

# **TRABAJO FINAL DE GRADUACION**

## **APORTES BIOTECNOLOGICOS AL CULTIVO DE OREGANO**

**Tesistas:**

**Braun, Gisela A.**

**Zuccari, Ulises**

**Directora: Dra. Picca, Aurora M. T.**

**Co-directora: Ing. Agr. Torroba, Ma. del Carmen**

**Ingeniería Agronómica**

**Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa**

**Año: 2014**

## **I-INDICE GENERAL**

<b>I-Indice general.....</b>	<b>2</b>
<b>II-Indice de tablas.....</b>	<b>4</b>
<b>III-Indice de figuras.....</b>	<b>4</b>
<b>1-Resumen.....</b>	<b>5</b>
<b>2-Introducción.....</b>	<b>6</b>
<b>3-Hipótesis.....</b>	<b>14</b>
<b>4-Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1-Objetivo General.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2-Objetivos Específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>5- Materiales y Métodos.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1- Detección de Polimorfismos.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1.1-Material Vegetal.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1.2-Extracción de ADN.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1.3-Marcadores Moleculares.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2- Multiplicación Agámica <i>in vitro</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>5.2.1-Material Vegetal.....</b>	<b>22</b>
<b>5.2.2-Extracción de Meristemas para la Liberación de Virus.....</b>	<b>23</b>
<b>5.2.3-Inducción de Callos.....</b>	<b>23</b>
<b>5.2.4-Inducción de Múltiples Vástagos.....</b>	<b>25</b>
<b>6-Resultados y Discusión.....</b>	<b>27</b>
<b>6.1-Detección de Polimorfismos.....</b>	<b>27</b>
<b>6.1.1-Extracción de ADN.....</b>	<b>27</b>
<b>6.1.2-Marcadores Moleculares.....</b>	<b>28</b>

<b>6.2- Multiplicación Agámica <i>in-vitro</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>6.2.1-Extracción De Meristemas Para La Liberación De Virus.....</b>	<b>31</b>
<b>6.2.2-Inducción de Callos Organogénicos y/o Embriogénicos.....</b>	<b>31</b>
<b>6.2.3-Múltiples Vástagos.....</b>	<b>34</b>
<b>7-Conclusiones.....</b>	<b>41</b>
<b>7.1-Detección de Polimorfismos.....</b>	<b>41</b>
<b>7.2-Multiplicación agámica <i>in vitro</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>8-Bibliografía.....</b>	<b>42</b>

## II-INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Compendio de las soluciones utilizadas por los distintos protocolos de extracción de ADN probados .....	<b>17</b>
<b>Tabla 2:</b> Secuencia de <i>primers</i> RAPD utilizados .....	<b>20</b>
<b>Tabla 3:</b> Secuencia de los <i>primers</i> SSR utilizados .....	<b>21</b>
<b>Tabla 4:</b> Secuencia de los <i>primers</i> ISSR utilizados .....	<b>22</b>
<b>Tabla 5:</b> Explantos, horas de luz y reguladores de crecimiento utilizados en las distintas técnicas de multiplicación .....	<b>26</b>
<b>Tabla 6:</b> Síntesis del comportamiento de los distintos marcadores moleculares utilizados .....	<b>30</b>
<b>Tabla 7:</b> Diferencias en el número de plántulas obtenidas por explanto en respuesta a la aplicación de BAP.....	<b>35</b>

## III-INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cultivo de orégano <i>in vitro</i> creciendo en la cámara climática.....	<b>24</b>
<b>Figura 2:</b> Patrones electroforéticos de ADN resultado de los distintos métodos de extracción .....	<b>28</b>
<b>Figura 3:</b> Marcadores SSR amplificados con los <i>primers</i> OR09 y OR12 en los genotipos de <i>Origanum vulgare</i> en estudio.....	<b>29</b>
<b>Figura 4:</b> Marcadores ISSR amplificados con los <i>primers</i> ISSR3; ISSR6 y ISSR12 en los genotipos <i>Origanum vulgare</i> en estudio .....	<b>30</b>
<b>Figura 5:</b> Desuniformidad en las respuestas de los explantos al agregado de 2.5 mg/l de BAP al medio de cultivo .....	<b>35</b>
<b>Figura 6:</b> Diferencias obtenidas en las respuestas a la aplicación de BAP.....	<b>36</b>
<b>Figura 7:</b> Números de explantos que se oxidaron con y sin agregado de ácido ascórbico .....	<b>38</b>
<b>Figura 8:</b> Plántulas de <i>Origanum vulgare</i> creciendo <i>in vitro</i> mostrando una oxidación incipiente .....	<b>39</b>
<b>Figura 9:</b> Representación gráfica porcentual de los resultados obtenidos utilizando la técnica de obtención de múltiples vástagos .....	<b>40</b>

## **1.-RESUMEN:**

Una de las principales problemáticas agronómicas del cultivo de orégano en Argentina, es la escasa identificación taxonómica de los materiales vegetales en cultivo, lo que no permite realizar en la actualidad una tipificación de la producción por variedad comercial que resulta fundamental para planes de mejoramiento o de propagación masiva. Otro problema importante es que el orégano tradicionalmente se multiplica por división de matas provenientes de plantaciones comerciales, sin selección, ni saneamiento del material inicial. La continua multiplicación vegetativa conduce al deterioro de los cultivos, debido, entre otras causas, a la acumulación de enfermedades sistémicas. Los objetivos generales de este trabajo fueron a) identificar polimorfismo genómico entre los distintos genotipos de orégano a partir de la utilización de cebadores estándares y b) establecer protocolos de multiplicación agámica *in vitro* tendientes a obtener el mayor número de plantas de alta calidad sanitaria en el menor tiempo posible. Se utilizaron plantas identificados morfológicamente como “orégano criollo”, “orégano compacto”, “orégano cordobés”, “orégano chileno”, “orégano mendocino” y “orégano laboratorio”. La utilización de marcadores SSR fue la que permitió, en mayor medida, la detección de polimorfismos entre las variedades en estudio, a partir de la visualización en geles de agarosa. Con respecto a la multiplicación agámica es posible la obtención de plántulas de orégano utilizando la técnica de múltiples vástagos para obtener mayor número de ejemplares en menor tiempo posible, comparado con la utilización de la técnica que resulta de obtener una planta por estaca uninodal.

**Palabras clave:** *Origanum*, cultivo *in vitro*, marcadores moleculares

## 2.-INTRODUCCION:

El orégano (*Origanum*, Lamiaceae) tradicionalmente se ha cultivado por su aroma y sabor altamente requeridos por la industria alimentaria y por la demanda del sector farmacéutico debido al alto contenido de timol y carvacrol de sus aceites esenciales. El timol ha sido usado en medicina preventiva como anti-fúngico y el carvacrol como anti-infeccioso y anti-helmíntico; ambas sustancias son empleadas como antioxidantes (Collura & Storti, 1971; Budavari, 1989; Maguna *et al*, 2006). Sus propiedades antioxidantes también son utilizadas para prolongar la vida de ciertos alimentos, estabilizando sus colores y pigmentos, y reduciendo la rancidez en los alimentos con altos contenidos grasos (Arizio & Curioni, 2003, Arizio *et al*, 2006). Si a esto se le suma que es un cultivo que luego de secado es no perecedero, constituye una alternativa interesante para el pequeño productor.

En nuestro país el orégano se cultiva a escala comercial para la obtención de hojas y sumidades floríferas que son empleadas como condimento (Xifreda, 1983; Rouquaud & Videla, 2000). El 85% del volumen producido se localiza principalmente en Mendoza, en segundo lugar se encuentran Córdoba y San Juan y, en menor proporción, San Luis, Salta, Jujuy, Misiones y Rio Negro (Alderete & Janin, 2000; Pagliarulo, 2010).

En La Pampa, la superficie dedicada al cultivo de orégano ha sufrido variaciones a través de los años. La producción se limita a parcelas en la localidad de Macachín, 25 de Mayo y al emprendimiento proyectado para áreas irrigadas por el Rio Colorado en Casa de Piedra.

Comparativamente con otros cultivos, el orégano posee poca importancia relativa dentro de la Argentina, tanto en términos económicos como de superficie

cultivada. Pese a esto, durante los últimos años se han organizado en forma ininterrumpida foros y proyectos en los que participan distintas instituciones, tales como universidades, INTA, etc. con el fin de mejorar los distintos aspectos del cultivo, como una salida socioeconómica importante para pequeños productores en zonas bajo riego.

Cabe destacar, que en la actualidad este cultivo en la Argentina, posee mayor demanda que oferta, ya que los países productores de orégano en el mundo son escasos respecto a la demanda mundial (Alderete & Janin, 2000).

Una de las principales problemáticas agronómicas del cultivo de orégano en Argentina es que el orégano tradicionalmente se multiplica por división de matas provenientes de plantaciones comerciales (Romero, 1993). En especies de multiplicación agámica, sin selección, ni saneamiento del material inicial, la continua multiplicación vegetativa conduce al deterioro de los cultivos, debido, entre otras causas, a la acumulación de enfermedades sistémicas (fúngicas, bacterianas y virósicas). Esta situación provoca una progresiva caída en los rendimientos, de la calidad de producción y de la vida útil de la plantación. Esto ha llevado a la desaparición paulatina de algunas variedades y a la necesidad de incorporar otras nuevas con mejor comportamiento sanitario (Arguello *et al*, 2012).

El cultivo *in vitro* de meristemas puede ser usado para producir plantas libres de patógenos a partir de un individuo infectado sistemáticamente (Jacoli, 1978; Fedotina & Krilova 2003) y la propagación *in vitro* representa una técnica alternativa que permite obtener un gran número de plantas (clones) a partir de material de alta calidad sanitaria (Roca & Mroginski 1991; Bima *et al*, 1999; 2000; Goleniowski *et al*, 2003).

La obtención de un protocolo de multiplicación rápida *in vitro* aseguraría la producción de un elevado número de plantas de alta calidad sanitaria en el menor tiempo posible. También posibilitaría estudios posteriores en cuanto a calidad y

cantidad de aceites esenciales, *in vitro* y *ex vitro*, ya que existen antecedentes que mencionan importantes diferencias entre los dos métodos de cultivo. Existen amplios antecedentes en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa en relación al establecimiento y regeneración de plantas de orégano *in vitro* (Bravo *et al*, 2004; Torroba *et al*, 2004; 2005).

Otro problema importante del orégano en el país, es la escasa identificación taxonómica de los materiales vegetales en cultivo, lo que no permite realizar en la actualidad una tipificación de la producción por variedad comercial. En algunos casos suele denominarse a un mismo genotipo con diferentes nombres vulgares, lo que lleva a presuponer que se trata de genotipos distintos. Tal es el caso de *Origanum x appli* denominado vulgarmente como orégano criollo u orégano chileno en Córdoba y orégano peruano en Salta (Bauzá & Pizzolato, 2003; Di Fabio, comunicación personal).

Desde el punto de vista tecnológico productivo, la correcta identificación varietal es fundamental para planes de mejoramiento o de propagación masiva, técnica común en este cultivo.

El análisis del material genético a nivel del ADN es la alternativa más promisoría para complementar con los caracteres morfológicos en los estudios de identificación varietal. Los marcadores moleculares son técnicas que permiten evaluar variaciones en las secuencias de ADN, posibilitando la discriminación de individuos relativamente emparentados. Las ventajas de esta metodología, radica en el alto número de marcadores disponibles en una población, su evaluación independiente del desarrollo de la planta, tiempos de análisis cortos, la identificación directa de genotipos sin la influencia del ambiente y un alto nivel de variabilidad encontrado, en comparación con marcadores morfológicos y bioquímicos (Collard *et al*, 2005). Diferentes especies aromáticas han sido caracterizadas mediante esta metodología: orégano (Klocke *et al*,



2002; Katsiotis *et al*, 2009); menta (Fenwick & Ward, 2001; Shasany *et al*, 2005), albahaca (Vieira *et al*, 2001; 2003), y ajo (Azura Hernández *et al*, 2008), entre otras.

La elección del sistema de marcadores de ADN a utilizar en un programa de mejoramiento vegetal depende de los objetivos del proyecto, de la estructura de la población, de la diversidad genómica de las especies que forman parte de la investigación, del sistema de marcadores disponible, del tiempo requerido para el análisis y del costo final por unidad de información (Staub & Serquen, 1996). Existen diversas técnicas que posibilitan la existencia de un número ilimitado de marcadores moleculares para cubrir la totalidad del genoma de un organismo, permitiendo formar mapas genéticos de numerosas especies vegetales para su posterior estudio, alguna de ellas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, las sondas marcadas y las hibridaciones, entre otras.

La amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos (RAPD) por la técnica PCR, usando oligonucleótidos de secuencia arbitraria de alrededor de diez bases cada uno llamados cebadores o *primers*, es una tecnología ampliamente utilizada para generar información sobre variabilidad a nivel del ADN para las más diversas aplicaciones en el análisis genético de procariotas y eucariotas.

Esta técnica se basa en la síntesis enzimática de copias de un segmento específico de ADN en presencia de una polimerasa de ADN termoestable (Taq). El polimorfismo de las bandas entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del oligonucleótido y por inserción o pérdidas de los fragmentos en estos sitios (Williams *et al*, 1990).

Estos marcadores son dominantes, es decir, no pueden discernir los homocigotos dominantes de los heterocigotos para un segmento particular (Whitkus *et al*, 1994; Backeljau *et al*, 1995)

Entre las principales ventajas de los RAPDs se menciona que amplifican regiones tanto codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación más altos que los RFLPs e isoenzimas (Williams *et al*, 1990; Lynch & Milligan, 1994; Otero *et al*, 1997; Russell *et al*, 1997; Parker *et al*, 1998); es una técnica relativamente fácil que no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN, no requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de *loci* que puede ser examinado es ilimitado y no requiere pruebas radiactivas (Reiter *et al*, 1992; Whitkus *et al*, 1994).

Las aplicaciones más comunes incluyen mapeo genético, estimación de la diversidad genética, sistemática molecular, identificación de genotipos y selección asistida por marcadores en el mejoramiento de plantas y animales domésticos (Ferreira & Grattapaglia, 1996). En aromáticas los marcadores RAPD han servido para determinar diferencias genéticas en poblaciones de menta piperita, cedrón y toronjil (Hinrichsen *et al*, 1999; Fenwick & Ward, 2001); manzanilla (Pirkhezri *et al*, 2010); coriandro (Pareek *et al*, 2011); ajedrea de jardín (*Satureja hortensis*) (Hadian *et al*, 2008); perejil (Vieira *et al*, 1999) y orégano (Klocke *et al*, 2002; Cazares Alonso *et al*, 2010; Tonk *et al*, 2010). También se han utilizado para detectar contaminaciones en el orégano mediterráneo comercial (Marieschi *et al*, 2009; 2010).

Los microsátélites o secuencias simples repetidas (SSR) son regiones del genoma que contienen secuencias repetitivas en tandem de dos a cuatro pares de bases flanqueadas por secuencias de copia única. Estos *loci* se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de

rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90% (Armour *et al*, 1994; Gupta *et al*, 2000). La base genética del polimorfismo detectado en microsatélites se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tándem y, consecuentemente, del tamaño del microsatélite amplificado entre individuos de una especie. El microsatélite amplificado por PCR es sometido a electroforesis en geles de alta resolución, que permiten detectar diferencias de dos, tres o cuatro nucleótidos que corresponden al mínimo polimorfismo de longitud en un microsatélite.

Estos marcadores tienen mayor grado de polimorfismo, segregan de manera mendeliana y son codominantes, la presencia de un solo *locus* genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar, y son selectivamente neutros (Golstein & Pollock, 1997; Vendramin *et al*, 1996).

Para trabajar con SRR es necesario conocer la secuencia de la región a analizar para contar con *primers* específicos que amplifiquen la región repetitiva responsable de la variación observada, que además es homóloga para diferentes especies o incluso géneros (Golstein *et al*, 1996). Esto es porque los mismos, son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí (Vendramin *et al*, 1996), lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo. Novak *et al* (2008), proponen el uso de marcadores SSR para el control de la conservación de recursos genéticos y estudios evolutivos del género *Origanum* y *Lamiaceae* relacionadas. Por su parte, Cazares Alonso *et al* (2010) utilizaron dichos marcadores para la caracterización molecular de diferentes genotipos de orégano.

Los marcadores moleculares conocidos como secuencias repetidas intersimples (ISSR) son relativamente nuevos y su técnica de aplicación es similar a los RAPDs, excepto que en los ISSRs el *primer* es un di ó trinucleotido repetido (Culley & Wolfe, 2001).

Son un tipo de marcador genético que permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Los ISSRs son marcadores dominantes, semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los *primers* de ISSRs consisten en un motivo repetido de di- o trinucleótidos complementario a la secuencia del microsatélite (Zietkiewicz *et al*, 1994; Bornet & Branchard, 2001; Pradeep *et al*, 2002).

Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad debida principalmente a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR. Los polimorfismos que presentan, además de su heredabilidad, permiten aplicarlos en la identificación de individuos, distinción de variedades intraespecíficas, identificación de paternidad y maternidad, mapeo genético, evaluación de diversidad y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones filogenéticas, introgresión e hibridización, y distinción de individuos con origen clonal y sexual (Zietkiewicz *et al*, 1994; Wolfe, 2000; Pradeep *et al*, 2002).

La técnica ISSR se ha utilizado en aromáticas para determinar variabilidad genética en distintas especies pertenecientes al género *Origanum* (Sözen & Poyraz, 2008, Chizhovkina *et al*, 2011); en cilantro (Melo *et al*, 2011); en tomillo (Smolik *et al*, 2009)

Existen numerosos protocolos para la extracción de ADN vegetal. La mayoría de estos protocolos no son adecuados para aromáticas, debido a los altos niveles de compuestos polifenólicos presentes en estas especies. Los polifenoles pueden inhibir el apareamiento de los oligonucleótidos de ADN, o la actividad de las enzimas endonucleasas, interfiriendo en la reacción de PCR (Pandey *et al*, 1996; Rogstad, 2003).

En los últimos años se han publicado una serie de trabajos tendientes a solucionar los problemas mencionados anteriormente (Dorokhov & Klocke 1997; Permigeat *et al*, 1998; Aristóteles & Loguercio-Leitr, 2005; El-Gengaihi *et al*, 2006; Padmalatha & Prasad, 2006; Niu *et al*, 2008; Poyraz *et al*, 2009).

### 3.- HIPOTESIS

-La existencia de polimorfismos entre los genotipos en estudio permitirá diferenciar los distintos cultivares comerciales de orégano, ya que el análisis de ADN, al no estar influenciado por el ambiente, posibilitará independizar las variaciones fenotípicas de las genotípicas.

- La obtención de plantas a través de callos organogénicos y/o embriogénicos o la inducción a múltiples vástagos, son técnicas que permitirán lograr un mayor número de plantas por explanto comparativamente con la multiplicación por estacas uninodales. Esto redundará en menor tiempo, costos y espacio. Además la utilización de explantos provenientes de plantas saneadas por el cultivo de meristemas, hará posible la obtención de ejemplares libres de virus.

### 4.- OBJETIVOS

#### 4.1.- Objetivos Generales:

- Identificar *primers* que revelen polimorfismos entre los distintos genotipos de orégano
- Establecer protocolos de multiplicación agámica *in vitro* tendientes a obtener el mayor número de plantas de alta calidad sanitaria en el menor tiempo posible.

#### 4.2.- Objetivos Particulares:

- Obtener un método de extracción de ADN de calidad, que no interfiera en la amplificación.
- Ajustar el protocolo de amplificación en PCR.
- Seleccionar *primers* que permitan evidenciar polimorfismos con la finalidad de diferenciar los distintos genotipos.

- Ajustar un protocolo de multiplicación rápida *in vitro* mediante la combinación de distintos reguladores de crecimiento, tendiente a obtener múltiples vástagos o callos, y posterior diferenciación de los mismos.

## **5.-MATERIALES Y METODOS**

### **5.1.- Detección de Polimorfismos**

#### **5.1.1.- *Material Vegetal***

Se utilizaron plantas provenientes de diferentes zonas productoras de orégano del país tales como: INTA La Consulta (Mendoza), 25 de Mayo (La Pampa), Traslasierra (Córdoba) y Macachín (La Pampa) identificados morfológicamente como “orégano criollo”, “orégano compacto”, “orégano cordobés”, “orégano chileno”, “orégano mendocino” y “orégano laboratorio”; este último, obtenido *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, UNLPam, a partir de plantas madre de “*orégano criollo*”.

#### **5.1.2.- *Extracción de ADN:***

La extracción del ADN genómico fue llevada a cabo a partir de tejido de hojas frescas y comparando tres métodos propuestos por la bibliografía. Los métodos probados fueron los siguientes:

1. Permingeat (Permingeat *et al*, 1998)
2. CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) (Fütterer *et al*, 1995)
3. Dorokhov (Dorokhov & Klocke, 1997) con modificaciones propuestas por Xun Yai (comunicación personal)

En la tabla 1 se resumen las diferencias en la composición de *buffers* y demás soluciones utilizadas en los distintos protocolos de extracción probados en este trabajo.



**Tabla 1:** Compendio de las soluciones utilizadas por los distintos protocolos de extracción de ADN probados

Soluciones	Permigeat	Fütterer	Dorokhov/Xun Jai
Tris HCl	0.1 M pH 8	0.5 M pH8	0.2 M pH 7.5
EDTA	0.02M	0.5 M pH8	0.025M
NaCl	1.4M	5M	2.5M
CTAB	2%	2%	
Glucosa	0.5M		
Acetato de sodio	3M pH5.2	3M pH5.2	
Acetato de potasio			5M pH 4.8
Cloroformo: isoamílico	24:01:00	24:01:00	
Fenol:Cloroformo:isoamílico		25:24:01	
Isopropanol	c.n	c.n	c.n
Etanol 100%	c.n	c.n	
Etanol 80%	c.n		
Etanol 70%		c.n	
RNAsa	10ug/ml	10mg/ml	1u
SDS			0.50%
PVP		0.1g/g	
Buffer TE	c.n	c.n	
Agua bidestilada estéril			c.n

El paso inicial fue idéntico en los tres protocolos ensayados. El material vegetal fresco se introdujo en microtubos de 2.2 ml y se maceró con una varilla metálica. A continuación se detallan los distintos métodos.

**Método 1.-** Se agregaron, 1.2 ml de *buffer* de extracción a los microtubos conteniendo el material macerado, se homogeneizó e incubó cada tubo a 60°C durante 1 hora, mezclando suavemente.

Transcurrido el tiempo, se colocaron 0.80 ml de cloroformo:isoamil (24:1) generando una emulsión por suave inversión del tubo. Luego, se centrifugó a 8000g por 10 minutos a 4°C.

Superada esta etapa, se transfirió el sobrenadante a un segundo tubo de centrifuga, se agregaron 0.8 volúmenes de isopropanol frío y se mezcló suavemente por

inversión. Acto seguido, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, descartando el sobrenadante obtenido, y resuspendiendo el *pellet* en 200  $\mu$ l de *buffer* TE.

A continuación, se agregaron 10  $\mu$ l/ml de ARNasa y se incubó a 37°C durante toda la noche. Luego, el ADN se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3M, pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol 100%.

Los tubos se mantuvieron a -20°C por 1 hora y se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos descartándose el sobrenadante. El *pellet* obtenido se secó y disolvió en 200 $\mu$ l de TE.

**Método 2.-** Fueron agregados 800  $\mu$ l de *buffer* de extracción (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 700 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% (w/v) CTAB) a cada microtubo y el material vegetal fue homogeneizado.

Las muestras así tratadas fueron posteriormente incubadas en baño de agua a 56°C durante 15 min, y luego enfriadas hasta alcanzar la temperatura ambiente. Luego de esto fueron agregados 800 $\mu$ l de cloroformo:octanol (CO, 24:1) y se mezclaron y centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

La fase acuosa superior fue transferida a otro microtubo de 2.2 ml, cuidando de no disturbar la interfase. Se agregaron 80  $\mu$ l (1/10 vol) de *stock* de CTAB mezclando bien pero suavemente. Luego se agregaron 800  $\mu$ l (1 vol) de CO, se mezcló bien y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

La fase acuosa superior fue transferida a otro microtubo de 2.2 ml, en el que fueron agregados 1000  $\mu$ l (1.2 vol) de *buffer* de precipitación (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% (w/v) CTAB), mezclando suavemente.

Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 20 min y luego centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el *pellet*

resuspendido en 400  $\mu$ l de solución *stock* de ClNa 1M, a la cual fueron agregados 1000  $\mu$ l de etanol puro mezclando bien. Las muestras fueron incubadas en baño de hielo durante 30 min, luego de los cuales se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante fue descartado y el *pellet* lavado con 1000  $\mu$ l de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue nuevamente descartado.

El *pellet* se dejó secar y posteriormente fue disuelto en 50  $\mu$ l de *buffer* TE pH 8.0 (Tris-HCl 1M pH7.5, EDTA 0.5M). Por último se agregó ARNasa en una concentración de 10mg/ml que actuó durante una hora a 37°C

**Método 3.-** Se agregaron 400 $\mu$ l de *buffer* de extracción (20 ml TRIS, 5 ml EDTA, 50 ml ClNa, 0.5 g SDS en 100 ml de agua) y se homogeneizó la mezcla en *vortex*.

Los tubos se sometieron a un baño de agua durante 15 minutos a 65 °C. Superada esta etapa, se agregaron 200 $\mu$ l de acetato de potasio 5 M, y se incubaron las muestras en baño de hielo por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos, se centrifugaron a 13000g por un lapso de 10 minutos. Del sobrenadante obtenido, se extrajeron 500  $\mu$ l (evitando remover el *pellet* del fondo) y se transfirieron a otro *eppendorf*. A éste, se le agregó 1  $\mu$ l de ARNasa y 500  $\mu$ l de isopropanol. Se homogeneizó la mezcla con cuidado y se mantuvo en hielo por 5 minutos.

Transcurrido el tiempo, se centrifugó cada tubo a 13000g por 10 minutos. El sobrenadante fue removido y el *pellet* lavado 2 veces con etanol 70%. Una vez evaporado el etanol, el ADN se disolvió en 50  $\mu$ l de agua bidestilada.

En los tres métodos probados, las muestras obtenidas fueron almacenadas a -20 °C. Se tomó una alícuota de cada una para evaluar la calidad y concentración del ADN

purificado mediante electroforesis en gel de agarosa 1% corriendo el material por 40 minutos a 70V y utilizando un transiluminador UV dual Labnet para su visualización.

### 5.1.3.- Marcadores Moleculares

#### RAPD

Se probaron 8 *primers* de la serie A (Biodynamics) denominados A01, A03, A04, A05, A06, A07, A08 y A09. Las secuencias correspondientes a cada *primer* se encuentran detalladas en la tabla 2.

**Tabla 2:** Secuencia de *primers* RAPD utilizados

PRIMER	SECUENCIA
A01	CCC AAG GTC C
A03	AAG ACC CCT C
A04	CTT CAC CCG A
A05	CAC CAG GTG A
A06	GAG TCT CAG G
A07	CCC GAT TCG G
A08	ACG CAC AAC C
A09	CTA ATG CCG T

La mezcla de la reacción consistió en 2 µl de ADN (1:10), 2 µl de TBE, 1.25 µl de Cl<sub>2</sub>Mg, 0.3 µl de Taq polimerasa, 10 µl de cada *primer*, 2 µl de cada dNTP, con el siguiente programa de ciclado: paso inicial de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, 36 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 36 °C y 1 minuto a 72°C; finalmente 6 minutos de extensión a 72°C. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa 1% preparados con TBE 1X. Las bandas fueron visualizadas con luz UV mediante el uso de redgel (Biotium) en un transiluminador dual Labnet.

## SSR

Se utilizaron los *primers* SSR denominados OR 09, OR 10, OR 12, OR 14, OR 27 y OR 40, diseñados específicamente para *Origanum* por Novak *et al* (2008). Las secuencias correspondientes a cada *primer* se encuentran detalladas en la tabla 3.

**Tabla 3:** Secuencia de los *primers* SSR utilizados

PRIMER	SECUENCIA	SECUENCIA REPETICION
OR09	F: TTGAAGCATTGTTGGAGGTAGATG R: TCCCAACTAGGGAGAAATGTGC	(TTTTTC) <sub>4</sub> (T) <sub>5</sub> (TTTTTC) <sub>1</sub>
OR10	F: TTTGCTCCGACATCTTCAACC R: AGCCTGCTGTGTTTGGATCAG	(ACC) <sub>1</sub> ATC(ACC) <sub>4</sub>
OR12	F: GCCCCTGCAGTGACTCCTAC R: AAAAAGGCTTCGGACTCGATC	(AG) <sub>7</sub> G(AG) <sub>3</sub>
OR14	F: TGTTTGGTGGAAACCGATCC R: AGACGACGAGCTCCAATAACG	(GAT) <sub>8</sub>
OR27	F: TCAGAAACAATGAAGGCCGC R: CCGTACAGGTCAAACACCGG	(CCT) <sub>6</sub>
OR40	F: GCCCAAGGACATCCAATTG R: CAACTGAACACCTCCCACAATG	(GGT) <sub>4</sub> GTT(GGT) <sub>1</sub>

La mezcla de la reacción se formó a partir de 2 µl de ADN (1:10), 0.5 µl de *primers* F y R, 0.9 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de cada dNTP, 2 µl de *buffer*, 0.12µl de Taq polimerasa, con el programa de ciclado siguiente: paso inicial de desnaturalización a 95°C por 15 minutos, 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 59 °C y 2 min a 72°C; finalmente 9 min de extensión a 72°C. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa 4% preparados con TBE 1X. Las bandas fueron visualizadas con luz UV mediante el uso de redgel (Biotium) en un transiluminador dual Labnet.

## ISSR

Se probaron cinco *primers* ISSR con la siguiente denominación: ISSR 3, ISSR 5, ISSR 6, ISSR 7, ISSR 12. Las secuencias correspondientes a cada *primer* se encuentran detalladas en la tabla 4.

La mezcla se preparó con 1.25  $\mu$ l de *buffer* (10X), 1.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 0.25  $\mu$ l de cada DNTP, 0.1  $\mu$ l de Taq polimerasa, 1  $\mu$ l de *primer*, 1.5  $\mu$ l de ADN (1:10) y se sometió al siguiente programa de ciclado: paso inicial de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 93 °C, 1 min a 45 °C y 1 min a 72°C; finalmente 10 min de extensión a 72°C. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa 4% preparados con TBE 1X. Las bandas fueron visualizadas con luz UV mediante el uso de redgel (Biotium) en un transiluminador dual Labnet.

**Tabla 4:** Secuencia de *primers* ISSR utilizados

PRIMER	SECUENCIA
ISSR 3	C(TCC) <sub>5</sub> T
ISSR 5	(AC) <sub>8</sub> G
ISSR 6	(CA) <sub>8</sub> AT
ISSR 7	(CAA) <sub>6</sub>
ISSR 12	(CA) <sub>6</sub> AG

## 5.2.- Multiplicación Agámica *in vitro*

### 5.2.1.-Material Vegetal

Se utilizó el ecotipo criollo, proveniente de un cultivo establecido en la localidad de Macachín, Pcia. La Pampa. La elección de este ecotipo se basó en su buen comportamiento productivo en ensayos comparativos de rendimiento, realizados en la localidad de 25 de Mayo, La Pampa (Mazzola & Bollini, 2013).

Los explantos utilizados variaron según la técnica llevada a cabo: liberación de virus, inducción de callos embriogénicos/organogénicos o múltiples vástagos.

### **5.2.2.-Extracción de Meristemas para Liberación de Virus**

Se utilizaron como explantos meristemas apicales y laterales de material proveniente de campo. La desinfección de los mismos se realizó lavando con agua corriente y luego con etanol 70% por 30 segundos, 15 minutos con hipoclorito de sodio al 6% y, por último, 3 enjuagues en agua estéril.

Para el establecimiento de los explantos se usó como medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) con la mitad de nitrógeno señalado en el protocolo original, con el agregado de sacarosa al 30%, agar al 6%, llevado a pH 5.8 (MS1); añadiéndose luego 0.01 mg/L de ANA (Ácido naftalenacético) y 0.01 mg/l de BAP (6-bencilaminopurina).

Para el repique se utilizaron 0.08 mg/l de ANA y BAP, en partes iguales (Torroba *et al*, 2005).

La siembra se realizó en cámara de flujo laminar, previa esterilización del medio de cultivo en autoclave por 20 minutos a 1 atmósfera de presión. A posteriori, los mismos fueron llevados a cámara climática programada con 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a 26 +/- 1 °C (Figura 1).

### **5.2.3.-Inducción de Callos**

Se utilizaron como explantos trozos de hoja estériles provenientes de plántulas liberadas de virus obtenidas mediante cultivo de meristemas acorde a lo detallado en el punto 5.2.2.

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

a) MS1 + 0.5 mg/l de 2.4-D

b) MS1 + 0.1 mg/l de 2.4-D



**Figura 1:** Cultivo de orégano *in vitro* creciendo en la cámara climática

La siembra se realizó en cámara de flujo laminar, previa esterilización del medio de cultivo en autoclave por 20 minutos a 1 atmósfera de presión. Los mismos, fueron llevados a cámara climática en total oscuridad, a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Se midió el número de plántulas por explanto, y los porcentajes de explantos prósperos, explantos oxidados y explantos contaminados. Se consideró explanto próspero a todo aquel que desarrolló en un individuo completo, sin haber sufrido una contaminación u oxidación tal, que ponga en juego la integridad del mismo.

Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:



$$\% \text{ de explantos prósperos} = \frac{\text{Número de explantos prósperos} \times 100}{\text{Número total de explantos}}$$

$$\% \text{ explantos oxidados} = \frac{\text{Número de explantos oxidados} \times 100}{\text{Número total de explantos}}$$

$$\% \text{ explantos contaminados} = \frac{\text{Número de frascos contaminados} \times 100}{\text{Número total de explantos}}$$

#### **5.2.4.-Inducción de Múltiples Vástagos**

Se utilizaron como explantos estacas uninodales estériles, provenientes de plántulas liberadas de virus mediante cultivo de meristemas acorde a lo detallado en el punto 5.2.2.

Como medio de cultivo se utilizó el MS1, con la adición de 2.5 mg/l de BAP.

La siembra se realizó en cámara de flujo laminar, previa esterilización del medio de cultivo en autoclave por 20 minutos a 1 atmósfera de presión. A posteriori, los mismos, fueron llevados a cámara climática programada con 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a 26 +/- 1°C.

Se midió el número de plántulas por explanto, y los porcentajes de explantos prósperos, explantos oxidados y explantos contaminados utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ de explantos prósperos} = \frac{\text{Número de explantos prósperos} \times 100}{\text{Número de explantos totales}}$$

$$\% \text{ de explantos que no prosperaron} = \frac{\text{Número de explantos no prósperos} \times 100}{\text{Número de explantos totales}}$$

$$\% \text{ explantos oxidados} = \frac{\text{Número de explantos oxidados} \times 100}{\text{Número total de explantos}}$$

$$\% \text{ explantos contaminados} = \frac{\text{Número de explantos contaminados} \times 100}{\text{Número total de explantos}}$$

Los vástagos obtenidos se repicaron *in vitro*, posteriormente se rustificaron en invernáculo y finalmente se llevaron a campo.

**Utilización de ácido ascórbico:**

Debido a que se observó oscurecimiento tisular por oxidación se optó por utilizar 50mg/l de ácido ascórbico, tal como lo propone Azofeifa (2009). El 33.1% de los explantos (147) fueron tratados con ácido ascórbico sumergiéndolos por 30 minutos, previo a la siembra.

**Tabla 5:** Explantos, horas de luz y reguladores de crecimiento utilizados en las distintas técnicas de multiplicación.

	<b>Liberación de virus</b>	<b>Obtención de callos</b>	<b>Múltiples vástagos</b>
<b>Explanto utilizado</b>	Meristemas apicales y laterales	Trozos de hoja	Estacas uninodales
<b>Horas de luz</b>	16	0	16
<b>Regulador de crec.</b>	0.01 mg/L de ANA + 0.01 mg/l de BAP	a-0.1 mg/l de 2.4-D b-0.5 mg/l de 2.4-D	2.5 mg/l de BAP

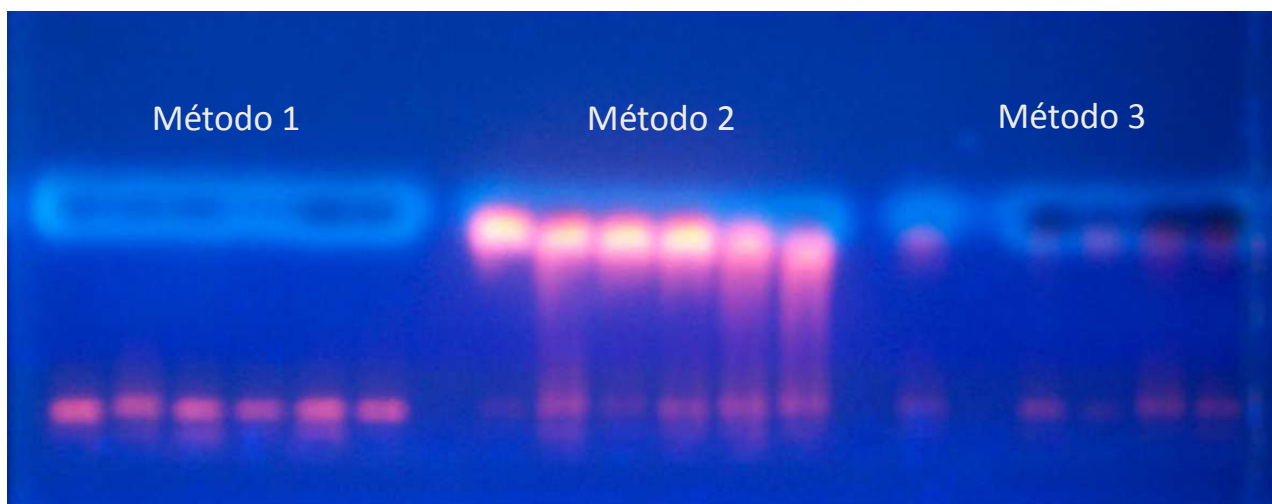
## **6.-RESULTADOS Y DISCUSION**

### **6.1.-Detección de Polimorfismos**

#### **6.1.1.-Extracción de ADN**

Probados los tres protocolos de extracción de ADN, los mejores resultados se obtuvieron con el propuesto por Permigeat *et al* (1998) (Figura 2), quienes incluyen glucosa como agente reductor en la composición del *buffer* de extracción. Dichos autores encontraron una drástica mejora en la calidad del ADN, disminuyendo la contaminación y el amarronamiento por polifenoles. Esto es coincidente con lo que cita la bibliografía en relación a las dificultades de aislar ADN de buena calidad a partir de *Origanum*, debido a su alto contenido de compuestos fenólicos sustancias y polisacáridos. Se sabe que los compuestos fenólicos se oxidan durante la homogeneización del tejido y se unen covalentemente a la proteína y ácidos nucleicos. Esto provoca cambios irreversibles vinculados a la formación de un ADN gelatinoso que no es adecuado para la PCR (Katterman & Shattuck, 1983; Porebski *et al*, 1997).

Una manera de evitar los problemas con polifenoles es congelar el tejido durante o antes de la homogeneización (Katterman & Shattuck, 1983). Alternativamente se pueden utilizar antioxidantes que se pueden incluir durante el procedimiento de extracción de ADN. Los polisacáridos también son importantes contaminantes en muestras de ADN e interfieren con la PCR mediante la inhibición de la actividad de la polimerasa Taq (Fang *et al*, 1992)



**Figura 2:** Patrones electroforéticos de ADN resultado de los distintos métodos de extracción.

### 6.1.2.-Marcadores Moleculares

Los *fingerprints* obtenidos fueron comparados por similitud por inspección visual de los patrones de bandas. Los *fingerprints* fueron considerados altamente similares cuando todas las bandas visibles obtenidas tuvieron la misma distancia de migración. Las variaciones de intensidad y forma en las bandas no se consideraron una diferencia, mientras que la presencia o ausencia de una banda se consideró como polimorfismo.

La tabla 6 resume los resultados obtenidos con los distintos *primers* utilizados en este trabajo.

### **RAPD**

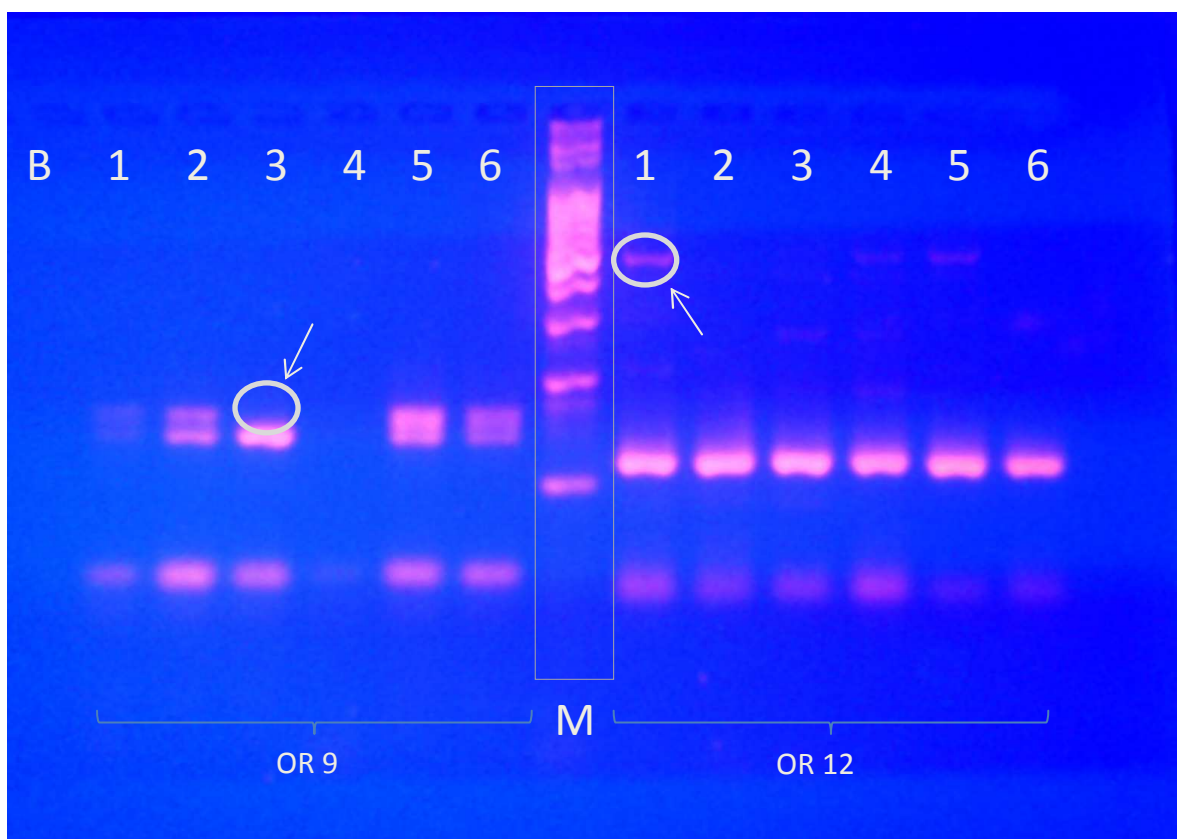
De los 8 *primers* evaluados, 7 no amplificaron o mostraron patrones difusos de amplificación en las condiciones de PCR establecidas y 1 resultó no polimórfico. Si bien dentro de las desventajas de los RAPDs se menciona la alta sensibilidad de la reacción a las condiciones de amplificación y a la calidad y concentración del ADN, las cuales influirían en la reproducibilidad del método (Narváez *et al*, 2000), es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para determinar diferencias genéticas en poblaciones

de aromáticas (Hinrichsen *et al*, 1999; Klocke *et al*, 2002; Tonk *et al*, 2010; Pirkhezri *et al*, 2010; Pareek *et al*, 2011).

### SSR

De los 6 *primers* evaluados, 1 resultó no polimórfico y los 6 restantes polimórficos (el 83% de los *primers* totales). Los *primers* que resultaron polimórficos fueron los identificados como: OR09, OR12, OR14, OR27 y OR40 (Figura 3).

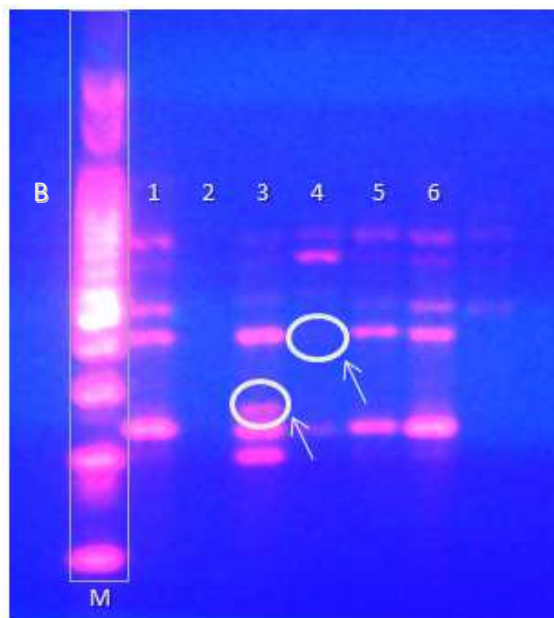
Estos resultados se ajustan a lo esperado ya que los *primers* utilizados fueron diseñados específicamente para *Origanum* a partir del análisis de secuencias expresadas (ESTs) de glándulas de aceites esenciales de dos especies pertenecientes a la familia de las Lamniaceas, *O. majorana* y *O. vulgare* (Novak *et al*, 2008).



**Figura 3:** Marcadores SSR amplificados con los *primers* OR09 y OR12 en los genotipos de *Origanum vulgare* en estudio. **B:** blanco, **1:** orégano cordobés, **2:** orégano chileno, **3:** orégano compacto, **4:** orégano mendocino **5:** orégano criollo, **6:** orégano laboratorio, **M:** marcador de peso molecular.

### ISSR

Se probaron 5 *primers* de los cuales 2 no amplificaron o mostraron patrones difusos de amplificación, 2 resultaron no polimórficos y 1, polimórfico (20% de los *primers*). El único *primer* que resultó polimórfico fue el ISSR 12. (Figura 4).



**Figura 4:** Marcadores ISSR amplificados con el *primer* ISSR12 en los genotipos *Origanum vulgare* en estudio. **B:** blanco, **M:** marcador de peso molecular, **1:** orégano cordobés, **2:** orégano chileno, **3:** orégano compacto, **4:** orégano mendocino **5:** orégano criollo, **6:** orégano laboratorio.

**Tabla 6:** Síntesis del comportamiento de los distintos marcadores utilizados

		No amplificó / patrón difuso	Polimórfico	No polimórfico	
PRIMERS	RAPD	A01	x		
		A03	x		
		A04			x
		A05	x		
		A06	x		
		A07	x		
		A08	x		
		A09	x		
		SSR	OR10		
	OR09			x	
	OR12			x	
	OR14			x	
	OR27			x	
	OR40			x	
	ISSR	ISSR 03	x		
ISSR 05				x	
ISSR 06				x	
ISSR 07		x			
ISSR 12			x		

## 6.2.-Multiplicación Agámica *in-vitro*

### 6.2.1.-Extracción de Meristemas para Liberación de Virus

Con esta técnica, se obtuvieron 24% de explantos contaminados y 76% de plántulas libres de virus. Cabe mencionar que el protocolo utilizado fue el de Torroba *et al* (2005) ya que el objetivo de este trabajo fue la obtención de plántulas de orégano a partir de material saneado.

### 6.2.2-Inducción de Callos

Para ninguna de las concentraciones de 2.4-D utilizadas hubo resultados positivos en cuanto a la inducción de callos. Hubo dos factores que incidieron negativamente, la oxidación y la contaminación. A continuación se muestran los porcentajes obtenidos para ambas concentraciones de 2.4-D probadas:

#### a) 0.5 mg/l de 2.4-D:

$$\frac{0 \text{ explantos prósperos}}{120 \text{ explantos totales}} = 0\% \text{ de explantos prósperos}$$

$$\frac{42 \text{ explantos contaminados}}{120 \text{ explantos totales}} \times 100 = 35\% \text{ explantos contaminados}$$

$$\frac{78 \text{ explantos oxidados}}{120 \text{ explantos totales}} \times 100 = 65\% \text{ explantos oxidados}$$

#### b) 0.1 mg/l de 2.4-D:

$$\frac{0 \text{ explantos prósperos}}{120 \text{ explantos totales}} = 0\% \text{ de explantos prósperos}$$

$$\frac{33 \text{ explantos contaminados}}{120 \text{ explantos totales}} \times 100 = 27.5\% \text{ explantos contaminados}$$

$$\frac{87 \text{ explantos oxidados}}{120 \text{ explantos totales}} \times 100 = 72.5\% \text{ explantos oxidados}$$

La oxidación fue el factor más importante de fracaso. Esto es consecuencia del alto contenido de compuestos fenólicos que poseen este tipo de especies aromáticas (Wogiatzi *et al.*, 2009; Kalemba & Kunicka, 2003). Este fenómeno, se puede definir por la oxidación de compuestos fenólicos, catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO), para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy propensas a reaccionar con el oxígeno, generando daños e incluso la muerte celular (Amiot *et al.* 1996, Bray *et al.* 2000).

En la etapa de establecimiento *in vitro*, muchos explantos empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando exudados al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas (Azofeifa, 2009).

La oxidación de tejidos y la oxidación de fenoles, están influenciadas e interrelacionadas por un número de factores que incluyen genotipo, tipo y época de escisión del explanto, tratamiento de desinfección, medio de cultivo y tipo de regulador de crecimiento utilizado (Thomas & Ravindra, 1997; Tabiyeh *et al.*, 2006; Van Staden *et al.*, 2006; Abdelwahd *et al.*, 2008). Con respecto al genotipo utilizado, es sabido, que especies del género *Origanum* poseen una alta concentración de sustancias fenólicas (Wogiatzi *et al.*, 2009), entre las que se encuentran el timol, el carvacrol y el eugenol (Kalemba & Kunicka 2003).

En relación a la edad del material donante, las plantas muestran diferentes comportamientos según su ontogenia. Así, George (1996) indica que los tejidos juveniles son menos propensos al oscurecimiento que los tejidos adultos. No obstante, en cultivares de *Saccharum ssp.*, el cultivo de explantos tiernos, con menos de 20 a 25 días de formados, presentaron una fuerte oxidación, comparado a los explantos más desarrollados (Aftab & Iqbal, 1999). Según la época del año, Das & Mitra (1990)



encontraron diferencias importantes relativas a la propensión de *Eucalyptus tereticornis* a exudar sustancias fenólicas dependiendo de la época en la que se recolecta el material de la planta donadora. Según la literatura consultada, auxinas y citoquininas son los grupos de reguladores de crecimiento más relacionados con el problema de oscurecimiento de explantos (Azofeifa, 2009). Dentro de las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y en las citoquininas, la 6-bencilaminopurina (BAP). Este último, es el regulador que cuenta con mayor número de referencias que asocian su uso con el problema de oscurecimiento (Azofeifa 2009). A pesar de que el BAP previene o retrasa la degradación de la clorofila (Costa *et al*, 2005; Zavaleta-Mancera *et al*, 2007), su incorporación al medio de cultivo se ha relacionado con decoloraciones y oscurecimiento del explanto (Brondani *et al*, 2011; Martínez Medina *et al*, 2012).

Murashige (1974), señala que en la etapa de establecimiento *in vitro* de los explantos, algunas veces, es necesario agregar al medio de cultivo, un antioxidante que retarde o evite la oxidación, sea del explanto o del medio de cultivo.

Las estrategias para evitar los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos del explanto cultivado *in vitro*, son numerosas. Se puede recurrir a una serie de medidas prácticas, entre ellas: uso de explantos en estado juvenil o de material en crecimiento activo; crecimiento del explanto a baja luminosidad o en oscuridad; crecimiento del explanto a bajas temperaturas; subcultivos frecuentes; cultivo en medio líquido; uso de adsorbentes, en la preparación del explanto para su cultivo o en el medio de cultivo; uso de antioxidantes en la preparación del explanto para su cultivo o en el medio de cultivo; elección del medio de cultivo; cambio del potencial osmótico del medio de cultivo; pH bajo del medio de cultivo e inactivación de enzimas (Azofeifa, 2009).

En segundo lugar, la contaminación actuó como limitante en la obtención de resultados positivos. Esta última se relaciona, en mayor medida, con fallas a nivel operativo: desinfección de material vegetal, manipulación del material y contaminaciones previas en la cámara de flujo laminar. Ciertas bacterias entran al cultivo de tejidos con los explantos iniciales pero otras son claramente introducidas en el laboratorio. Entre los hongos filamentosos contaminantes, los géneros encontrados con mayor frecuencia han sido *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Neurospora*. Las bacterias son consideradas como los contaminantes más comunes y las que ocasionan los problemas más serios, porque pueden ser sistémicas, y su detección es más difícil (Roca & Mroginski, 1991)

### **6.2.3-Múltiples Vástagos**

#### ***Respuesta a la utilización de BAP***

Del total de explantos cultivados (444), sólo el 27.7% resultó próspero. Al igual que en la técnica anterior, la oxidación y la contaminación, incidieron negativamente.

$$\text{Explantos prósperos} = \frac{123 \text{ explantos prósperos}}{444 \text{ explantos totales}} = 27,7\%$$

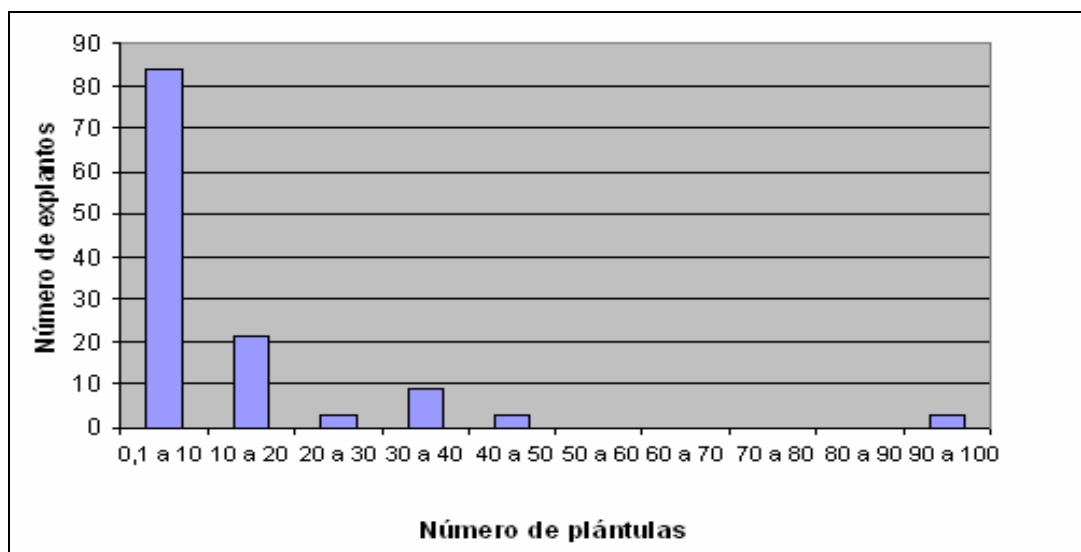
$$\text{Explantos que no prosperaron} = \frac{66 \text{ explantos no prósperos}}{444 \text{ explantos totales}} \times 100 = 14,9\%$$

Respecto a los explantos viables, se encontró una gran diferencia entre las respuestas a la aplicación de BAP (Figura 5 y 6), dificultando la utilización de estudios estadísticos convencionales, debido a que la varianza es demasiado amplia, por lo que los resultados carecerían de representatividad. Por esto, se optó por la confección de una

tabla (Tabla 7) que refleja, a través de rangos, la respuesta de los explantos a la aplicación del regulador de crecimiento.

**Tabla 7:** Diferencias en el número de plántulas obtenidas por explanto en respuesta a la aplicación de BAP.

Nº de plántulas/explanto	0,1 a 10	10 a 20	20 a 30	30 a 40	40 a 50	50 a 60	60 a 70	70 a 80	80 a 90	90 a 100
Nº de explantos	84	21	3	9	3	0	0	0	0	3
% de explantos	68,3	17,1	2,4	7,3	2,4	0	0	0	0	2,4



**Figura 5:** Desuniformidad en las respuestas de los explantos al agregado de 2.5 mg/l de BAP al medio de cultivo.



**Figura 6:** Diferencias obtenidas en las respuestas a la aplicación de BAP.

Las diferencias en cuanto a la respuesta, pueden deberse a la distribución hormonal dentro la misma planta. En consecuencia, el número de vástagos obtenidos, variará dependiendo de la ubicación del explanto en la planta donante. El fenómeno conocido como topófisis, explica la influencia de la posición del explanto en el vegetal, sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* luego del aislamiento (Pierik & Mateo-Sagasta, 1990).

Un ejemplo de topófisis fue descrito por Evers en 1984. Este autor encontró, trabajando con *Pseudotsuga menziesii*, que las yemas iniciales del vástago, aisladas de posiciones bajas en el árbol, mostraron un mejor desarrollo *in vitro* y, que las yemas terminales, crecían más rápidamente que las yemas axilares. Igualmente, si se aíslan los explantos teniendo en cuenta su posición original en la planta, se pueden observar las diferencias como gradientes de regeneración. Esto se ha encontrado en tabaco (Aghion-Prat, 1965), en catáfilos de azucena (Robb, 1957), *Lunaria annua* (Pierik, 1967) y *Brassica carinata* (Jaiswal *et al*, 1987).

Para la obtención de los máximos valores de regeneración, es necesaria la adición de, por lo menos, BAP y/o CIN (cinetina) y/o AG<sub>3</sub> (ácido giberélico), dependiendo del explanto y el genotipo que se cultiva. Cuando se utilizaron como explanto yemas axilares, el número de vástagos por explantos fue superior cuando al medio se adicionó solamente 1mg/l de BAP (Molina *et al*, 2013).

En la micropropagación de *Origanum acutidens*, utilizando como explanto estacas uninodales y MS como medio de cultivo, con el agregado de 1.8 mg/l de BAP y 0.2 mg/l de ANA, se obtuvo la máxima tasa de regeneración de vástagos con 9.31 vástagos/explanto (Yildirim, 2013). Con el cultivo de segmentos uninodales, en diferentes clones de *Camellia sinensis*, los mejores resultados fueron obtenidos en el medio ½ MS + 1mg/l de BAP.

Se realizaron uno, dos o tres repiques dependiendo del número de vástagos alcanzado por explanto. Se esperaba una relación directa entre el número de repiques y el total de vástagos obtenidos por explanto. Al subdividir los vástagos, la respuesta fue claramente desuniforme, impidiendo estandarizar el número de repiques, dificultando un seguimiento que permitiera la obtención de conclusiones. El tiempo transcurrido entre repiques osciló entre los 60-90 días, dependiendo del estado de desarrollo de los vástagos.

***Respuesta a la utilización de ácido ascórbico:***

a) Sin ácido ascórbico:

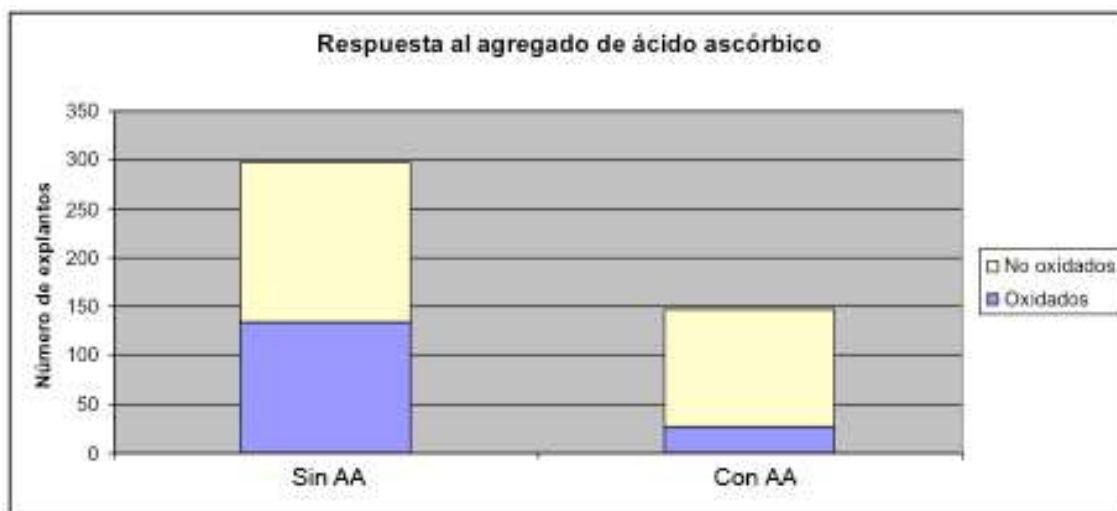
De 297 explantos, 135 resultaron oxidados, lo que indica un 45.5% de oxidación sin la utilización del antioxidante

b) Con ácido ascórbico:

De 147 explantos tratados con ácido ascórbico, 27 se oxidaron, lo que equivale al 18.4% de las muestras.

Esto es acorde a lo que indica la bibliografía. La utilización de antioxidantes como el AA (ácido ascórbico) en el medio de cultivo o con lavados del explanto previos a la siembra, ayuda a disminuir el problema en *Nicotiana tabacum* (Joy IV *et al*, 1988). Un agente antioxidante es un compuesto que inhibe o demora la oxidación de un sustrato propenso al fenómeno, evitando las reacciones en cascada de los radicales libres (Matkowski, 2008).

En la Figura 7 se muestra el número de explantos oxidados en los tratamientos con y sin agregado de ácido ascórbico.



**Figura 7:** Números de explantos oxidados con y sin agregado de ácido ascórbico



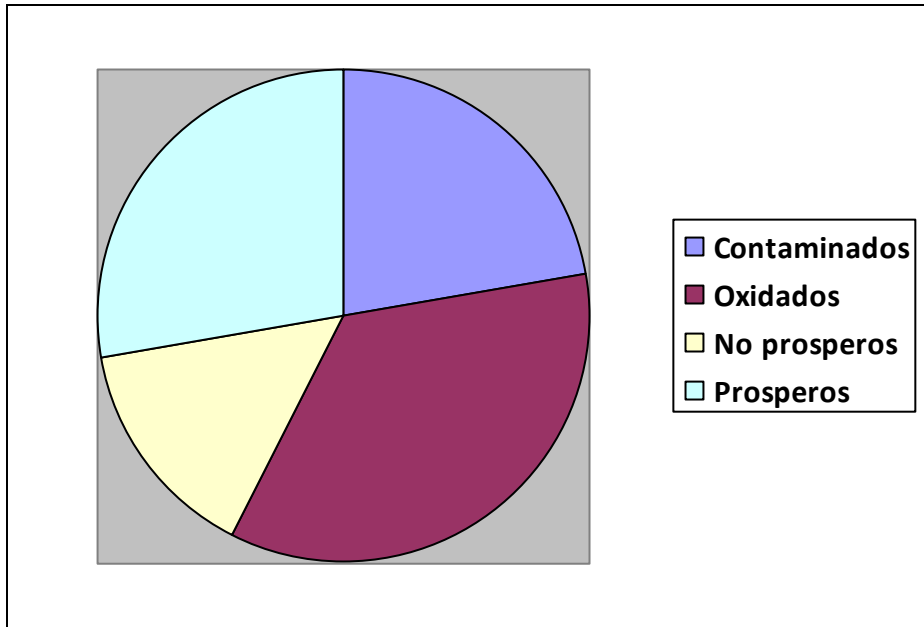
**Figura 8:** Plántulas de *Origanum vulgare* creciendo *in vitro* mostrando una oxidación incipiente

### **Contaminación**

El porcentaje de contaminación fue de 22.3%, valor inferior al obtenido en inducción de callos. La bibliografía general para esta técnica menciona contaminaciones normales entre un 10-20%.

$$\frac{99 \text{ explantos contaminados}}{444 \text{ explantos totales}} \times 100 = 22.3\% \text{ explantos contaminados}$$

En la Figura 9 se representan gráficamente los resultados finales obtenidos con la técnica de múltiples vástagos.



**Figura 9:** Representación gráfica porcentual de los resultados obtenidos utilizando la técnica de obtención de múltiples vástagos.

## **7.-CONCLUSIONES**

### **7.1.-Detección de Polimorfismos**

A partir de las diferentes técnicas probadas, se concluye que la utilización de marcadores SSR fue la que permitió, en mayor medida, la detección de polimorfismos entre las variedades en estudio, a partir de la visualización en geles de agarosa. La utilización de mayor número de *primers* sería aconsejable para encontrar suficiente cantidad de *loci* polimórficos que permitan diferenciar los distintos genotipos estudiados.

Asimismo se recomienda el uso de alguna otra técnica de visualización como la electroforesis en geles de secuenciación de acrilamida que permita una mejor definición y una mayor separación entre bandas que haga posible la identificación de los posibles polimorfismos entre los genotipos estudiados.

### **7.2.-Multiplicación Agámica *in vitro***

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye, que es posible la obtención de plántulas de orégano criollo utilizando la técnica de múltiples vástagos para obtener mayor número de ejemplares en menor tiempo posible, comparado con la utilización de la técnica que resulta de obtener una planta por estaca uninodal.

El ajuste de esta tecnología, tendiente a evitar tanto las oxidaciones como la desuniformidad en las respuestas a la citoquinina BAP, permitirá obtener los resultados deseables para una futura aplicación



## 8.-BIBLIOGRAFIA:

- Abdelwahd R., Hakam N., Labhilili M., Udupa S. 2008. *Use of and adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean*. African Journal of Biotechnology 7: 997-1002
- Aftab F., Iqbal J. 1999. *Plant regeneration from protoplasts derived from cell suspension of adventive somatic embryos in sugarcane (Saccharum spp. Hybrid cv. CoL-54 and cv. CP-43/33)* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 155-162
- Aghion-Prat D. 1965. *Floral meristem-organizing gradient in tobacco items*. Nature 5002: 1211
- Alderete J. & A. Janín. 2000. Orégano. Alimentos Argentinos 15: 47-50.
- Amiot M., Forget F., Goupy P. 1996. *Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products*. Herba-Polonica 42: 237-247
- Arguello J.A., Núñez S.B., Davidenco V., Suárez D.A., Seisedos L., Baigorria M.C., La Porta N., Ruiz G., Yossen V. 2012. *Sistema de producción y cadena de valor del cultivo de Orégano (Origanum sp.) en la Provincia de Córdoba (Argentina)* Pyton 81: 23-34
- Aristóteles G., C Loguercio-Leitr. 2005. *DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods*. Biotemas 18: 19-32
- Arizio O., Curioni A. 2003. *Documento 5: Productos aromáticos y medicinales*. Estudio 1. EG. 33.7. Estudios Agroalimentarios. Componente A: Fortalezas y debilidades del sector agroalimentario. Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola (IICA)-CEPAL. 131 P.
- Arizio O., Curioni A., Sánchez Vallduvi G., García M. 2006. *El cultivo de Orégano (Origanum sp.)*. En Curioni A. & Arizio O. (Eds.) Plantas Aromáticas y Medicinales. Labiadas. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina, pp. 57-92
- Armour J.A., Neumann R., Gobert S., Jeffreys A.J. 1994. *Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection*. Human Molecular Genetics 3: 599-565
- Azofeifa, A. 2009. *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantos cultivados in vitro*. Agronomía mesoamericana 20 (1:153-175).
- Azuara Hernández L, Silos Espino H, Perales Segovia C, Gómez Leyna J.F., Alpuche Solís A.G., Macías Valdez L.M. 2008. *Características morfológicas y genéticas permiten la identificación de cultivares de ajo en las regiones Norte y Central de México*. Phytón 77: 81-91
- Backeljau T., De Bruyn L., De Wolf H., Jordaens K., Van Dongen S., Verhagen R., Winnepenicky B. 1995. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Parsimony Methods*. Cladistics 11: 119-130
- Bauzá, P; Pizzolato R. 2003. *Oreganeros de San Carlos. Aportes para una diversificación comercial*. XXVI Congreso Argentino de Horticultura.
- Bima P.; Goleniowski M.; Alemanno G.; Flamarique M. 1999. *Micropropagación de orégano Mendocino (Origanum x applii) a partir de meristemas apicales*. Confederación Latinoamericana de Horticultura. Asaho-Colhor (ed.). Revista de la Asociación de Horticultura Argentina. 19 (46)
- Bima P., C. Flamarique y M. Goleniowski 2000. *Efectos de la fuente nitrogenada sobre el crecimiento in vitro de Origanum vulgare x applii*. Actas del XXXIII Cong. Arg. de Fisiología Vegetal. Río Cuarto. p. 186.

- Bornet B., Branchard M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215
- Bravo S., A. Melis; M.C. Torroba. 2004. *Efecto de la sacarosa y las condiciones de cultivo sobre el crecimiento in vitro de orégano criollo (Origanum x applii D. Boros)*. XXV Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Santa Rosa. La Pampa. Pag 121
- Bray E., Bailey-Serres J., Werwiltynk E. 2000. *Responses to abiotic stresses*. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones R. eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1158-1203
- Brondani G.E., Dutra L.F., Wendling I., Grossi F., Hansel F.A., Araujo M.A. 2011. *Micropropagation of an Eucalyptus hybrid (Eucalyptus benthamii x Eucalyptus dunni)*. *Acta Scientiarum Agronomy Maringá* 33(4): 655-663
- Budavari S. 1989. *The Merck index. An encyclopedia of chemical, drugs and biologicals*. Merck &Co. Inc. Rahway, N. Jersey. EE. UU.
- Cazares Alonso N. P., Villavicencio Gutiérrez E.E., Verde Star J., Pecina Quintero V., Almeyda Leon I.H. 2010. *Caracterización molecular y producción de aceites esenciales de diferentes genotipos de orégano (Lippia sp.)*. *Rev. Mex. Cien. For.* Vol. 1 (1): 85-94
- Chizhovkina Ye.S., Bel'tyukova N.N., Boronnikova S.V. 2011. *Polimorfismos en el ADN del Origanum Vulgare L. en la región de Perm*. Congreso de grado y postgrado de biología. Rusia. 185-187
- Collard B.C.Y., Collard J., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. 2005. *An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts*. *Euphytica*. 142: 169-196
- Collura A. & Storti N. 1971. *Manual para el cultivo de plantas medicinales*. Colección Agropecuaria INTA No. 18
- Costa M.L., Civello P.M., Cháves A.R., Martínez G.A. 2005. *Efecto of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (Brassica oleracea L.) at 20°C*. *Postharvest Biology and Technology* 35: 191-199
- Culley M.T., Wolfe A.D. 2001. *Population genetic structure of the cleistogamous plant species Viola pubescens Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers*. *Heredity* 86: 545-556
- Das T., Mintra G. 1990. *Micropropagation of Eucalyptus tereticornis Smith*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 22: 95-103
- Dorokhov, B.D. & E. Klocke 1997. *A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes*. *Russ. J of genetics* 33: 358-365
- El-Gengaihi, S. Taha H.S., Kamel A.M. 2006. *In vivo and in vitro comparative studies of Origanum species*. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, Vol.4 (3-4), 127-134.
- Evers P.W. 1984. *Growth and morphogenesis of shoot initials of Douglas fir, Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco, in vitro*. Diss., Landbouwhogeschool te Wageningen
- Fang G., Hammar S., Rebecca R. 1992. *A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA*. *BioTechniques* 13:52-56
- Fedotina & Krilova 2003. *Micropropagation of oregano (Origanum vulgare x applii) from meristem tips*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 39: 125-128

- Fenwick A.L., Ward S.M., 2001. *Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers for Cultivar Identification in Mint*. Hort Science, Vol 36 (4): 761-764
- Ferreira M.E., Grattapaglia D. 1996. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. EMBRAPA
- Fütterer J., Gisel A., Iglesias V., Klöti A., Kost B., Mittelsten Scheid O., Neuhaus-Url G., Schrott M., Shillito R., Spangenberg G., Wang Z.Y. 1995. *Standard molecular techniques for the analysis of transgenic plants*. In: Gene transfer to plants. Potrykus I., Spangenberg G. (eds), Springer Lab Manual, capítulo 25, 215-263
- George E. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. Part 2. In: Practice, 2ed. Exegenetics Limited. England. 1361 p
- Goldstein D.B., Zhivotovsky L.A., Nayar K., Linares A.R., Cavalli-Sforza L.L., Feldman M.W. 1996. *Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci-implications for the history of human Y-chromosome*. Mol Biol Evol. 13:1213-1218
- Goldstein D.B., Pollock D.D. 1997. *Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference*. Journal of Heredity 88 (5): 335-342
- Goleniowski, M.E.; Flamarique, C.; Bima, P. 2003. *Micropropagation of oregano (Origanum vulgare x applii) from meristem tips*. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 39: 125–128
- Gupta P.K.; Varshney R.K 2000. *The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat*. Euphytica. 113: 163-185
- Hadian J., Tabatabaei S.M.F., Naghavi M.R., Jamzad Z., Ramak-Masoumi T. 2008. *Genetic Diversity of Iranian accessions of Satureja hortensis L. based on horticultural traits and RADP markers*. Scientia Horticulturae. Vol 115(2): 196-202
- Hinrichsen P., Délano G. Narváez C., 1999. *Diversidad genética en poblaciones de menta, cedrón y Melissa determinadas mediante RAPD*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA La Platina.
- Jacoli, 1978. *Micropropagation of oregano (Origanum vulgare×applii) from meristem tips*. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. Vol. 39 (2): 125-128
- Jaiswal S.K., Bhojwani S.S., Bhatnagar S.P. 1987. *In vitro regeneration potentialities of seedling explants of Brassica carinata A. Braun*. Phytomorphology 37: 235-241
- Joy IV R.W., Patel K.R., Thorpe T.A. 1988. *Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco callus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 13: 219-228
- Kalemba D., Kunica A. 2003. *Antibacterial and antifungal properties of essential oils*. Current medicinal Chemistry 10: 813-829
- 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*. Scientia Horticulturae 121 (2009) 103–108
- Katterman F.R., Shattuck V.I. 1983. *An effective method of DNA isolation from the mature leaves of Gossypium species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins*. Prep Biochem.13(4): 347-59
- Klocke E., Langbehn J., Grewe C., Pank F., 2002. *DNA fingerprinting by RAPD on Origanum majorana L*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants Vol 9 (2-3): 171-176

- Lynch M., Milligan B.G. 1994. *Analysis of population genetic structure with RAPD markers*. *Molecular Ecology* 3:91-99
- Maguna F., Romero A., Garro O., Okulik N., 2006. *Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides*. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: E-057
- Marieschi M., Torelli A., Poli F., Sacchetti G., Bruni R., 2009. *RAPD-Based Method for the Quality Control of Mediterranean Oregano and Its Contribution to Pharmacognostic Techniques*. *J. Agric. Food Chem.* 57 (5): 1835–1840
- Marieschi M., Torelli A., Poli F., Bianchi A., Bruni R. 2010. *Quality control of commercial Mediterranean oregano: Development of SCAR markers for the detection of the adulterants Cistus incanus L., Rubus caesius L. and Rhus coriaria L.* *Food Control* 21: 998–1003
- Martínez Medina S.J., Gómez Kosky R., Posada Pérez L., Barbón Rodríguez R., Acosta Suárez M., Reyes Vega M., Pérez Benitez M., Torres Rodríguez D., Pons Corona M., La O Cardenas M., Aguilera Chávez A., Tejeda González M. 2012. *Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas in vitro de Sorghum bicolor para la formación de callos*. *Revista Colombiana de biotecnología* 14 (2): 101-110
- Matkowski A 2008. *Plant in vitro culture for the production of antioxidants. A review*. *Biotechnol Adv* 26: 548-560
- Mazzola J.O., Bollini J.A. 2013. *Evaluación de distintos ecotipos de origanum sp.* Tesis de Grado. Biblioteca Facultad de Agronomía, UNLPam
- Melo R., Resende L. V., Menezes D., Beck A.P., Da Costa J.C., Coutinho A., Do Nascimento A.V., 2011. *Genetic similarity between coriander genotypes using ISSR markers*. *Horticultura Brasileira* 29
- Molina S.P., Pérez M.L., Rey H.Y., Mroginski L.A. 2013. *Regeneración de plantas de té (Camellia sinensis) por cultivo in vitro de meristemas, yemas axilares y segmentos uninodales*. *Rev. FCA UNCUYO*. 45 (1): 127-134
- Murashige, T. 1974. *Plant propagation through tissue culture*. *Annual Review of Plant Physiology* 25:135-166
- Murashige T. & F. Skoog. 1962. *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Narváez R. C., Valenzuela B. J., Muñoz Sch. C., Hinrichsen R. P. 2000. *Comparación de RAPD y AFLP como métodos de identificación genética de vid basados en el estudio de fragmentos genómicos anónimos*. *Agricultura Técnica*, 60(4): 320-340
- Niu Ch., Kebede H., Auld D., Woodward J., Burow G., Wright R.. 2008. *A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment*. *African Journal of Biotechnology* 7: 2818-2822
- Novak J., Lukas B, Bolzer K, Grausgruber-Gröger S, Degenhardt J. 2008. *Identification and characterization of simple sequence repeat markers from a glandular Origanum vulgare expressed sequence tag*. *Mol Ecol Resour.* 8(3): 599-601
- Otero A.A., De la Cruz M., Oyama K. 1997. *El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas*. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 60:85-117
- Padmalatha K, Prasad M.N.V 2005. *Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India*. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 5 (3): 230-234
- Pagliarulo, C. 2010. *Agro: 3 productos en pleno auge*. *Diario Uno*. Mendoza, 17 de octubre de 2010

- Pandey R.N., Adams R.P., Flournoy L.E. 1996. *Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides*. Plant Mol Biol Report. 14:17-22
- Pareek N., Jakhar M.L., Malik C. P. 2011. *Analysis of genetic diversity in coriander (Coriandrum sativum L.) varieties using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers*. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 1 (4): 206-215
- Parker P.G., Snow A.A., Schug M.D, Booton G.C., Fuerst P.A. 1998. *What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker*. Ecology. 79:361-382
- Permingeat H., Romagnoli M.; Vallejos R. 1998. *A simple method for isolating high yield and Quality DNA from Cotton (Gossypium hirsutum L.) leaves*. Plant Molecular Biology Reporter 16: 1-6
- Pierik, R.L.M. 1967. *Regeneration, vernalization and flowering in Lunaria annua L. in vivo and in vitro*. Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland, 67-6, Publication 295, Laboratorium voor Tuinbouwplantenteel
- Pierik R.L.M., Mateo-Sagasta L.A. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Mundi-Prensa, Madrid. 326 p.
- Pirkhezri M., Hassani M.E., Hadian J., 2010. *Genetic Diversity in Different Populations of Matricaria chamomilla L. growing in Southwest of Iran, Based on Morphological and RAPD Markers*. Reserch Journal of Medicinal Plant, 4:1-13
- Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. 1997. *Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component*. Plant Molecular Biology Reporter 15: 8-15
- Poyraz I., Sözen E., Arslanyolu M., 2009. *Isolation of Quality Total RNA from the Aromatic Plant Origanum onites*. Z. Naturforsch. 65c, 266-270
- Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E. A., 2002. *Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding*. Euphytica 128: 9–17
- Reiter R.S., Rafalski, J.A. Tingey S.V., Scolnick P.A 1992. *Global and local genome mapping in Arabidopsis thaliana by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1477-1481
- Robb S. 1957. *The culture of excised tissue from bulb scales of Lilium speciosum Thunb*. J Exp. Bot 8: 348-352
- Roca W.M. & Mroginski L.A. 1991. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical)
- Rogstad SH.2003. *Plant DNA extraction using silica*. Plant Mol. Biol. Rep. 21. 463a-463g
- Romero, I. 1993. *Orégano*. Tras la huella. 2: 36–38. INTA, Villa Dolores
- Rouquaud E. y M. Videla. 2000. *Oréganos de Mendoza (Argentina)*. Rev. Fac. Ciencias Agrarias 32: 23–32.
- Russell J.R., Fuller J.D., Macaulay M., Hatz BG., Jahoor A., Powell W., Waugh R. 1997. *Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs*. Theor. Appl. Genet. 95:714-722
- Shasany A. K., Darokar M. P., Dhawan S., Gupta A. K., Gupta S., Shukla A. K., Patra N. K., Khanuja S.P.S. 2005. *Use of RAPD and AFLP Markers to Identify Inter- and Intraspecific Hybrids of Mentha*. Journal of Heredity 96: 542-549
- Smolik M., Jadczyk D., Korzeniewska S. 2009. *Assessment of Morphological and Genetic Variability in some Thymus Accessions Using Molecular Markers*. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 37 (2): 234-240

- Staub J.E., Serquen F.C. 1996. *Genetic marker, map construction, and their application in plant breeding*. HortScience. 31:729-741
- Sözen E., Poyraz I., 2008. *Rapid and High Quality DNA Isolation from Origanum onites for RAPD and ISSR Analysis*. Z. Naturforsch. 595-598
- Tabiyeh D., Bernard F., Shacker H. 2006. *Investigation of glutathione, salicylic and GA<sub>3</sub> effects on browning in pistacia vera shoot tips culture*. Acta Horticulturae 726: 201-204
- Thomas P., Ravindra M. 1997. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factor, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. Journal of Horticultural Science 72: 713-722
- Tonk F.A., Yüce S., Bayram E., Akcali Giachino R.R., Sönmez C., Telci I., Furan M.A. 2010. *Chemical and genetic variability of selected Turkish oregano (Origanum onites L.) clones*. Plant Syst Evol 288:157–165
- Torroba M.del C., Bravo S.L., AGUILERA L.G. 2004. *Micropropagación de Orégano*. Jornadas de Ciencia y Técnica ISSN 1668-8430
- Torroba M.del C.; Bravo S.L.; Aguilera L.G.; Paccapelo H. 2005. *Establecimiento y regeneración in vitro de plantas de Origanum x majoricum Cambess (orégano)*. Aceptado para su publicación en el VI Simposio de Biotecnología REDBIO Argentina, I Congreso Internacional de Biotecnología–Grupo Bio, I Encuentro Trinacional REDBIO Chile/Argentina/ Uruguay
- Van Staden J., Fennell C., Taylor N. 2006. *Plant stress in vitro: the role of phytohormones*. Acta Horticulturae 725: 55-62
- Vendramin G.G., Lellil L., Rossi P, Morgante M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. Molecular Ecology 5: 595–598
- Vieira R.F., Grayer R.J., Paton A., Simon J.E. 1999. *Genetic diversity of Ocimum gratissimum L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers*. Biochemical Systematics and Ecology 29: 287-304
- Vieira R.F.; Grayer R.J.; Paton A.; Simon J.E. 2001. *Genetic diversity of Ocimum gratissimum L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers*. Biochemical Systematics and Ecology 29: 287-304
- Vieira, R.F.; Goldsbrough, P.; Simon J.E. 2003. *Genetic diversity of basil (Ocimum spp.) based on RAPD markers*. Journal of the American Society for Horticultural Science 128: 94-99
- Whitkus R., J. Doebley y J.F. Wendel. 1994. *Nuclear DNA markers in systematics and evolution*. Klumer Academic Publishers, Netherlands. pp. 116-141
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535
- Wogiatzi E., Gougoulas N., Papachatzis A., Vagelas I., Chouliaras N. 2009. *Chemical composition and antimicrobial effects of Greek Origanum species essential oil*. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 23: 1322–1324
- Wolfe A., 2000. *ISSR Resource Website*. <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>
- Xifreda C. 1983. *Sobre oréganos cultivados en Argentina*. Kurtziana 16: 133-148
- Yildirim, M. U., 2013. *Micropropagation of Origanum acutidens (HAND.-MAZZ.) IETSWAART Using Stem Node Explants*. The Scientific World Journal Vol. 2013. Article ID 276464

- Zavaleta-Mancera H., López-Delgado H., Loza-Tavera H., Mora-Herrera M., Trevilla-García C., Vargas-Suárez M., Ougham H. 2007. *Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence*. *Journal of Plant Physiology* 164: 1572-1582
- Zietkiewicz E., Rafalski a., Labuda D. 1994. *Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification*. *Genomics* 20: 176-183