

Artículo Original / Original Article

Identificación genética del orégano de Putre (*Origanum vulgare* L.) mediante ITS y microsatélites, una especie reconocida en Chile con Sello de Origen

[Genetic identification of the Putre's oregano (*Origanum vulgare* L.) by ITS and microsatellites, a species recognized in Chile with Seal of Origin]

Roberto Contreras¹, Isabel Calle², Rómulo Oses¹, Fernanda Aguayo¹, Vincenzo Porcile¹ y Mariana Arias¹

¹Centro Regional de Investigación y Desarrollo Sustentable de Atacama (CRIDESAT), Universidad de Atacama, Copiapó, Chile

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Oficina INIA Ururi, Arica, Chile

Reviewed by:

Pablo Lacoste
Universidad de Santiago de Chile
Chile

Luisauris Jaimes
Universidad de Santiago de Chile
Chile

Correspondence:
Roberto CONTRERAS
roberto.contreras@uda.cl

Section **Genetic resources**

Received: 24 January 2020
Accepted: 30 April 2020
Accepted corrected: 20 May 2020
Published: 30 March 2021

Citation:

Contreras R, Calle I, Oses R, Aguayo F, Porcile V, Arias M. Identificación genética del orégano de Putre (*Origanum vulgare* L.) mediante ITS y microsatélites, una especie reconocida en Chile con Sello de Origen

Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat
20 (2): 177 - 194 (2021).
<https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.2.14>

Abstract: Putre's oregano (*Origanum vulgare* L.) is a variety of oregano that grown in the Arica-Parinacota Region. Its organoleptic attributes and unique production conditions have earned it a certification with Geographical Indication (GI). However, the demands of the markets require a scientific-technological support for identification and authentication of materials. In this context, was proposed to identify Putre's oregano by phylogenetic relationships based on the use of molecular markers SSR and "DNA Barcode". The results showed that when comparing materials from different sources of Putre's oregano versus information from certified germplasms and GenBank sequences, added to the analysis with nuclear genetic markers, Putre's oregano corresponds to the species *Origanum vulgare* L. subsp virens. This precise identification will support the correct differentiation and authentication of this genotype, serving in addition to supporting the GI.

Keywords: DNA Barcode; Oregano; *Origanum vulgare* L.; SSR; Phylogenetic relationships.

Resumen: El orégano de Putre (*Origanum vulgare* L.) es una variedad de orégano que se cultiva en la Región de Arica y Parinacota. Sus atributos organolépticos y condiciones únicas de producción lo han hecho acreedor de una certificación con Indicación Geográfica (IG). Sin embargo, las exigencias de los mercados requieren de un respaldo científico-tecnológico de identificación y autenticación de materiales. En este contexto, se propuso identificar el orégano de Putre mediante relaciones filogenéticas a partir del uso de marcadores moleculares SSR y "DNA Barcode". Los resultados demostraron que al comparar los materiales de distintas procedencias de orégano de Putre versus la información desde germoplasmas certificados y secuencias de GenBank, sumado al análisis con marcadores genéticos nucleares, el orégano de Putre corresponde a la especie *Origanum vulgare* L. subsp virens. Esta identificación precisa dará soporte a la correcta diferenciación y autenticación de este genotipo, sirviendo además de apoyo a la IG.

Palabras clave: Código de barras de ADN; Orégano; *Origanum vulgare* L.; SSR; Relaciones filogenéticas.

INTRODUCCIÓN

El género *Origanum*, es un miembro de la familia Lamiaceae, que comprende 43 especies y 18 híbridos, muchos de estos crecen en forma silvestre en el Mediterráneo, Europa, Asia, África y América (Ietswaart, 1980; Ince et al., 2014; Marrelli et al., 2018). De la revisión taxonómica de Ietswaart (1980) el género *Origanum* se puede dividir en 3 grupos, 10 secciones, 38 especies, 6 subespecies y 17 híbridos (Skoula & Harborne, 2002). Entre las especies del género *Origanum*, existen dos tipos principales, el orégano (*Origanum onites* L. y *Origanum vulgare* L.) y marjorama (*Origanum marjorana* L.) (Lukas et al., 2013).

El orégano *O. vulgare*, es una hierba perenne, aromática, que crece en lugares asoleados, con suelos relativamente secos y pobre en nutrientes (Helsen et al., 2013). Es una de las especies de uso culinario y medicinal más importantes en el comercio mundial, formando parte de productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos. El aceite esencial posee propiedades anti-bacterianas, anti-fúngicas, nematocidas y antioxidante entre otras (Kintzios, 2002; Katsiotis et al., 2009; Leyva-López et al., 2017). Varias de las actividades biológicas atribuidas al orégano se deben a la composición de los aceites esenciales donde se destacan principales el carvacrol y/o timol, seguido por γ -terpineno, *p*-cimeno, linalol y terpinen-4-ol e hidrato de sabineno (Skoula y Harborne, 2002).

El género *Origanum* posee una alta diversidad inter e intra-específica lo cual implica un alto polimorfismo fitoquímico y morfológico, con varios quimiotipos con marcada segregación en ambientes naturales lo cual hace difícil establecer su taxonomía (Radušiene et al., 2005; Lukas et al., 2013; Ince et al., 2014). Así, las diferencias en cantidad y calidad en las composiciones de los aceites esenciales pueden variar dependiendo del origen geográfico, así como de las condiciones ambientales (gradientes latitudinales y altitudinales) generando una brecha de conocimiento y dificultando su identificación (Chalchat y Pasquier, 1999; Giuliani et al., 2013). En términos generales, el orégano es una especie rica en compuestos naturales bioactivos que ha recibido una renovada atención como recurso genético por sus usos potenciales variados, sin embargo, es necesario como paso fundamental una adecuada identificación de los materiales.

En Latinoamérica, los estudios sobre la especie *Oreganum vulgare*, abarcan tópicos variados, sin embargo, son escasos aquellos trabajos dirigidos a resolver problemas taxonómicos o de autenticación y

se centran en la exploración de potenciales aplicaciones. En Argentina, se pueden mencionar estudios sobre descriptores morfológicos, de calidad y rendimiento en clones de distintas procedencias (Farias et al., 2010), caracterización de la composición química y actividad biológica de aceites esenciales (Asensio et al., 2015) y patrones de polifenoles (González et al., 2017). En Perú, cabe mencionar estudios que incluyen colecta, análisis, evaluación de propiedades etno-farmacológicas de plantas medicinales y su protección como recurso asociado a pueblos originarios (Rehecho et al., 2011), la composición química del aceite esencial (Tellez-Monzon et al., 2017) y la incorporación de aceites esenciales en la dieta sobre la promoción del crecimiento de animales (Apaéstegui-Livaque et al., 2018). En Brazil, se pueden señalar los trabajos de Santoro et al. (2007) que reportaron el efecto del aceite esencial sobre la inhibición del crecimiento de *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas), Leite et al. (2009) estudiaron el efecto larvicida, Cleff et al. (2010) actividad biológica antifúngico y aplicaciones veterinarias (Waller et al., 2016). En México, se destaca el estudio de los efectos de aceites esenciales desde materiales locales y su actividad biológica de tipo antimicrobiana y antiparasitaria (Adame-Gallegos et al., 2016). Murillo-Amador et al. (2015) estudiaron el efecto de sistemas agronómicos de producción y la fertilización orgánica sobre rendimiento, fisiología y morfología de plantas de orégano, la composición química de extractos (Bañuelos-Valenzuela et al., 2018) y efecto insecticida (Vite-Vallejo et al., 2018).

En Chile, de acuerdo a la encuesta de Superficie Hortícola 2018, realizada por el Instituto Nacional de Estadísticas (INE) en la Región de Arica y Parinacota, la superficie cultivada de orégano fue de 39.0 ha, lo que representa el 10 % de la superficie total de este cultivo en el país (378.4 ha) (ODEPA, 2018). En la región, el orégano *O. vulgare*, se cultiva en la Comuna de Putre, principalmente en las localidades de Socoroma, Murruntani, Chapiquiña, Belén, Lupica, Saxámar y Ticnámbar, ubicándose en la precordillera del norte de Chile entre los 3000 y 3500 msnm (Goykovic, 1995). Estudios de mercado según ENEXPRO (2017), indican que para el año 2016, las exportaciones de orégano totalizaron US \$1.6 millones, llegando a 18 mercados, siendo Alemania el mayor comprador con un 32% de las exportaciones.

En el procesamiento de la planta, la parte área es cortada y deshidratada en condiciones naturales. Su sabor y textura, así como su intenso

aroma, son resultados del proceso de adaptación en la zona de precordillerana durante siglos (INAPI, 2020). Estas particularidades organolépticas son las que constituyen las características diferenciadoras del orégano de Putre con respecto de otras variedades cultivadas en Chile, por esta razón, el Sello de Origen del Instituto Nacional de Protección Industrial (INAPI, 2020) a partir de la solicitud de los agricultores de la Comuna de Putre, le concedió Indicación Geográfica (IG). Sin embargo, si bien esta especie fue introducida por los españoles en la época colonial (INAPI, 2020), aún no hay certeza de cuál es la especie, subespecie o variedad que corresponde.

La mayoría de los estudios sobre sistemática, diversidad genética e identificación de especies del género *Origanum* han utilizado características morfológicas, la composición de aceites esenciales y se han centrado en las especies de *O. vulgare* y sus subespecies (Lukas et al., 2013). Sin embargo, en las últimas décadas, el uso de marcadores moleculares tales como AFLP, RAPD, SAMPL, ISSR, CAPS, SRAP y SSR (Azizi et al., 2009; Jia et al., 2017; Salgado et al., 2017; Contreras et al., 2017; Jo et al., 2018; Contreras et al., 2018a; Contreras et al., 2018b; Contreras et al., 2019a), así como las secuencias de ADN_r, han sido usados en la detección de polimorfismos del ADN entre/inter-poblaciones e identificación de relaciones filogenéticas entre especies/clones de individuos.

En un enfoque clásico, la identificación botánica de especies y subespecies del género *Origanum* se ha basado en sus características morfológicas y químicas, en este último aspecto, varios estudios quimiosistemáticos, han encontrado múltiples quimiotipos, respecto al análisis de los perfiles químicos de los aceites esenciales (Ince et al., 2014). Sin embargo, en muchos casos, la composición de los aceites esenciales de orégano, está influenciada por efectos ambientales debido a la plasticidad fenotípica (Elezi et al., 2013). En este sentido, el descubrimiento de los marcadores moleculares, ha proporcionado relevantes y diversas aplicaciones en biotecnología vegetal, considerando además que no son afectados por el medio ambiente y generalmente carecen de pleiotropía y efectos epistáticos; en este contexto, los microsatélites SSR (simple sequence repeat) han sido utilizados en estudios de caracterización y diversidad genética, entre otras (Ranabhatt y Kapor, 2018). Otro método para el análisis de marcadores de ADN es “el código de barras de ADN” (DNA Barcode, en inglés), es un procedimiento estandarizado que utiliza secuencias de ADN universales como herramienta óptima para

monitorear biodiversidad y realizar estudios de filogenia y evolución de especies de plantas (Pei et al., 2017). El espaciador transcrito interno (ITS, en inglés) del ADN ribosómico es uno de los marcadores de ADN más utilizados para el análisis de código de barras de ADN y análisis filogenético de plantas, estando separado este en regiones ITS1 e ITS2 (Cheng et al., 2015). De estas dos regiones, el espaciador ITS1 es el que presenta mayor eficiencia que ITS2 en especies eucariotas (Wang et al., 2014). Hasta la fecha, no hay registro de ningún estudio genético que identifique la variedad de orégano de Putre a la cual le fue otorgada IG, inclusive a nivel sudamericano hay pocos estudios de identificación molecular de oréganos introducidos por colonos europeos.

El propósito de este estudio es identificar el orégano de Putre mediante relaciones filogenéticas a partir del uso de marcadores moleculares SSR y “DNA Barcode”. Creemos que el análisis de filogenia nos permitirá, por un lado, sentar las bases para la identificación molecular de la variedad producida en la Comuna de Putre de Chile por primera vez, discutir acerca de un posible origen biogeográfico de la misma y, por otro lado, sentar las bases para futuros protocolos de autenticación de materiales provenientes de esta zona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se tomaron muestras de hojas de *O. vulgare* de diez individuos provenientes de tres localidades de la Comuna de Putre (Región de Arica-Parinacota). Las localidades muestreadas fueron Murmuntani (MUR) (18°21'08.5"S 69°33'50.1"W), Socoroma (SOC) (18°15'55.1"S 69°35'51.2"W) y Zapahuira (ZAP) (18°20'01.8"S 69°35'41.0"W). Por otro lado, como individuo control procedente de una localidad distinta de Putre, se colectó una muestra de orégano en la localidad de Melipilla (33°46'13.8"S 71°10'29.4"W). Para cada individuo, se recogieron cincuenta gramos de hojas jóvenes en la temporada marzo de 2016, y se transportaron en bolsas de polietileno a 4°C, para posteriormente almacenar a -80°C. Para realizar las comparaciones y fortalecer los análisis del estudio, se solicitaron al banco de germoplasma IPK Gatersleben (Alemania) siete muestras de semillas de *O. vulgare*, de distintos países de origen. Los códigos de estas semillas son: ORI-12 (Georgia), ORI-20 (Federación de Rusia), ORI-23 (Alemania), ORI-29 (Italia), ORI-45 (República Checa), ORI-5 (desconocido) y ORI-6 (Hungría). Las semillas de IPK Gatersleben fueron importadas desde Alemania hasta Chile con la debida

autorización del "Servicio Agrícola Ganadero" (SAG). Las semillas se germinaron en medio sólido MS y se mantuvieron a 22°C con fotoperíodo de 14

h; cuando las plántulas crecieron hasta una altura de 6 cm, se cortó el tejido para su extracción de ADN.

Tabla N° 1

País de origen, localidad, nomenclatura y especie/subespecie de las muestras usadas en este estudio

País de origen	Localidad	n	Nomenclatura	Especie/Subespecie	Referencia
Chile	Murmuntani	3	ORPU1-ORPU3	<i>O. vulgare</i> L. (subsp desconocida)	Propia
Chile	Socoroma	3	ORPU4-ORPU6	<i>O. vulgare</i> L. (subsp desconocida)	Propia
Chile	Zapahuira	4	ORPU7-ORPU10	<i>O. vulgare</i> L. (subsp desconocida)	Propia
Chile	Melipilla	1	MP1	<i>O. vulgare</i> L.	Propia
Georgia	-	1	ORI12	<i>O. vulgare</i> L.	IPK-Gatersleben
Federación Rusia	-	1	ORI20	<i>O. vulgare</i> L. subsp. vulgare	IPK-Gatersleben
Alemania	-	1	ORI23	<i>O. vulgare</i> L. subsp. vulgare	IPK-Gatersleben
Italia	-	1	ORI29	<i>O. vulgare</i> L. subsp. viride Hayek	IPK-Gatersleben
República Checa	-	1	ORI45	<i>O. vulgare</i> L.	IPK-Gatersleben
Desconocida	-	1	ORI5	<i>O. vulgare</i> L. subsp. virens Letsw	IPK-Gatersleben
Hungría	-	1	ORI6	<i>O. vulgare</i> L.	IPK-Gatersleben

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con un método CTAB modificado descrito por Contreras *et al.* (2019b). Brevemente, el material vegetal fue lavado para eliminar agentes contaminantes, luego fue homogenizado con nitrógeno líquido. Aproximadamente 0.4-0.6 g de material vegetal homogenizado, fue mezclado con 850 µL de CTAB 2X (100 mM Tris-HCl pH 8; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB) y 3% PVP-40, precalentado a 65°C por 15 min y 6 µL de β-mercaptoetanol. Se agitó en vortex (Scilogex, Connecticut, USA) durante 8 s a máxima velocidad y luego se incubó en baño térmico por 1 h a 65°C, invirtiendo los tubos cada 20 min, se centrifugó en centrifuga Universal 320 (Andreas Hettich, Tuttlingen, Alemania) a 14000 rpm por 10 min a 4°C. La fase acuosa (700 µL aprox.) se transfirió a un tubo nuevo y se mezcló con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se invirtieron los tubos por 2 min y se centrifugó en centrifuga Universal 320 (Andreas Hettich, Tuttlingen, Alemania) a 14000 rpm por 10 min a 4°C. La fase acuosa (500 µL aprox.) se transfirió a un tubo nuevo, se añadió 5 µL de RNAsa 10 mg/mL (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) y se incubó 10 min a 55°C. Se agregó un volumen de 2/3 de isopropanol se invirtió 30 veces. Se transfirió el contenido a una columna. El pellet fue resuspendido en 40 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 7,8; 1

mM EDTA) y se colocó a 4°C por toda la noche. La calidad y la concentración total de ADN fueron verificadas por el espectrofotómetro de microvolumen Colibri (Titertek Berthold, Alemania) a 260, 280 y 230 nm. La integridad del ADN genómico se verificó en un gel de agarosa al 0,7%.

Secuenciación ITS

Se utilizó el espaciador intergénico ITS1 para la amplificación de productos PCR y su posterior secuenciación de ADN de distintas muestras de orégano. La pareja de cebadores ITS utilizadas son ITS1-18sf 5'-CAAGGTTTCCGTAGGTGAACC-3' e ITS1-5.8sr 5'-TCGCATTTTGCTGCGTTC-3', descritas por Besnard *et al.* (2009). La mezcla de PCR se realizó en un total de 20 µL a partir de: 10 µL de Master Mix SapphireAmp 2X de Takara (Clontech), 1.5 µL de cada cebador (a 5 µM), 6 µL de ADN genómico (5 ng/µL) y 1 µL de agua libre de nucleasas. Las reacciones (PCR) se colocaron en un termociclador Swift Max Pro (ESCO) usando las siguientes condiciones: paso inicial 94°C durante 2 min, luego 36 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, anillamiento a 58°C por 30 segundos, y polimerización a 72°C durante 45 segundos, también una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1% (p/v), corrido en tampón TBE (100 V durante 40 min) y se

visualizaron al teñirse con GelRed™ 10.000X (10 µL/100 mL de TBE). Luego los geles se purificaron con el kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up” (Promega). Los productos de PCR purificados se analizaron en un secuenciador ABI 3730xl (Applied Biosystems Inc.) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Para la secuenciación de los productos purificados se usó el servicio Genscan de Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) usando la pareja de cebadores antes indicados.

Amplificación de microsatélites (SSR)

Para la amplificación de los marcadores microsatélites (SSR) se utilizaron parejas de cebadores detallados en la Tabla N° 2, descritos por Novak et al. (2008). Se prepararon reacciones de PCR con cada pareja de cebador SSR a un volumen total de 20 µL como se describe a continuación: 10 µL de Master Mix SapphireAmp Fast PCR 2X

(Takara-Clontech), 4 µL de ADN genómico (5 ng µL⁻¹), 1 µL de cada cebador forward y reverse (a 5 µM), y 4 µL de agua libre de nucleasas. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Labnet MultiGene OptiMax con las siguientes condiciones: un paso inicial de 5 minutos a 95°C, 32 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C y 2 minutos a 72°C, seguido por un paso de extensión final de 7 minutos a 72°C. Para la detección de los alelos (por electroforesis capilar), la reacción de PCR fue preparada con un cebador forward al cual se marcó con un fluoróforo 5'-FAM ó 5' HEX, el cual permitió detectar el producto de PCR con un analizador genético ABI3730XL (Applied Biosystems). El tamaño de los alelos se observaron y registraron mediante el software Peak Scanner (Applied Biosystems, versión 1.0) y para comprobar su tamaño se utilizó un marcador estándar Gene Scan™ 400 HD™ Rox (Applied Biosystems).

Tabla N° 2
Description of microsatellite primers used in *Origanum vulgare* individuals

Locus *	Secuencia ADN (5' – 3') y fluoróforo (FAM, HEX)	Motivo
OR09	F: 5'-FAM-TTGAAGCATTGTTGGAGGTAGATG-3' R: 5'-TCCCAACTAGGGAGAAATGTGC-3'	(TTTTTC) ₄ (T) ₅ (TTTTTC) ₁
OR10	F:5'-HEX-TTTGCTCCGACATCTTCAACC-3' R:5'-AGCCTGCTGTGTTTGATCAG-3'	(ACC) ₂ ATC(ACC) ₄
OR12	F:5'-FAM-GCCCCTGCAGTGACTCCTAC-3' R:5'-AAAAAGGCTTCGGACTCGATC-3'	(AG) ₇ G(AG) ₃
OR13	F: 5'-FAM-GAGAGAATCCAAGCCTCCGC-3' R: 5'-TGAAGGAGTCCGATGTTGACG-3'	(AAC) ₇ AGC(AAC) ₁
OR14	F: 5'-HEX-TGTTTGGTGAAACCGATCC-3' R: 5'-AGACGACGAGCTCCAATAACG-3'	(GAT) ₈
OR27	F:5'-FAM-TCAGAAACAATGAAGCCGC-3' R: 5'-CCGTACAGGTCAAACCCGG-3'	(CCT) ₆
OR75	F:5'-HEX-CAAGAAGAATAACGGAGGAGCAG-3' R:5'-TGGAGAATTTCTGATGCTCGG-3'	(GCA) ₆
OR77	F:5'-HEX-TGAAGTCAGTTTGATGATGGTG-3' R:5'-GTCACGTATGGAATGCACGG-3'	(GGT) ₆

(*) Novak et al. (2008)

Análisis estadísticos

Las secuencias “Forward” y “Reverse” se editaron con el software Chromas Pro v1 (Technelysium Pty, Ltd) y se ensamblaron utilizando DNA Baser

Sequence Assembler v4.10 (Biosoft 2012). Con este programa se utilizaron ajustes y análisis automáticos para la edición de “contig” con parámetros predeterminados. Se buscaron y descargaron

secuencias ITS de “GenBank” que coincidieron con las secuencias ITS obtenidas de este trabajo. En total desde la web se descargaron 19 secuencias de distintas especies del género *Origanum* que mostraron mayor puntaje en GenBank (BLASTn, con los parámetros predeterminados de NCBI). Las secuencias se alinearon utilizando el software MEGA 6 (Tamura et al., 2013) y posteriormente se usaron para realizar los análisis filogenéticos.

Para evaluar la filogenia se utilizó el método de máxima verosimilitud (MV) e inferencia bayesiana (IB). El análisis de MV fue inferido basado en el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) utilizando el software MEGA6 (Tamura et al., 2013) y para la confiabilidad del soporte de los análisis se utilizó 1000 réplicas de bootstrap (BS). El análisis de inferencia filogenética bayesiana se llevó a cabo con MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012). Se utilizó el programa MrModeltest 2.3 (Nylander, 2008) para explorar el mejor modelo de evolución que se ajusta a los datos de las secuencias de ADN, basado en “Akaike Information Criterion (AIC)”. Una prueba de razón de probabilidad jerárquica implementada con el programa MrModeltest y AIC sugirió que el modelo que mejor se ajusta a los datos es “K80 + I”. Se efectuaron dos análisis independientes de Cadenas de Monte Carlo Markov (CMCM) que consta cada una de 2.000.000 generaciones, obtenidos con una desviación promedio de frecuencias inferior a 0,001. Los árboles se muestrearon con una frecuencia cada 100 generaciones, y el 25% de los primeros árboles se desecharon como “burn-in”. Se utilizó el programa TRACER v. 1.5 (Rambaut y Drummond, 2007) para verificar la estabilidad de la probabilidad general y la convergencia entre generaciones de los análisis ejecutados con Mr Bayes. La fiabilidad de los clados en el análisis bayesiano se evaluó por medio de la probabilidad posterior (PP). Los valores de PP bajo 0,8 se consideraron de bajo soporte; entre 0,8 y 0,89 se consideraron como moderado; y los valores de PP superiores a 0,9 como alto soporte. En el análisis, los valores de bootstrap (BS) para los nodos internos se estimaron con 100 réplicas, siendo confiables los valores mayores a 70. Finalmente, todos los árboles se editaron con el programa FigTree (Rambaut, 2012).

Se realizaron análisis de relaciones genéticas de 17 muestras de *Origanum vulgare* basándose en distancias genéticas de Nei (1973), el cual se obtuvo a partir de la información de ocho marcadores SSR. Se construyeron dos dendrogramas empleando los métodos de agrupamiento UPGMA y Neighbour-Joining (NJ). Para ello se emplearon los programas

SEQBOOT, GENDIST, NEIGHBOR y CONSENSUS todos pertenecientes al paquete de programas PHYLIP versión 3.6 (Felsenstein, 1989). En todos los casos se llevó a cabo un análisis de “bootstrap” con 1000 réplicas, para determinar el grado de soporte estadístico de los agrupamientos. Se considera generalmente que un grupo está apoyado de forma concluyente cuando el valor de “bootstrap” es mayor a 70, lo que generalmente corresponden a una probabilidad del 95% de consistencia del agrupamiento (Hillis y Bull, 1993). Los dendrogramas fueron editados usando el programa FigTree 1.4.0 (Rambaut, 2012).

RESULTADOS

En este estudio, diez muestras de orégano de la Comuna de Putre, siete genotipos de orégano de un banco de germoplasma y varios accesos de secuencias descargadas de GenBank se utilizaron para realizar relaciones filogenéticas a partir de secuencias ITS y análisis de clusters con marcadores co-dominantes microsatélites. La longitud de la región ITS1 obtenida de las muestras de orégano de Putre y los genotipos de IPK Gatersleben fue de 278 pb (Figura N° 1). Las relaciones filogenéticas de diferentes especies de *Origanum* fueron inferidos con el método de agrupamiento UPGMA, el cual fue calculado con el método de máxima verosimilitud (Figura N° 2). Este análisis filogenético mostró tres principales grupos. Un grupo 1 formado con un moderado soporte (BP=57), el cual se subdividió en dos subgrupos, uno con moderado soporte (BP=54) el cual agrupó 10 muestras de Putre, dos accesos de *O. vulgare* subsp virens, una muestra ORI5 (*O. vulgare* subesp virens) y un acceso *O. vulgare* cuya subespecie no está descrita y, por otro lado, se formó otro subgrupo con bajo soporte (BP=43) que contiene la muestra ORI29 (*O. vulgare* subesp viride), la muestra de Melipilla (MP1) y un acceso *O. vulgare* sin describir su subespecie. El grupo 2 agrupó con bajo soporte (BP=22) las especies *O. onites*, *O. elongatum*, *O. grosii* y *O. compactum*. El grupo 3 agrupó con moderado soporte (BP=54) muestras de *O. vulgare*, formando un subgrupo ORI45 y ORI23 con alto soporte (BP=89) y otro subgrupo con bajo soporte (BP=40) en el cual se encuentran los accesos JQ669127.1 y DQ667243.1, y las muestras ORI20, ORI6 y ORI12. Un análisis de Inferencia Bayesiana (IB) de secuencias ITS produjo un árbol filogenético (Figura N° 3) donde se observan dos principales grupos conformados con buen soporte (BP=86 y PP=0.99). Similar a los resultados de la Figura N° 1, un grupo formado por todas las muestras de Putre,

accesos de *O. vulgare* subsp *virens*, muestra de *O. vulgare* subsp *virens* (ORI5) y un acceso *O. vulgare* se diferenció bien de otro grupo conformado por especies de *Origanum* (*O. onites*, *O. elongatum*, *O. grosii* y *O. compactum*) y muestras de *O. vulgare*. Los árboles filogenéticos representados en las Figuras N° 2 y Figura N° 3 muestran con un alto soporte que las muestras de orégano de Putre se anida con individuos de *Origanum vulgare* subsp. *virens*, y están muy separadas de grupos conformados por individuos de *Origanum vulgare* subsp *vulgare* y otras especies del género *Origanum*.

Las relaciones genéticas de individuos de *Origanum vulgare* de diez muestras de orégano de Putre, siete muestras de orégano de IPK Gatersleben y una muestra de Melipilla, se analizó en función de las distancias genéticas obtenidas a partir de la información de ocho microsatélites. El número y tamaño de los alelos de ocho microsatélites a partir de 18 muestras de orégano se detectó mediante electroforesis capilar (Figura N° 4), los que mostraron los siguientes valores: OR09 (4 alelos, rango 135-147 pb), OR12 (5 alelos, rango 111-118 pb), OR13 (8 alelos, rango 121-172 pb), OR14 (4 alelos, rango 80-89 pb), OR27 (5 alelos, rango 94-112 pb), OR10 (3 alelos, rango 109-115 pb) y OR77 (3 alelos, rango 113-119 pb). A partir de la información de los alelos se creó un dendrograma mediante NJ, el cual mostró cuatro principales grupos, un grupo lo conformó un solo individuo ORI2 y otro grupo lo conformó ORI20, luego un tercer grupo por MP1, ORI45 y ORI23, y finalmente un cuarto grupo conformado por ORI29, ORI6, ORI5 y 10 muestras de Putre (Figura N° 5). Se destaca que en el cuarto grupo, las diez muestras de Putre forman un conglomerado junto a ORI5 (*Origanum vulgare* subsp *virens*) con bajo soporte (BP<50), sin embargo es la muestra más cercana en distancia genética a los genotipos de Putre, comparado con los otras seis muestras de orégano (Figura N° 5). Un segundo dendrograma obtenido con el método de agrupamiento UPGMA mostró tres pequeños grupos de un sólo individuo (ORI2, ORI29 y ORI6) y dos grupos mayores con más de dos individuos; uno de ellos agrupó los genotipos MP1, ORI45, ORI20 y ORI23 y, el otro grupo conglomeró diez muestras de Putre y el genotipo ORI5 (*O. vulgare* subsp *virens*) (Figura N° 6).

DISCUSIÓN

Una correcta identificación y caracterización de especies de importancia como recurso genético y agrícola es fundamental para protección del producto

en el mercado, sobre todo aquellos que están registrados con Indicación Geográfica (IG). En países como Brasil y Argentina los productores han buscado la necesidad de distinguir, valorizar y proteger sus productos locales de manera legal mediante DO o IG, debido a que son altamente beneficiosos para las empresas y el desarrollo territorial en general, sin embargo, destaca la complejidad del proceso de calificación colectiva e implementación del protocolo de calidad (de Souza Borda, 2015; Cendón y Bruno, 2018). En Chile, el artículo 92 de la Ley de Propiedad Industrial, otorga IG a un producto originario de alguna localidad del país cuando su característica sea imputable a su origen geográfico, para ello el interesado debe acompañar a su solicitud un informe técnico que recopile antecedentes históricos y científicos que permitan acreditar la vinculación entre el producto (características, calidad y reputación) y su lugar de origen (Arancibia, 2016; Belmar, 2016; Richard, 2018). Sin embargo, la recopilación de antecedentes científicos probablemente sea lo más difícil de conseguir para un productor, requiriendo para ello el apoyo del sector público-privado e instituciones gubernamentales. El orégano de Putre, ya sea en forma de plántulas o semillas, no se tiene certeza de su procedencia a pesar de que se señala que fue introducido por los colonos españoles, también es posible presumir que podría haber provenido de cualquier centro de origen del orégano como Europa, Asia, África o incluso América Central. Si bien al orégano de Putre actualmente no posee estudios de identificación genética, el orégano de Putre se describe taxonómicamente como *Origanum vulgare* L. de acuerdo a Goykovic (1995).

Esta especie se destaca por su gran variabilidad en cuanto a sus características morfológicas y de composición química (Kokkini, 1997). En la actualidad la taxonomía de la especie, en base a sus características morfológicas, se divide en seis subespecies: *O. vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desfontaines) Ietswaart, *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart, *O. vulgare* L. subsp. *gracile* (Koch) Ietswaart, *O. vulgare* L. subsp. *virens* (Hoffmannsegg et Link) Ietswaart, *O. vulgare* L. subsp. *vulgare* L. and *O. vulgare* L. subsp. *viride* (Boissier) Hayek (Ietswaart, 1980; Kokkini, 1997; Kosakowska y Czupa, 2018).

En cuanto a su composición química y capacidad antioxidante se observan ciertas diferencias entre subespecies de *Origanum vulgare* L. Por ejemplo, se ha demostrado diferencias en la composición de aceite esencial y la capacidad antioxidante entre *O. vulgare* subsp *vulgare* (OVV) y

ORI45 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORI23 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORI6 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORI12 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORI20 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORI29 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORI5 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

MP1 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORPU1 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORPU2 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORPU3 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORPU4 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORPU5 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORPU6 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORPU7 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORPU8 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORPU9 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

ORPU10 AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

O. vulgare virens (MG434484.1) AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

O. vulgare (AY506647.1) AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

O. onites (JX162989.1) AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

O. elongatum (MG434473.1) AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

O. grosii (MG434478.1) AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

O. compactum (MG434472.1) AACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAACCTTTAAAAGTAGACCGGGAACAGTGTTTAAACATCATGGGGGACGGTGGGGGGCAACCCCTCTGC

***** * *****

ORI45 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORI23 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORI6 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORI12 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORI20 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORI29 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORI5 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

MP1 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORPU1 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORPU2 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORPU3 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORPU4 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORPU5 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORPU6 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORPU7 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORPU8 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORPU9 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

ORPU10 CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

O. vulgare (AY506647.1) CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

O. vulgare virens (MG434484.1) CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

O. onites (JX162989.1) CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

O. elongatum (MG434473.1) CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

O. grosii (MG434478.1) CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

O. compactum (MG434472.1) CGTAACCCATCTCCTGCGGGCGTGTATCTTCGGGTCACGCTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGAAAACCTAAACGA

***** * *****

ORI45 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORI23 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORI6 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORI12 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORI20 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORI29 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORI5 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

MP1 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORPU1 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORPU2 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORPU3 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORPU4 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORPU5 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORPU6 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORPU7 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORPU8 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORPU9 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

ORPU10 AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

O. vulgare (AY506647.1) AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

O. vulgare virens (MG434484.1) AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

O. onites (JX162989.1) AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

O. elongatum (MG434473.1) AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

O. grosii (MG434478.1) AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

O. compactum (MG434472.1) AGCGTTTCCCCCAGCATCCCGTCCGCGGAGCGTGTGGGGGATCGAACGCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT

***** * *****

Figura N° 1

Alineación múltiple de secuencias de nucleótidos ITS1 (18S-5.8S) de diez muestras de orégano de la Comuna de Putre, siete muestras de IPK Gatersleben y seis accesos de especies *Origanum* descargadas de GenBank. Las secuencias de nucleótidos fueron alienadas usando ClustalW. Los asteriscos indican nucleótidos idénticos y los nucleótidos en rojo indican polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

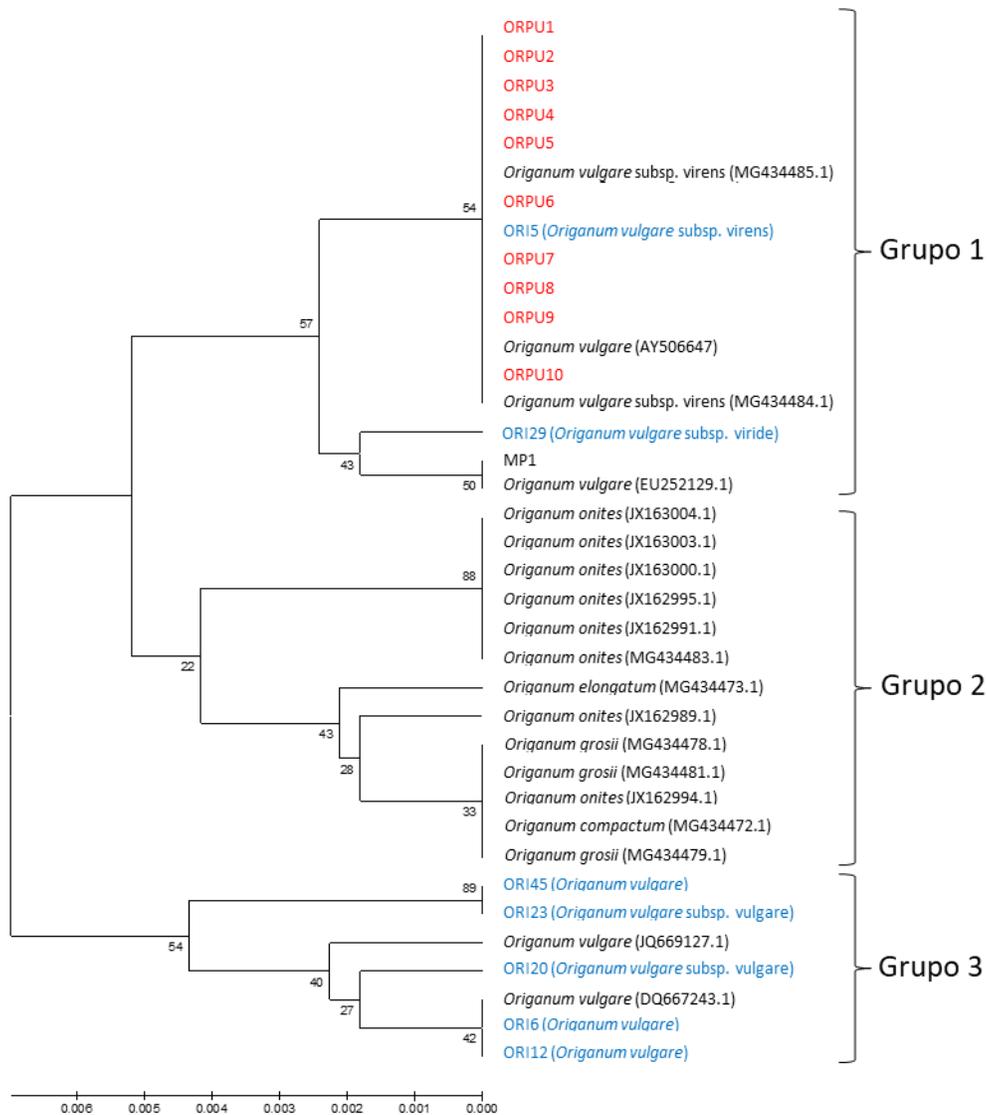


Figura N° 2

Árbol filogenético (UPGMA) de 37 secuencias ITS (provenientes de 5 especies de *Origanum*) obtenido mediante el método de Máxima Verosimilitud y basado en el modelo Tamura y Nei (1993). En rojo se observan las muestras de Putre y en azul las muestras de IPK Gatersleben. La barra de escala representa la distancia genética. Los números indican valores de bootstrap basado en 1000 réplicas.

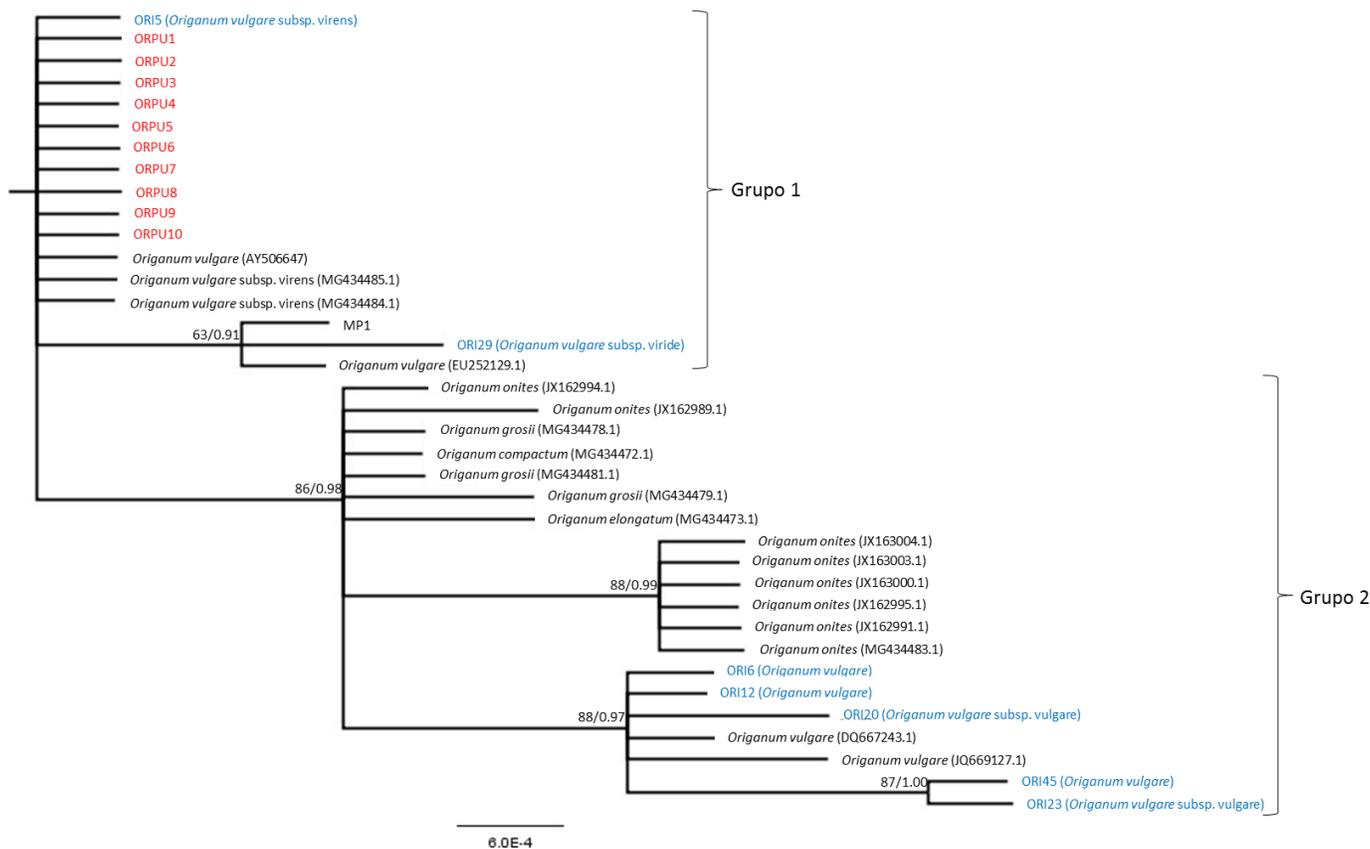


Figura N° 3

Árbol filogenético de 37 secuencias ITS (provenientes de 5 especies de *Origanum*) obtenido mediante Inferencia Bayesiana (IB), basado en el modelo de evolución K80 + I. En rojo se observan las muestras de Putre y en azul las muestras de IPK Gatersleben. Los números a la izquierda en cada nodo indican valores de BP y a la derecha valores PP.

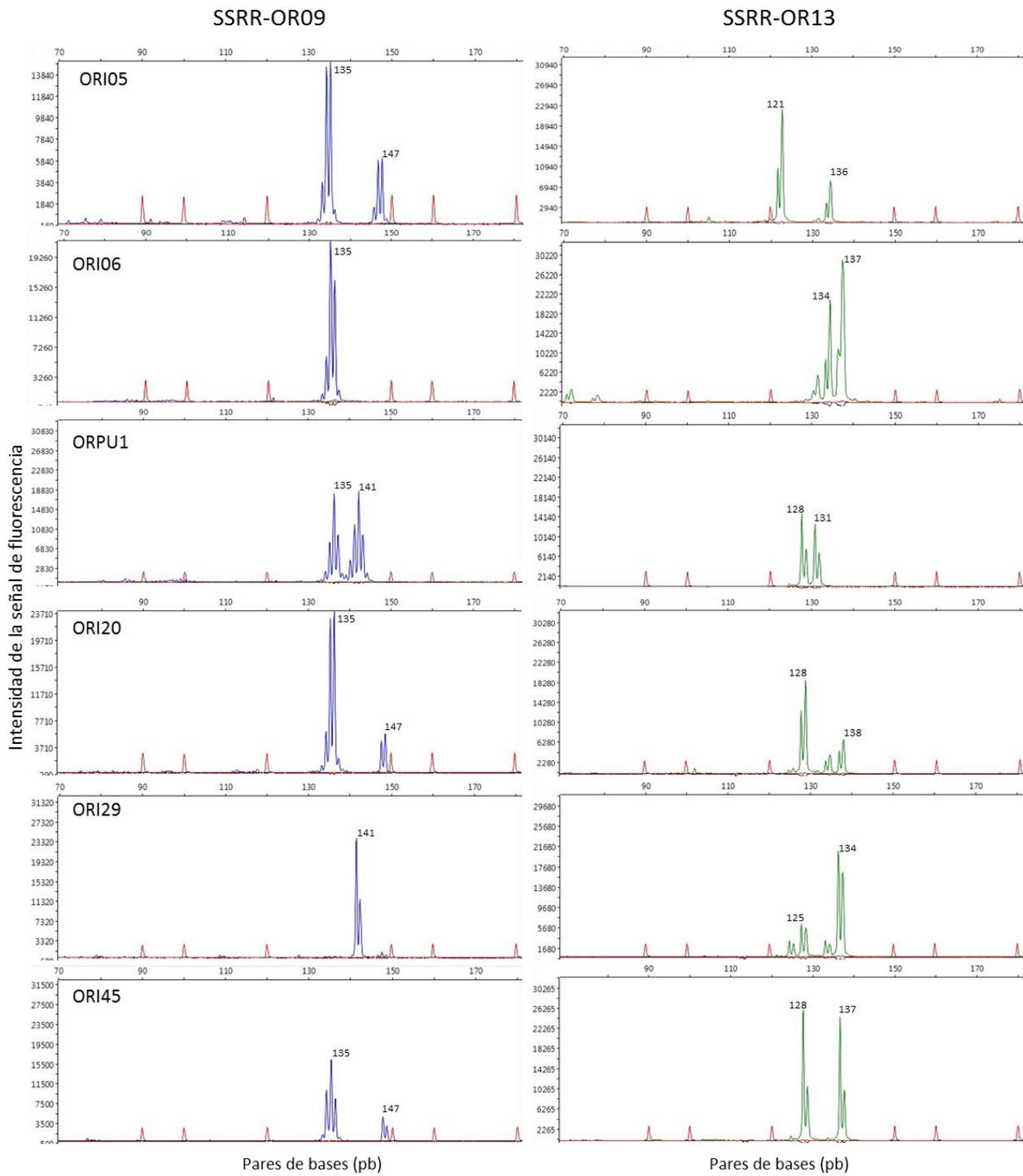


Figura N° 4

Ejemplo de electroferograma de electroforesis capilar usado en el estudio, que muestra la amplificación de dos marcadores microsatélites SSR-OR09 (5'FAM) y SSR-OR13(5'HEX), usando las muestras de orégano ORI05, ORI06, ORPU1, ORI20, ORI29 y ORI45. Los picos indican el tamaño de alelos en pares de bases representado en el eje X, y en el eje Y se especifica la intensidad de la señal de fluorescencia.

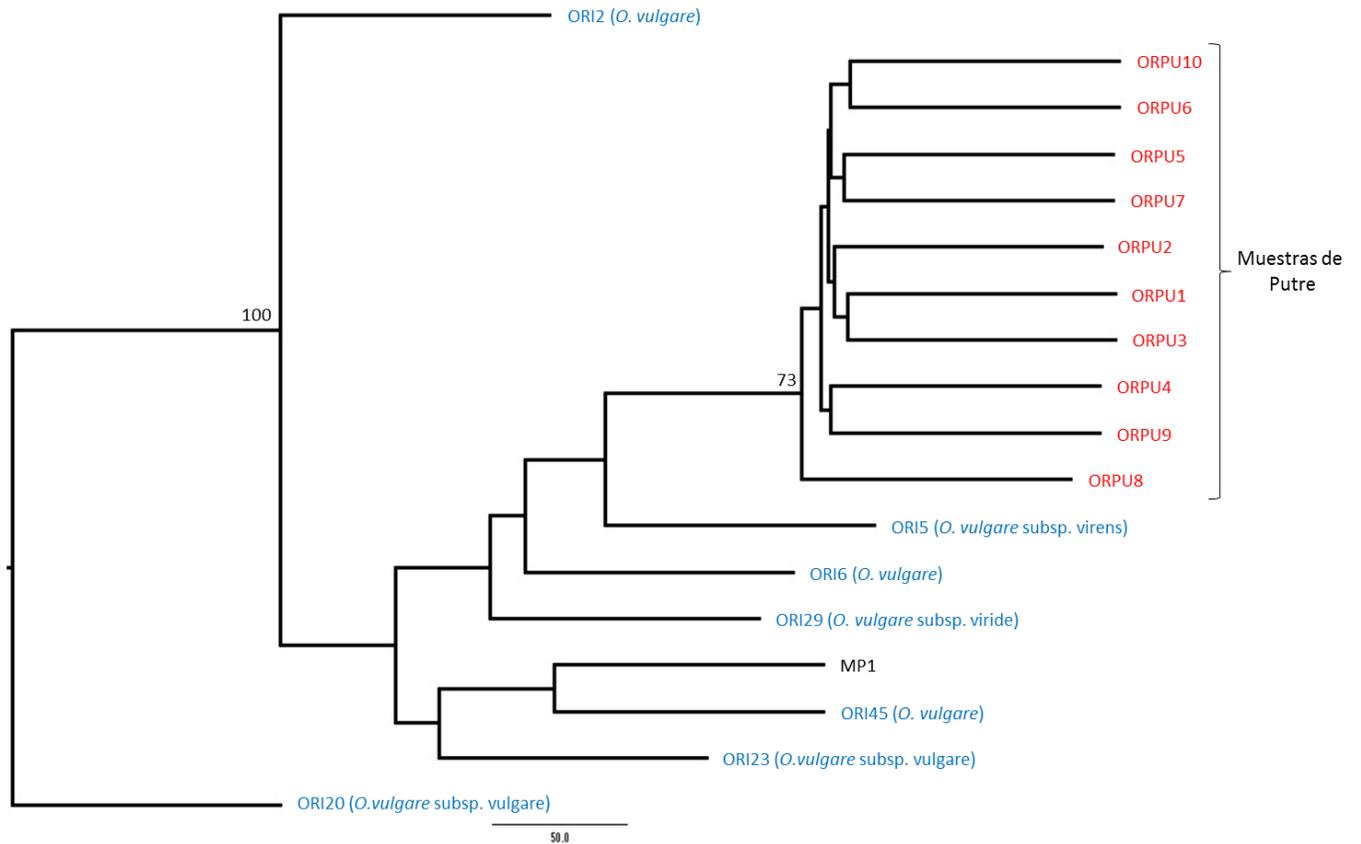


Figura N° 5

Relaciones genéticas de 17 *Origanum vulgare* obtenido mediante Neighbor joining, basado en la información de 8 microsatélites. Se observan valores de bootstrap >70, obtenidos a partir de 1000 réplicas. En rojo se observan las muestras de Putre y en azul las muestras de IPK Gatersleben.

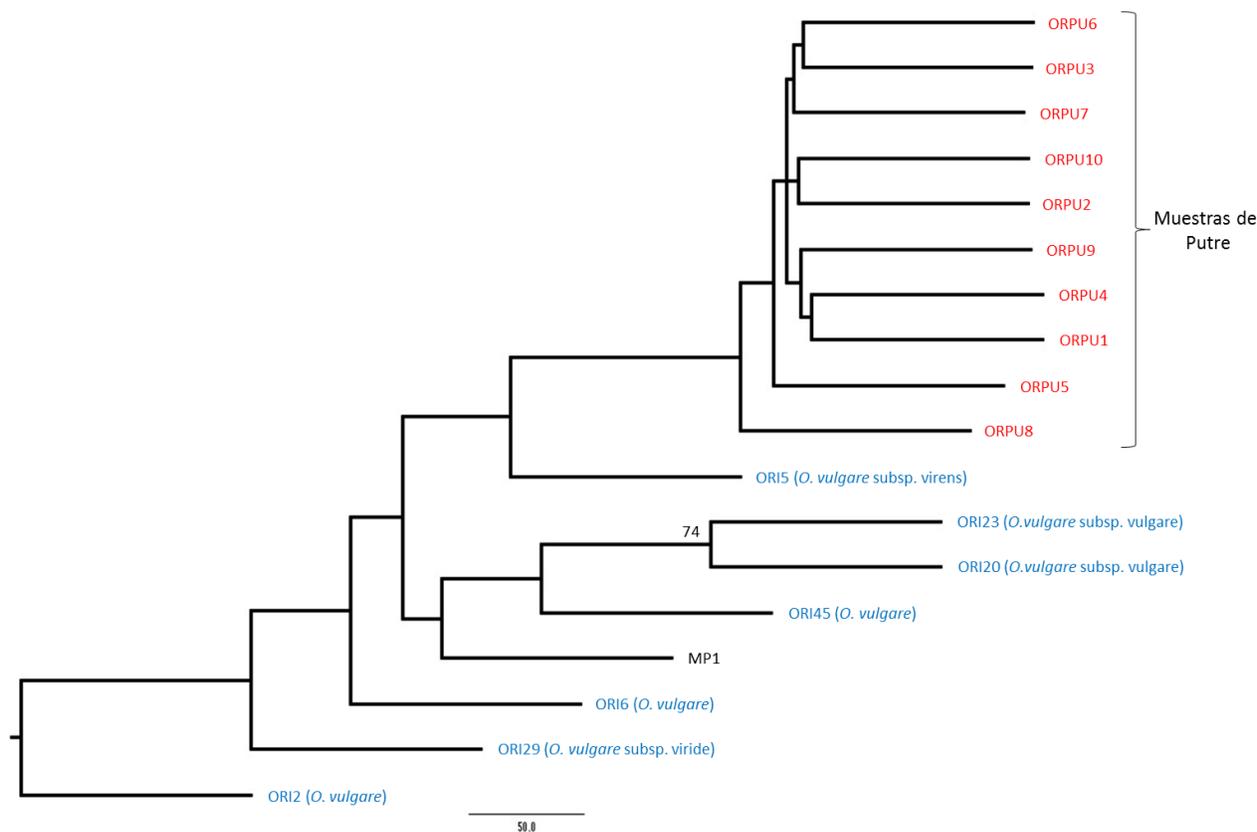


Figura N° 6

Relaciones genéticas de 17 *Origanum vulgare* obtenido mediante UPGMA, basado en la información de 8 microsatélites. Se observan valores de bootstrap >70, obtenidos a partir de 1000 réplicas. En rojo se observan las muestras de Putre y en azul las muestras de IPK Gatersleben.

O. vulgare subsp hirtum (OVH) (Sarikurkcú et al., 2015). Así mismo, individuos de OVV colectados en diferentes regiones de Turquía mostraron componentes ricos en Timol, Carvacrol, *p*-cimeno y *y*-terpineno, mientras que OVH mostró componentes ricos en linalool, de hecho OVH es considerado como quimiotipo “linalool”; así también, en cuanto a la capacidad antioxidante, la eliminación de radicales libres (DPPH y ABTS) fue significativamente mayor en OVV que OVH, y por otro lado, la actividad de quelación de metales y reducción de molibdeno fue exhibida mayoritariamente por OVH que OVV (Sarikurkcú et al., 2015). Por otro lado, un estudio de 42 muestras de *Origanum vulgare* L. de las subespecies vulgare, viride, virens, hirtum y gracile, cuyas plántulas se mantuvieron en condiciones controladas, mostraron una alta variación entre subespecies en cuanto a su capacidad antioxidante (tanto el ORAC como TPC) y contenido de aceite esencial, éste último con diferencias de 98 veces entre los valores más altos y más bajos (Yan et al., 2016). Estos antecedentes muestran claramente que

no es posible quedar indiferente ante la identificación de una determinada subespecie de *Origanum vulgare* ya que existen evidentes diferencias de su composición química. Si bien, las diferencias de calidad de aceite y componentes volátiles no son provocados sólo por la subespecie de *Origanum vulgare*, también son responsables variables agronómicas como condiciones climáticas, localización geográfica, condiciones de suelo, estrés hídrico, tiempo de cosecha y factores genéticos (Sarikurkcú et al., 2015; Croteau et al., 2015).

La identificación, caracterización o verificación de autenticidad de especies del género *Origanum* ha tomado gran relevancia en los últimos años dada la necesidad de una correcta identificación y verificación. Entre las distintas técnicas utilizadas se mencionan las técnicas espectroscópicas como el ultravioleta-visible (UV), infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR), espectroscopia Raman, análisis isotópicos, cromatografía líquida y gaseosa, métodos moleculares (PCR), ensayos con anticuerpos y análisis térmicos en combinación con métodos

quimiométricos (Reid *et al.*, 2006; Altameme *et al.*, 2015; Black *et al.*, 2016; Kucharska-Ambrożej y Karpinska, 2019).

En la actualidad existen varios estudios con marcadores SSR en especies del género *Origanum*. En un estudio de Novak *et al.* (2008), se desarrollaron un conjunto de 13 marcadores SSR de *O. vulgare* para el género *Origanum* y especies de la familia *Lamiaceae*. Adicionalmente, un exhaustivo estudio de Aboukhalid *et al.* (2017), con marcadores SSR proporcionó los primeros datos para la gestión de la conservación a largo plazo de *O. compactum* del Norte de Marruecos, donde las poblaciones del orégano marroquí con mayor diversidad genética fueron las que provenían de poblaciones más fragmentadas. En otro estudio, se analizaron loci EST-SSR para evaluar la diversidad genética y la diferenciación de *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*, una especie endémica de Túnez (Mechergui *et al.*, 2017). Sin embargo, es necesario como primer paso identificar la especie y subespecie de un producto que requiere diferenciación en el mercado. En el caso del orégano de Putre, en el proceso de solicitud de IG no fue tomado en cuenta la identificación precisa de su genotipo.

Los resultados de este trabajo han demostrado a partir de dos distintas fuentes de material y datos (germoplasma certificado y secuencias de GenBank), y analizado con distintos marcadores genéticos nucleares (ITS y microsatélites), que el orégano de Putre corresponde a la especie *Origanum vulgare* L. subsp. *virens*. Este es el primer trabajo que ha corroborado genéticamente la especie y subespecie de orégano que se produce en la Comuna de Putre. Sin duda, la identificación precisa del orégano de Putre de la Región de Arica-Parinacota, dará más soporte a la correcta diferenciación de este genotipo en el mercado, además, como información adicional de apoyo a la certificación de IG.

El orégano procedente de Putre corresponde a la subsp. *virens*, esta es una subespecie que crece naturalmente es el Mediterráneo occidental (Bakha *et al.*, 2017). En los registros europeos, *O. vulgare* L. subsp. *virens* crece de forma espontánea en el suroeste de Europa (Azores, Islas Baleares, España y Portugal), en España es abundante en el tercio norte y en la mitad suroeste, aunque es escasa en la cuenca del río Guadalquivir (Muñoz, 2002). Específicamente en la flora de la Península Ibérica, se registran solo dos subespecies de *O. vulgare* L.: la subsp. *vulgare* y la subsp. *virens*, sin embargo, no es fácil separar estas dos y considerando que la subsp. *vulgare* no se

registra en Portugal, algunos floristas portugueses reconocen a *O. virens* Hoffmanns & Link, como una especie diferente (Franco, 1984; Castroviejo, 2010). Además, la subsp. *virens* también se ha reportado en Marruecos, pero en áreas muy restringidas, esto debido a su importancia económica, donde por usos terapéuticos y características culinarias, en general todas las poblaciones de orégano en Marruecos están bajo explotación intensiva (Bakha *et al.*, 2017).

Con este nuevo hallazgo de la identificación del orégano de Putre, es probable aventurarse a preguntar si este genotipo es similar a los genotipos de orégano de la Región de Tacna en Perú (probablemente también a los territorios de Moquegua y Arequipa) y de la zona de Cochabamba en Bolivia, debido a que son zonas geográficas muy productivas cercanas a Chile, y donde el intercambio de semillas y propágulos de plantas entre agricultores fue costumbre en el pasado. De hecho, en nuestros análisis con microsatélites e ITS se observó que los genotipos de orégano son iguales entre las localidades de Murmuntani, Socoroma y Zapahuira. Así también, en un estudio con AFLP en poblaciones de oréganos de Tacna (Perú), se observó un bajo grado de diversidad genética, debido a que son propagados asexualmente o clonación (por medio de esquejes de una misma planta) (Karla, 2018), siendo el mismo sistema usado por los agricultores de la Comuna de Putre (Goykovic, 1995). Actualmente el intercambio informal de material vegetal es reducido entre países debido a los controles ejercidos por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de Chile. Por lo tanto, es posible sospechar que entre poblaciones de orégano de Perú, Chile y Bolivia podría existir algún grado de similitud entre especie y subespecie.

Este trabajo puede apoyar a la trazabilidad del orégano de Putre en el mercado, cultivado durante siglos por los agricultores aymaras de la Comuna de Putre. Su real identificación taxonómica en cuanto a especie y subespecie podrá diferenciarse de otros productos a base de orégano a nivel nacional.

CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo que permite corroborar genéticamente a partir de marcadores nucleares (ITS y microsatélites) a nivel de especie y subespecie al orégano que se cultiva en la Comuna de Putre, correspondiendo a la especie *Origanum vulgare* L. subsp. *virens*. La identificación precisa mediante técnicas moleculares validadas científicamente permite no solo poner en valor el conocimiento acerca del orégano de Putre de la Región de Arica-Parinacota, sino, además, dará más soporte a la

correcta diferenciación y autenticación de este genotipo en el mercado, sirviendo además de información complementaria de apoyo a la IG.

entregadas al manuscrito. Además se agradece el financiamiento de la Universidad de Atacama a partir del proyecto DIUDA 19/18 (22380) y al fondo FIC del Gobierno Regional de Atacama.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los evaluadores las recomendaciones

REFERENCIAS

- Aboukhalid K, Machon N, Lambourdière J, Abdelkrim J, Bakha M, Douaik A, Al Faiz C. 2017. Analysis of genetic diversity and population structure of the endangered *Origanum compactum* from Morocco, using SSR markers: Implication for conservation. **Biol Conserv** 212: 172 - 182. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.05.030>
- Adame-Gallegos JR, Andrade-Ochoa S, Nevarez-Moorillon GV. 2016. Potential use of Mexican oregano essential oil against parasite, fungal and bacterial pathogens. **J Essent Oil Bear Plants** 19: 553 - 567. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2015.1116413>
- Altameme HJ, Hameed IH, Idan SA, Hadi MY. 2015. Biochemical analysis of *Origanum vulgare* seeds by fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **J Pharmacogn Phytother** 7: 221 - 237. <https://doi.org/10.5897/jpp2015.0362>
- Apáestegui-Livaque R, Pineda C, Chuquiyaui M. 2018. Orégano (*Origanum vulgare* L) en los parámetros productivos de pollos de engorde. **Investigación Valdizana** 11: 85 - 93.
- Arancibia MJ. 2016. La importancia de las denominaciones de origen e indicaciones geográficas para la identidad país. **RIVAR** 3: 267 - 283.
- Asensio CM, Grosso NR, Juliani HR. 2015. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum spp.*) Essential oils from Central and Southern Argentina. **Ind Crops Prod** 63: 203 - 213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.056>
- Azizi A, Wagner C, Honermeier B, Friedt W. 2009. Intraspecific diversity and relationship between subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. **Plant Syst Evol** 281: 151 - 160. <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0197-1>
- Bakha M, Al Faiz C, Daoud C, El Mtili N, Aboukhalid K, Khiraoui A, Machonc N, Siljak-Yakovlev S. 2017. Genome size and chromosome number for six taxa of *Origanum* genus from Morocco. **Bot Lett** 164: 361 - 370. <https://doi.org/10.1080/23818107.2017.1395766>
- Bañuelos-Valenzuela R, Delgadillo Ruíz L, Echavarría Chairez FG, Delgadillo-Ruiz O, Meza-López C. 2018. Composición química y FTIR de extractos etanólicos de "Larrea tridentata", "*Origanum vulgare*", "*Artemisa ludoviciana*" y "*Ruta graveolens*". **Agrociencia** 52: 309 - 321.
- Belmar C. 2016. La importancia de las denominaciones de origen e indicaciones geográficas para la identidad país. **RIVAR** 3: 253 - 266.
- Besnard G, Rubio de Casas R, Christin P, Vargas P. 2009. Phylogenetics of Olea (Oleaceae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences: tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. **Ann Bot** 104: 143 - 160. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp105>
- Black C, Haughey SA, Chevallier OP, Galvin-King P, Elliott CT. 2016. A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: the oregano approach. **Food Chem** 210: 551 - 557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.004>
- Castroviejo S. 2010. **Flora Ibérica vol. XII, Verbenaceae-Labiatae-Callitrichaceae**. Editorial CSIC, Madrid, España.
- Chalchat J, Pasquier B. 1999. Chemical Studies of *Origanum vulgare* L. ssp. *Gracile* (Koch) letswaart and *Origanum vulgare* L. ssp. *Virens* (Hoffm. et Link) letswaart. **J Essent Oil Res** 11:143 - 144. <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701093>
- Cheng T, Chao X, Lei L, Li C, Zhang Y, Zhou S. 2015. Barcoding the kingdom Plantae: New PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. **Mol Ecol Res** 16138149. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12438>
- Cendón ML, Bruno M. 2018. Indicaciones geográficas en Argentina: aportes metodológicos para el estudio de sus potencialidades y limitantes. **RIVAR** 5: 106 - 127
- Cleff MB, Meinerz AR, Faria RO, Xavier MO, Santin R, Nascente PS, Rodrigues MR, Meireles MCA. 2010. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas/191**

- Inhibitory activity of origanum essential oil against important fungus in veterinary. **Arq Bras Med Vet Zoot** 62: 1291 - 1294. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352010000500040>
- Contreras R, Figueiras AM, Gallego FJ, Benavente E, Manzaneda AJ, Benito C. 2017. Neutral molecular markers support common origin of aluminium tolerance in three congeneric grass species growing in acidic soils. **AoB Plants** 9: plx060. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx060>
- Contreras R, Porcile V, Aguayo F. 2018a. Genetic diversity of *Geoffroea decorticans*, a native woody leguminous species from the Atacama Desert in Chile. **Bosque** 39: 321 - 332. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002018000200321>
- Contreras R., Aguayo F., Guerra A., Tapia F., Porcile V. 2018b. Genetic characterization of centennial olive trees from Northern Chile: The case of extra virgin olive oil from Huasco in the process of designation of origin. **Chil J Agric Anim Sci** 34: 126 - 139. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902018005000402>
- Contreras R, Aguayo F, Porcile V. 2019a. Microsatellites reveal a high genetic differentiation among native *Geoffroea decorticans* Burkart populations in Chilean Atacama Desert. **Bol Soc Arg Bot** 54: 225 - 240. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002018000200321>
- Contreras R, Porcile V, Guggiana-Nilo D, Aguayo F. 2019b. An efficient protocol to perform genetic traceability of tissue and foods from *Geoffroea decorticans*. **Chil J Agric Anim Sci** 35: 224 - 237. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902019005000402>
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. 2015. **Natural products (secondary metabolites)**. In Buchanan B, Grissem W, Jones R, eds. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plants: Rockville, USA.
- De Souza Borda. 2015. Denominaciones de origen en Brasil: situación actual. Su desarrollo: jurisprudencia y avances de los productores. **RIVAR** 2: 1 - 21
- ENEXPRO. 2017. **Orégano, Mercado Internacional, Estudio ENEXPRO**. ProChile Ministerio de Relaciones Exteriores, Santiago, Chile. https://www.prochile.gob.cl/wp-content/uploads/2017/05/Oregano_ENEXPRO.pdf
- Elezi F, Plaku F, Ibraliu A, Stefkov G, Karapandzova M, Kulevanova S, Aliu S. 2013. Genetic variation of oregano (*Origanum vulgare* L.) for etheric oil in Albania. **Agric Sci** 4: 449. <https://doi.org/10.4236/as.2013.49060>
- Farías G, Brutti O, Grau R, Lira PDL, Retta D, van Baren C, Bandoni AL. 2010. Morphological, yielding and quality descriptors of four clones of *Origanum* spp. (Lamiaceae) from the Argentine Littoral region Germplasm bank. **Ind Crops Prod** 32: 472 - 480. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.019>
- Felsenstein J. 1989. PHYLIP-Phylogeny Inference Package (version 3.2). **Cladistics** 5: 164 - 166.
- Franco J. 1984. **Nova Flora de Portugal** (Continente e Açores), Volume II, Clethraceae - Compositae. Edição do Autor, Lisboa, Portugal.
- Giuliani C, Maggi F, Papa F, Maleci Bini L. 2013. Congruence of phytochemical and morphological profiles along an altitudinal gradient in *Origanum vulgare* ssp. vulgare from Venetian region (NE Italy). **Chem Biodiv** 10: 569 - 583. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300019>
- González MD, Lanzelotti PL, Luis CM. 2017. Characterization of the polyphenolic fingerprint of *Origanum majoricum* Cambess. from Argentina by high-performance liquid chromatography and multivariate analysis. **Food Anal Method** 10: 3275 - 3284. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0894-2>
- Goykovic V. 1995. El Cultivo del Orégano (*Origanum vulgare* L.) en la Precordillera de la Provincia de Parinacota. **IDESIA** 14: 43 - 52.
- Helsen K, Jacquemyn H, Hermy M, Vandepitte K, Honnay O. 2013. Rapid buildup of genetic diversity in founder populations of the gynodioecious plant species *Origanum vulgare* after semi-natural grassland restoration. **PLoS One** 8: e67255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067255>
- Hillis D, Bull J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Syst Biol** 42:182 - 192. <https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182>
- Ince AG, Karaca M, Elmasulu SY. 2014. New microsatellite and CAPS-microsatellite markers for clarifying taxonomic and phylogenetic relationships within *Origanum* L. **Mol Breeding** 34: 643 - 654. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0064-9>
- Ietswaart JH. 1980. A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). Leiden University Press, Amsterdam, The Netherlands.
- INAPI. 2020. **Sello de Origen**, productos registrados y en proceso de Norte Grande, “Orégano de la precordillera

- de Putre". <https://www.inapi.cl/sello-de-origen/productos-registrados-y-en-proceso/norte-grande>
- Jia S, Yan Z, Wang Y, Wei Y, Xie Z, Zhang F. 2017. Genetic diversity and relatedness among ornamental purslane (*Portulaca* L.) accessions unraveled by SRAP markers. **3 Biotech** 7: 241. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0881-8>
- Jo I, Sung J, Hong C, Raveendar S, Bang K, Chung J. 2018. Development of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and high-resolution melting (HRM) markers from the chloroplast genome of *Glycyrrhiza* species. **3 Biotech** 8: 220. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1245-8>
- Karla P. 2018. Caracterización molecular de los principales ecotipos de "Oregano" (*Origanum* sp.) en la Región Tacna. Tesis, Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
- Katsiotis A, Nikoloudakis N, Linos A, Drossou A, Constantinidis T. 2009. Phylogenetic relationships in *Origanum* spp. based on rDNA sequences and intra-genetic variation of Greek *O. vulgare* subsp. *hirtum* revealed by RAPD. **Sci Horticult** 121: 103 - 108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.015>
- Kintzios SE. (2002). The genera *Origanum* and *Lippia* (Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles). 296 p. Taylor and Francis, London, UK.
- Kokkini S. 1997. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. In: Paludosi S, editor. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano 8-12 May 1996. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Kosakowska O, Czupa W. 2018. Morphological and chemical variability of common oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*) occurring in eastern Poland. **Herba Polonica** 641: 11 - 21. <https://doi.org/10.2478/hepo-2018-0001>
- Kucharska-Ambrożej K, Karpinska J. 2019. The application of spectroscopic techniques in combination with chemometrics for detection adulteration of some herbs and spices. **Microchem J** 153: 104278. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104278>
- Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva E, Vázquez-Olivo G, Heredia J. 2017. Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. **Molecules** 22: 989. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>
- Leite AM, Lima EDO, Souza ELD, Diniz MDF, Leite SP, Xavier AL, Medeiros IAD. 2009. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Rev Bras Farmacogn** 19: 842 - 846. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2009000600008>
- Lukas B, Samuel R, Mader E, Başer KHC, Duman H, Novak J. 2013. Complex evolutionary relationships in *Origanum* section *Majorana* (Lamiaceae). **Bot J Linnean Soc** 171: 667 - 686. <https://doi.org/10.1111/boj.12022>
- Marrelli M, Statti GA, Conforti F. 2018. *Origanum* spp.: an update of their chemical and biological profiles. **Phytochem Rev** 17: 873 - 888. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9566-0>
- Murillo-Amador B, Morales-Prado LE, Troyo-Diéguez E, Córdoba-Matson MV, Hernández-Montiel LG, Rueda-Puente EO, Nieto-Garibay A. 2015. Changing environmental conditions and applying organic fertilizers in *Origanum vulgare* L. **Front Plant Sci** 6: 549. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00549>
- Mechergui0 K, Jaouadi W, Bekele WA, Khouja ML, Friedt W. 2017. Genetic structure and differentiation among oregano [*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart] provenances from North Africa: bioinformatic approaches cause systematic bias. **Genetic Res Crop Evol** 64: 717 - 732. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0395-y>
- Muñoz LM. 2002. Plantas medicinales españolas: *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) (Orégano). **Acta Bot Malacitana** 27: 273 - 280. <https://doi.org/10.24310/abm.v27i0.7343>
- Nei M. 1973. The theory and estimation of genetic distance, pp 45-54. In: Genetic Structure of Populations edited by N E Morton University Press of Hawaii, Honolulu.
- Novak J, Lukas B, Bolzer K, Grausgruber-Gröger SABINE, Degenhardt J. 2008. Identification and characterization of simple sequence repeat markers from a glandular *Origanum vulgare* expressed sequence tag. **Mol Ecol Resour** 8: 599 - 601. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.02059.x>
- Nylander JAA. 2008. **MrModeltest** 2.3. Department of Systematic Zoology, Uppsala University. Uppsala, Sweden. <https://github.com/nylander/MrModeltest2>
- ODEPA. 2018. Encuesta de Superficie Hortícola 2018. INE. marzo de 2019. Santiago, Chile. Oficina de estudios y políticas agrarias ODEPA.

https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletin-de-hortalizas-frescas-marzo-de-2019/attachment/encuesta-de-superficie-horticola-2018-ine_mar

- Pei N, Chen B, Kress WJ. 2017. Advances of community-level plant DNA barcoding in China. **Front Plant Sci** 8: 225. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00225>
- Rambaut A, Drummond A. 2007. Tracer v1.4 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>
- Rambaut A. 2012. **FigTree** (version 1.4.0). <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Ranabhatt H, Kapoor R. 2018. Plant Biotechnology. Vol. 1, 526 pp. Woodhead Publishing India Pvt. Ltd, Nueva Delhi, India.
- Radušienė J, Stankevičiūtė D, Venskutonis R. 2005. Morphological and chemical variation of *Origanum vulgare* L. from Lithuania. **Acta Hort** 675: 197 - 203. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.675.29>
- Rehecho S, Uriarte-Pueyo I, Calvo J, Vivas LA, Calvo MI. 2011. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. **J Ethnopharmacol** 133: 75 - 85. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.09.006>
- Reid LM, O'Donnell CP, Downey G. 2006. Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Trends Food Sci Technol** 17: 344 - 353. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.01.006>
- Richard N. 2018. Industria del queso y sus aspectos culturales en Chile. **RIVAR** 5: 128 - 145.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Syst Biol** 61: 539 - 542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Salgado P, Prinz K, Finkeldey R, Ramírez CC, Vogel H. 2017. Genetic variability of *Aristotelia chilensis* ("maqui") based on AFLP and chloroplast microsatellite markers. **Gen Resour Crop Evol** 64: 2083 - 2091. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0498-0>
- Sarikurku C, Zengin G, Oskay M, Uysal S, Ceylan R, Aktumsek A. 2015. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp *vulgare* and subsp *hirtum*) essential oils. **Ind Crop Prod** 70: 178 - 184. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.030>
- Skoula M, Harborne JB. 2002. **The taxonomy and chemistry of Origanum**. In: Kintzios, S.E. (Ed.), *Origanum: The Genera Origanum and Lippia*. Taylor and Francis, New York, USA.
- Santoro GF, das Graças Cardoso M, Guimarães LGL, Salgado APS, Menna-Barreto RF, Soares MJ. 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitol Res** 100: 783 - 790. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0326-5>
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol Biol Evol** 10: 512 - 526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol Biol Evol** 30: 2725 - 2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tellez-Monzón LA, Nolasco-Cama DM. 2017. Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* spp.) de Tacna. **Ing Ind** 35: 195 - 205. <https://doi.org/10.26439/ing.ind2017.n035.1801>
- Vite-Vallejo O, Barajas-Fernández MG, Saavedra-Aguilar M, Cardoso-Taketa A. 2018. Insecticidal Effects of Ethanolic Extracts of *Chenopodium ambrosioides*, *Piper nigrum*, *Thymus vulgaris*, and *Origanum vulgare* against *Bemisia tabaci*. **Southwestern Entomol** 43: 383 - 393. <https://doi.org/10.3958/059.043.0209>
- Waller SB, Madrid IM, Silva AL, De Castro LLD, Cleff MB, Ferraz V, Meireles MC, Zanette R, de Mello JRB. 2016. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oils of Lamiaceae family. **Mycopathologia** 181: 857 - 863. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0047-y>
- Wang XC, Liu C, Huang L, Bengtsson-Palme J, Chen H, Zhang JH, Cai D, Li JQ. 2014. ITS1: A DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? **Mol Ecol Resour**. 15: 573 - 586. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12325>
- Yan F, Azizi A, Janke S, Schwarz M, Zeller S, Honermeier B. 2016. Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare* L.) collection of the German National Genebank. **Ind Crop Prod** 92: 19 - 25. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.038>