticadas de Chile del Noroeste de México Analizadas con Isoenzimas y RAPD's. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29:25-29.
- Huerta, C. 2002. Orégano Mexicano. Oro Vegetal. *Revista BIODIVERSITAS* 15:30-38.
- Huerta, C. 2005. "Orégano mexicano oro vegetal". <http://www.maph49.galeon.com/biodiv2/oregano.html> (15 de agosto de 2005).
- INFOAGRO 2006. "El cultivo de orégano". <http://www.infoagro.com/aromaticas/oreganin.asp> (23 de mayo de 2006).
- Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal (INAFED). 2005. Instituto Nacional para el federalismo y desarrollo municipal del gobierno del estado de Coahuila. <http://www.local.gob.mx/work/templates/enciclo/coahuila/index.html> (21 de agosto 2007).
- Licón, P. 2003. Orégano mexicano. <http://www.agrodonpablo.com> (5 de marzo de 2007).
- Litt, M. and J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetic*. 44: 397-401.
- Loxdale, H. D., I. J. Tarr, C. P. Weber, C. P. Brookes, G. N. Digby P. and P. Castanera. 1985. Electrophoretic study of enzymes from cereal aphid populations. III. Spatial and temporal genetic variation of populations of *Sitobion avenae* (F.) (Hemiptera: Aphididae) *Bulletin of Entomological Research* 75: 121-141.
- Loxdale, H. D., and G. Lushai. 1998. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88: 577-600.
- Martínez R. A., R. Ocampo V., L. Hernández S. y S. Mendoza D. 2003. Determinación de compuestos fenólicos de *Lippia graveolens*, colectada en los estados de Querétaro, Puebla y Guanajuato. UAQ, Querétaro, México. <http://www.uaq.mx/investigación/difusión/veranos/memorias> (28 Noviembre 2006).
- Milbourne, D., R. Meyer, J. E. Bradshaw, E. Baird, N. Bonar, J. Provan, W. Powell and R. Waugh. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding* 3:127-136.
- Nei, M. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America* 76:5269-5273.
- Oliva, M. L., J. G. Shannon, D. A. Seper, M. R. Eilersieck, A. J. Cardinal, R. L. Paris and J. D. Lee. 2006. Stability of fatty acid profile in Soybean genotypes with modified seed oil composition. *Crop Science* 46:2069-2075.
- Pecina Q., V., O. Martínez de la V., M. Alvarado B., G. J. Vandemark y H. Willmas A. 2001. Comparación de dos sistemas de marcadores moleculares en el análisis de las relaciones genéticas de *Macrophomina* (Tassi) Goid. *Revista de Fitopatología Mexicana* 19:128-139.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparisons of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-238.
- Richardson, B. J., P. R. Baverstock and M. Adams. 1986. Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies. Academic Press. London, UK. 235 p.

- Russell, J. R., J. D. Fuller, M. Macaulay, B. G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 714-722.
- Statistical Analysis System Institute. (SAS) 1990. *SAS/STAT User's guide*. Versión 6. 4th. Edition. Cary, NC. USA. 378 p.
- Steiner W., W. M. and D. J. Joslyn. 1979. Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitoes. *Mosquito News* 39: 35-54.
- Vilavicencio G., E. E., O. U. Martínez B. y A. Cano P. 2007. Orégano recurso con alto potencial. *Rev. Ciencia y Desarrollo*. Septiembre Vol. 33(211) 60-66.