

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies
nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae) con
potencial fitomedicinal**

por

Lic. Jimena Guajardo

Director: Dr. Nicolás Nagahama

Co-directora: Dra. Cecilia Ezcurra

Estación Experimental Agroforestal INTA Esquel



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2023

COMISION ASESORA

Dr. Jorge Chiapella, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA)- Centro Científico Tecnológico CONICET - Patagonia Norte (CCT Patagonia Norte)

Dr. Héctor Keller, Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE)
Centro Científico Tecnológico CONICET - Nordeste (CCT Nordeste)

Dr. Nicolás Nagahama, Estación Experimental Agroforestal INTA Esquel
Centro Científico Tecnológico CONICET - Patagonia Norte (CCT Patagonia Norte)

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

A Eloisa y Daniel

A mi familia, por el amor incondicional y apoyo constante durante todos estos años.

A mi director, por la paciencia, acompañamiento durante el trabajo y por las ayudas fuera del ámbito laboral.

A mi co-directora por su comprensión y buena predisposición. Su experiencia y trayectoria fueron inspiradoras.

A mis asesores y evaluadores, sus sugerencias y comentarios contribuyeron a la calidad de este trabajo.

A la Dra. Manifesto por su ayuda y amabilidad en el laboratorio.

A mis amistades, que supieron acompañarme en todo momento con amor y dándome fuerzas cuando me sentía abatida. Especialmente a Selva por estar conmigo aún a la distancia, por saber qué decir cuando me quedo sin palabras, por su hospitalidad y buen corazón; y a mi Anita querida, cuyo amor cruza océanos y volcanes.

A Gise E. y Estefi O. por encontrarnos y acompañarnos amorosamente en las últimas instancias de este proceso.

A Luli M. y a Agus R. por los momentos de escucha y contención, tanto en Córdoba como en Esquel.

A Luz, Rosi M. y Fre por las catarsis compartidas y las risas de siempre.

A Nati L. por todas las tardes de escritura juntas, los mates, los sueños y proyectos compartidos.

A Ceci C., su presencia fue un rayito de luz cálida dentro del universo intaiano.

A Juan A. por su compañerismo y los hermosos momentos vividos compartiendo oficina.

A mis compañeros de la EEA INTA Esquel, por alentarme a seguir, por escucharme, por compartir momentos, mates y trabajos, especialmente a Victor M.

Al personal y docentes de la UNPSJB, por su buena predisposición para utilizar el laboratorio de Química.

Al personal del Doctorado de la UNC por el vínculo que creamos en estos años y la buena onda de nuestras idas y venidas virtuales.

Al personal del CIRN del INTA Castelar, por recibirme y ayudarme a sobrellevar de la mejor manera mis días en el laboratorio de Marcadores Moleculares.

A todas las personas que me acompañaron a subir los cerros más lindos y compartieron conmigo las maravillas botánicas de altura. A quienes creyeron en mí, cuando yo no podía hacerlo.

**Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*
(Valerianoideae, Caprifoliaceae)**
ÍNDICE

Índice de tablas.....	1
Índice de figuras.....	2
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Introducción general.....	6
Compuestos secundarios en <i>Valeriana</i>	7
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos.....	13
Capítulo I: Estudios morfológicos.....	14
Resumen.....	15
Introducción.....	16
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos.....	17
Materiales y métodos.....	17
Material vegetal.....	17
Base de datos morfológicos.....	20
Análisis estadísticos.....	28
Resultados.....	29
<i>Valeriana moyanoi</i>	29
<i>Valeriana philippiana</i>	51
Discusión.....	64
Conclusiones.....	68
Capítulo II: Estudios químicos.....	69
Resumen.....	70
Introducción.....	70
Factores que influyen en la síntesis de productos naturales.....	73
Radicales libres y antioxidantes.....	74
Compuestos fenólicos.....	75
Las plantas como fuentes de antioxidantes.....	76
Objetivo general:.....	77
Objetivos específicos:.....	78
Materiales y métodos.....	78
Área de estudio y material vegetal.....	78

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*
(Valerianoideae, Caprifoliaceae)
ÍNDICE

Equipos y reactivos	82
Preparación de extractos.....	83
Determinación del contenido de fenoles totales	83
Preparación de la curva de calibración con ácido gálico.....	84
Determinación de la actividad antioxidante	86
Preparación de la curva de calibración con ácido ascórbico (Vitamina C).....	87
Análisis estadísticos	88
Resultados	90
Comparación de contenido de fenoles y actividad antioxidante entre especies	90
Contenido de fenoles totales en <i>Valeriana moyanoi</i>	92
Variabilidad intra-poblacional del contenido de fenoles totales en <i>Valeriana moyanoi</i>	93
Actividad antioxidante en <i>Valeriana moyanoi</i>	95
Variabilidad de actividad antioxidante a nivel intra-poblacional en <i>Valeriana moyanoi</i>	96
Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en las poblaciones de <i>Valeriana moyanoi</i>	98
Contenido de fenoles totales en <i>Valeriana philippiana</i>	98
Variabilidad intra-poblacional del contenido de fenoles totales en <i>Valeriana philippiana</i>	99
Actividad antioxidante en <i>Valeriana philippiana</i>	102
Variabilidad de actividad antioxidante a nivel intra-poblacional en <i>Valeriana philippiana</i>	103
Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en <i>Valeriana philippiana</i>	105
Variabilidad fitoquímica según estadio fenológico en <i>Valeriana moyanoi</i>	106
Variabilidad fitoquímica según estadio fenológico en <i>Valeriana philippiana</i>	108
Discusión.....	109
Conclusiones	114
Capítulo III: Estudios genéticos	115
Resumen.....	116
Introducción	116
Objetivo general:.....	119
Materiales y métodos	119
Material vegetal.....	119
Protocolo de extracción de ADN	121
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	122
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	122
Análisis estadístico	124

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*
(Valerianoideae, Caprifoliaceae)
ÍNDICE

Resultados	124
Comparación entre especies	124
Estructura poblacional y diversidad genética en <i>Valeriana moyanoi</i>	124
Análisis multivariados con las poblaciones de <i>Valeriana moyanoi</i>	126
Estructura poblacional y diversidad genética en <i>Valeriana philippiana</i>	129
Análisis multivariados con las poblaciones de <i>Valeriana philippiana</i>	131
Discusión.....	134
Conclusiones	136
Conclusiones generales.....	137
Estudios morfológicos.....	139
Estudios químicos	140
Estudios genéticos.....	141
Bibliografía.....	144

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I: ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

TABLA 1. DATOS GEOGRÁFICOS DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS POR ESPECIE.	18
TABLA 2. CARACTERES MORFOLÓGICOS SELECCIONADOS PARA <i>V. MOYANOI</i>	22
TABLA 3. CARACTERES MORFOLÓGICOS SELECCIONADOS PARA <i>V. PHILIPPIANA</i>	25
TABLA 4. PUBESCENCIA EN LAS HOJAS DE LAS POBLACIONES DE <i>V. MOYANOI</i>	30
TABLA 5. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES-AUTOVECTORES 1, 2 Y 3 (<i>V. MOYANOI</i>).....	38
TABLA 6. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL- FUNCIONES DISCRIMINANTES (<i>V. MOYANOI</i>).....	42
TABLA 7. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES- MORFOTIPO FLORES AMARILLAS.....	46
TABLA 8. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL- MORFOTIPO FLORES AMARILLAS.....	51
TABLA 9. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES- AUTOVECTORES 1, 2 Y 3 (<i>V. PHILIPPIANA</i>).....	57
TABLA 10. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL- FUNCIONES DISCRIMINANTES (<i>V. PHILIPPIANA</i>).....	62
TABLA 11. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL CON LAS VARIABLES CUALITATIVAS (<i>V. PHILIPPIANA</i>).....	63

CAPÍTULO II: ESTUDIOS QUÍMICOS

TABLA 12. DATOS GEOGRÁFICOS DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS POR ESPECIE.	79
TABLA 13. POBLACIONES SELECCIONADAS PARA ESTUDIO DE LA DINÁMICA QUÍMICA EN DISTINTOS ESTADIOS FENOLÓGICOS.	81
TABLA 14. FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE INTERPOBLACIONAL (POR ESPECIE).	90
TABLA 15. PRUEBA DE COMPARACIONES DE TUKEY- CONTENIDO FENÓLICO EN <i>V. MOYANOI</i>	92
TABLA 16. MEDIDAS DE DISPERSIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (<i>V. MOYANOI</i>).....	93
TABLA 17. VARIABILIDAD INTERPOBLACIONAL DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (<i>V. MOYANOI</i>).....	95
TABLA 18. MEDIDAS DE POSICIÓN Y DISPERSIÓN PARTICIONADAS POR POBLACIÓN (<i>V. MOYANOI</i>).....	96
TABLA 19. PRUEBA DE COMPARACIONES DE TUKEY- CONTENIDO FENÓLICO EN <i>V. PHILIPPIANA</i>	98
TABLA 20. MEDIDAS DE POSICIÓN Y DISPERSIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO EN <i>V. PHILIPPIANA</i>	100
TABLA 21. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE INTERPOBLACIONAL (<i>V. PHILIPPIANA</i>).....	102
TABLA 22. MEDIDAS DE DISPERSIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR POBLACIÓN (<i>V. PHILIPPIANA</i>)... .	103
TABLA 23. MEDIDAS DE POSICIÓN Y DISPERSIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SEGÚN ESTADIOS.....	107

CAPÍTULO III: ESTUDIOS GENÉTICOS

TABLA 24. LISTADO DE LOS MARCADORES UTILIZADOS.....	119
TABLA 25. MEDIA Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LOS PARÁMETROS DE DIVERSIDAD GENÉTICA	125
TABLA 26. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS OBTENIDOS EN EL AMOVA.	125
TABLA 27. ALELOS PRIVADOS POR POBLACIÓN (<i>V. MOYANOI</i>).....	126
TABLA 28. DISTANCIAS GENÉTICAS DE NEI POR PARES DE POBLACIONES (<i>V. MOYANOI</i>).....	126
TABLA 29. MEDIA Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LOS PARÁMETROS DE DIVERSIDAD GENÉTICA (<i>V. PHILIPPIANA</i>) . .	130
TABLA 30. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS OBTENIDOS EN EL AMOVA (<i>V. PHILIPPIANA</i>).....	130
TABLA 31. ALELOS PRIVADOS POR POBLACIÓN (<i>V. PHILIPPIANA</i>).....	131
TABLA 32. DISTANCIAS GENÉTICAS DE NEI POR PARES DE POBLACIONES (<i>V. PHILIPPIANA</i>).....	131

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción general

FIGURA 1. EJEMPLARES DE <i>V. MOYANOI</i>	10
FIGURA 2. EJEMPLARES DE <i>V. PHILIPPANA</i>	11
FIGURA 3. EJEMPLARES DE <i>V. GAIMANENSIS</i>	12

Capítulo I: Estudios morfológicos

FIGURA 4. MAPA CON LAS POBLACIONES NATURALES DE <i>V. MOYANOI</i> Y <i>V. PHILIPPANA</i>	19
FIGURA 5. DETALLE DE LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS DE <i>V. MOYANOI</i> SELECCIONADOS	24
FIGURA 6. DETALLE DE LOS PRINCIPALES CARACTERES SELECCIONADOS PARA <i>V. PHILIPPANA</i>	27
FIGURA 7. <i>V. MOYANOI</i> , PLANTAS DE LA POBLACIÓN RL EN DIFERENTES ESTADIOS FENOLÓGICOS.....	31
FIGURA 8. <i>V. MOYANOI</i> , DIFERENTES MORFOTIPOS OBSERVADOS EN LA POBLACIÓN NA (CHUBUT).	32
FIGURA 9. MATRIZ DE CORRELACIÓN.....	33
FIGURA 10. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE <i>V. MOYANOI</i> EN LOS COMPONENTES 1 Y 2.....	35
FIGURA 11. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE <i>V. MOYANOI</i> EN LOS COMPONENTES 1 Y 3.....	36
FIGURA 12. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE <i>V. MOYANOI</i> EN LOS COMPONENTES 2 Y 3.....	37
FIGURA 13. ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS. DENDOGRAMA DE <i>V. MOYANOI</i>	39
FIGURA 14. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL DE <i>V. MOYANOI</i> . EJES CANÓNICOS 1 VS 2.	40
FIGURA 15. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL DE <i>V. MOYANOI</i> . EJES CANÓNICOS 1 VS 3.	41
FIGURA 16. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE <i>V. MOYANOI</i> EN LOS COMPONENTES 1 Y 2.....	43
FIGURA 17. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE <i>V. MOYANOI</i> EN LOS COMPONENTES 1 Y 3.....	44
FIGURA 18. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE <i>V. MOYANOI</i> EN LOS COMPONENTES 1 Y 3, BASADO EN 23 VARIABLES CUANTITATIVAS.	45
FIGURA 19. ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS. DENDOGRAMA DE <i>V. MOYANOI</i> INCLUYENDO EL MORFOTIPO DE FLORES AMARILLAS.	47
FIGURA 20. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL DE <i>V. MOYANOI</i> . EJES CANÓNICOS 1 VS 2..	48
FIGURA 21. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL DE <i>V. MOYANOI</i> . EJES CANÓNICOS 1 VS 3.	49
FIGURA 22. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL DE <i>V. MOYANOI</i> . EJES CANÓNICOS 2 VS 3.	50
FIGURA 23. MATRIZ DE CORRELACIÓN.	54
FIGURA 24. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE <i>V. PHILIPPANA</i> EN LOS COMPONENTES 1 Y 2.....	55
FIGURA 25. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE <i>V. PHILIPPANA</i> EN LOS COMPONENTES 1 Y 3.....	56
FIGURA 26. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE <i>V. PHILIPPANA</i> EN LOS COMPONENTES 1 Y 2.....	56
FIGURA 27. ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS. DENDOGRAMA DE LAS POBLACIONES DE <i>V. PHILIPPANA</i>	58
FIGURA 28. ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS. DENDOGRAMA DE LAS POBLACIONES DE <i>V. PHILIPPANA</i> CON LAS VARIABLES CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS.....	59
FIGURA 29. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL DE <i>V. PHILIPPANA</i> . EJES CANÓNICOS 1 Y 2.....	60
FIGURA 30. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL DE <i>V. PHILIPPANA</i> . EJES CANÓNICOS 1 Y 3.....	60
FIGURA 31. ANÁLISIS DISCRIMINANTE LINEAL DE <i>V. PHILIPPANA</i> . EJES CANÓNICOS 2 Y 3.....	61

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo II: Estudios químicos

FIGURA 32. ESTRUCTURAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN <i>VALERIANA</i>	73
FIGURA 33. ESTRUCTURA QUÍMICA BÁSICA DE UN FENOL	75
FIGURA 34. ESTRUCTURAS FENÓLICAS EN <i>VALERIANA</i>	76
FIGURA 35. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LAS POBLACIONES NATURALES VISITADAS.....	80
FIGURA 36. EJEMPLARES DE <i>V. MOYANOI</i> Y <i>V. PHILIPPIANA</i> EN DISTINTOS ESTADIOS.....	81
FIGURA 37. RAÍCES DE EJEMPLARES DE <i>V. MOYANOI</i> Y <i>V. PHILIPPIANA</i>	82
FIGURA 38. MOLIENDA Y FILTRADO DEL MATERIAL.	83
FIGURA 39. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO.....	85
FIGURA 40. ESQUEMA DE REACCIÓN DEL REACTIVO DPPH.	86
FIGURA 41. CURVA DE CALIBRACIÓN CON ÁCIDO ASCÓRBICO.....	88
FIGURA 42. FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS VALERIANAS DE MONTAÑA.	91
FIGURA 43. VARIABILIDAD INTERPOBLACIONAL DE FENOLES TOTALES EN <i>V. MOYANOI</i>	92
FIGURA 44. VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL DE FENOLES TOTALES EN <i>V. MOYANOI</i>	94
FIGURA 45. VARIABILIDAD INTERPOBLACIONAL DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN <i>V. MOYANOI</i>	95
FIGURA 46. VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN <i>V. MOYANOI</i>	97
FIGURA 47. VARIABILIDAD INTERPOBLACIONAL DE FENOLES TOTALES EN <i>V. PHILIPPIANA</i>	99
FIGURA 48. VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL DE FENOLES TOTALES EN <i>V. PHILIPPIANA</i>	101
FIGURA 49. VARIABILIDAD INTERPOBLACIONAL DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN <i>V. PHILIPPIANA</i>	102
FIGURA 50. VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN <i>V. PHILIPPIANA</i>	104
FIGURA 51. CORRELACIÓN ENTRE CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN <i>V. PHILIPPIANA</i>	105
FIGURA 52. CORRELACIÓN ENTRE CONTENIDO TOTAL DE FENOLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN <i>V. PHILIPPIANA</i> , EXCLUYENDO A LAS POBLACIONES DEL SUR.	105
FIGURA 53. POBLACIÓN FO (<i>V. MOYANOI</i>). CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN TRES ESTADIOS ANALIZADOS	106
FIGURA 54. POBLACIÓN FO (<i>V. MOYANOI</i>). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN TRES ESTADIOS ANALIZADOS.	107
FIGURA 55. POBLACIÓN CL (<i>V. PHILIPPIANA</i>). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LOS ESTADIOS ANALIZADOS... ..	108
FIGURA 56. POBLACIÓN TR (<i>V. PHILIPPIANA</i>). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LOS ESTADIOS ESTUDIADOS. ...	109
Capítulo III: Estudios genéticos	
FIGURA 57. UBICACIÓN DE LAS POBLACIONES NATURALES INCLUIDAS EN ESTE CAPÍTULO.....	120
FIGURA 58. POBLACIONES DE <i>V. MOYANOI</i> Y GRÁFICOS DE DISPERSIÓN DEL PCoA.	127
FIGURA 59. GRÁFICOS DE DISPERSIÓN DEL PCoA PARA <i>V. MOYANOI</i>	128
FIGURA 60. DENDOGRAMA DE LAS POBLACIONES DE <i>V. MOYANOI</i> ANALIZADAS.. ..	129
FIGURA 61. POBLACIONES DE <i>V. PHILIPPIANA</i> Y GRÁFICOS DE DISPERSIÓN DEL PCoA.	132
FIGURA 62. DENDOGRAMA CON LAS POBLACIONES NORTE Y SUR (<i>V. PHILIPPIANA</i>).....	133

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

RESUMEN

El género *Valeriana* incluye varias especies de uso medicinal, destacándose, por ejemplo, la especie euroasiática *V. officinalis* a nivel mundial, *V. jatamansi* en Asia, *V. carnosa* en Patagonia, entre otras. Estas plantas son utilizadas principalmente como sedantes y para tratar desequilibrios del sistema nervioso. En esta tesis se caracterizaron poblaciones naturales de tres especies de valerianas nativas patagónicas (*V. gaimanensis*, *V. moyanoi* y *V. philippiana*) en base a análisis morfológicos, químicos y genéticos. Si bien existen trabajos preliminares sobre morfología y química de valerianas nativas de Argentina, es poco lo que se conoce sobre la variabilidad morfológica, genética y química particularmente a nivel interpoblacional de las especies mencionadas. En una primera instancia, se analizó la variación morfológica de *V. moyanoi* y de *V. philippiana*, a los fines de caracterizar las poblaciones e identificar caracteres de interés agronómico. Se encontró gran variabilidad morfológica entre y dentro de las poblaciones, se identificaron las poblaciones que desarrollaron órganos subterráneos y aquenios de mayor tamaño, y otras con caracteres morfológicos distintivos. En segunda instancia, se compararon los perfiles de contenido de fenoles totales y actividad antioxidante entre poblaciones de *V. moyanoi*, *V. philippiana* y *V. gaimanensis*, y se analizó la dinámica química en distintos estadios fenológicos en poblaciones naturales seleccionadas. De las tres especies estudiadas se destaca *V. philippiana* por sus mayores valores en el contenido de fenoles y actividad antioxidante, particularmente las poblaciones Lago Guacho (LG), Cerro Cónico (CC) y Cerro Lindo (CL). En general, las plantas en estadio vegetativo registraron los valores más altos de actividad antioxidante. Por otro lado, se caracterizaron genéticamente las poblaciones de *V. moyanoi* y *V. philippiana* mediante marcadores moleculares (EST–SSR), encontrándose una alta diversidad genética en la mayoría de las poblaciones de *V. moyanoi*. En el caso de *V. philippiana* se observó una menor diversidad entre las poblaciones y la estructuración genética poblacional mostró una correspondencia con su distribución geográfica, asociada a un gradiente latitudinal Norte–Sur. Adicionalmente, en base a la caracterización química, genética y morfológica de estas especies, se pudo identificar un ecotipo particular de *V. moyanoi*. El estudio de estas valerianas con potencial fitomedicinal contribuye al conocimiento y conservación de la flora nativa patagónica y constituye una importante herramienta para desarrollar planes de selección y cultivo en potenciales programas de aprovechamiento sustentable.

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

ABSTRACT

The genus *Valeriana* includes several species of medicinal use, highlighting, for example, the Eurasian species *V. officinalis* worldwide, *V. jatamansi* in Asia, *V. carnosa* in Patagonia, among others. These plants are mainly used as sedatives and to treat nervous system imbalances. In this Thesis, natural populations of three native Patagonian valerian species (*V. gaimanensis*, *V. moyanoi* and *V. philippiana*) were characterized based on morphological, chemical and genetic analysis. Although there are preliminary works on morphology and chemistry of native valerians from Argentina, little is known about the morphological, genetic and chemical variability, particularly at the inter-population level of the mentioned species. In the first instance, the morphological variation of *V. moyanoi* and *V. philippiana* was analyzed in order to characterize the populations and identify characters of agronomic interest. Great morphological variability was found between and within populations, populations that developed larger underground organs and achenes, and others with distinctive morphological characters were identified. Secondly, we compared the profiles of total phenol content and antioxidant activity among populations of *V. moyanoi*, *V. philippiana* and *V. gaimanensis*, and analyzed the chemical dynamics at different phenological stages in selected natural populations. Of the three species studied, *V. philippiana* stands out for its higher values in phenol content and antioxidant activity, particularly in the populations Lago Guacho (LG), Cerro Cónico (CC) and Cerro Lindo (CL). In general, plants in vegetative stage registered the highest values of antioxidant activity. On the other hand, the populations of *V. moyanoi* and *V. philippiana* were genetically characterized by molecular markers (EST-SSR), finding a high genetic diversity in most populations of *V. moyanoi*. In the case of *V. philippiana*, less diversity was observed among the populations and the genetic population structure showed a correspondence with its geographic distribution, associated with a north-south latitudinal gradient. Additionally, based on the chemical, genetic and morphological characterization of these species, it was possible to identify a particular ecotype of *V. moyanoi*. The study of these valerians with phytomedicinal potential contributes to the knowledge and conservation of the native Patagonian flora and constitutes an important tool for developing selection and cultivation plans in potential sustainable use programs.

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

Introducción general

La familia Valerianaceae (Batsch.) fue históricamente considerada una familia clásica dentro del orden Dipsacales. Sin embargo, en base a estudios filogenéticos, a partir de la tercera edición del Sistema de Clasificación de las Angiospermas (APG III, 2009), la familia Valerianaceae *nom. conserv.*, es incorporada como una sub-familia, Valerianoideae Raf., dentro de la familia Caprifoliaceae Juss., orden Dipsacales. Dentro de esta familia, el género *Valeriana* L. es uno de los más diversos, incluyendo entre 200–350 especies distribuidas en las zonas templadas a frías del Hemisferio Norte, África y regiones montañosas de América del Sur (Kutschker, 2009; Nandhini et al., 2018). En Sudamérica estas plantas habrían ingresado desde el norte gracias a la formación del istmo de Panamá, alrededor de 12,8 – 13,7 Ma atrás. Se sugiere que podrían haber sucedido cuatro eventos independientes de colonización de nuevos hábitats, involucrando procesos de dispersión de larga distancia y vicarianza. Como resultado, habrían surgido importantes centros de diversificación de especies, especialmente en el Páramo andino (Bell & Donoghue, 2005; Gonzalez, 2014) y en los Andes australes (Bell et al., 2012). En Argentina, se registró una alta diversificación secundaria en la provincia de Neuquén (Kutschker & Morrone, 2012), lo que coincide con un “punto caliente” de diversidad biológica ubicado en la zona central de Chile (Myers et al., 2000). En efecto, las valerianas se encuentran bien representadas en el territorio argentino, incluyendo actualmente 51 especies en total, que en su mayoría crecen restringidas a los Andes de nuestro país y Chile (Kutschker, 2011; Bell et al., 2012). En Patagonia, estas plantas habitan numerosos ambientes, desde estepa y ecotono (ej.: *V. clarionifolia*), bosques subantárticos (ej.: *V. lapathifolia*) hasta mallines (ej.: *V. macrorhiza*) y pedreros de altura (ej.: *V. moyanoi*) (Kutschker & Morrone, 2012).

Los órganos subterráneos de ciertas especies de *Valeriana* contienen numerosos productos naturales con atribuciones terapéuticas, por lo que han sido utilizadas como sedantes y relajantes, permitiendo la reducción del nerviosismo y la agitación asociados al estrés (Das et al., 2021). Con estos fines desde la antigüedad se han utilizado extractos de rizomas y raíces de la especie euroasiática *Valeriana officinalis* L. (Houghton, 1988). Numerosas investigaciones se han llevado a cabo en esta especie y en la especie asiática *V. jatamansi*

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

Jones, con el objetivo de determinar cuáles son los compuestos químicos responsables de la actividad biológica, pero hasta el momento no se ha llegado a un consenso.

En las plantas, los compuestos secundarios pertenecen mayoritariamente a tres familias químicas: fenoles, terpenos y alcaloides (Dereli, 2022). Esta amplia variedad de moléculas orgánicas, parecen no tener una función directa en los procesos vitales de las plantas (ej. fotosíntesis), aunque sí son importantes en otros procesos como la reproducción, constituyendo los pigmentos de las flores y frutos, atrayendo insectos y animales dispersores (Wink, 2003). Los metabolitos secundarios también participan en la protección contra herbivoría y defensa contra patógenos (War et al., 2020). Al ser una respuesta al entorno, su síntesis puede verse afectada por factores ambientales como temperatura, altitud, precipitaciones, estacionalidad, así como también por la fisiología y desarrollo fenológico de las plantas (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Yang et al., 2018).

En diferentes países se buscan especies autóctonas de *Valeriana* como fuentes de materia prima alternativas a *V. officinalis*. Ejemplos son los implementados en India con *V. jatamansi* (Kaur et al., 1999), en México con *V. edulis* Nutt. ex Torr. & A. Gray subsp. *procera* (Kunth) G. F. Mey. (Oliva et al., 2004), en Brasil con *V. glechomifolia* F. G. Mey. (de Andrade Salles et al., 2000), en Guatemala con *V. prionophylla* Standl (Holzmann et al., 2011) y en Argentina con *V. carnosa* Sm. (Nagahama et al., 2017; Guajardo et al., 2018; Nagahama et al., 2019, 2020; Nagahama & Bonino, 2020).

Compuestos secundarios en *Valeriana*

En valerianas se han identificado más de 150 constituyentes químicos, entre alcaloides, terpenos y fenoles, muchos de los cuales son farmacológicamente activos (Patočka & Jakl, 2010). En algunos reportes se menciona al ácido valerénico y sus derivados (presentes en el aceite esencial) como los principales compuestos activos de estas plantas, y responsables de la actividad terapéutica (Bos et al., 1998; Benke et al., 2009; Orhan, 2021). En otros estudios, la actividad sedativa es atribuida a los valepotriatos, compuestos que fueron aislados por primera vez de raíces y rizomas de *V. jatamansi* (Thies & Funke, 1966). No obstante, la variabilidad observada en el contenido de estos compuestos y el mismo uso que se le da a las diferentes valerianas en sus lugares de origen, sugieren que la actividad biológica de estas

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

plantas quizás no sea debida a un solo tipo de compuesto, sino a un complejo de otro/s compuesto/s que podrían no estar aún descriptos (Letchamo et al., 2004); o que la actividad biológica es por el sinergismo de varios principios químicos (Lipp, 1996; Fernández et al., 2005). Otros reportes involucran compuestos de naturaleza fenólica, al observarse que los flavonoides presentes en valerianas poseen actividad sedativa en el sistema nervioso central (Marder et al., 2003; Fernández et al., 2004, 2005, 2006).

Ante el conocimiento florístico de la región patagónica (Correa, 1963, 1971, 1984a, 1984b, 1988, 1998, 1999) y registros etnobotánicos de especies utilizadas en la medicina popular (Conticello et al., 1997; Casamiquela, 1999; Molares & Ladio, 2008), se inició la propuesta de evaluación de valerianas patagónicas a los fines de seleccionar fuentes de fitofármacos alternativas en especies nativas (Kutschker, 2009; Bach et al., 2014; Nagahama et al., 2014). En dicha región, *V. carnos*a, *V. clarionifolia* Phil., *V. macrorrhiza* DC., entre otras, poseen antecedentes de uso medicinal (Gusinde, 1936; Niemeyer, 1995; Molares & Ladio, 2009; Richeri et al., 2015). En estas especies se han identificado tentativamente varios ácidos hidroxicinámicos, como el clorogénico, cinámico, ferúlico, entre otros (Guajardo et al., 2018) y recientemente, se identificaron dos compuestos con propiedades sedativas: diosmetina (un derivado de flavona) y hesperidina (una flavanona glicosilada) en *V. clarionifolia*, estando presente este último compuesto también en *V. carnos*a y *V. macrorrhiza* (Marcucci et al., 2020). Asimismo, se reportó la ausencia de ácido valerénico en estas especies patagónicas. Otra planta que reporta usos medicinales y místicos¹, es *V. lapathifolia* Vahl., de la cual también se utilizan las raíces (Niemeyer, 1995). Además, las hojas de *V. virescens* Clos. poseen propiedades aromáticas, refrescantes y tónicas (Gusinde, 1936), mientras que los extractos de *V. macrorrhiza* presentan actividad ansiolítica (Marcucci et al., 2020).

Si bien en nuestro país se comercializa material vegetal de algunas especies de *Valeriana* nativas (Cuassolo et al., 2010) cabe destacar que en la fitomedicina argentina sólo existen antecedentes de producción de fitomedicamentos a partir de *V. officinalis* y no de representantes autóctonos (Bach et al., 2014). Debido a ello, se han realizado estudios

¹ *V. lapathifolia* serviría de alimento al Camahueto (torito del mar), animal mitológico chileno (Bezzemberger, 2020).

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

químicos preliminares en algunas especies patagónicas (Kutschker et al., 2010; Guajardo et al., 2018; Nagahama et al., 2020) y de caracterización genética e introducción a cultivo en *V. carnosa*, una de las especies más utilizada en la medicina popular de la Patagonia (Nagahama et al., 2019, 2014). Los resultados obtenidos sugieren la existencia de una gran variabilidad a nivel químico y genético entre diferentes poblaciones de *V. carnosa* distribuidas a lo largo de la Patagonia (Nagahama et al., 2014).

En este contexto, se propusieron estudios de caracterización morfológica, química y genética en tres especies de valerianas nativas de la Patagonia que habitan ambientes con características particularmente extremas: *V. moyanoi* y *V. philippiana* en zonas de gran altitud, y *V. gaimanensis* en uno de los ambientes más áridos de la meseta patagónica. Para analizar la variabilidad intraespecífica, estas especies se estudiaron en diferentes ambientes a lo largo y ancho de su distribución, y en distintos estadios fenológicos, ya que según reportes previos en *V. carnosa*, la producción de metabolitos secundarios varía según el estadio fenológico de las plantas (Guajardo et al., 2018).

En la Patagonia argentina, *V. moyanoi* se distribuye en las provincias de Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz, entre los 1000 y 2500 m sobre el nivel del mar (snm), y *V. philippiana* en las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut, entre los 1000 y 2400 m snm (Correa, 1999; Kutschker, 2011). *Valeriana gaimanensis* habita en afloramientos rocosos entre los 100–200 m snm y es la única *Valeriana* endémica de la Patagonia extra-andina, encontrándose solamente una población en las cercanías del Dique Florentino Ameghino, Chubut (Nagahama et al., 2016).

Las plantas de *V. moyanoi*, desarrollan una roseta comprimida contra el suelo en el primer año de vida (Fig. 1A), y en el segundo año desarrollan un tallo florífero grueso, que se cubre por completo de numerosas flores (Fig. 1B). Florece en primavera o verano dependiendo principalmente de la altitud y latitud en donde crece, luego fructifica y finalmente muere (Fig. 1C). Los frutos, como en todas las valerianas, son aquenios que en este caso poseen pappus plumoso (Kutschker, 2008, 2011). Por lo general, las poblaciones de *V. moyanoi* crecen circunscriptas a pedreros por encima de los 1000 m snm y a veces los individuos crecen bajo la protección de plantas nodrizas.

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)



Figura 1. Ejemplares de *V. moyanoi*. A) Roseta de un año. B) Inflorescencia. C) Ejemplar en estadio de fructificación.

Por otro lado, *V. philippiana* se desarrolla en grietas de paredes rocosas o entre piedras en las montañas patagónicas (Fig. 2A), posee rizomas extendidos que le permiten formar matas extensas (Fig. 2B), sus hojas son pinnatisectas y poseen numerosos lóbulos superpuestos que le otorgan aspecto de helecho (Fig. 2C). Es una hierba sumamente aromática, de olor penetrante y desagradable. Florece en verano y fructifica a fines de esa estación, desarrollando frutos con papus plumosos (Kutschker, 2011; Ferreyra et al., 2020).

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

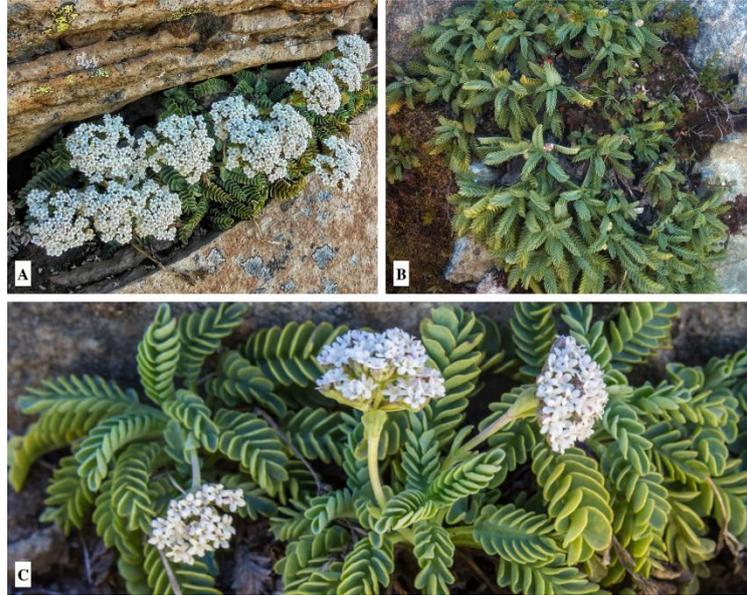


Figura 2. *V. philippiana* A) Ejemplar en floración creciendo entre grietas rocosas. B) Forma de crecimiento. C) Inflorescencias contraídas y hojas con lóbulos superpuestos.

En cuanto a *V. gaimanensis*, es una hierba que crece en paredes rocosas a 180 m snm (Fig. 3A). Esta especie es similar morfológicamente a *V. carnososa*, de la cual se diferencia por presentar hojas membranosas-papiráceas (Fig. 3B), mayor número de dientes en los márgenes de las hojas (20–30), papus con 10–12 cerdas, cerdas de papus más cortas (1,7–3,6 mm de largo) y frutos más pequeños y pubescentes (2,9–4,7 × (0,9–)1,7–2,5 mm), entre otros caracteres (Nagahama et al., 2016). Esta especie se desarrolla en una de las zonas más áridas de Patagonia (Fig. 3C), con una precipitación anual que no supera los 150–200 mm (Bianchi & Cravero, 2010).

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)



Figura 3. *V. gaimanensis* A) Ejemplar en floración creciendo en las paredes rocosas. B) Detalle de las hojas. C) Dique Florentino Ameghino, sitio donde crece esta especie.

Un aspecto importante del empleo de las valerianas para uso medicinal es que se utilizan las raíces y/o rizomas, por lo cual la obtención de la materia prima a partir de poblaciones silvestres implica prácticas extractivas que no son recomendadas para este tipo de especies. Por lo general, las valerianas forman poblaciones aisladas, poco numerosas y sólo se encuentran en estado silvestre. El inicio de cultivo de especies nativas representaría una solución a la problemática asociada al aprovechamiento de estos recursos, atendiendo los aspectos de sustentabilidad y calidad. Identificar poblaciones potencialmente proveedoras de material vegetal resulta un aspecto muy importante en la conservación y uso sustentable de estos recursos genéticos nativos, en caso que se decida explorar su cultivo.

De esta manera, en este trabajo se propone estudiar tres especies de valerianas nativas, *V. gaimanensis*, *V. moyanoi* y *V. philippiana*, bajo la hipótesis de que su amplia distribución geográfica en la Patagonia argentina ha promovido la ocurrencia de procesos de plasticidad y/o adaptación local, asociados a variabilidad morfológica, química y genética entre y dentro de poblaciones. Principalmente, se pretende: 1– caracterizar de manera integrada diferentes poblaciones de estas especies en Patagonia teniendo en cuenta sus características morfológicas, químicas y genéticas, 2– correlacionar la caracterización morfológica y molecular con la de metabolitos secundarios, 3– identificar posibles fenotipos de interés

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies nativas de *Valeriana* (Valerianoideae, Caprifoliaceae)

agronómico y 4– contribuir al conocimiento general y conservación de recursos fitogenéticos nativos.

Objetivo general

Caracterizar desde el punto de vista morfológico, químico y genético diferentes poblaciones de *V. moyanoi*, *V. philippiana* y *V. gaimanensis* e identificar la/s especies/poblaciones que presenten mayor potencial para el desarrollo de planes de aprovechamiento sustentable.

Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente diferentes poblaciones naturales de las especies e identificar fenotipos con caracteres de interés agronómico (mayor desarrollo del sistema subterráneo y tamaño de los frutos).
- Cuantificar compuestos fenólicos y actividad antioxidante en extractos etanólicos de órganos subterráneos de las tres especies.
- Comparar los perfiles químicos entre especies y sus poblaciones e identificar quimiotipos candidatos con potencial uso fitomedicinal.
- Evaluar el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de poblaciones seleccionadas, en diferentes estadios fenológicos.
- Estudiar y caracterizar genéticamente mediante el empleo de marcadores moleculares (EST-SSR) diferentes poblaciones naturales de cada una de las especies en Patagonia.
- Correlacionar los resultados de caracterización morfológica con los obtenidos de la caracterización química y genética.

Capítulo I: Estudios morfológicos

Resumen

El género *Valeriana* ha sido revisado en Argentina y Chile, pero existe muy poca información respecto a la variabilidad morfológica intra e interpoblacional de las especies que incluye. En este trabajo se estudiaron 56 individuos de 7 poblaciones naturales de *V. moyanoi* y 64 individuos de 8 poblaciones de *V. philippiana*, dos especies patagónicas de alta montaña. Se consideraron 65 caracteres vegetativos y reproductivos para *V. moyanoi* y 69 para *V. philippiana*, a los fines de caracterizar morfológicamente las poblaciones e identificar caracteres de interés agronómico. El material se evaluó mediante la metodología clásica de observación y medición mediante microscopio estereoscópico y calibre digital. Los datos se analizaron con técnicas de estadística multivariada: Análisis de Conglomerados (AC), Análisis Discriminante Lineal (ADL) y Análisis de Componentes Principales (ACP). Los resultados de este estudio indican gran variabilidad morfológica dentro y entre las poblaciones de ambas especies, reportándose nuevos morfotipos para *V. moyanoi* en el Río Limay (Neuquén) y en Cerro Nahuelpan (Chubut). También se identificaron las poblaciones con mayor desarrollo del sistema radical y aquenios más grandes (Cerro Chalhuaco, Río Negro). En *V. philippiana* se diferenciaron las poblaciones ubicadas en la provincia de Neuquén, presentando un mayor desarrollo de raíces y rizomas (Copahue y Rucachoroi). Además, se ampliaron los rangos de medidas de los caracteres descriptos con anterioridad para cada una de las especies.

Introducción

Las plantas pertenecientes a la subfamilia Valerianaceae se caracterizan por tener frutos del tipo aquenio, ausencia de endosperma, flores con simetría bilateral o esporádicamente asimétricas y con corolas gamopétalas, ovarios tricarpelares e inferiores, un carpelo fértil en su madurez y un óvulo anátropo (Das et al., 2021). Existe gran diversidad en la morfología de frutos y flores dentro de la subfamilia, destacándose la reducción de la condición ancestral de 4 a 3 estambres (Donoghue et al., 2003). Entre los géneros botánicos que incluye, se destaca *Valeriana* por presentar importantes representantes medicinales, siendo plantas con raíces y rizomas de intenso aroma fétido, muy apreciadas en la medicina herbolaria (Houghton, 1988). Por lo general, las valerianas crecen en altitudes bajas y medias, aunque existen especies de montañas y algunas restringidas a la zona de alta montaña (Bell et al., 2012). Su distribución a nivel mundial es amplia, habitando las zonas templadas a frías del Hemisferio Norte, África y preferentemente la región andina de Sudamérica. No se encuentran en Australia ni las Islas del Pacífico (Kutschker, 2009).

Los tratamientos taxonómicos de las valerianas sudamericanas se han basado principalmente en descripciones florísticas y análisis filogenéticos. Se cita la morfología de las flores, frutos y número de estambres como caracteres importantes en la delimitación de especies, siendo estos caracteres altamente diversos (Bell & Smets, 2010). En valerianáceas (*Valerianaceae nom. conserv.*) de Argentina, Borsini (1942, 1944) utilizó la forma, el tamaño y aspecto de los frutos como carácter específico diferencial más constante, mientras que Kutschker (2009) además de los frutos, consideró la morfología de las hojas para definir grupos informales de especies dentro del género.

Son escasos los estudios que abordan la variabilidad morfológica de las poblaciones naturales de las especies a lo largo de su área de distribución (variabilidad intra-específica). Una de las herramientas tradicionales en el estudio de la taxonomía botánica es el análisis morfométrico, que resulta de gran utilidad para diferenciar híbridos interespecíficos, circunscribir especies o dilucidar relaciones taxonómicas a escala regional (Chiapella, 2000; Grundt et al., 2000; Blanco-Dios, 2007; Fernández et al., 2017). En valerianas, este tipo de estudios se ha reportado con anterioridad comparando caracteres morfológicos entre *V. gaimanensis* y *V. carnososa*, dos especies que resultan similares entre sí (Nagahama et al.,

2016), y recientemente se ha comparado y descrito una especie afín a *V. philippiana* (*V. praecipitis* A.E. Villarroel & Menegoz) (Villarroel et al., 2022).

Con el fin de evaluar la diversidad morfológica de *V. moyanoi* y *V. philippiana*, se propuso caracterizar especímenes provenientes de diferentes poblaciones, cubriendo la mayor parte de sus distribuciones naturales. Resulta importante poder identificar a partir de estudios morfológicos las poblaciones con mayor potencial para la producción de materia prima con fines medicinales (raíces y rizomas), en caso que se decida explorar su cultivo a futuro. Cabe destacar que *V. gaimanensis* no se consideró en este capítulo, debido a que no se han encontrado más poblaciones naturales (actualmente sólo se conoce una única población muy pequeña) para evaluar la variabilidad inter poblacional.

Objetivo general

Caracterizar desde el punto de vista morfológico diferentes poblaciones de *V. moyanoi* y *V. philippiana* y analizar la variabilidad morfológica existente entre y dentro de las poblaciones.

Objetivos específicos

- Ampliar los rangos de medidas morfológicas para enriquecer las descripciones realizadas con anterioridad.
- Comparar la morfología de las especies a nivel intra e inter poblacional.
- Identificar fenotipos de *V. moyanoi* y *V. philippiana* que presenten caracteres de interés agronómico, como por ejemplo mayor desarrollo del sistema radical (de posible uso medicinal) y/o tamaño de los frutos (relacionado con la cantidad de reservas y posibilidad de germinación).

Materiales y métodos

Material vegetal

Durante la época estival de los años 2018 y 2019 se localizaron siete poblaciones naturales de *V. moyanoi* y ocho poblaciones de *V. philippiana*, en cuatro provincias patagónicas para cubrir el rango geográfico de distribución y representar la variabilidad de las mismas (Fig. 4). Al momento de las recolecciones, algunos especímenes se encontraban en flor y otros en fruto. Se trabajó con un mínimo de 2 (Tecka) y un máximo de 12 individuos (Rio Limay)

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

por población para el caso de *V. moyanoi*, y con 8 individuos por población para el caso de *V. philippiana* (Tabla 1). Ejemplares de cada una de las poblaciones de ambas especies serán depositados en los herbarios BCRU y CORD (siglas según Index Herbariorum: <https://sweetgum.nybg.org/science/ih/>). El estudio morfológico se llevó a cabo mediante observaciones y mediciones de material fresco o seco, utilizando un microscopio estereoscópico Leica L2 (Leica Microsystems Ltd.) y calibre digital (Electronic IP65, 797B Series, Starrett®).

Tabla 1. Datos geográficos de las poblaciones estudiadas por especie, indicando el número de individuos recolectados por población (N).

Especies	N	Provincia	Población	Latitud	Longitud	Altitud msnm
<i>V. moyanoi</i>	12	Neuquén	Rio Limay (RL)	40°57'34"S	71°02'40"O	748
<i>V. moyanoi</i>	8	Rio Negro	Cerro Chalhuaco (CH)	41°15'25"S	71°17'58"O	1591
<i>V. moyanoi</i>	8	Chubut	Talagapa (TA)	42°03'51"S	68°12'14"O	1595
<i>V. moyanoi</i>	8	Chubut	Cerro Nahuelpan (NA)	42°59'02"S	71°12'40"O	1376
<i>V. moyanoi</i>	2	Chubut	Tecka (TE)	43°37'37"S	70°44'08"O	1348
<i>V. moyanoi</i>	8	Chubut	Lago Fontana (FO)	44°54'31"S	71°12'59"O	1013
<i>V. moyanoi</i>	7	Santa Cruz	Monte Zeballos (ZE)	47°00'55"S	71°48'58"O	1470
<i>V. philippiana</i>	8	Neuquén	Copahue (CO)	37°48'56"S	71°06'35"O	2146
<i>V. philippiana</i>	8	Neuquén	Cerro Atravesada (AT)	38°56'34"S	70°37'08"O	2194
<i>V. philippiana</i>	8	Neuquén	Rucachoroi (RU)	39°16'43"S	71°10'58"O	1905
<i>V. philippiana</i>	8	Neuquén	Cerro Bayo (BA)	40°44'38"S	71°36'42"O	1722
<i>V. philippiana</i>	8	Rio Negro	Cerro Tronador (TR)	41°11'23"S	71°49'18"O	1559
<i>V. philippiana</i>	8	Rio Negro	Cerro Lindo (CL)	41°58'28"S	71°39'11"O	1600
<i>V. philippiana</i>	8	Chubut	Cerro Cónico (CC)	43°15'35"S	71°43'13"O	1380
<i>V. philippiana</i>	8	Chubut	Lago Guacho (LG)	43°47'38"S	71°30'11"O	1451

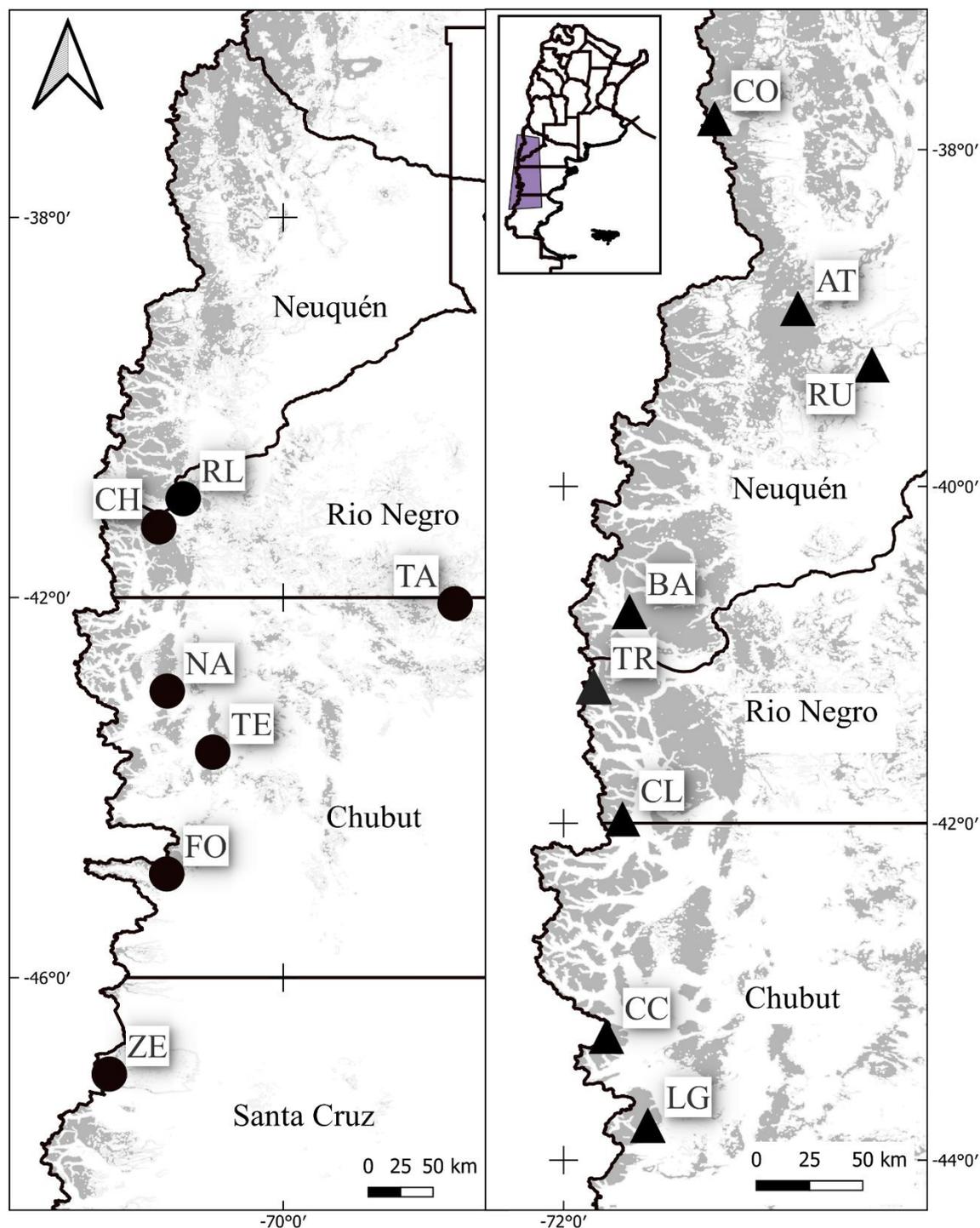


Figura 4. Izquierda, mapa con las poblaciones naturales de *V. moyanoi* visitadas (círculos): **RL**, Río Limay; **CH**, Cerro Chahuaco; **TA**, Talagapa; **NA**, Cerro Nahuelpan; **TE**, Tecka; **FO**, Lago Fontana; **ZE**, Monte Zeballos. Derecha, mapa con las poblaciones de *V. philippiana* (triángulos): **CO**, Copahue; **AT**, Cerro Atravesada; **RU**, Rucachoroi; **BA**, Cerro Bayo; **TR**, Cerro Tronador, **CL**, Cerro Lindo; **CC**, Cerro Cónico; **LG**, Lago Guacho.

Base de datos morfológicos

Como criterio de selección de las variables a medir se tuvieron en cuenta las descripciones de Kutscher (2009) y Nagahama et al. (2016), con ligeras modificaciones. Para *V. moyanoi* se examinaron 69 variables, teniendo en cuenta caracteres vegetativos y reproductivos (Tabla 2). A continuación, se mencionan algunas aclaraciones respecto a las denominaciones y caracteres involucrados en este trabajo.

Inflorescencia

Las inflorescencias son una de las características morfológicas más destacables de las valerianas, ya que resultan estructuras complejas y variables entre especies. Larsen (1986) utiliza el término sinflorescencia, para referirse a una agregación densa de paracladios, definiendo paracladio a la repetición de la estructura del eje principal del sistema de floración, en las ramas laterales. En este trabajo, los paracladios se llamaron “ramas” a los fines prácticos. De esta manera, la “rama basal” sería aquella primera ramificación lateral ubicada en la zona basal del vástago principal de la inflorescencia, “rama media” aquella ramificación lateral ubicada en la quinta posición, contando desde abajo hacia arriba y “rama superior”, la que se ubica en la zona apical del vástago (Fig. 5A). Además, se estimó una medida para definir la densidad de las ramificaciones e inflorescencia, que se denominó “índice de compactación” y dependiendo de si se trataba de la inflorescencia completa o de una rama, se denominó de manera diferente. Para calcular este índice, se dividió la longitud de la rama basal (LR1), media (LRM) o superior (LR3) por el número de ramas de segundo orden (NR). En el caso de la rama basal, el índice de compactación se denominó “RR1NR”. Por otro lado, la compactación de la inflorescencia se calculó de la misma manera, dividiendo la longitud del vástago principal (LI) por el número total de ramas (NR), por lo que la denominación fue RLINR, siendo los valores más altos de RLINR un indicio de inflorescencias más laxas.

Frutos

Se tomaron tres medidas de ancho y longitud de 45 aquenios en total (Fig. 5B) de todas las poblaciones (excepto Tecka, *V. moyanoi*).

Estructuras foliares

Se realizó una distinción entre hojas “basales” y “superiores”, teniendo en cuenta su ubicación dentro de la roseta, lo que implica una diferencia de desarrollo de la hoja, siendo las hojas superiores más jóvenes que las hojas basales (Fig. 5C y D).

Los términos “bráctea” y “bractéola” resultan controversiales en bibliografía y fueron discutidos por Rickett (1954) sin llegar a enunciados concluyentes. En este trabajo se tuvieron en cuenta las recopilaciones de Font Quer (1953), basadas en las definiciones de Linnaeus (1751), donde una bráctea es cualquier órgano foliáceo situado en la proximidad de las flores y distinto por su forma, tamaño, consistencia, etcétera, de las hojas normales y de las que, transformadas, constituyen el cáliz y la corola. En *V. moyanoi*, se consideraron brácteas a aquellas estructuras que acompañaban a las ramificaciones laterales (paracladios) de la inflorescencia (Fig. 5E).

Para *V. philippiana* se seleccionaron 61 caracteres morfológicos en total (Tabla 3). A continuación, algunos comentarios al respecto.

Inflorescencia

Se denominó “zona de ramificación”, a aquella porción de la inflorescencia donde comienzan a dividirse las ramificaciones portadoras de flores (Fig. 6A).

Frutos

La mayoría de los individuos recolectados se encontraban en estadio de floración, por lo que se pudo trabajar con 55 frutos en total, de 4 poblaciones (RU, CO, BA y LG). Se tomaron tres medidas de ancho y longitud de los aquenios (Fig. 6B).

Estructuras foliares

Se midieron 2 hojas por individuo. Se seleccionaron 3 lóbulos por hoja (basal, medio, superior), midiendo el ancho y largo de cada uno (Fig. 6C). Se tuvieron en cuenta aspectos cualitativos como pubescencia del pecíolo (glabro, pubescente) y tipo de ápice de las hojas (retuso, agudo, redondeado, emarginado).

En el caso de *V. philippiana*, se seleccionaron 3 brácteas del vástago principal de la inflorescencia, denominadas de acuerdo a su posición: basales, medias y superiores; y se

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

consideró bractéolas a aquellos profilos que se hallaban sobre un eje lateral de la inflorescencia acompañando a las flores (Font Quer, 1953). Las bractéolas basales se encontraban inmediatamente por encima de la bráctea superior, las bractéolas medias se ubicaban en la segunda posición sobre las bractéolas basales y las bractéolas superiores en la zona apical (Fig. 6D).

Tabla 2. Caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos seleccionados para *V. moyanoi*

Estructura	Datos cuantitativos	Datos cualitativos
Planta entera	1. Altura	
Raíz y rizoma	2. Ancho	Textura
Hoja basal	3. Ancho base foliar	Presencia/ausencia pubescencia pecíolo
	4. Ancho lámina	
	5. Longitud	
	6. N° lóbulos	
	7. Long. Lob 1	
	8. Long. Lob 2	
	9. Long. Lob 3	
	10. Long. Lob 4	
	11. Long. Lob 5	
	Hoja superior	
13. Ancho lámina		
14. Longitud		
15. N° lóbulos		
16. Long. Lob 1		
17. Long. Lob 2		
18. Long. Lob 3		
19. Long. Lob 4		
20. Long. Lob 5		
Bráctea basal		21. Ancho base foliar
	22. Ancho lámina	
	23. Longitud	
	24. N° lóbulos	
	25. Long. Lob 1	
	26. Long. Lob 2	
	27. Long. Lob 3	
	28. Long. Lob 4	
	29. Long. Lob 5	
	Bráctea media	30. Ancho base foliar
31. Ancho lámina		
32. Longitud		
33. N° lóbulos		
34. Long. Lob 1		
35. Long. Lob 2		
36. Long. Lob 3		
37. Long. Lob 4		
38. Long. Lob 5		
Bráctea superior		39. Ancho base foliar
	40. Ancho lámina	
	41. Longitud	
	42. N° lóbulos	

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

		43. Long. Lob 1		
		44. Long. Lob 2		
		45. Long. Lob 3		
		46. Long. Lob 4		
		47. Long. Lob 5		
Inflorescencia	Primera rama	48. Longitud	Presencia/ausencia pubescencia	
		49. Número de ramitas		
		50. Relación long. rama/n° de ramitas		
		51. Orden		
	Rama media	52. Longitud	Presencia/ausencia pubescencia	
		53. Número de ramitas		
		54. Relación long. Rama/n° de ramitas		
		55. Orden		
	Rama superior	56. Longitud	Presencia/ausencia pubescencia	
		57. Número de ramitas		
		58. Relación long. rama/n° de ramitas		
		59. Orden		
			60. Ancho basal	Presencia/ausencia pubescencia
			61. Ancho medio	
			62. Ancho superior	
		63. Longitud		
		64. Número total de ramas		
		65. Relación longitud del vástago/N° de ramas		
Fruto		66. Ancho medio, mayor	Presencia/ausencia pubescencia	
		67. Ancho apical		
		68. Longitud		

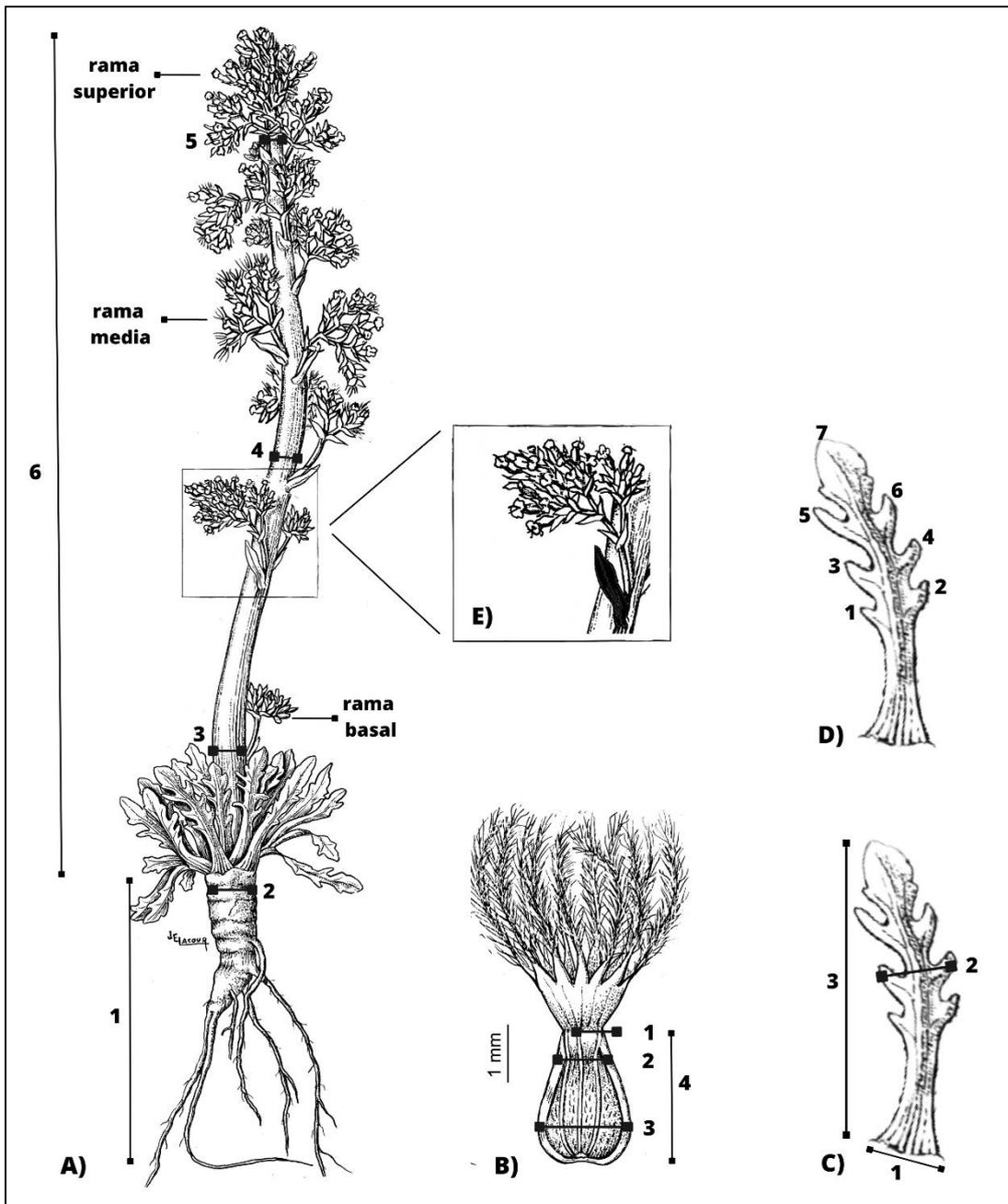


Figura 5. Detalle de las medidas lineales tomadas de los caracteres morfológicos de *V. moyanoi*. A) **Planta entera:** 1 y 2, longitud y ancho de raíz; 3–5, anchos basal, medio y superior del vástago principal; 6, longitud de la inflorescencia. B) **Fruto:** 1–3 anchos; 4, longitud del aquenio. C) **Hoja:** 1, ancho base foliar; 2, ancho lámina; 3, longitud. D) **Hoja:** número de lóbulos. E) **Bráctea:** (en negro) acompañando las ramificaciones. Imagen modificada de la Flora Argentina (<http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/5040/55618>)

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

Tabla 3. Caracteres morfológicos seleccionados para *V. philippiana*

Estructura		Datos cuantitativos	Datos cualitativos		
Planta entera		1. Altura			
Rizoma y/o raíz		2. Ancho	Textura Forma		
		1. Longitud			
Tallo		2. Diámetro			
Hoja 1		3. Long. pecíolo	Pubescencia pecíolo Tipo de ápice		
		4. Ancho lámina			
		5. Long. lámina			
		6. N° lóbulos			
		7. Ancho Lob 1			
		8. Long. Lob 1			
		9. Ancho Lob 2			
		10. Long. Lob 2			
		11. Ancho Lob 3			
		12. Long. Lob 3			
Hoja 2		13. Long. pecíolo	Pubescencia pecíolo Tipo de ápice		
		14. Ancho lámina			
		15. Ancho lóbulo a lóbulo			
		16. Long. lámina			
		17. N° lóbulos			
		18. Ancho Lob 1			
		19. Long. Lob 1			
		20. Ancho Lob 2			
		21. Long. Lob 2			
		22. Ancho Lob 3			
		23. Long. Lob 3			
Inflorescencia		Bráctea basal		24. Ancho base foliar	Pubescencia Tipo de margen Tipo de ápice
				25. Ancho lámina	
				26. Longitud	
				27. N° lóbulos	
				28. Long. Lob 1	
		Bráctea media		29. Ancho Lob 1	Pubescencia Tipo de margen Tipo de ápice
				30. Ancho base foliar	
				31. Ancho lámina	
				32. Longitud	
				33. N° lóbulos	
		Bráctea superior		34. Long. Lob 1	Pubescencia Tipo de margen Tipo de ápice
				35. Ancho Lob 1	
				36. Ancho base foliar	
				37. Ancho lámina	
				38. Longitud	
Bractéola 1		39. N° lóbulos	Pubescencia Tipo de margen Tipo de ápice		
		40. Long. Lob 1			
		41. Ancho Lob 1			
		42. Ancho base			
		43. Ancho lámina			
		44. Longitud	Pubescencia		
		45. N° lóbulos			
		46. Ancho base			

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

	Bractéola 2	47. Ancho lámina	Tipo de margen Tipo de ápice
		48. Longitud	
		49. N° lóbulos	
	Bractéola 3	50. Ancho base	Pubescencia Tipo de margen Tipo de ápice
		51. Ancho lámina	
		52. Longitud	
		53. N° lóbulos	
	54. Longitud vástago		Pubescencia vástago principal
	55. Longitud zona de ramificación		
	56. N° de infloresc. x rizoma		
57. N° ramas del vástago principal			
Fruto	58. Ancho basal		Pubescencia
	59. Ancho medio		
	60. Ancho apical		
	61. Longitud		

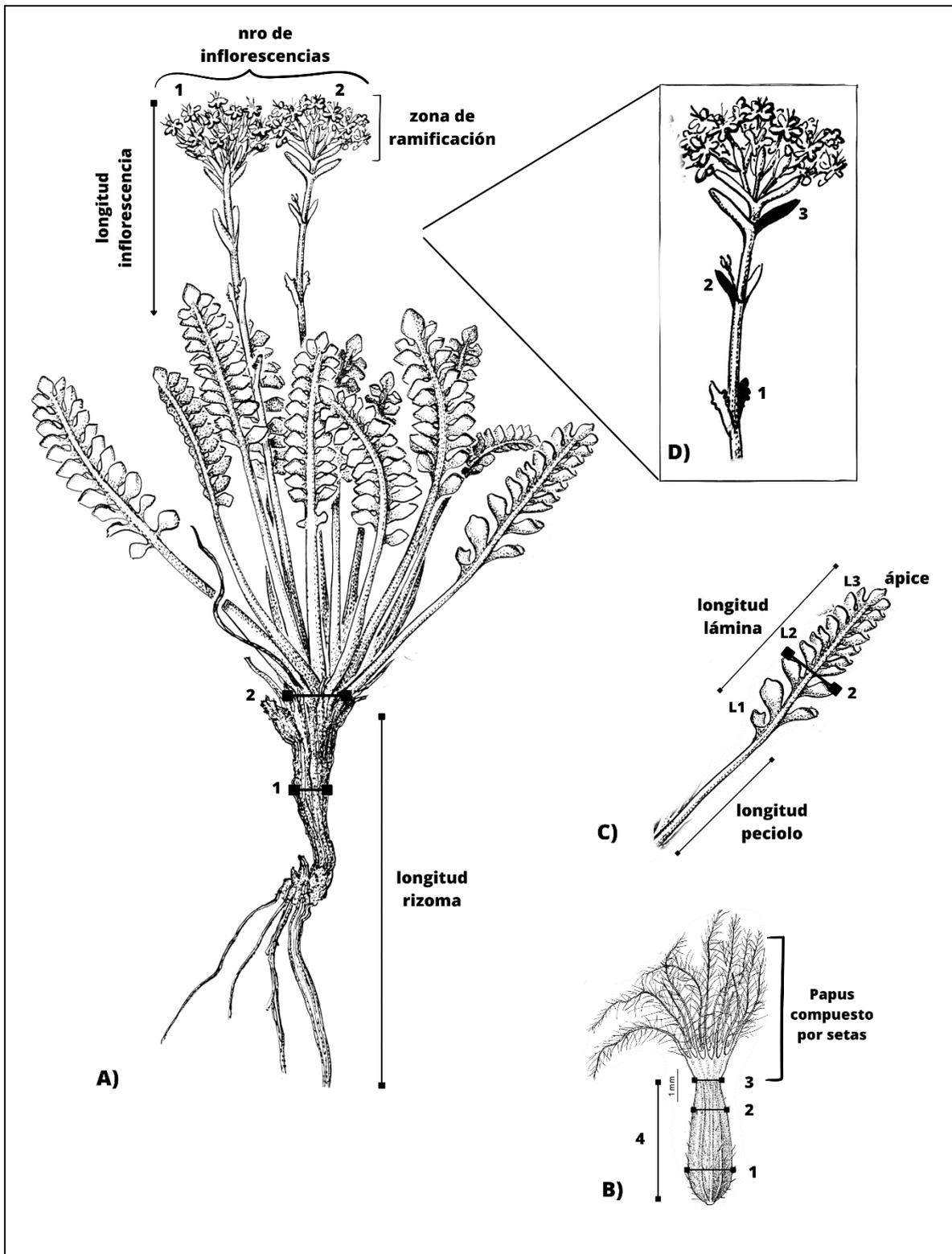


Figura 6. Detalle de los principales caracteres seleccionados para el caso de *V. philippiana*. A) **Planta entera:** 1, ancho del rizoma; 2, ancho del tallo. B) **Fruto:** 1–3, ancho; 4, longitud del aqenio. C) **Hoja:** 1, lóbulos; 2, ancho de la lámina. D) **Inflorescencia:** 1, bráctea basal; 2, bráctea media; 3, bráctea superior; se consideró bracteólas a aquellas estructuras foliares que acompañan las ramificaciones laterales, portadoras de flores. Imagen modificada de la Flora Argentina (<http://buscador.floraargentina.edu.ar/species/details/5099/55619>)

Análisis estadísticos

Se estimaron los coeficientes de correlación de Spearman para un total de 41 variables cuantitativas en el caso de *V. moyanoi*, con el objetivo de identificar aquellos pares de caracteres altamente correlacionados que pudieran distorsionar los análisis multivariados. El análisis de correlación se visualizó mediante un gráfico con distintas intensidades de color, los pares de variables con $\rho > 0,5$ se consideraron altamente correlacionadas y se descartó una de ellas, asumiendo que dos rasgos correlacionados podrían estar bajo el control de un solo gen con efectos pleiotrópicos (Laphitz & Semple, 2015).

La base de datos fue analizada mediante Análisis de Conglomerados (AC), Análisis Discriminante Lineal (ADL) y Análisis de Componentes Principales (ACP), con el objetivo de identificar patrones morfológicos que contribuyan a la separación entre poblaciones.

La población Tecka de *V. moyanoi*, no fue incluida en los análisis ya que se contaba solamente con dos individuos en estadio de floración. En el caso del AD, se utilizaron variables cuantitativas y cualitativas ordinales en algunos casos, mientras que en los ACP se utilizaron solamente las variables cuantitativas. Todos los valores de los caracteres morfológicos fueron estandarizados antes de realizar los análisis multivariados.

Además, de acuerdo a la distribución de los datos, se llevaron a cabo Análisis de Varianza a 1 factor (ANOVA) bajo la hipótesis nula de que las medias de los grupos son estadísticamente iguales, o en su defecto, la prueba de Kruskal Wallis (análisis no paramétrico) con la hipótesis nula de que las medianas de todas las poblaciones resultaban estadísticamente iguales entre sí. Los análisis estadísticos se realizaron con los softwares Infostat (Di Rienzo et al., 2020) y R studio v. 1.3.1073 (R Core Team, 2020).

Resultados

Valeriana moyanoi

Descripción:

Valeriana moyanoi Speg., Revista Fac. Agr. Univ. Nac. de L. P. 3: 607. 1897. TIPO: Argentina. Chubut, Río Corcovado, 2–III–1900, Ilín s.n. (holotipo, BAB 5150).

Valeriana fonckii Phil. var. *spiciformis* Dusén, Rep. Princeton Univ. Exped. Patagonia 3: 250, tab.3. 1914. TIPO: Argentina. Santa Cruz, Boquete Zeballos, entre Lago Buenos Aires y Lago Ghio, 1700 m s.m., 17–XII–1908, Skottsberg s.n. (SGO 58789).

Valeriana radicalis Clos var. *patagonica* Hicken, Darwiniana 2 (2–3): 70. 1930. TIPO: Argentina. Santa Cruz, 300 m s.m., 14–X–1929, Donat 168 (holotipo, SI 346).

Plantas de hasta 50 cm de alto, diámetro de la raíz principal entre 0,5 – 3,30 cm. Hojas basales dispuestas en roseta, de 0,9 a 9 cm, ancho de 0,3 a 1,5 cm. Las hojas pueden ser glabras o pubescentes, lo que resulta variable dentro y entre poblaciones (Tabla 4). El vástago principal de la inflorescencia se desarrolla engrosado en su zona basal (entre 0,4 – 2 cm) y a medida que crece en altura se vuelve más delgado (ancho de la zona media entre 0,2 – 1,5 cm, ancho de la parte superior entre 0,09 – 0,7 cm); la altura del vástago de las inflorescencias varía entre 4 – 50 cm. Las brácteas que acompañan a las ramificaciones basales, miden entre 8,5 y 53 mm de largo, con base foliar de 1 – 6 mm, y ancho de lámina de 0,9 – 8,5 mm. Pueden ser enteras o lobuladas, presentando hasta 13 lóbulos, de 1,9 mm de largo en promedio. A medida que se asciende por el vástago principal, se encuentran brácteas de 3 a 25 mm de largo y 0,4 a 5,5 mm de ancho, que pueden presentar hasta 12 lóbulos, de 0,7 mm de largo en promedio. Las brácteas de la región apical de la inflorescencia, miden 6 mm de longitud, con la base foliar un poco más ancha que la lámina (1,6 mm y 1,3 mm respectivamente). Por lo general son enteras, aunque se pueden encontrar hasta 6 lóbulos, de menos de 1 mm de largo. Las inflorescencias pueden ser laxas (RINR=10,68) o muy densas (RINR=0,82), con hasta 72 ramificaciones de primer orden. Las ramificaciones laterales de la parte basal del vástago principal, miden 0,5– 15,5 cm de largo y pueden dividirse en hasta 11 ramificaciones de segundo orden. En la zona media del escapo floral, las ramificaciones laterales varían entre 0,4 – 7 cm de longitud y pueden

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

contener 10 ramificaciones de segundo orden. Las ramificaciones de la zona apical del vástago principal de la inflorescencia, miden entre 0,1 – 4,5 cm de largo y por lo general se dividen en 2 ramificaciones de segundo orden. Las plantas son polígamas dioicas: algunas presentan flores perfectas y flores pistiladas, de estigma trífido, y otras presentan flores perfectas y flores masculinas con estambres exertos. Los frutos son aquenios piriformes, de entre 2 – 4 mm de longitud y 1 – 3 mm de ancho.

Tabla 4. Presencia de pelos en las hojas de las poblaciones de *V. moyanoi*. Con × se indica ausencia y con ✓ presencia de pelos, junto con el número de individuos que resultaron positivos para esa característica.

Poblaciones	Hoja basal		Hoja superior	
	Pubescencia en toda la lámina	Pubescencia sólo en el envés	Pubescencia en toda la lámina	Pubescencia sólo en el envés
Lago Fontana (FO)	×	✓ 6 ind.	×	✓ 8 ind.
Rio Limay (RL)	×	×	×	×
Co. Nahuelpan (NA) morfotipo “flores amarillas”	×	✓ 8 ind.	×	✓ 8 ind.
Co. Nahuelpan (NA)	×	✓ 5 ind.	×	✓ 8 ind.
Talagapa (TA)	×	×	×	×
Tecka (TE)	×	✓ 2 ind.	×	✓ 2 ind.
Co. Chahuaco (CH)	✓ 3 ind.	✓ 5 ind.	×	✓ 7 ind.
Monte Zeballos (ZE)	×	✓ 1 ind.	×	✓ 1 ind.

Variabilidad morfológica entre poblaciones de *Valeriana moyanoi*

Se destacaron dos poblaciones de acuerdo a la morfología general de los ejemplares observados. Por un lado, la población situada a orillas del Rio Limay (RL, Fig. 7A) y por el otro, la población del Cerro Nahuelpan (NA). Las plantas pertenecientes a la población RL fueron significativamente más altas que el resto ($p < 0,05$; Anexo I), con un valor promedio de 34,95 cm. También presentaron hojas glabras (Fig. 7B y C) y las brácteas medias y superiores más largas (valor promedio de 15,6 mm y 7,5 mm respectivamente), aunque sin diferencias significativas con TA. Las inflorescencias observadas fueron más bien laxas (al momento de su recolección se encontraban en estadio de fructificación; Fig. 7D). Este sitio fue visitado una segunda vez, encontrándose un solo ejemplar en estadio de floración (Fig. 7E) que exhibía flores pequeñas de corolas amarillas. Se destacó la imbricación de numerosas brácteas en las ramificaciones terminales de la inflorescencia (Fig. 7F). Los aquenios de RL (valor promedio 2,7 mm) junto con los de la población de Lago Fontana (FO) fueron los más pequeños en longitud y ancho.

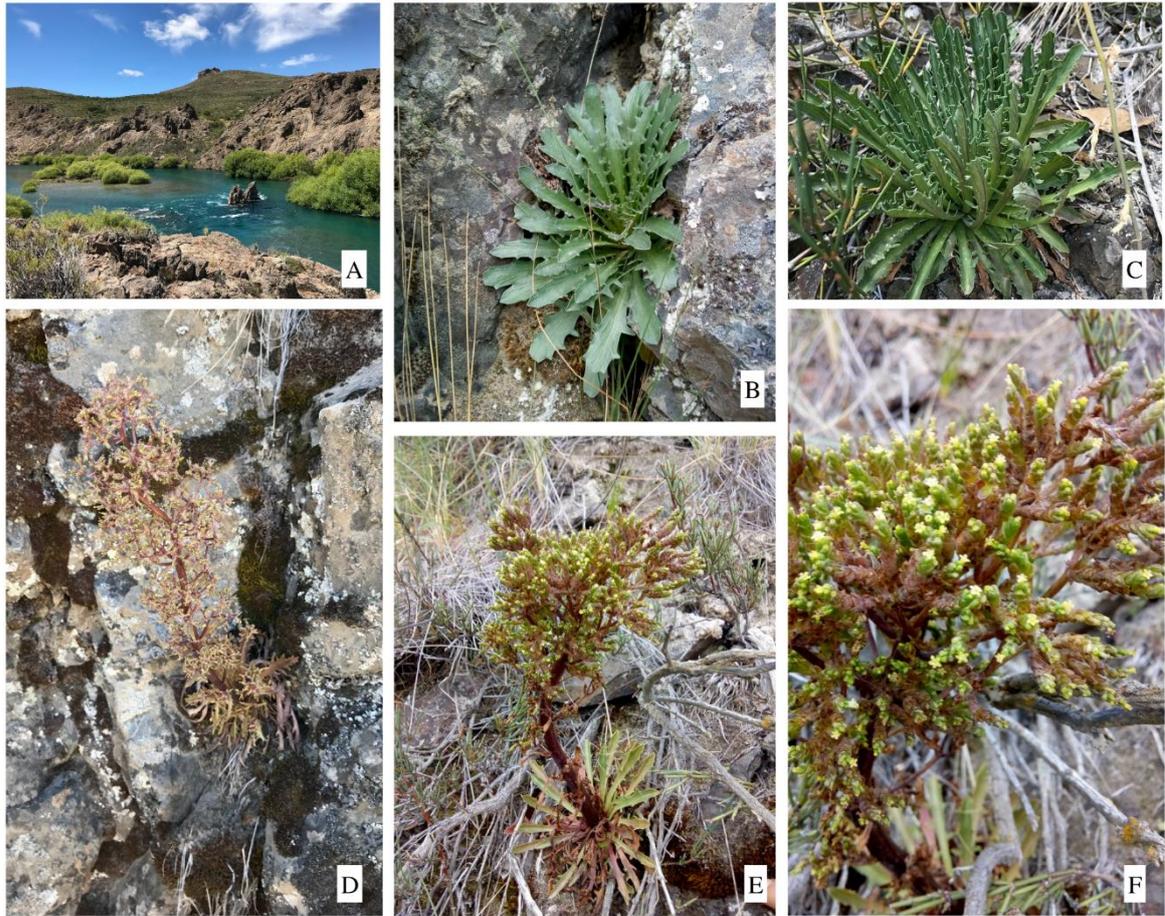


Figura 7. *V. moyanoi*, plantas de la población RL en diferentes estadios fenológicos. A) Sitio donde crecen las plantas; (B–C) rosetas de un año de edad; d) ejemplar fructificando; (E–F) ejemplar en floración, obsérvese las flores amarillas y numerosas bracteólas imbricadas.

En el caso de la población NA (Fig.8A), a medida que se ascendió por la montaña, se observaron distintos morfotipos: a 1376 msnm de altitud se registraron ejemplares pequeños con flores pistiladas de color amarillo pálido, con estambres reducidos (aparentemente no funcionales) y estilos exertos (Fig. 8B y C). Asimismo, se observaron ejemplares más altos (altura promedio de 18 cm), con flores grandes, estaminadas, de corolas bicolor: por dentro amarillentas y por fuera tendiendo a marrón-rojizas, en las que el gineceo se encontraba disminuido (Fig. 8D y E). Estos morfotipos coexistían con algunos ejemplares típicos de corolas rosadas (estaminadas o pistiladas), sin observarse individuos intermedios visibles (Fig. 8F). A mayor altitud (1560 msnm), se encontraron plantas de menor porte y exclusivamente con flores rosadas.

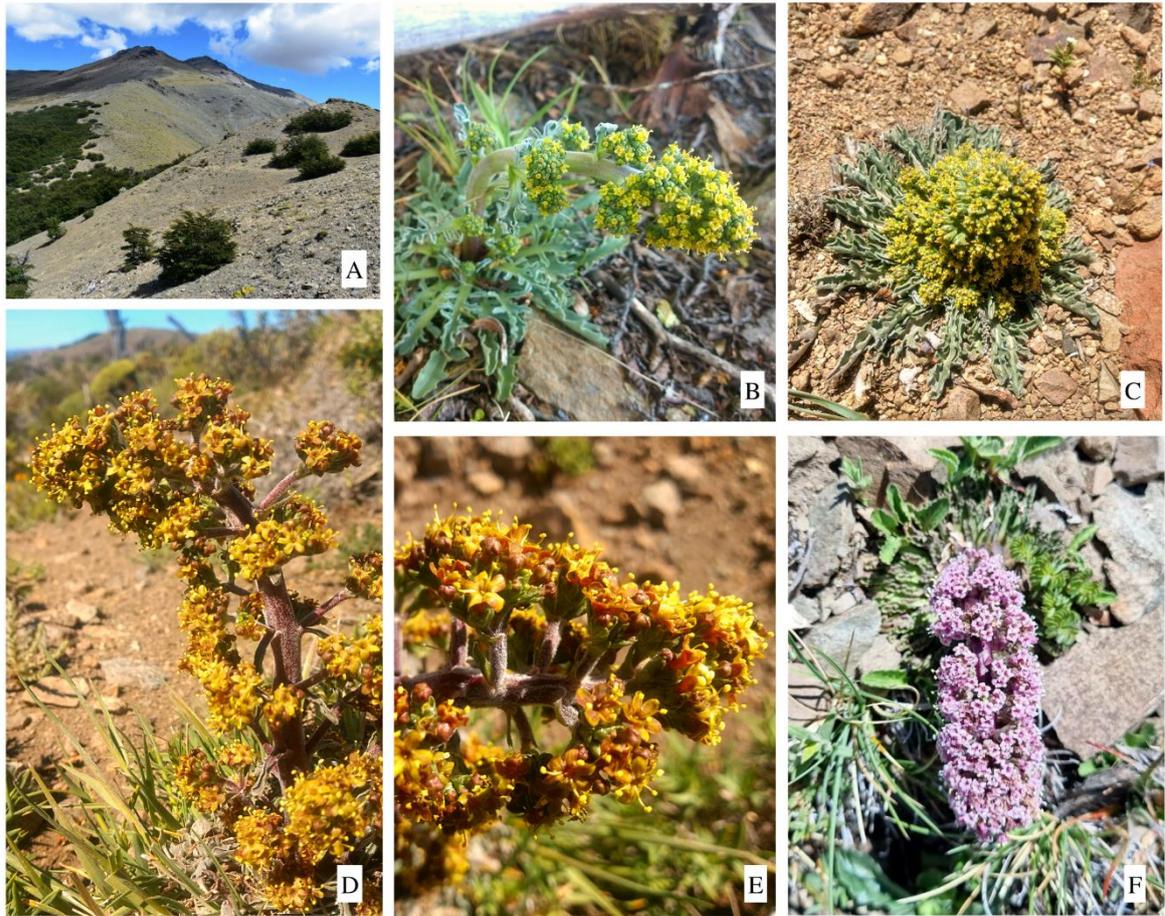


Figura 8. *V. moyanoi*, diferentes morfotipos observados en la población NA (Chubut). (B–C) pies femeninos, flores pistiladas (D–E) pies masculinos con flores estaminadas, a 1376 msnm (F) ejemplares típicos de flores rosadas, en este caso pie masculino (flores estaminadas) creciendo a 1560 msnm.

Por otro lado, los individuos de los cerros Chaluaco (CH) y Nahuelpan (NA) registraron raíces de diámetros mayores en comparación con el resto de poblaciones ($p < 0,05$; Anexo I). Las brácteas basales tuvieron longitudes mayores en la población Talagapa (TA), aunque sin diferencias significativas con RL y NA. Finalmente, los aquenios de las plantas del Cerro Chaluaco (CH) resultaron significativamente más largos y anchos que los frutos de las demás poblaciones.

En base a los resultados obtenidos a partir del análisis de Correlación de Spearman (Fig. 9), se descartaron algunas variables cuantitativas para realizar los Análisis Multivariados, considerando 25 variables totales: Longitud (LF) y ancho medio del aquenio (A2), altura de las plantas (HP), diámetros de las raíces (DR), longitud hoja basal (LHB), ancho del pecíolo (AP), número de lóbulos hoja basal (NLHB), ancho pecíolo hoja superior (APHS), ancho lámina hoja superior (ALHS), ancho base foliar bráctea basal (ABFB), ancho lámina bráctea

basal (ALBB), número de lóbulos bráctea basal (NLBB), longitud bráctea media (LBM), ancho base foliar bráctea media (ABFBM), longitud bráctea superior (LBS), número de lóbulos bráctea superior (NLBS), número de ramas de 2do orden de rama primera (NR1), media (NR2) y superior (NR3), longitud rama media (LRM), relación entre la longitud de la rama media y el número de ramas de segundo orden (RR2NR), ancho basal (ABI) y superior (ASI) de la inflorescencia, número total de ramificaciones (NR) e índice de compactación de la inflorescencia (RLINR).

Los morfotipos amarillos de la población NA, fueron incluidos en los Análisis Multivariados considerando 23 variables cuantitativas en total, ya que, al encontrarse los individuos en estadio de floración, no se registraron las medidas de los frutos.

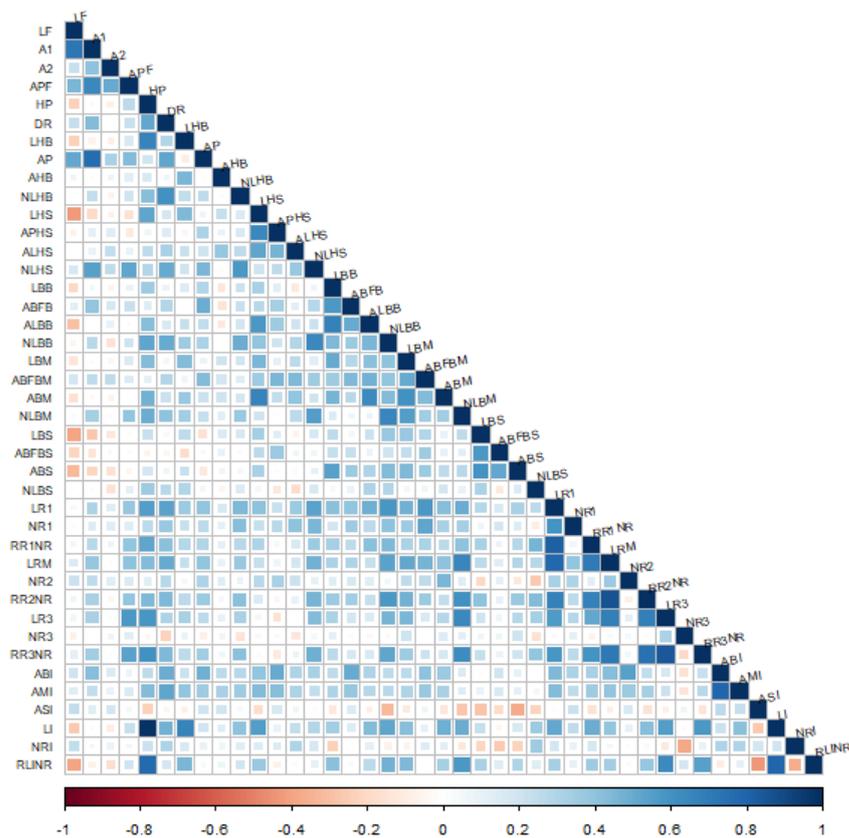


Figura 9. Matriz de correlación, en color azul se observan las variables correlacionadas de manera positiva, en rojo, las correlaciones negativas. A mayor intensidad de color, mayor correlación.

LF= longitud del aquenio; **A1** y **A2**= anchos medio y mayor del aquenio; **APF**= ancho del ápice del aquenio; **HP**= altura de la planta; **DR**= diámetro raíz; **LHB**= longitud hoja basal; **AP**= ancho pecíolo hoja basal; **AHB**= ancho hoja basal; **NLHB**= número de lóbulos hoja basal; **LHS**= longitud hoja superior; **APHS**= ancho pecíolo hoja superior; **ALHS**= ancho lámina hoja superior; **NLHS**= número lóbulos hoja superior; **LBB**= longitud

bráctea basal; **ABFB**= ancho base foliar bráctea basal; **ALBB**= ancho lámina bráctea basal; **NLBB**= número de lóbulos bráctea basal; **LBM**= longitud bráctea media; **ABFBM**= ancho base foliar bráctea media; **ABM**= ancho bráctea media; **NLBM**= número lóbulos bráctea media; **LBS**= longitud bráctea superior; **ABFBS**= ancho base foliar bráctea superior; **ABS**= ancho bráctea superior; **NLBS**= número de lóbulos bráctea superior; **LR1**= longitud rama basal; **NR1**= número de ramas de 2do orden de la rama basal; **RR1NR**= relación entre la longitud de la rama basal y el número de ramas de segundo orden (índice compactación); **LRM**= longitud rama media; **NR2**= número de ramas de 2do orden de la rama media; **RR2NR**= relación entre la longitud de la rama media y el número de ramas de segundo orden (índice compactación); **LR3**= longitud rama superior; **NR3**= número de ramas de 2do orden de la rama superior; **RR3NR**= relación entre la longitud de la rama superior y el número de ramas de segundo orden (índice compactación); **ABI**= ancho basal inflorescencia; **AMI**= ancho medio inflorescencia; **ASI**= ancho superior inflorescencia; **LI**= longitud del vástago de la inflorescencia; **NRI**= número de ramas totales; **RLINR**= relación entre la longitud de la inflorescencia y el número de ramificaciones (índice compactación).

Análisis multivariados sin incluir el morfotipo “flores amarillas” de la población NA

En el ACP con todas las poblaciones de *V. moyanoi* los tres primeros componentes explicaron el 50% de la variación total. Observando los autovectores (1, 2 y 3), las variables altura de planta, ancho lámina de bráctea basal, número de lóbulos bráctea basal, longitud rama media, longitud bráctea media y relación entre la longitud de la rama media y el número de ramas de segundo orden (RR2RM) expresaron la principal variación en el componente principal 1 (CP 1); mientras que las variables longitud aquenio, ancho del pecíolo de la hoja basal, longitud bráctea superior, ancho basal y superior de la inflorescencia y relación entre la longitud del vástago de la inflorescencia y el número total de ramas, fueron importantes en el CP 2. Por último, las variables diámetro de raíz, ancho del pecíolo hoja superior, longitud de la bráctea media, número de ramificaciones de 2do orden de la rama media, relación entre la longitud de la rama media y el número de ramas de segundo orden, número de ramificaciones de 2do orden de la rama superior y número total de ramificaciones de la inflorescencia, fueron responsables de la principal variación en el CP 3 (Tabla 5). El coeficiente de correlación cofenética fue alto (0,90), indicando un buen ajuste en relación a las distancias Euclídeas en el espacio reducido y las distancias en el multiespacio original. En los gráficos del ACP (Figs. 10–12) se destaca la separación de los individuos de la población RL del resto de poblaciones, sobre todo en los gráficos CP1 vs CP2 y CP2 vs CP3.

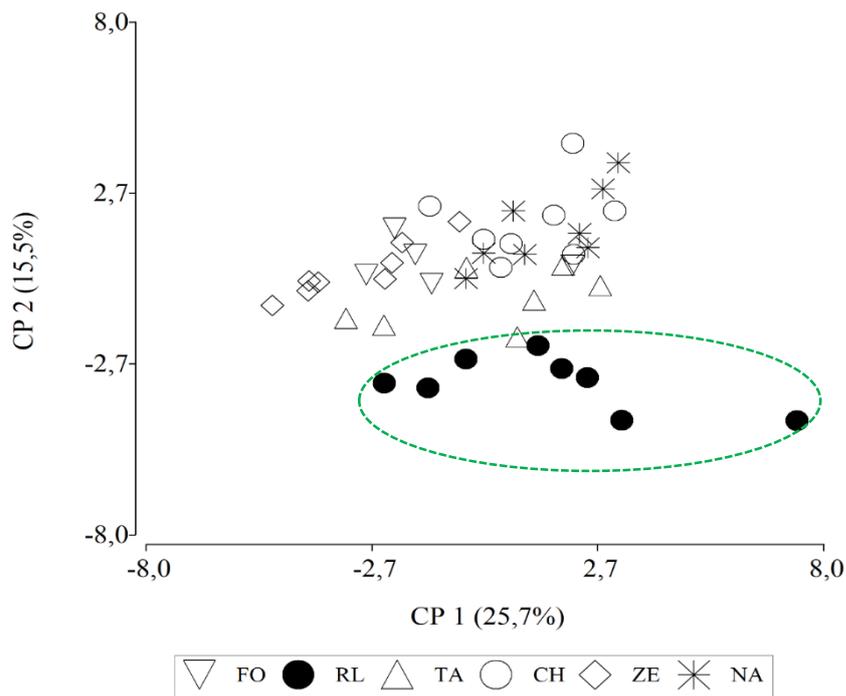


Figura 10. Análisis de Componentes Principales. Gráfico de dispersión del valor medio de los especímenes de *V. moyanoi* en los 2 primeros componentes principales, basado en 25 variables cuantitativas. Se señala con elipse los individuos de **RL**. Poblaciones: **FO**, Lago Fontana; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **CH**, Cerro Chahuaco; **ZE**, Monte Zeballos; **NA**, Cerro Nahuelapan.

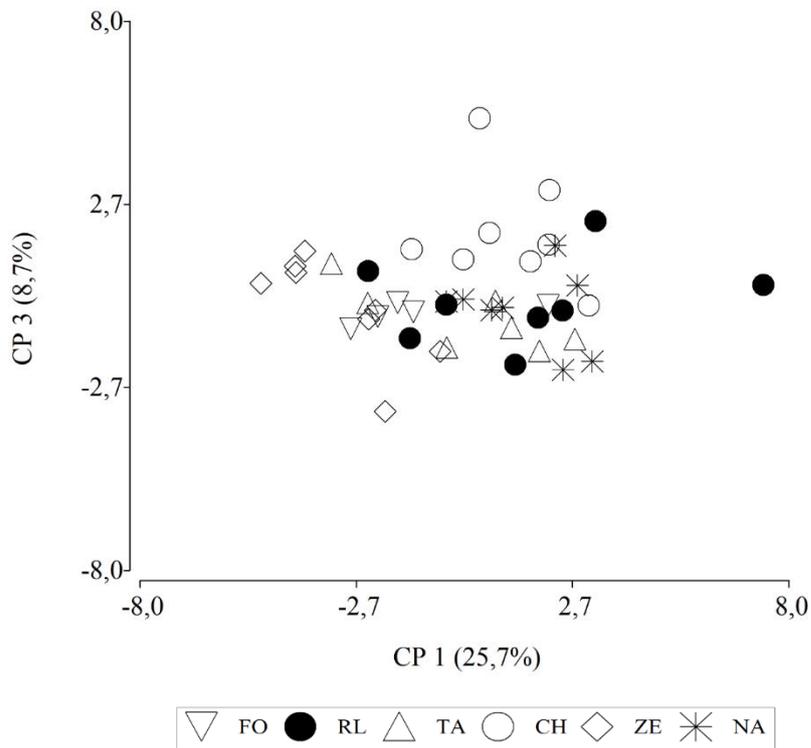


Figura 11. Análisis de Componentes Principales. Gráfico de dispersión del valor medio de los especímenes de *V. moyanoi* en los componentes principales 1 y 3, basado en 25 variables cuantitativas. Poblaciones: **FO**, Lago Fontana; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **CH**, Cerro Chaluaco; **ZE**, Monte Zeballos; **NA**, Cerro Nahuelapan.

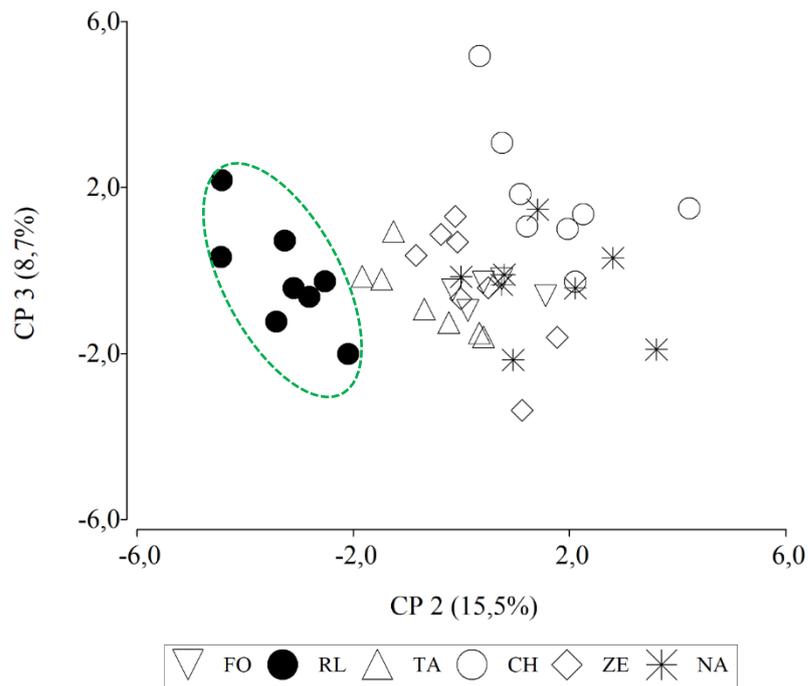


Figura 12. Análisis de Componentes Principales. Gráfico de dispersión del valor medio de los especímenes de *V. moyanoi* en los componentes principales 2 y 3, basado en 25 variables cuantitativas. Se señala (elipse) los individuos de **RL**. Poblaciones: **FO**, Lago Fontana; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **CH**, Cerro Chahuaco; **ZE**, Monte Zeballos; **NA**, Cerro Nahuelapan.

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

Tabla 5. Análisis de Componentes Principales. Autovectores 1, 2 y 3. En negrita se indican las variables que más aportaron a la variación en cada componente.

Variables	1	2	3
1. Longitud aquenio (LF)	-0,03	0,34	0,25
2. Ancho medio fruto (A2)	0,01	0,21	-0,02
3. Altura planta (HP)	0,28	-0,21	0,08
4. Diámetro raíz (DR)	0,22	0,21	0,33
5. Longitud hoja basal (LHB)	0,22	-0,19	0,01
6. Ancho pecíolo hoja basal (AP)	0,17	0,30	0,20
7. N° lóbulos hoja basal (NLHB)	0,19	0,07	0,16
8. Ancho pecíolo hoja superior (APHS)	0,13	0,20	-0,29
9. Ancho hoja superior (ALHS)	0,23	0,02	-0,14
10. Ancho base foliar bráctea basal (ABFB)	0,19	0,20	-0,11
11. Ancho lámina bráctea basal (ALBB)	0,27	-0,14	-0,10
12. N° lóbulos bráctea basal (NLBB)	0,29	-0,06	0,04
13. Longitud bráctea media (LBM)	0,26	-0,10	-0,29
14. Ancho base foliar bráctea media (ABFBM)	0,24	0,16	-0,27
15. Longitud bráctea superior (LBS)	0,20	-0,28	-0,01
16. N° lóbulos bráctea superior (NLBS)	0,17	-0,23	0,24
17. N° ramas 2do orden rama 1 (NR1)	0,22	0,13	-0,20
18. Longitud rama media (LR2)	0,30	0,07	0,11
19. N° ramas rama media (NR2)	0,10	0,25	-0,31
20. Índice de compactación (RR2NR)	0,26	-0,07	0,28
21. N° ramas R3 (NR3)	-0,04	-0,04	-0,30
22. Ancho basal inflorescencia (ABI)	0,19	0,31	-0,03
23. Ancho superior inflorescencia (ASI)	-0,02	0,30	0,01
24. N° total de ramas (NRI)	0,13	0,06	0,27
25. Índice de compactación I (RLINR)	0,19	-0,27	-0,10

En el AC la correlación cofenética fue de 0,76 indicando un buen agrupamiento de los datos. Teniendo en cuenta una distancia Euclídea de 6, se observaron 4 conglomerados. Las poblaciones que resultaron más similares entre sí fueron Monte Zeballos y Lago Fontana, por un lado y Cerro Chalhuaco junto con Cerro Nahuelpan por el otro. Talagapa y Rio Limay se separaron como grupos independientes (Fig. 13). Estas dos poblaciones están localizadas en zonas particulares, Talagapa es el sitio más al Este donde hallamos ejemplares de *V. moyanoi*, mientras que Rio Limay se encuentra a orillas del río homónimo, a una altura de 748 msnm.

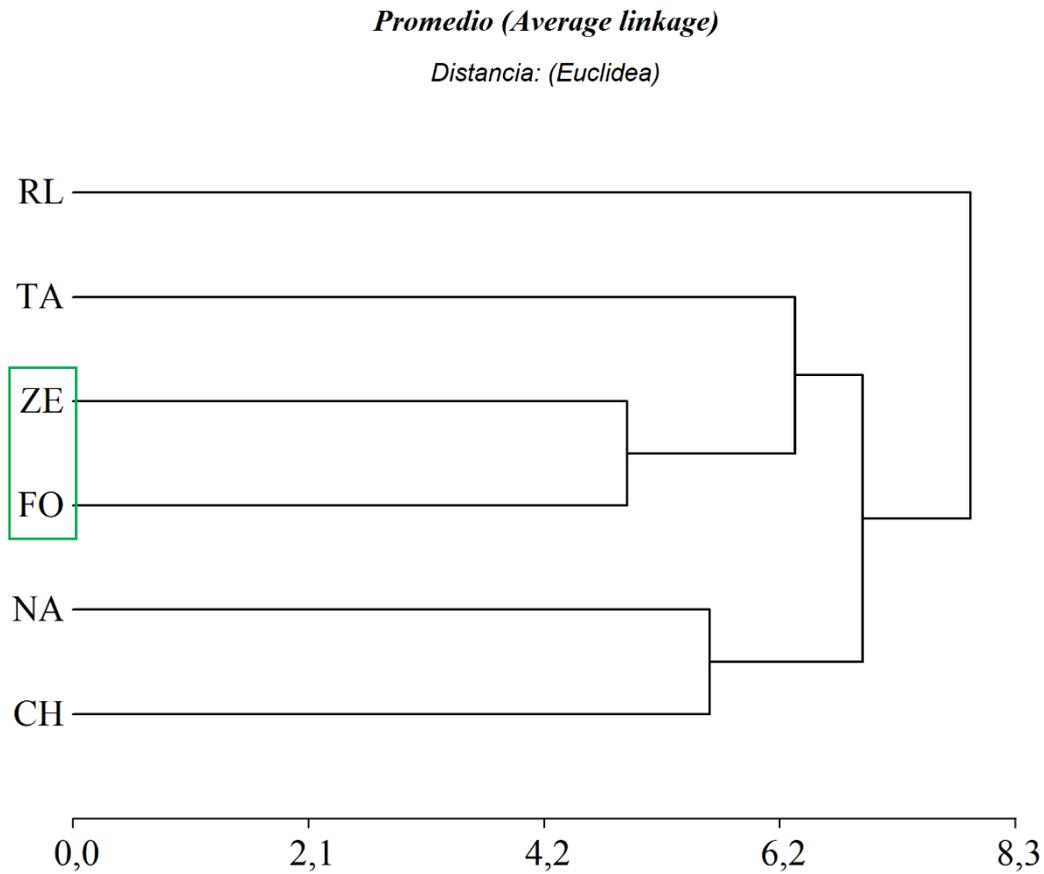


Figura 13. Análisis de Conglomerados. Dendograma obtenido a partir de las poblaciones de *V. moyanoi* estudiadas: **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **ZE**, Monte Zeballos; **FO**, Lago Fontana; **NA**, Cerro Nahuelapan; **CH**, Cerro Chalhuaco. Se indica en el rectángulo las poblaciones más similares.

Por otro lado, en el ADL se discriminaron entre 3 y 4 grupos en base a las 25 variables seleccionadas. En el gráfico de los ejes canónicos 1 vs 2, se observaron a las poblaciones RL, ZE y CH como grupos separados (Fig. 14). En el gráfico de los ejes canónicos 1 vs 3, se observó a los individuos de RL y CH separados del resto de poblaciones (Fig. 15).

El eje canónico 1 explicó el 56,34% de la variación total entre poblaciones. A partir de las funciones discriminantes estandarizadas por las varianzas comunes, se observó que las variables índice de compactación de la rama media de la inflorescencia, longitud y ancho medio del aquenio, longitud de la rama media de la inflorescencia, número de ramas de 2do orden de la rama media de la inflorescencia, altura de las plantas y número de lóbulos de hoja basal, fueron las más importantes para la discriminación sobre el eje 1, mientras que las variables ancho del pecíolo de la hoja basal, número de lóbulos de la bráctea basal, longitud

de rama media de la inflorescencia, número de ramas de 2do orden de la rama media y el índice de compactación de la rama media de la inflorescencia, fueron las más importantes para el eje canónico 2, que explicó el 17,97% de la variación. Por último, el eje canónico 3 explicó el 12,68% de la variación total, siendo las variables altura planta, longitud hoja basal, número de lóbulos de bráctea basal y número de ramas de 2do orden de la rama basal, las más importantes en este eje (Tabla 6).

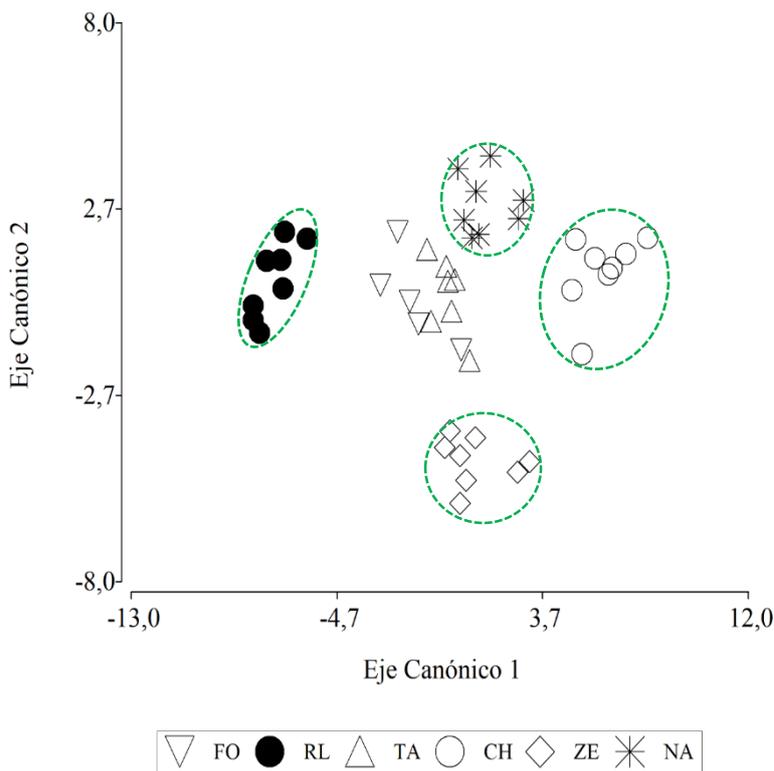


Figura 14. Análisis Discriminante Lineal. Gráfico de los ejes canónicos 1 vs 2 para las poblaciones de *V. moyanoi*. Se destacan en verde las poblaciones más separadas. Poblaciones: **FO**, Lago Fontana; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **CH**, Cerro Chalhucaco; **ZE**, Monte Zeballos; **NA**, Cerro Nahuelpan.

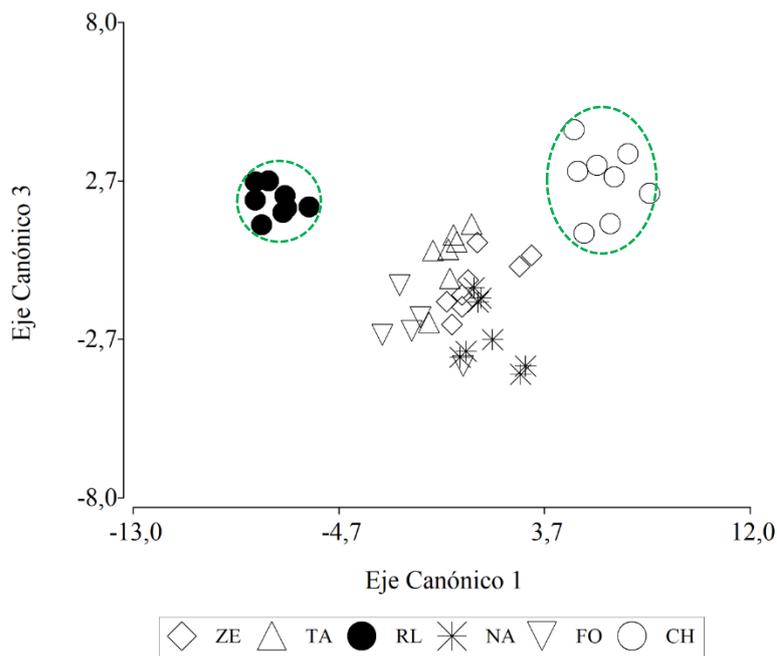


Figura 15. Análisis Discriminante Lineal. Gráfico de los ejes canónicos 1 vs 3. Se destacan (rectángulos) las poblaciones RL y CH claramente separadas del resto. Poblaciones: **FO**, Lago Fontana; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **CH**, Cerro Chalhuaco; **ZE**, Monte Zeballos; **NA**, Cerro Nahuelpan.

Tabla 6. Análisis Discriminante Lineal- Funciones discriminantes, datos estandarizados con las varianzas comunes. En negrita los valores más importantes en cada eje.

Variables	1	2	3
1. Longitud aquenio	1,10	-0,46	0,42
2. Ancho medio fruto	0,86	0,15	-0,19
3. Altura planta	-0,66	-0,18	0,84
4. Diámetro raíz	-0,04	0,34	-0,21
5. Longitud hoja basal	-0,28	-0,13	0,70
6. Ancho peciolo hoja basal	0,26	0,65	0,23
7. N° lóbulos hoja basal	0,79	-0,34	0,47
8. Ancho peciolo hoja superior	0,02	0,16	-0,35
9. Ancho hoja superior	0,05	0,32	-0,10
10. Ancho base foliar bráctea basal	-0,05	0,53	0,20
11. Ancho lámina bráctea basal	-0,13	-0,56	-0,11
12. N° lóbulos bráctea basal	-0,26	0,77	-0,96
13. Longitud bráctea media	-0,11	-0,33	0,49
14. Ancho base foliar bráctea media	0,11	-0,29	-0,13
15. Longitud bráctea superior	-0,71	0,02	0,41
16. N° lóbulos bráctea superior	0,02	0,23	0,10
17. N° ramas 2do orden rama 1	0,19	-0,03	-0,67
18. Longitud rama media (R2)	-1,35	2,31	-0,42
19. N° ramas R2	0,95	-0,69	0,26
20. Índice de compactación R2	2,10	-1,71	0,19
21. N° ramas R3	-0,39	-0,27	-0,25
22. Ancho basal inflorescencia	-0,07	-0,44	-0,43
23. Ancho superior inflorescencia	0,39	0,20	0,45
24. N° total de ramas	0,16	-0,06	0,15
25. <u>Índice de compactación I</u>	<u>0,21</u>	<u>0,52</u>	<u>0,05</u>

Análisis Multivariados incluyendo el morfotipo “flores amarillas” de la población NA

En el ACP los tres primeros componentes explicaron el 48% de la variación total. Observando los tres autovectores (1, 2 y 3), las variables altura de planta (HP), longitud rama media (LRM), relación entre la longitud de la rama media y el número de ramas de segundo orden (RR2RM), longitud bráctea media (LBM), número de lóbulos bráctea basal (NLBB) y ancho de lámina de bráctea basal (ALBB) expresaron la principal variación en el

componente principal 1 (CP 1); mientras que las variables ancho del pecíolo de la hoja basal (AP), ancho superior del vástago de la inflorescencia (ASI); ancho del pecíolo de la hoja superior (APHS), ancho basal del vástago de la inflorescencia (ABI) e índice de compactación de la inflorescencia (RLINR) fueron importantes en el CP 2. Por último, las variables diámetro de raíz (DR), número de lóbulos de la hoja basal (NLHB), número de ramas de 2do orden de la rama superior (NR3), número de ramas de segundo orden de rama media (NR2), longitud bráctea media (LBM) y ancho base foliar bráctea media (ABFBM) fueron responsables de la principal variación en el CP 3 (Tabla 7). En los gráficos CP1 vs CP2 y CP2 vs CP3 del ACP (Figs. 16–18) también se destaca la separación de los individuos de la población RL del resto de poblaciones.

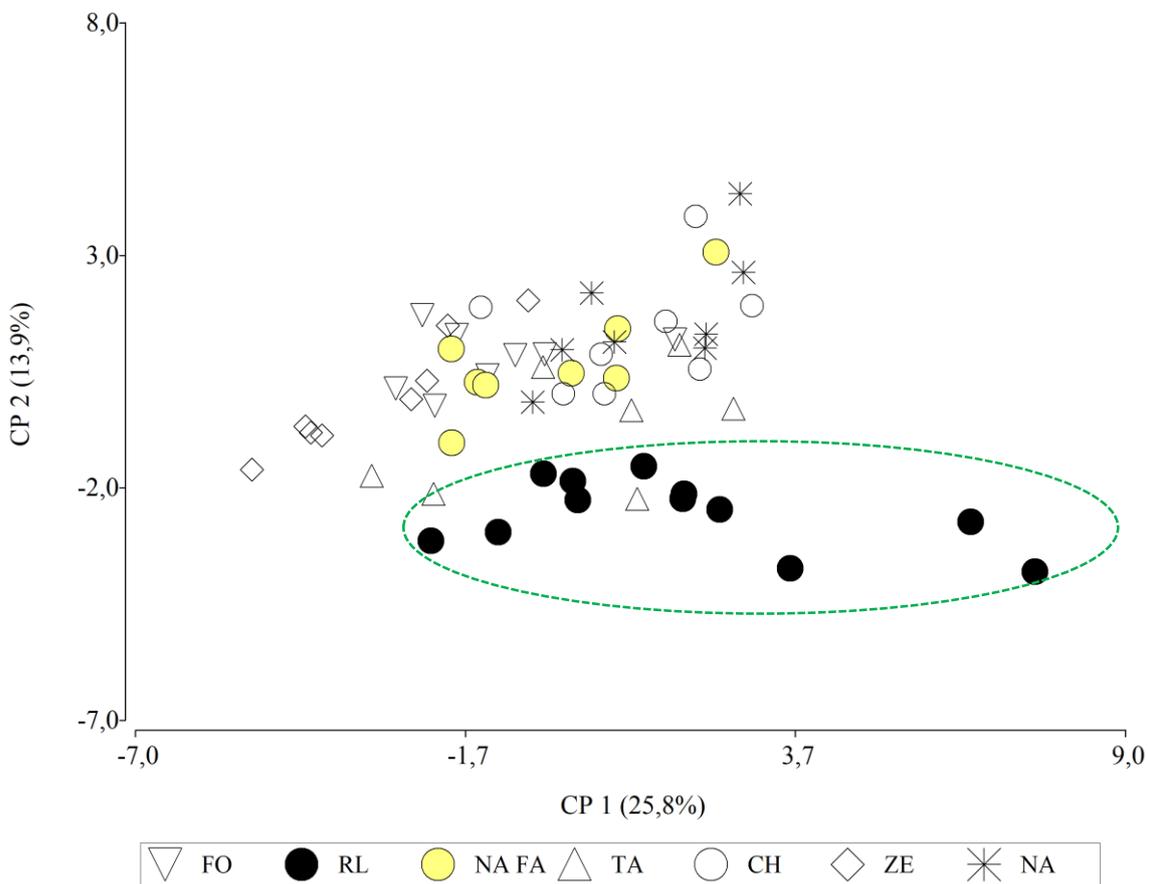


Figura 16. Análisis de Componentes Principales. Gráfico de dispersión del valor medio de los especímenes de *V. moyanoi* en los componentes principales 1 y 2, basado en 23 variables cuantitativas. Se señalan dentro del elipse todos los individuos de RL y dos de TA. Poblaciones: **FO**, Lago Fontana; **RL**, Rio Limay; **NA FA**, Cerro Nahuelpan morfotipo flores amarillas; **TA**, Talagapa; **CH**, Cerro Chaluaco; **ZE**, Monte Zeballos; **NA**, Cerro Nahuelapan.

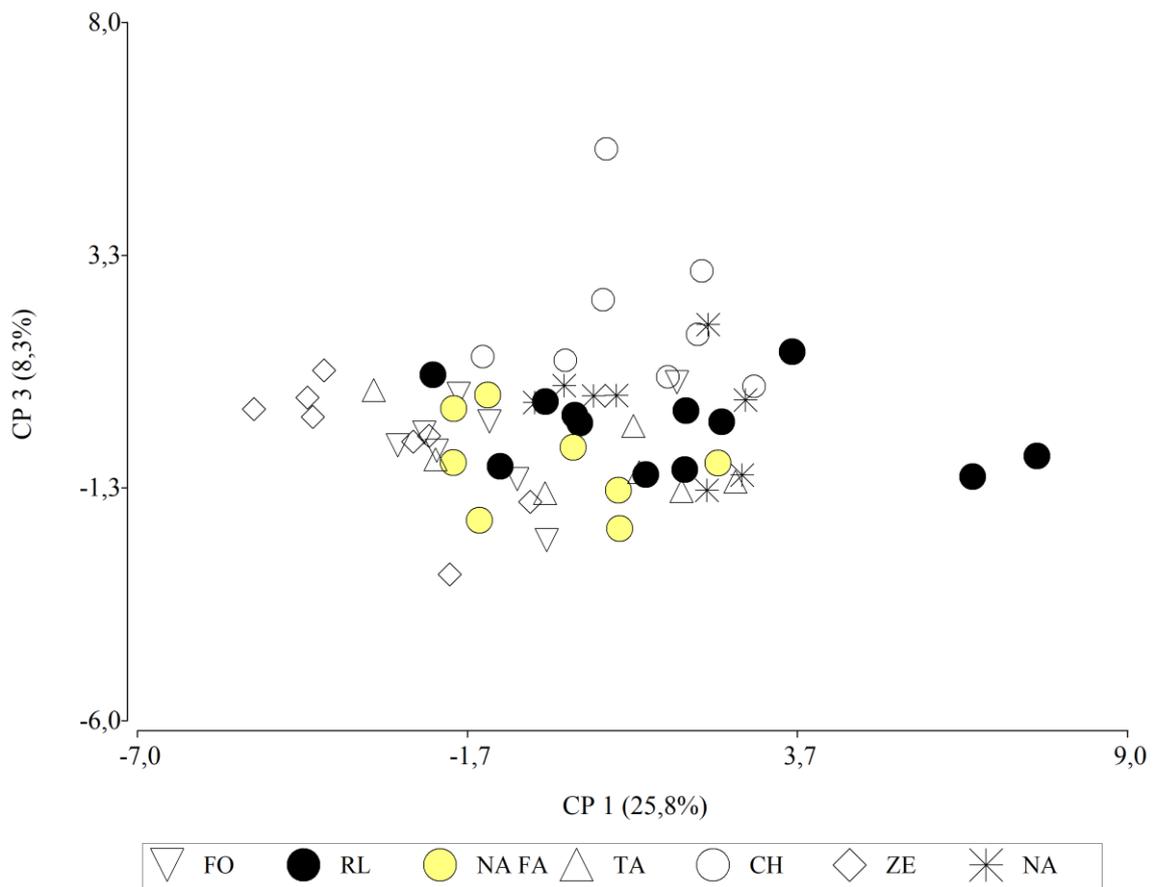


Figura 17. Análisis de Componentes Principales. Gráfico de dispersión del valor medio de los especímenes de *V. moyanoi* en los componentes principales 1 y 3, basado en 23 variables cuantitativas. Poblaciones: **RL**, Rio Limay; **ZE**, Monte Zeballos; **TA**, Talagapa; **FO**, Lago Fontana; **NA FA**, Cerro Nahuelpan morfotipo flores amarillas; **NA**, Cerro Nahuelapan (flores rosadas); **CH**, Cerro Chahuaco.

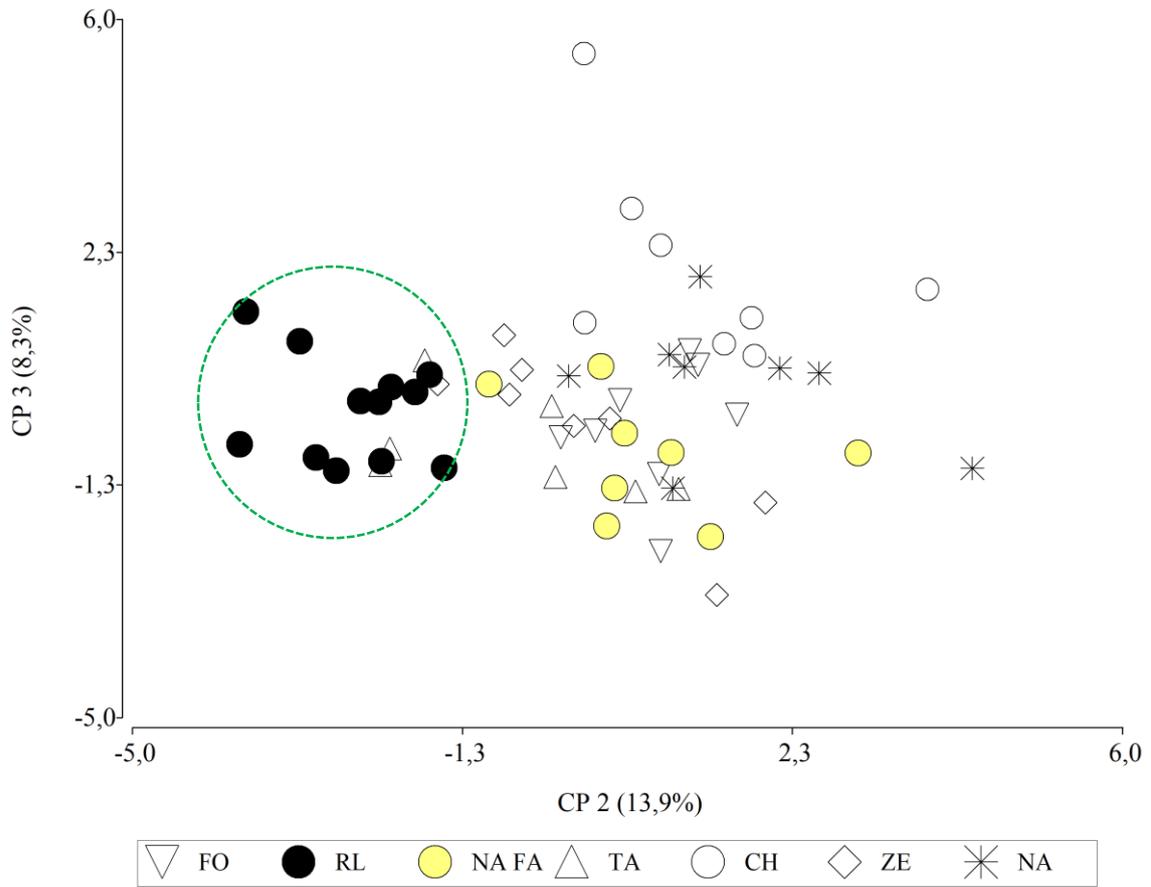


Figura 18. Análisis de Componentes Principales. Gráfico de dispersión del valor medio de los especímenes de *V. moyanoi* en los componentes principales 1 y 3, basado en 23 variables cuantitativas. Se señala (elipse) los individuos de RL. Poblaciones: **RL**, Rio Limay; **ZE**, Monte Zeballos; **TA**, Talagapa; **FO**, Lago Fontana; **NA FA**, Cerro Nahuelpan morfotipo flores amarillas; **NA**, Cerro Nahuelapan (flores rosadas); **CH**, Cerro Chalhuaco.

Tabla 7. Análisis de Componentes Principales- Autovectores 1, 2 y 3. En negrita se indican las variables que más aportaron a la variación en cada componente.

Variables	1	2	3
1. HP	0,30	-0,22	0,07
2. DR	0,21	0,23	0,42
3. LHB	0,22	-0,11	-0,03
4. AP	0,14	0,34	0,25
5. NLHB	0,13	0,08	0,36
6. APHS	0,09	0,31	-0,12
7. ALHS	0,25	-0,02	-0,11
8. ABFB	0,19	0,26	-0,07
9. ALBB	0,26	-0,06	-0,18
10. NLBB	0,26	-0,04	0,05
11. LBM	0,27	-0,12	-0,30
12. ABFBM	0,21	0,25	-0,30
13. LBS	0,23	-0,28	-0,09
14. NLBS	0,17	-0,20	0,15
15. NR1	0,20	0,11	-0,17
16. NR2	0,06	0,28	-0,33
17. NR3	-0,02	0,09	-0,35
18. LRM	0,32	0,04	0,04
19. RR2RM	0,29	-0,11	0,21
20. ABI	0,20	0,30	0,03
21. ASI	-0,03	0,34	0,04
22. NRI	0,13	0,09	0,19
23. RLINR	0,22	-0,29	-0,05

En el AC la correlación cofenética fue de 0,70 indicando un buen agrupamiento de los datos. Teniendo en cuenta una distancia Euclídea de 5, se observaron 6 conglomerados. Las poblaciones FO y el morfotipo amarillo NA FA fueron agrupadas, siendo más similares entre sí. El resto de poblaciones se separaron como grupos independientes (Fig. 19).

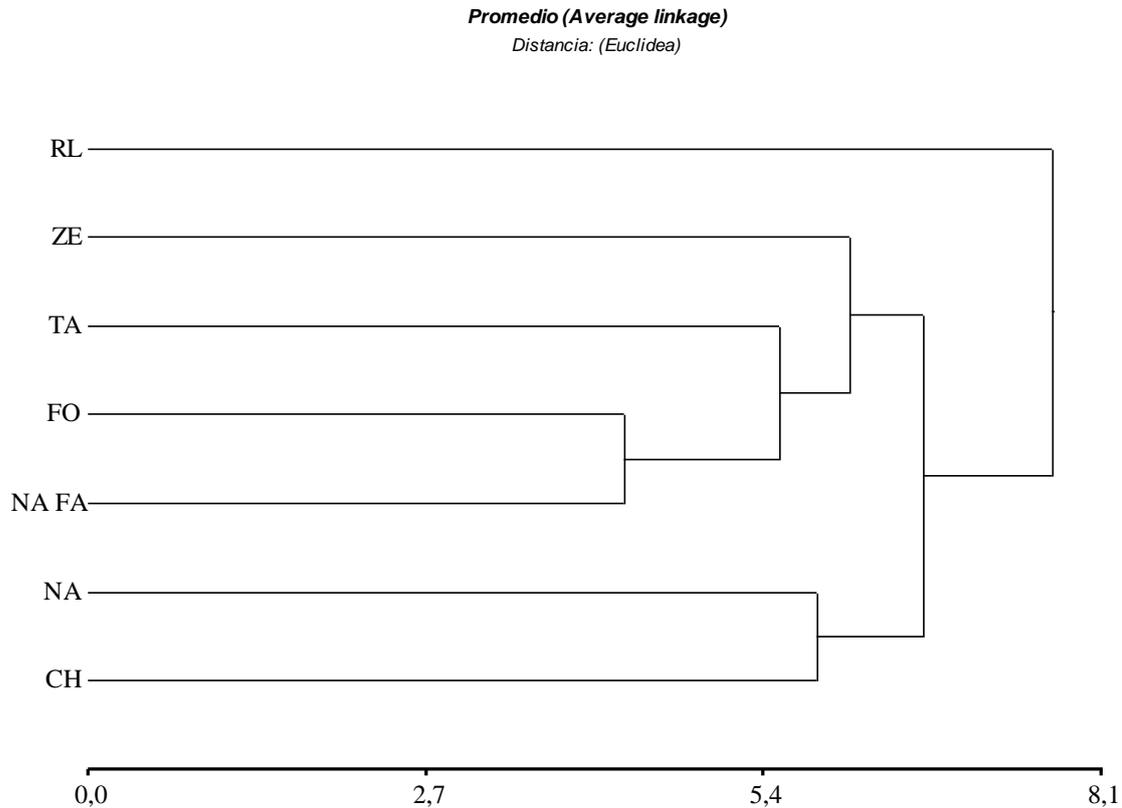


Figura 19. Análisis de Conglomerados. Dendrograma obtenido a partir de las poblaciones de *V. moyanoi* incluyendo el morfotipo de flores amarillas: **RL**, Rio Limay; **ZE**, Monte Zeballos; **TA**, Talagapa; **FO**, Lago Fontana; **NA FA**, Cerro Nahuelpan morfotipo flores amarillas; **NA**, Cerro Nahuelapan (flores rosadas); **CH**, Cerro Chahuaco.

En el ADL se discriminó la población RL de forma clara en los ejes canónicos 1vs2 y 1vs3. Los individuos de flores amarillas (NA FA) mostraron poca dispersión (Fig. 20). En los ejes canónicos 1vs3 también se separó TA (Fig. 21). Por último, en los ejes canónicos 2vs3, se observaron tres poblaciones más separadas del resto: CH, NA y TA (Fig. 22).

El eje canónico 1 explicó el 36,62% de la variación total entre poblaciones. A partir de las funciones discriminantes estandarizadas por las varianzas comunes, se observó que las variables longitud bráctea superior (LBS), índice de compactación de la inflorescencia (RLINR), longitud rama media (LRM), longitud bráctea media (LBM), altura de planta (HP), longitud hoja basal (LHB), ancho lámina hoja superior (ALHS), relación entre la longitud de la rama media y el número de ramas de segundo orden (RR2RM), ancho de pecíolo (AP) fueron las más importantes para la discriminación sobre el eje 1, mientras que las variables AP, número de ramas de 2do orden de rama superior (NR3), el número de ramas de segundo orden (RR2RM) y RLINR fueron las más importantes para el eje canónico 2,

que explicó el 26,81% de la variación. Por último, el eje canónico 3 explicó el 12,86% de la variación total, siendo las variables ancho base foliar bráctea media (ABFBM), ancho de lámina de bráctea basal (ALBB), ancho basal del vástago de la inflorescencia (ABI), NR3, número de lóbulos bráctea superior (NLBS) y diámetro de raíz (DR) las más importantes en este eje (Tabla 8).

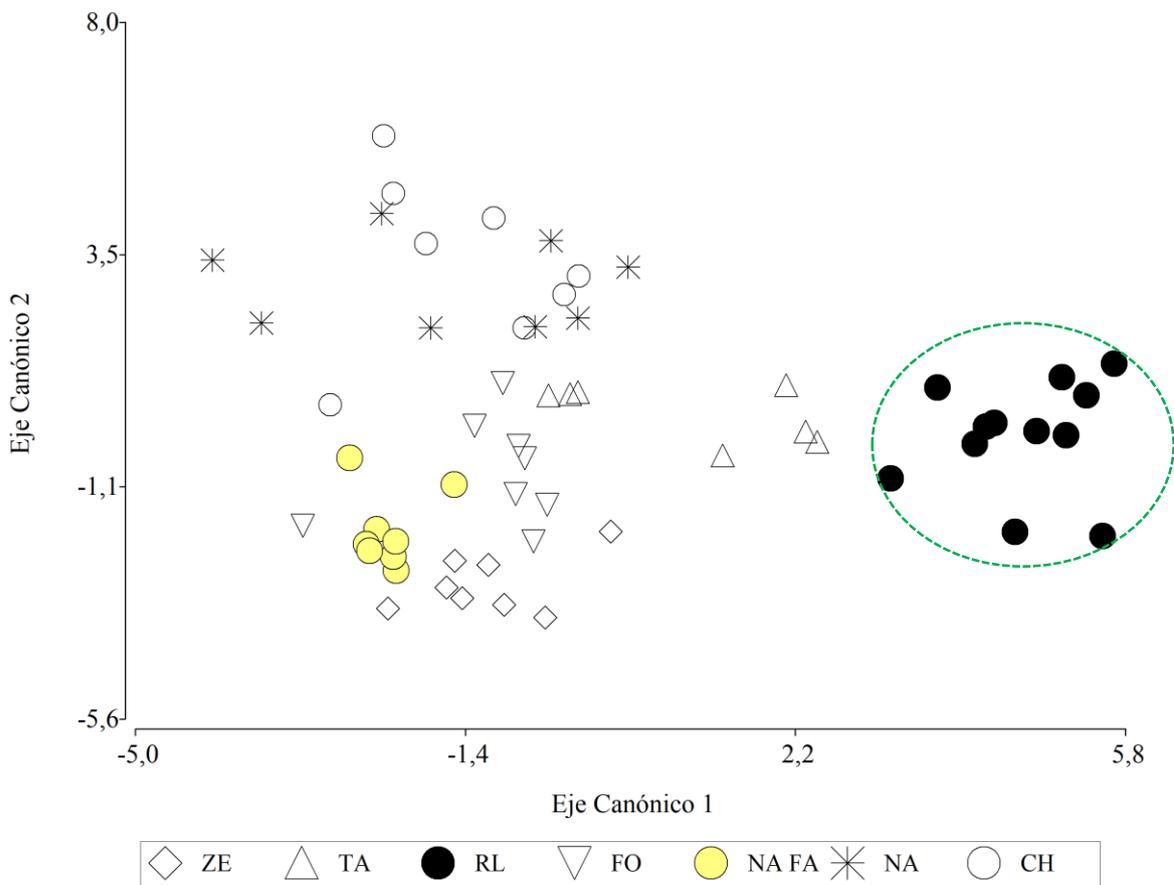


Figura 20. Análisis Discriminante Lienal. Gráfico de los ejes canónicos 1 vs 2 para las poblaciones de *V. moyanoi*. Se señalan (elipse) los individuos de RL. Poblaciones: **ZE**, Monte Zeballos; **TA**, Talagapa; **RL**, Rio Limay; **FO**, Lago Fontana; **NA FA**, Cerro Nahuelpan morfotipo flores Amarillas; **NA**, Cerro Nahuelpan; **CH**, Cerro Chalhuaco.

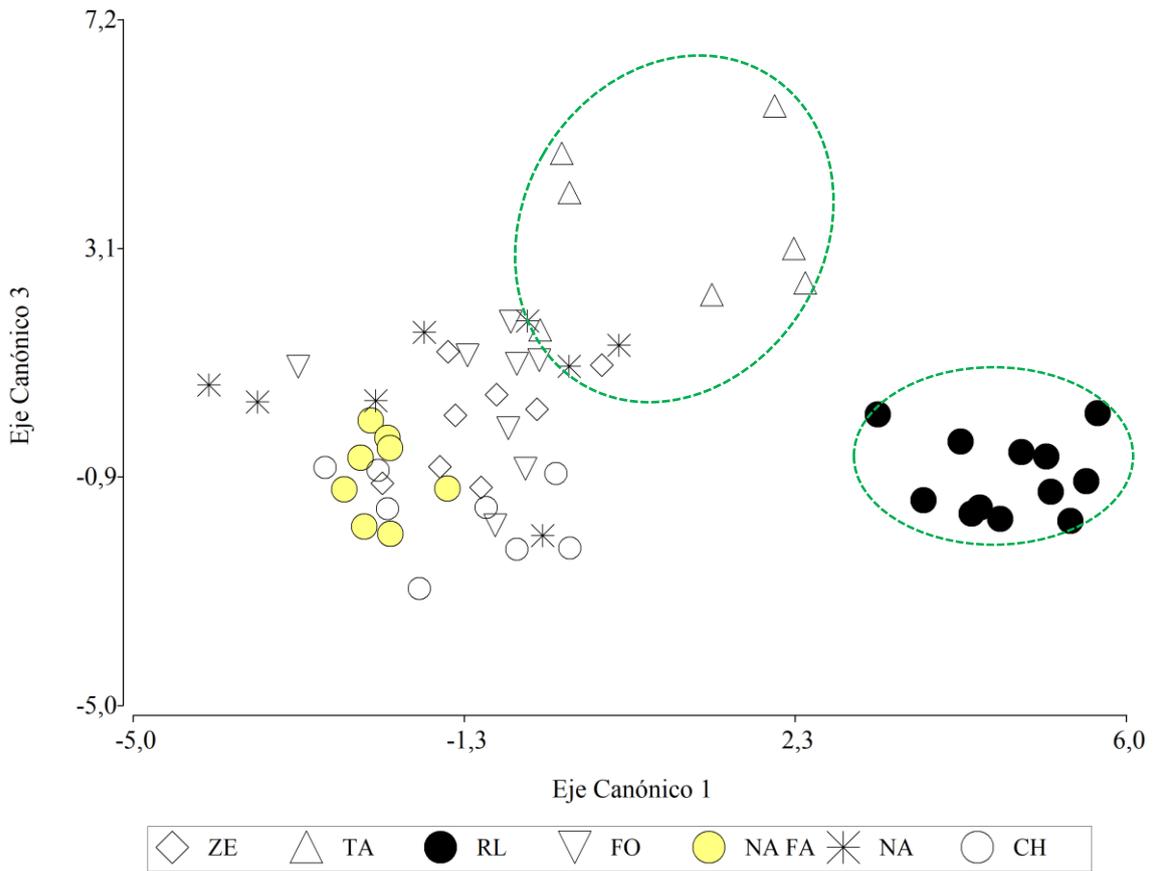


Figura 21. Análisis Discriminante Lineal. Gráfico de los ejes canónicos 1 vs 3 para las poblaciones de *V. moyanoi*. Se destacan con elipses las poblaciones más separadas (**RL** y **TA**). Poblaciones: **ZE**, Monte Zeballos; **TA**, Talagapa; **RL**, Rio Limay; **FO**, Lago Fontana; **NA FA**, Cerro Nahuelpan morfotipo flores Amarillas; **NA**, Cerro Nahuelpan flores rosadas; **CH**, Cerro Chalhuaco.

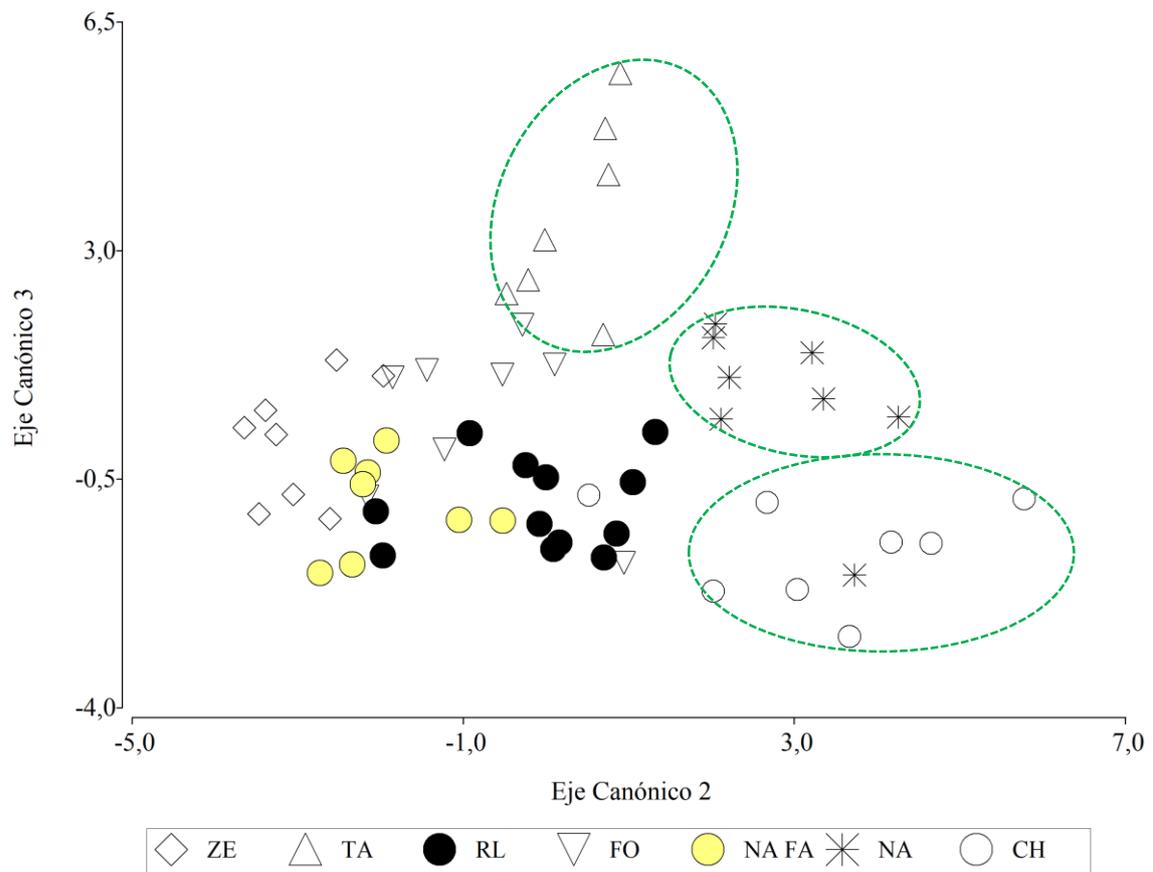


Figura 22. Análisis Discriminante Lineal. Gráfico de los ejes canónicos 2 vs 3 para las poblaciones de *V. moyanoi*. Las elipses destacan las poblaciones que mejor se separaron (CH, NA y TA). Poblaciones: **ZE**, Monte Zeballos; **TA**, Talagapa; **RL**, Rio Limay; **FO**, Lago Fontana; **NA FA**, Cerro Nahuelpan morfotipo flores Amarillas; **NA**, Cerro Nahuelpan; **CH**, Cerro Chalhuaco.

Tabla 8. Análisis Discriminante Lineal- Funciones discriminantes, datos estandarizados con las varianzas comunes. En negrita los valores más importantes en cada eje.

	1	2	3
1. HP	0,46	-0,09	-0,31
2. DR	-0,08	0,35	-0,68
3. LHB	0,40	0,06	0,35
4. AP	-0,46	0,56	-0,08
5. NLHB	-0,16	0,19	-0,32
6. APHS	0,03	-0,19	0,22
7. ALHS	-0,54	-0,12	-0,74
8. ABFB	0,03	0,25	0,56
9. ALBB	0,03	-0,34	0,61
10. NLBB	-0,09	0,27	-0,12
11. LBM	0,47	-0,28	-0,51
12. ABFBM	-0,32	0,12	0,80
13. LBS	0,63	-0,23	-0,21
14. NLBS	-0,22	0,24	-0,85
15. NR1	-0,21	0,02	-0,02
16. NR2	-0,38	-0,07	0,48
17. NR3	-0,30	-0,67	-0,86
18. LRM	0,48	1,18	0,47
19. RR2RM	-0,48	-0,55	1,01
20. ABI	-0,10	-0,08	-0,87
21. ASI	-0,11	0,12	-0,17
22. NRI	0,04	-0,37	-0,24
23. RLINR	0,55	0,40	0,06

Valeriana philippiana

Descripción:

Valeriana philippiana Briq., Ann. Conserv. Jard. Bot. Genève 17: 333. 1911–1913 = *Valeriana pulchella* Phil., Linnaea 33:102. 1864–65, non Marl. & Gal., 1844. TIPO: Chile. Provincia de Valdivia, Andes de Ranco, 1676 m s.m., Pearce s.n.

Plantas de hasta 23 cm de alto, rizoma cilíndrico, subleñoso, diámetro entre 0,4 – 1,5 cm. Tallos de 0,2 – 72 cm de diámetro, con entrenudos muy cortos. Hojas pinnatilobadas dispuestas en pseudo rosetas, láminas de 2 – 45 cm de longitud y 1 – 3 cm de ancho. Lóbulos superpuestos, glabros, 12 a 39 por hoja, orbiculares a obovados, algo irregulares, más grandes en la zona media de la hoja (7 × 6,5 mm). Pecíolos de 0,8 a 9 cm de largo, canaliculados y pubescentes. Inflorescencias terminales contraídas, hasta 4 por planta, de 3 – 19 cm de largo, y con 15 ramificaciones. Zona de ramificación pubescente, de 0,7 – 7,5 cm de longitud.

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

Las brácteas son sésiles, crecen en el vástago principal de cada inflorescencia (antes de llegar a la zona de ramificación), y pueden ser hasta 4. Las brácteas basales miden entre 3 – 29 mm de largo, con base foliar de 1 – 5 mm, y ancho de lámina de 0,8 – 7 mm. Pueden ser enteras o lobuladas, presentando hasta 10 lóbulos por bráctea (0,6 mm de largo × 0,3 mm de ancho). Las brácteas medias miden entre 4 – 21 mm de largo y 1 – 6 mm de ancho, con ancho de la base foliar de 0,8 – 4 mm. Pueden ser enteras o lobuladas, presentando hasta 11 lóbulos por bráctea, de 0,5 mm de largo × 0,3 mm de ancho. Las brácteas superiores miden 4 – 14 mm de longitud, con láminas de 1 – 5 mm de ancho y base foliar de 1 – 6 mm. Generalmente son enteras, pero pueden tener entre 1 – 4 lóbulos por bráctea, de 0,06 mm de largo × 0,05 mm de ancho.

En la zona de ramificación, se observan bractéolas sésiles que acompañan a las flores o ramificaciones florales. Las que se encuentran en la parte basal son de 3 – 10 mm de longitud, con láminas de 1 – 4 mm de ancho y base foliar de 0,6 – 4 mm, son enteras, generalmente con pelos en la base y de ápice laminar agudo. Las bractéolas medias miden 3 – 21 mm de longitud y 0,7 – 6 mm de ancho, con base foliar de 1 – 5 mm de ancho. Presentan pelos en la base, por lo general son enteras, pero pueden presentar hasta un lóbulo. Generalmente el ápice es agudo, pero también puede ser redondeado o emarginado. Las bractéolas superiores miden 4 – 14 mm de longitud y 1 – 5 mm de ancho, presentando una base foliar de 1 – 6 mm de ancho. Son enteras, aunque pueden presentar hasta un lóbulo. Tienen pelos en la base y ápices variables en forma, siendo agudos, redondeados, retusos o emarginados.

Plantas polígamo dioicas, con flores gibosas, las masculinas con estambres exertos y gineceo reducido, las femeninas con estigmas sobresalientes y estambres reducidos, lóbulos de la corola plegados hacia atrás. Los frutos son aquenios elipsoides, de entre 2 – 5 mm de longitud, 0,8 – 2 mm de ancho basal y 0,5 – 1,5 mm de ancho medio, con ápice de 0,4 – 1 mm de longitud. Pappus formado por 13 a 17 setas plumosas, de 5,5 mm de longitud promedio.

Variabilidad morfológica entre poblaciones de *Valeriana philippiana*:

Se observó variabilidad morfológica en las poblaciones de esta especie (Anexo I). En las poblaciones RU y CO se observaron las plantas más altas (incluyendo a las inflorescencias) con láminas más largas y anchas, ubicadas en la provincia de Neuquén. Las plantas de Cerro Lindo (CL) y Lago Guacho (LG), ubicadas en Rio Negro y Chubut, respectivamente,

resultaron significativamente más bajas ($p < 0,05$). El diámetro de las raíces de las plantas de Cerro Atravesada (AT) y CO fue mayor de manera significativa respecto a las poblaciones sur LG, CC, TR y CL (Rio Negro y Chubut). Por otro lado, la población RU presentó las brácteas basales más largas, aunque sin diferencias significativas respecto a AT y BA. La población BA, además, presentó brácteas medias significativamente mayores que las brácteas de CL y LG. Las brácteas superiores de las poblaciones CC y BA fueron significativamente mayores que las brácteas superiores de LG. Por último, los aquenios resultaron ser más grandes (longitud) en RU respecto a BA y LG; y más anchos en CO y RU respecto a LG y BA.

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de Correlación de Spearman (Fig. 23) se seleccionaron 19 variables cuantitativas para realizar los análisis multivariados: ancho (AR) y longitud del rizoma (LR); longitud lámina (LL); longitud (LBB), ancho (ABB) y número de lóbulos de bráctea basal (NLBB); número de lóbulos bráctea superior (NLBS); longitud (LBr1) y ancho de bractéola basal (AnBr1); longitud (LBr2) y número de lóbulos de bractéola media (NLBr2); longitud (LBr3), ancho (AnBr3) y número de lóbulos de bractéola superior (NLBr3); longitud de inflorescencia (LI); número de inflorescencias por planta (NI); número de ramificaciones (NR); número de entrenudos (NE) y relación entre la longitud de la zona de ramificación y el número de entrenudos (RINR).

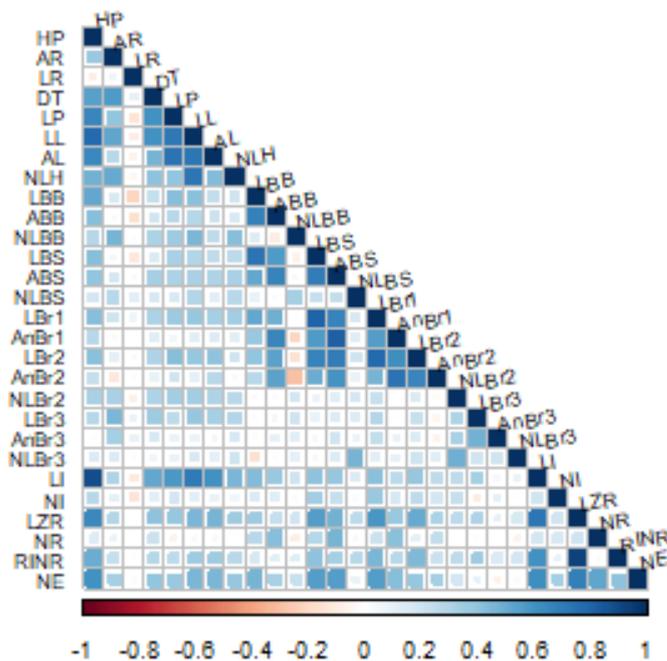


Figura 23. Visualización de la matriz de correlación, en color azul se observan las variables correlacionadas de manera positiva, en rojo, las correlaciones negativas. A mayor intensidad de color, mayor correlación.

HP= altura planta; **AR**= ancho rizoma; **LR**= longitud rizoma; **DT**= diámetro tallo; **LP**= longitud pecíolo; **LL**= longitud lámina; **AL**= ancho lámina; **NLH**= número lóbulos hoja; **LBB**= longitud bráctea basal; **ABB**= ancho bráctea basal; **NLBB**= número de lóbulos bráctea basal; **LBS**= longitud bráctea superior; **ABS**= ancho bráctea superior; **NLBS**= número de lóbulos bráctea superior; **LBr1**= longitud bractéola basal; **AnBr1**= ancho bractéola basal; **LBr2**= longitud bractéola media; **AnBr2**= ancho bractéola media; **NLBr2**= número de lóbulos bractéola media; **LBr3**= longitud bractéola superior; **AnBr3**= ancho bractéola superior; **NLBr3**= número de lóbulos bractéola superior; **LI**= longitud inflorescencia; **NI**= número de inflorescencias por planta; **LZR**= longitud zona de ramificación; **NR**= número de ramificaciones; **RINR**= Relación longitud de zona de ramificación / número de entrenudos; **NE**= número de entrenudos.

En el ACP los tres primeros componentes explicaron el 49% de la variación total. Observando los tres autovectores (1, 2 y 3), las variables ABB, AnBr1, LBr, NLBr2, LBr2, LI y NE fueron importantes para explicar la variación en el CP1. En el CP2, las variables AR, ABB, AnBr1, NLBr2, LBr3 y AnBr3 fueron las más importantes, mientras que en el CP3 las variables que más explicaron la variación en este componente fueron NLBB y NLBS (Tabla 9). En los gráficos del ACP (Fig. 24–26) se puede observar mayor dispersión de los individuos de las poblaciones norte, localizadas en la provincia de Neuquén (CO, RU, AT y BA) y no se observa un patrón claro de agrupamiento, sólo tendencias de separación.

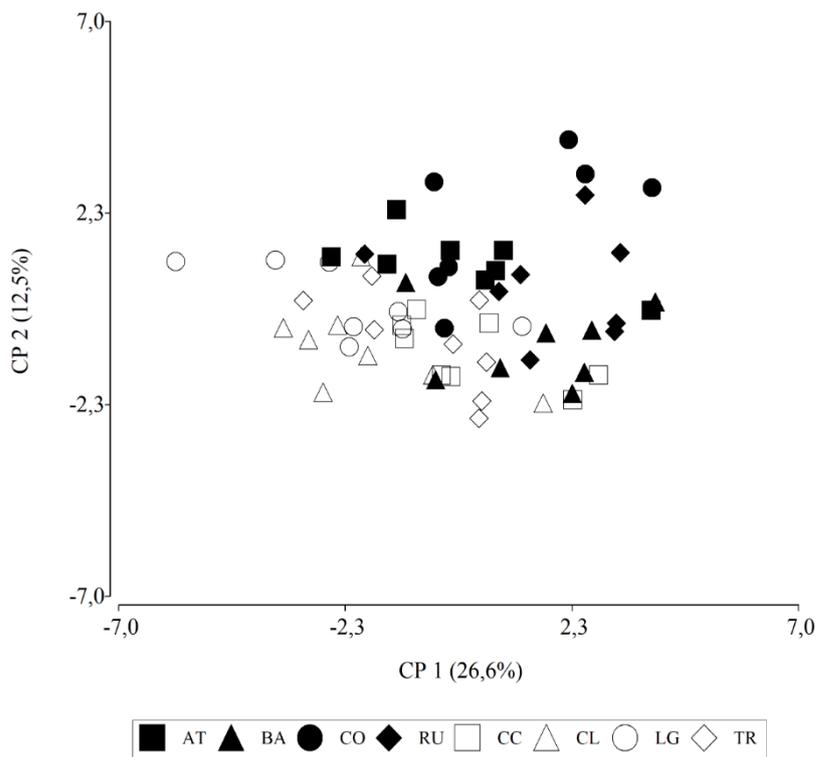


Figura 24. Análisis de Componentes Principales. Gráfico de dispersión del valor medio de los especímenes de *V. philippiana* en los 2 primeros componentes principales, basado en 19 variables cuantitativas. Poblaciones norte (símbolos rellenos): **AT**, Cerro Atravesada; **BA**, Cerro Bayo; **CO**, Copahue; **RU**, Rucachoroi. Poblaciones sur (símbolos vacíos): **CC**, Cerro Cónico; **CL**, Cerro lindo; **LG**, Lago Guacho; **TR**, Cerro Tronador.

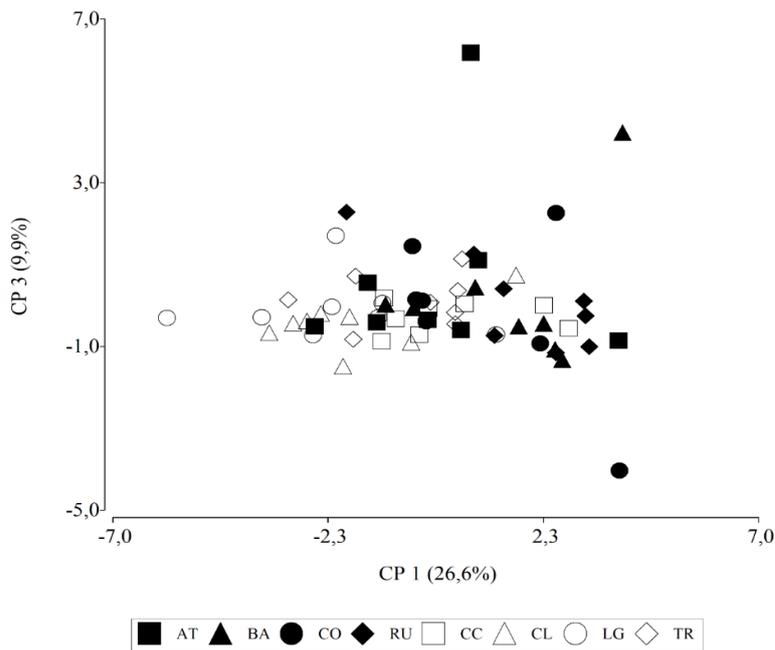


Figura 25. Análisis de Componentes Principales. Gráfico de dispersión del valor medio de los especímenes de *V. philippiana* en los componentes principales 1 y 3, basado en 19 variables cuantitativas. Poblaciones norte (símbolos rellenos): **AT**, Cerro Atravesada; **BA**, Cerro Bayo; **CO**, Copahue; **RU**, Rucachoroi. Poblaciones sur (símbolos vacíos): **CC**, Cerro Cónico; **CL**, Cerro lindo; **LG**, Lago Guacho; **TR**, Cerro Tronador.

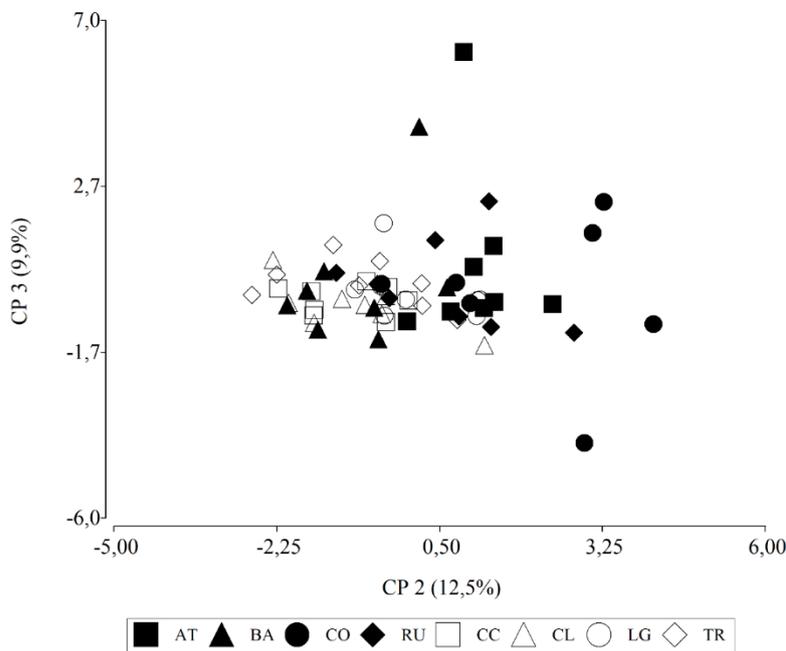


Figura 26. Análisis de Componentes Principales. Gráfico de dispersión del valor medio de los especímenes de *V. philippiana* en los componentes principales 1 y 2, basado en 19 variables cuantitativas. Poblaciones norte (símbolos rellenos): **AT**, Cerro Atravesada; **BA**, Cerro Bayo; **CO**, Copahue; **RU**, Rucachoroi. Poblaciones sur (símbolos vacíos): **CC**, Cerro Cónico; **CL**, Cerro lindo; **LG**, Lago Guacho; **TR**, Cerro Tronador.

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

Tabla 9. Análisis de Componentes Principales- Autovectores 1, 2 y 3. En negrita se resaltan los valores que más aportaron a cada componente.

Variables	1	2	3
1. Ancho rizoma (AR)	0,19	0,42	0,04
2. Longitud raíz (LR)	-0,02	0,13	0,11
3. Longitud lámina (LL)	0,11	-0,04	0,10
4. Long. bráctea basal (LBB)	0,27	-0,13	0,33
5. Ancho bráctea basal (ABB)	0,31	-0,29	-0,07
6. N° lóbulos bráctea basal (NLBB)	0,05	0,32	0,55
7. N° lóbulos bráctea superior (NLBS)	0,13	0,13	0,50
8. Long. bractéola basal (LBr1)	0,37	-0,10	-0,06
9. Ancho bractéola basal (AnBr1)	0,31	-0,31	-0,09
10. N° lóbulos bractéola media (NLBr2)	0,14	0,33	-0,26
11. Longitud bractéola media (LBr2)	0,32	-0,17	-0,10
12. N° lóbulos bractéola superior (NLBr3)	0,00	0,00	0,00
13. Longitud bractéola superior (LBr3)	0,17	0,41	-0,25
14. Ancho bractéola superior (AnBr3)	0,15	0,32	-0,37
15. Longitud inflorescencia (LI)	0,32	0,15	0,04
16. N° inflorescencias (NI)	0,19	-0,02	-0,05
17. N° ramificaciones (NR)	0,20	-0,16	-0,06
18. N° entrenudos (NE)	0,33	-0,02	0,14
19. Zona de ramif./N° entrenudos (RINR)	0,25	0,17	-0,01

En el AC la correlación cofenética fue de 0,73 y a una distancia de 5,95 se pudo observar la separación en dos conglomerados de acuerdo a la ubicación geográfica de las poblaciones, por un lado las localizadas al sur del paralelo 41 (poblaciones sur: CL, TR, LG, CC) y por el otro, las poblaciones ubicadas en la provincia de Neuquén (poblaciones norte: BA, CO, RU, AT; Fig. 27).

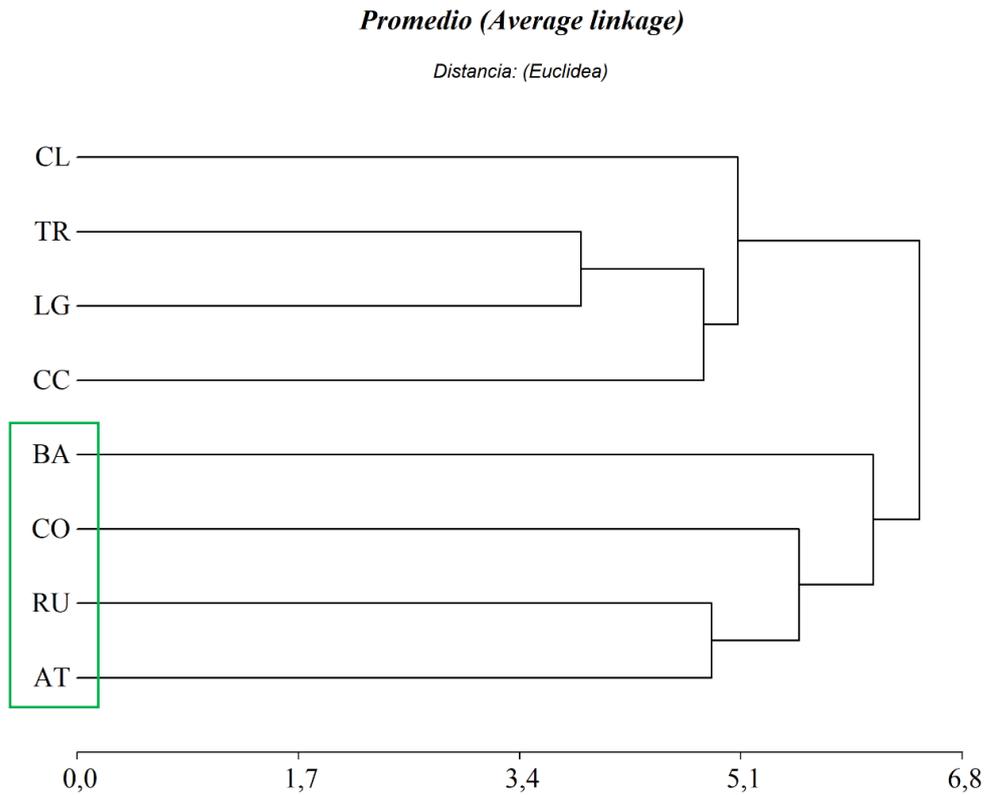


Figura 27. Análisis de Conglomerados. Dendrograma obtenido a partir de 19 variables cuantitativas, de las poblaciones de *V. philippiana*. En el rectángulo se señalan las poblaciones norte, localizadas en la provincia de Neuquén. Poblaciones sur: **CL**, Cerro Lindo; **TR**, Cerro Tronador; **LG**, Lago Guacho; **CC**, Cerro Cónico. Poblaciones norte: **BA**, Cerro Bayo; **CO**, Copahue; **RU**, Rucachoroi; **AT**, Cerro Atravesada.

Si se agrega en el análisis a las variables cualitativas, se obtiene otro agrupamiento con una mayor correlación cofenética (0,80), donde la población BA (Neuquén), a una distancia de 8,9 se separa como grupo independiente pero junto a las poblaciones sur, en vez de estar en el conglomerado con las poblaciones norte como en el caso anterior (Fig. 28).

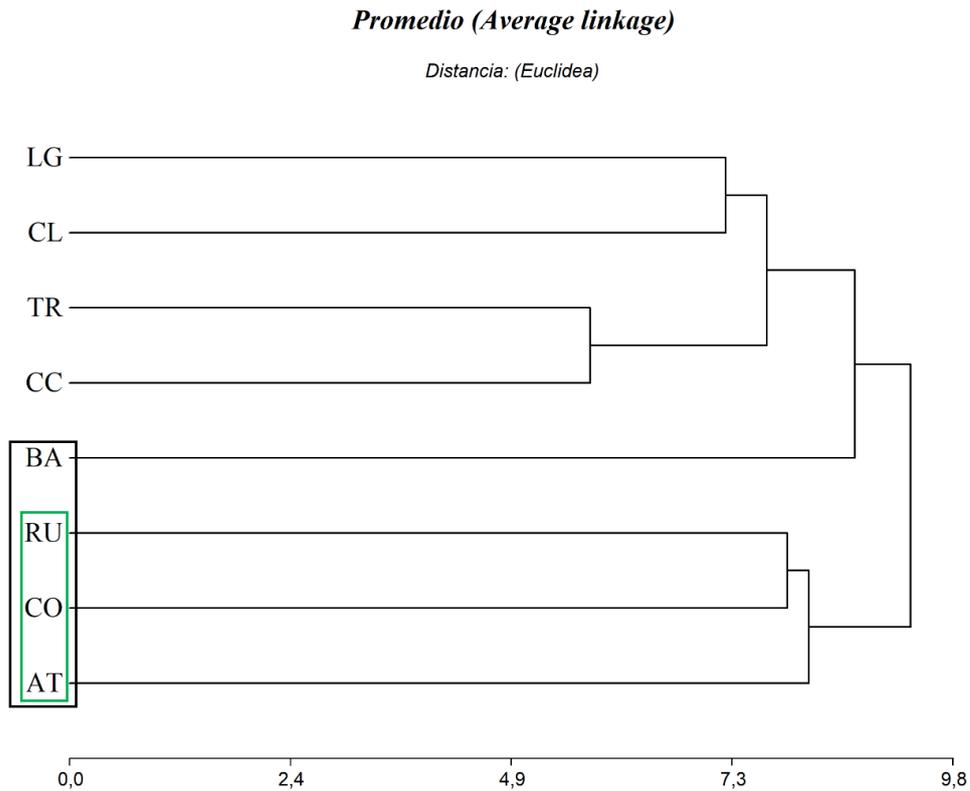


Figura 28. Análisis de Conglomerados. Dendograma de las poblaciones de *V. philippiana* teniendo en cuenta las variables cualitativas y las 19 variables cuantitativas. El rectángulo negro señala las poblaciones ubicadas en la provincia de Neuquén y el rectángulo verde, las poblaciones del norte neuquino. Poblaciones sur: **LG**, Lago Guacho; **CL**, Cerro Lindo; **TR**, Cerro Tronador; **CC**, Cerro Cónico. Poblaciones norte: **BA**, Cerro Bayo; **RU**, Rucachoroi; **CO**, Copahue; **AT**, Cerro Atravesada.

En el ADL, las poblaciones CO y CL se presentaron más separadas del resto de poblaciones, mientras que las poblaciones AT y RU se observaron agrupadas (Fig. 29). Además, la población BA (Neuquén) se agrupó con las poblaciones sur, como se observó en el Análisis de Conglomerados (Ejes Canónicos 1vs2). En el segundo gráfico (Fig. 30) se visualizaron 3 grupos: CO como un grupo independiente del resto, la población CL sumada al grupo de AT y RU y el tercer grupo con el resto de las poblaciones. En el tercer gráfico de los Ejes Canónicos 2vs3, se observaron 3 grupos, por un lado los individuos de AT y RU, por otro los individuos de BA y por último, los individuos de CL (Fig. 31).

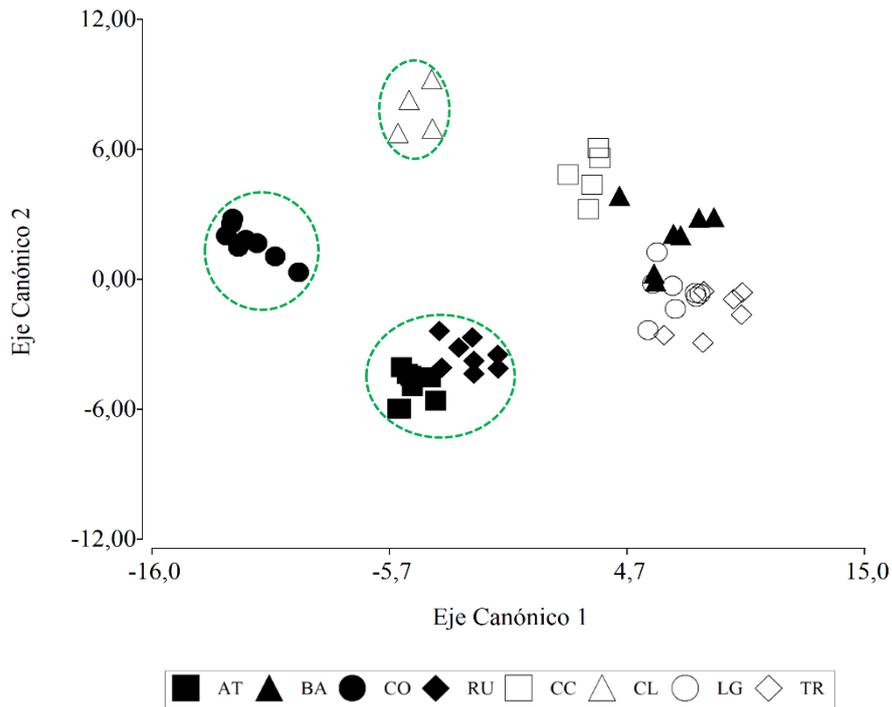


Figura 29. Análisis Discriminante Lienal. Gráfico de los ejes canónicos 1 y 2. Los símbolos rellenos indican las poblaciones norte (**AT**, Cerro Atravesada; **BA**, Cerro Bayo; **CO**, Copahue; **RU**, Rucachoroi), los símbolos sin relleno indican las poblaciones sur (**CC**, Cerro Cónico; **CL**, Cerro Lindo; **LG**, Lago Guacho; **TR**, Cerro Tronador).

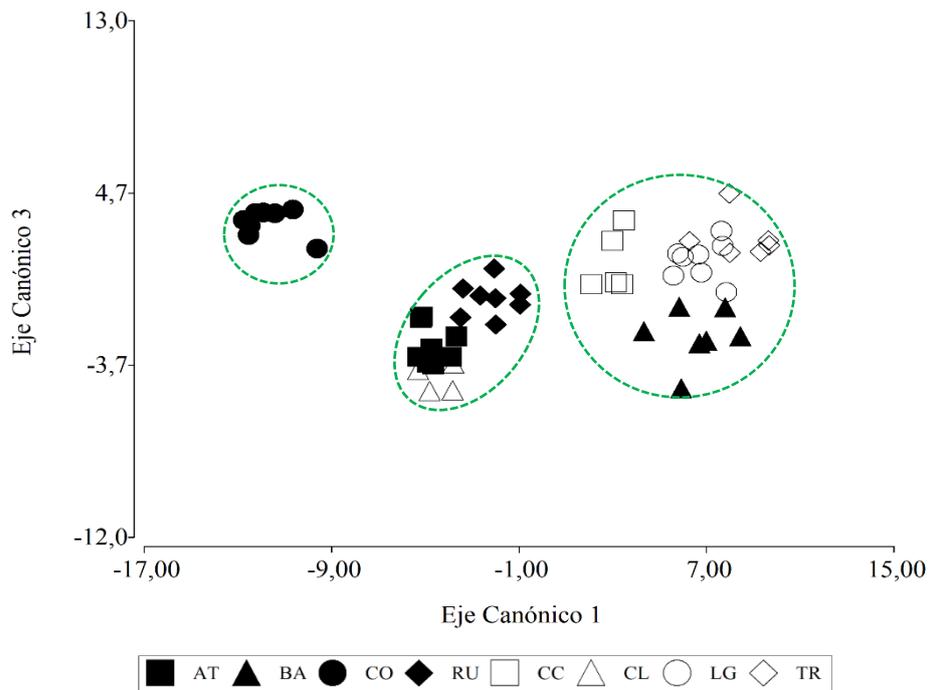


Figura 30. Análisis Discriminante Lineal. Gráfico de los ejes canónicos 1 y 3. Los símbolos con relleno indican las poblaciones norte (**AT**, Cerro Atravesada; **BA**, Cerro Bayo; **CO**, Copahue; **RU**, Rucachoroi), los símbolos sin relleno indican las poblaciones sur (**CC**, Cerro Cónico; **CL**, Cerro Lindo; **LG**, Lago Guacho; **TR**, Cerro Tronador).

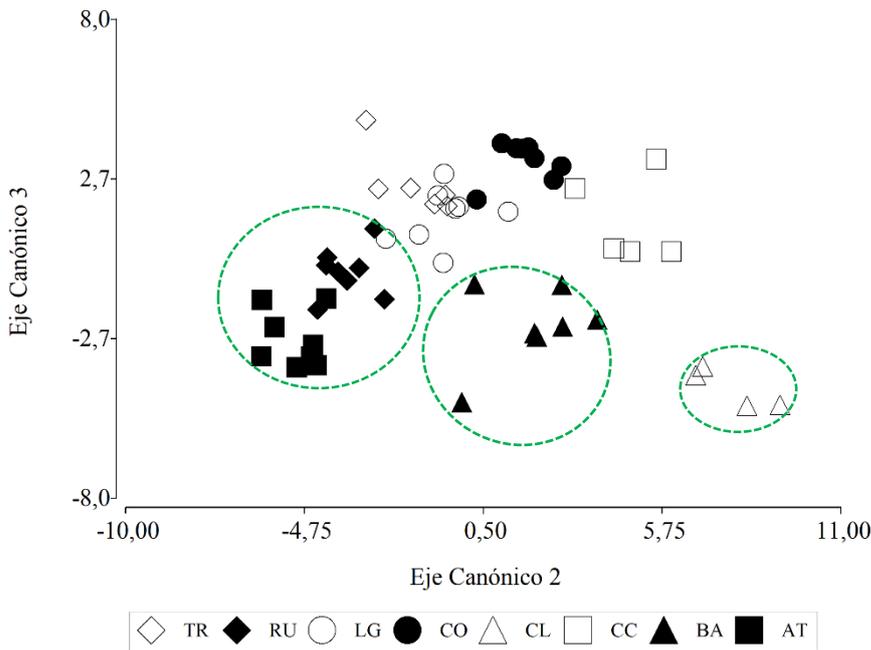


Figura 31. Análisis Discriminante Lineal. Gráfico de los ejes canónicos 2 y 3. Los símbolos con relleno indican las poblaciones norte (**RU**, Rucachoroi; **CO**, Copahue; **BA**, Cerro Bayo; **AT**, Cerro Atravesada), los símbolos sin relleno indican las poblaciones sur (**TR**, Cerro Tronador; **LG**, Lago Guacho; **CL**, Cerro Lindo; **CC**, Cerro Cónico).

El eje canónico 1 explicó el 60,98% de la variación total entre poblaciones, el eje canónico 2 explicó el 17,45% y el eje canónico 3 el 7,67%. A partir de las funciones discriminantes estandarizadas por las varianzas comunes (Tablas 10 y 11), se observó que las variables cuantitativas número de lóbulos bráctea superior (NLBS) y número de lóbulos bractéola superior (NLBr3) junto con las variables cualitativas ápice lámina, pubescencia bractéola superior, margen bráctea superior, ápice bractéola basal, margen bractéola superior y pubescencia bractéola superior, aportaron al eje canónico 1, mientras que las variables cuantitativas número de lóbulos bráctea basal (NLBB), longitud y ancho bractéola basal (LBr1 y AnBr1) y relación entre la zona de ramificación y el número de entrenudos de la inflorescencia (RINR) junto con las variables cualitativas ápice de lámina, pubescencia bráctea superior, margen bráctea superior, ápice bractéola basal, resultaron importantes en el eje canónico 2. Por último, las variables cuantitativas longitud de lámina (LL), número de lóbulos bráctea superior (NLBS), longitud bractéola basal (LBr1), longitud bractéola media (LBr2), número de ramificaciones de la inflorescencia (NR) y número de entrenudos (NE) junto con las variables cualitativas pubescencia bráctea basal, margen bráctea basal, pubescencia bráctea media y margen bráctea superior, aportaron a la variación explicada en el eje canónico 3.

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

Tabla 10. Análisis Discriminante Lineal- Funciones discriminantes - datos estandarizados con las varianzas comunes. En negrita se destacan los valores más importantes para cada componente.

Variables cuantitativas	1	2	3
1. Ancho rizoma (AR)	0,25	-0,30	-0,47
2. Longitud raíz (LR)	-0,78	-0,05	0,53
3. Longitud lámina (LL)	0,06	0,68	-1,51
4. Long. bráctea basal (LBB)	0,97	-0,95	0,69
5. Ancho bráctea basal (ABB)	-0,74	-0,05	-0,79
6. N° lóbulos bráctea basal (NLBB)	-2,22	1,34	-0,11
7. N° lóbulos bráctea superior (NLBS)	11,12	0,32	1,35
8. Long. bractéola basal (LBr1)	0,48	1,22	-1,72
9. Ancho bractéola basal (AnBr1)	0,13	1,57	-0,12
10. N° lóbulos bractéola media (NLBr2)	-1,27	0,08	0,46
11. Longitud bractéola media (LBr2)	0,51	0,18	1,39
12. N° lóbulos bractéola superior (NLBr3)	-4,13	0,34	-0,14
13. Longitud bractéola superior (LBr3)	-1,35	-0,22	0,25
14. Ancho bractéola superior (ANBr3)	1,09	-0,06	-0,24
15. Longitud inflorescencia (LI)	1,03	-0,86	0,24
16. N° inflorescencias (NI)	-1,72	0,69	0,11
17. N° ramificaciones (NR)	0,42	-0,52	-1,65
18. N° entrenudos (NE)	-1,15	-0,45	1,84
19. Zona de ramificación/ N° entrenudos (RINR)	0,17	-1,52	0,47

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO I: Estudios morfológicos

Tabla 11. Análisis Discriminante Lineal- Funciones discriminantes de las variables cualitativas - datos estandarizados con las varianzas comunes. En negrita se destacan los valores más importantes para cada componente.

Variables cualitativas	1	2	3
1. Pubescencia pecíolo	0,00	0,00	0,00
2. Ápice lámina	2,15	-0,94	-0,02
3. Pubescencia bráctea basal	-0,21	0,35	0,93
4. Margen bráctea basal	0,08	-0,76	-0,96
5. Ápice bráctea basal	-0,89	0,31	0,88
6. Pubescencia bráctea media	-1,39	-0,73	-0,89
7. Margen bráctea media	-1,49	-0,50	0,81
8. Ápice bráctea media	0,53	0,08	-0,03
9. Pubescencia bráctea superior	3,17	0,87	-0,58
10. Margen bráctea superior	-5,66	-0,89	-1,64
11. Ápice bráctea superior	1,76	-0,11	-0,30
12. Margen bractéola basal	0,00	0,00	0,00
13. Ápice bractéola basal	-3,05	1,07	-0,47
14. Pubescencia bractéola basal	-1,34	-0,33	-0,31
15. Margen bractéola media	-1,27	0,08	0,46
16. Ápice bractéola media	1,71	-0,58	0,66
17. Pubescencia bractéola media	-0,32	-0,44	0,04
18. Margen bractéola superior	-4,13	0,34	-0,14
19. Ápice bractéola superior	0,73	0,35	-0,01
20. Pubescencia bractéola superior	2,27	0,06	-0,40
21. Pubescencia vástago inflorescencia	-0,30	0,59	-0,36
22. Pubescencia ramificaciones	-0,29	0,37	0,42

Discusión

Los resultados de este trabajo revelaron gran variabilidad morfológica entre poblaciones naturales de *V. moyanoi* y *V. philippiana*. Borsini (1946) menciona que las variaciones en las hojas e inflorescencias tienen un valor secundario para separar especies dentro del género y lo mismo ratifica Kutschker (2011) en cuanto al tamaño y la caracterización de las inflorescencias (laxas o contraídas). Sin embargo, esos caracteres resultaron útiles para separar entre las poblaciones de *Valeriana* analizadas, sobre todo en *V. moyanoi*, donde la longitud y ancho del vástago de las inflorescencias, índices de compactación y número de ramificaciones, permitieron discriminar entre poblaciones. Otras variables importantes en esta especie fueron la longitud y ancho de los frutos, carácter utilizado por Borsini (1942–1944) para separar entre especies. Las poblaciones Rio Limay (RL) y Talagapa (TA) resultaron interesantes ya que se diferenciaron del resto de poblaciones, estando RL localizada a la menor altitud registrada hasta el momento, y TA ubicada al extremo Este de su distribución natural. En *V. moyanoi* además se pudieron relevar morfotipos que no habían sido descritos para la especie con anterioridad. Tal es el caso de la población RL, donde se examinaron caracteres cuantitativos, como el tamaño de las hojas, tamaño de frutos, altura de las plantas y caracteres cualitativos como la coloración de flores y pubescencia de las hojas, observándose diferencias significativas respecto a las demás poblaciones. Teniendo en cuenta que estas plantas crecen circunscriptas a una formación rocosa a 748 msnm aislada de otras poblaciones, estos ejemplares podrían ser considerados un ecotipo de *V. moyanoi* o incluso una variedad o subespecie dentro de la especie, aunque para su confirmación se requiere de un estudio más profundo.

Otra población interesante fue Cerro Nahuelpan (NA), donde además de hallar las típicas plantas con flores rosadas, se encontraron especímenes con flores de distintas tonalidades de marrón y amarillo (dependiendo el individuo). En esta población se observaron plantas bajas en altura (~ 10 cm), con flores pistiladas de corolas pequeñas amarillo pálido, con el androceo reducido, y plantas más altas (20 cm) con flores estaminadas que presentan el gineceo reducido, de corolas grandes con tonalidad rojiza o marrón. En valerianáceas, Eriksen (1989) menciona que muchas veces las flores de distintos sexos de una misma especie presentan diferentes tonalidades (o gradiente de colores), siendo las flores pistiladas las más oscuras. Esto no coincide con nuestras observaciones en la población NA (*V.*

moyanoi), donde las flores más oscuras fueron las de estambres exertos y gineceo aparentemente no funcional. Si bien este autor también menciona que el color, el tamaño y las formas de las corolas tienen un valor taxonómico limitado dentro del género, esas características resultan importantes en lo que respecta a polinizadores y sistemas de apareamiento de las plantas (Drew & Sytsma, 2013). Por ejemplo, muchas flores rojas del bosque Andino Patagónico dependen mayormente del picaflor rubí (*Sephanoides sephanoides*) para su polinización (Ezcurra et al., 2014). Las flores rojas de *Anemone pavonina* Lam. son preferidas por los escarabajos (*Pygopleurus sp.*), que son sus principales polinizadores en elevaciones bajas (Streinzer et al., 2019). Los registros bibliográficos respecto a la coloración de las flores de *V. moyanoi*, indican que en esta especie puede observarse una gradación del color blanco al rosado, flores blancas con tintes rosados o flores rosadas a lilas (Kutschker, 2011; Ferreyra et al., 2020). El color amarillo es considerado raro en valerianas de Sudamérica Austral (Kutschker, 2009) y se reporta en *V. chilensis* Borsini (Kutschker, 2011), en *V. sedifolia* d'Urv. (Ferreyra et al., 2020) y en los géneros *Patrinia* y *Aretiastrum* (DC.) Spach (Eriksen, 1989) que actualmente son considerados sinónimos heterotípicos de *Valeriana* (WCVP, <https://powo.science.kew.org/>). Las variaciones del color floral son consideradas una de las transiciones evolutivas más comunes en plantas y los polinizadores se proponen como importantes agentes selectivos que impulsan esas variaciones (Johnson et al., 2020). Asimismo, los polinizadores pueden variar a lo largo de un gradiente altitudinal, pudiendo afectar las características florales (Dohzono & Suzuki, 2010; Nagano et al., 2014). Otras hipótesis involucran la evolución no adaptativa producto de la deriva genética, o la consecuencia indirecta de los efectos pleiotrópicos de los genes relacionados con la adaptación fisiológica o vegetativa a las condiciones ambientales (Wright, 1943; Armbruster, 2002). Las relaciones ecológicas no se han estudiado en estas valerianas, por lo que este interrogante quedará pendiente para futuras investigaciones.

Por otro lado, en valerianas sudamericanas y en otras como *V. jatamansi* (valeriana india), se cita que las flores hermafroditas son de mayor tamaño que las femeninas (Barrie, 2003; Kutschker, 2011; Chakraborty et al., 2015). En este trabajo observamos que en *V. moyanoi* las flores estaminadas con gineceo reducido son más grandes que las flores pistiladas con estaminodios. En cuanto al sistema de apareamiento, en trabajos previos se menciona que la ginodioecia, modalidad de la poligamia en que unos pies tienen flores hermafroditas y otros pies las tienen femeninas (Font Quer, 1953), está mayormente presente en plantas con

inflorescencias paniculiformes, aunque también se reporta en *V. moyanoi*, cuyo tipo de inflorescencia es más bien espiciforme (Kutschker, 2011; Gonzalez, 2014). Las observaciones de las flores de los especímenes de esta especie, se adaptan a la definición de polígamo-dioicas, debido a que técnicamente todas las flores fueron originalmente hermafroditas, sólo que aparentemente uno u otro arreglo parece funcional (pies femeninos o pies masculinos). Se podría hipotetizar que esta especie se encuentra transitando su evolución hacia la dioecia.

Para *V. philippiana* también se citan flores polígamo ginodioicas (Kutschker, 2011), aunque González (2014) reporta que el sistema de apareamiento es hermafrodita. Nuestras observaciones al igual que en *V. moyanoi*, se adaptan a la definición de polígamo dioicas. En esta especie todas las flores observadas fueron de coloración blanco y rosadas.

Los análisis multivariados en *V. philippiana* revelaron una diferenciación de las poblaciones situadas más al norte, localizadas en la provincia de Neuquén (poblaciones norte) respecto a las poblaciones ubicadas por debajo de los 40° de latitud Sur, mayormente en Rio Negro y Chubut. Las brácteas y bractéolas resultaron estructuras importantes para separar a las poblaciones de esta especie. Las poblaciones Rucachoroi (RU) y Cerro Atravesada (AT) fueron agrupadas teniendo en cuenta las 19 variables cuantitativas seleccionadas, tanto en el ADL como en el AC, pero con la inclusión de los caracteres cualitativos, Rucachoroi (RU) se agrupó con Copahue (CO). (Kutschker & Morrone, 2012) sugirieron un centro de diversificación del género en las latitudes correspondientes a la provincia de Neuquén, producto de un período de aislamiento causado por el levantamiento de los Andes. Las poblaciones norte se localizan en sitios relativamente cercanos entre sí, comparten un clima similar, y podrían haber estado aisladas por miles de años de las poblaciones del sur, principalmente debido a numerosos periodos glaciales que pudieron haber influido en la historia evolutiva de la especie.

Por otro lado, las raíces y rizomas de las valerianas son utilizadas en la herbolaria mundial por poseer compuestos químicos de importancia medicinal (Dweck, 1997), es por ello que el desarrollo de estos órganos es importante al momento de seleccionar las plantas como fuente de materia prima con fines medicinales. Para *V. moyanoi* se cita un rizoma poco desarrollado, carnoso y rugoso transversalmente (Correa, 1999; Kutschker, 2009). Sin embargo, en este estudio no se observaron rizomas en esta especie, ya que es una planta

bianual con raíz pivotante, por lo que no sería conveniente multiplicarla mediante macropropagación asexual (esquejes). Se recomienda explorar la propagación sexual mediante germinación de frutos. Para futuros programas de reproducción de la especie, considerando que el tamaño de las semillas está directamente relacionado con la cantidad de reservas disponibles y la viabilidad de las mismas (Joseau et al., 2013), se sugiere seleccionar a las plantas de la población del Cerro Chahuaco (CH) por presentar los frutos significativamente más grandes.

En ensayos de propagación de especies de valerianas de Ecuador, la luz resulta indispensable para la germinación de las semillas (Jiménez, 2022). En cuanto al tiempo y la viabilidad de los aquenios, en ensayos con *V. clarionifolia* se menciona que la viabilidad de las semillas disminuye con el almacenamiento a largo plazo (Berastegui et al., 2016). No existe información respecto a la propagación de las valerianas de montaña estudiadas, no obstante, los parámetros a considerar de acuerdo a ensayos con otras representantes del género, serían la luz, estratificación fría húmeda (5°C), asepsia de aquenios y tamaño de partículas del sustrato (Sánchez & Riat, 2021).

Para el caso de *V. philippiana* al ser una especie perenne y presentar rizomas muy extendidos y ramificados, su propagación vegetativa podría ser factible (Kutschker, 2011). Las poblaciones que se sugieren para ser seleccionadas en caso de iniciar alguna práctica de cultivo, de acuerdo al desarrollo del sistema subterráneo (diámetro de sus rizomas), serían las denominadas aquí como “poblaciones norte”, distribuidas en la provincia de Neuquén. Específicamente las plantas de Copahue por presentar además menor varianza intra-poblacional, seguida por la población Rucachoroi.

Finalmente, en una próxima etapa proponemos recopilar información ambiental de los sitios de muestreo a partir de estaciones meteorológicas *in situ*, o en su defecto mediante herramientas geomáticas (Ej.: Google Earth Engine), a los fines de realizar un Análisis de Redundancia (RDA, en inglés) y poder evaluar la relación entre la variación morfológica observada y el ambiente donde se desarrollan estas plantas.

Conclusiones

Los resultados de este capítulo proporcionan una visión general respecto a la variabilidad morfológica de dos especies de valerianas de alta montaña. En general, las dos especies presentan variación entre sus poblaciones en el tamaño de las plantas, el diámetro de sus órganos subterráneos y el tamaño de sus frutos. El color de las flores también varía en algunos casos. En *Valeriana moyanoi* se encontró que las plantas pertenecientes a la población Río Limay fueron significativamente más altas que el resto, con inflorescencias más laxas y flores amarillo pálido en vez de blanco-rosadas, mientras que la población de Nahuelpan presentó plantas de distinta altura, siendo más pequeñas las que crecen a mayor altitud, y con gran variación en el tamaño y color de las flores, desde amarillas hasta rosadas. Los individuos de los cerros Chalhuaco y Nahuelpan registraron raíces de diámetros mayores en comparación con el resto, y los aquenios de las plantas del Cerro Chalhuaco resultaron significativamente mayores que los frutos de las demás poblaciones. En el caso de *Valeriana philippiana*, se encontró que las poblaciones de Neuquén situadas al norte de su distribución (Copahue, Cerro Atravesada y Rucachoroi) difieren morfológicamente de las del sur, principalmente en características de sus brácteas, y que las de Copahue y Rucachoroi presentan un mayor desarrollo de órganos subterráneos. Algunos aspectos derivados de los resultados obtenidos serán retomados en los siguientes capítulos de esta Tesis y otros podrán ser de utilidad en investigaciones futuras.

Capítulo II: Estudios químicos

Resumen

En este capítulo se analizó el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante de extractos etanólicos de raíz en tres especies de valerianas nativas (*V. moyanoi*, *V. philippiana* y *V. gaimanensis*). El contenido de fenoles totales varió entre 0,20 y 2,26 mg GAE/g para *V. moyanoi* y su actividad antioxidante fue 5,82–273,74 mg VCE/100 g. En *V. philippiana* se registraron mayores valores para el contenido de fenoles totales (3,39–9,64 mg GAE/g) y actividad antioxidante (65,83–347,75 mg VCE/100 g). Por último, en *V. gaimanensis* el contenido fenólico registrado fue de 3,45 mg GAE/g y la actividad antioxidante estimada en porcentaje de DPPH neutralizado fue del 20%. Se observó variabilidad y diferencias significativas entre poblaciones en las especies de montaña ($p < 0,05$). Además, se reportó mayor actividad antioxidante en plantas en estadio vegetativo para *V. moyanoi* y *V. philippiana*. Los análisis de correlación mostraron una correlación positiva entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante en *V. philippiana* ($\rho = 0,56$; $p < 0,001$). En algunos individuos de esta especie, el contenido de fenoles y actividad antioxidante resultaron similares al de otras valerianas de uso medicinal en Patagonia (*V. carnososa* y *V. clarionifolia*).

Introducción

A lo largo de su historia evolutiva, las plantas desarrollaron un complejo y diverso metabolismo utilizando precursores simples e inorgánicos para sintetizar compuestos de bajo peso molecular estructuralmente variados (Yeshi et al., 2022). El arsenal de sustancias químicas no estaba presente en sus antepasados acuáticos, permitiéndoles adaptarse e interactuar con el ambiente terrestre y otros seres vivos (Jacobowitz & Weng, 2020; Wink, 2010). Durante mucho tiempo a estas moléculas se las consideró “productos de desecho”, acumulados en las células como resultado de un sistema excretor deficiente (Hartmann, 2007). A finales del siglo XIX, Kossel (1891) introdujo la expresión “componentes secundarios” para referirse a ciertos compuestos celulares que no se encontraban en todas las células y por lo tanto no eran esenciales, diferenciándolos de los componentes “primarios” (Luckner, 1984). Posteriormente, a medida que se fueron conociendo las actividades biológicas de estos compuestos, surgieron numerosas denominaciones para

evitar la connotación negativa que implicaba llamarlos “secundarios”, lo que denotaría un menor valor para el organismo (Hadacek, 2002).

De acuerdo a la bibliografía tradicional, los metabolitos **primarios** son compuestos químicos presentes en organismos vivos vitales para su normal funcionamiento, como aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos (Karlovsky, 2008). Los metabolitos considerados **secundarios**, por otra parte, no estarían implicados de manera directa en los procesos del metabolismo primario, pero su presencia representaría una ventaja competitiva considerable para los individuos que los sintetizan; como ejemplos se pueden mencionar a los compuestos fenólicos, terpenos, esteroides y alcaloides (Diyabalanage, 2022). Las especies vegetales también cuentan con compuestos involucrados en los procesos regulatorios, denominados **fitohormonas**, como por ejemplo las auxinas, ácido giberélico y citoquininas (Erb & Kliebenstein, 2020).

Recientemente, gracias a los avances genéticos y químicos se ha demostrado que los metabolitos secundarios pueden ser multifuncionales y comportarse como primarios, secundarios o fitohormonas, con el fin de que la planta se adapte al ambiente; de esta manera, se conciben como moléculas integradas en redes metabólicas que pueden ser moldeadas dinámicamente por las presiones de selección ambiental (Hartmann, 2007; Erb & Kliebenstein, 2020). En este trabajo se adoptará “metabolitos secundarios” para referirnos a todos los compuestos químicos presentes en las plantas.

Mientras que los metabolitos primarios son conservados a nivel taxonómico de División y entre Reinos (Karlovsky, 2008), dentro del Reino Plantae la presencia de ciertos metabolitos secundarios puede encontrarse restringida a una familia, género botánico o incluso a nivel de especie (Wink, 2010); por ello en ciertas ocasiones son considerados marcadores quimiotaxonómicos de importancia sistemática (Schenck & Busta, 2022). Los metabolitos secundarios se sintetizan en estructuras especializadas como ductos, glándulas, tricomas y en pequeñas cantidades, incluso siendo almacenados en sus formas inactivas (Li et al., 2020). En ocasiones los metabolitos de interés se encuentran en toda la planta, pero en mayor concentración en órganos o estructuras específicas. Por ejemplo, en el caso del hipérico (*Hypericum perforatum* L.) el compuesto hipericina se halla en mayor medida en las anteras de las flores, disminuyendo su contenido en hojas y tallos (Hevia et al., 2005); en la manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) sucede algo similar, las sustancias de interés se

encuentran específicamente en las flores más que en el resto de la planta (Franz, 1985). En el caso de las valerianas, los valepotriatos generalmente se hallan en mayor proporción en los órganos subterráneos, aunque también pueden encontrarse en otras partes de la planta (Silva et al., 2002; Almeida et al., 2019). Estos compuestos de naturaleza iridoide, son inestables, termolábiles y se descomponen bajo condiciones alcalinas, ácidas o soluciones alcohólicas, formando sustancias amarillentas denominadas baldrinales (Patočka & Jakl, 2010). Algunos autores mencionan que estos compuestos serían los responsables de la actividad sedativa de las valerianas y contribuirían al tratamiento de la epilepsia, la depresión, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Nandhini et al., 2018). Sin embargo, desde que se reportó que los valepotriatos presentan actividad citotóxica y pueden inhibir la síntesis de ADN, en el mercado se buscan productos con alto contenido de ácido valerénico (sesquiterpeno) pero bajo en valepotriatos (Wang et al., 2010).

Los metabolitos secundarios juegan un papel clave en la adaptación de la planta al medio ambiente, con diversas actividades biológicas. Como ejemplos se pueden mencionar las propiedades antioxidantes, antialimentarias, insecticidas y larvicidas, antibióticas, antifúngicas y antivirales que previenen las infecciones y ataques de patógenos, brindando protección contra la depredación, el parasitismo, la invasión y la competencia (Nishida, 2014; War et al., 2020; Yeshi et al., 2022). Además, los metabolitos secundarios protegen contra la radiación UV y forman parte de los pigmentos de flores y frutos (Moghe & Last, 2015).

Si bien es posible clasificar a estas familias de moléculas según el tipo de esqueleto carbonado y grupos funcionales que las forman, o nombrarlas de acuerdo al nombre genérico o epíteto específico de las plantas donde se descubrieron, resulta ampliamente aceptado diferenciarlas según el origen biosintético, existiendo tres grandes grupos: **terpenos** (y esteroides), **alcaloides** (junto con otros compuestos nitrogenados) y **compuestos fenólicos** (Li et al., 2020) (Fig. 32).

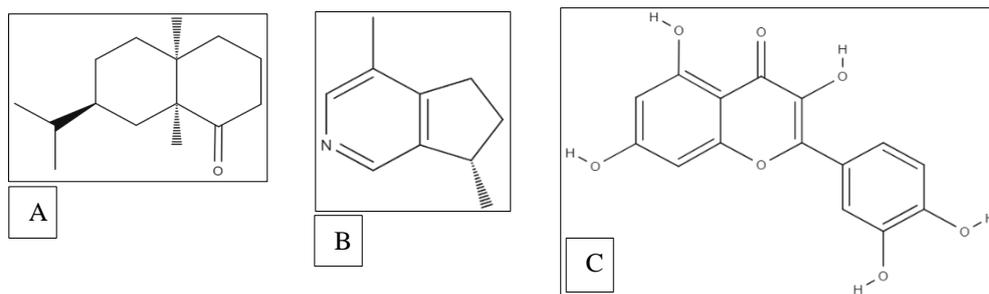


Figura 32. Estructuras de metabolitos secundarios presentes en especies de *Valeriana*. A) Terpeno valeranonona presente en *V. himalayana* Grubov. B) Alcaloide actinidina y C) Flavonoide quercetina, presentes en *V. officinalis* (Wang et al. 2010). Imágenes extraídas de <https://molview.org>

Factores que influyen en la síntesis de metabolitos secundarios

La síntesis y acumulación de los metabolitos secundarios involucran factores genéticos, ontogenéticos, morfogenéticos y ambientales (Yang et al., 2018) que determinan la variabilidad fitoquímica existente dentro de las especies vegetales. Muchos estudios sobre la variación de estos metabolitos se han realizado en plantas de importancia comercial, por lo que podrían haber estado bajo ciertas presiones selectivas (antrópicas) y cuyo comportamiento no siempre sería representativo de las especies silvestres (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Conocer la variabilidad fitoquímica de las plantas es sumamente importante al momento de decidir, por ejemplo, qué parte (órgano) es el más conveniente a utilizar o la época más provechosa para realizar la cosecha del material vegetal (Santos-Gomes & Fernandes-Ferreira, 2001).

Las plantas han desarrollado ciertos mecanismos de adaptación frente a los cambios del medio y diversas formas de relacionarse con otros seres vivos, tales cambios en las condiciones de crecimiento son considerados estreses (Robert-Seilaniantz et al., 2010). Pueden ser de naturaleza biótica (causados por organismos vivos) o abiótica, relacionados a factores ambientales como la temperatura, altitud, radiación solar, sequía, características edafológicas, entre otros (Yeshi et al., 2022).

La respuesta metabólica al estrés es integral e involucra a todo el organismo, siendo común a ambos estreses los mecanismos relacionados con las **especies reactivas del oxígeno** (ROS en inglés) (Robert-Seilaniantz et al., 2010). Estas moléculas naturalmente dañinas para el ADN, proteínas y lípidos, también son consideradas importantes elementos de señalización celular, vitales para el crecimiento y desarrollo normal de la planta (Brosché et al., 2010; Baxter et al., 2014). Se encuentran bajo esta denominación los radicales libres como el anión

superóxido, el oxígeno singlete, peróxidos de lípidos y el radical hidroxilo (Lourenço et al., 2019). Un **radical libre** es una molécula altamente reactiva, que posee un electrón desapareado y produce daño oxidativo en las biomoléculas (Singleton et al., 1999). Las especies reactivas del oxígeno no se movilizan demasiado dentro de la célula (con excepción de H₂O₂, que es capaz de atravesar membranas celulares) y por lo general, el sitio de producción es el mismo donde llevan a cabo su acción oxidante (Brosché et al., 2010). Así, en el citosol de las células vegetales no se han encontrado fuentes directas de producción de ROS y, por el contrario, en los cloroplastos hay intermediarios altamente oxidantes, generados durante las reacciones fotosintéticas. Otras rutas de producción de ROS incluyen los procesos de oxidación de ácidos grasos y respiración en las mitocondrias (Biswal et al., 2011; Baxter et al., 2014).

Radicales libres y antioxidantes

Los **antioxidantes** son moléculas que retardan o inhiben la oxidación causada por radicales reactivos en un sistema biológico (Kim et al., 2003). A su vez, cumplen un rol significativo en la conservación de los alimentos, ya que los procesos de deterioro de los productos alimenticios implican reacciones de oxidación (Lourenço et al., 2019). Pueden ser de origen natural o sintético, destacándose en el primer grupo, los flavonoides y ácidos fenólicos (Kancheva & Kasaikina, 2013).

Dentro del organismo humano, se puede hacer una distinción entre los antioxidantes endógenos (mayoritariamente enzimas y moléculas sintetizadas internamente) y los antioxidantes exógenos, incorporados a través de la dieta (Fraunberger et al., 2016). En enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, cáncer, Alzheimer y Parkinson, se producen de manera excesiva radicales libres en el organismo, estado fisiológico conocido como estrés oxidativo (Schiffrin, 2010; Chiou et al., 2017). Existen también otras especies reactivas que inducen a este desequilibrio como las especies reactivas de nitrógeno, de cloro, de bromo y de azufre (Halliwell & Gutteridge, 2015). Según estudios epidemiológicos, existe una asociación positiva entre el consumo de cereales, frutas, legumbres, bebidas como el té o vino, hierbas, especias y la reducción de la tasa de mortalidad por enfermedades del corazón y cánceres comunes (Hertog et al., 1993; Sikora et al., 2008; Khoddami et al., 2013). Esto se atribuye al hecho de que estos alimentos pueden proporcionar una mezcla óptima de fitoquímicos como antioxidantes naturales, fibras y otros compuestos bióticos (Kaur &

Kapoor, 2001). La mayoría de los antioxidantes presentes en los alimentos son **compuestos fenólicos**, capaces de donar el átomo de hidrógeno del grupo fenol a los radicales libres, interrumpiendo así la cadena de propagación durante el proceso de oxidación (Singleton et al., 1999; Teixeira et al., 2013).

Compuestos fenólicos

Los fenoles o compuestos fenólicos, son moléculas sintetizadas por plantas, hongos y bacterias (Couto et al., 2006; Tsao, 2010; Huang et al., 2018). Derivan principalmente de la fenilalanina y en algunas plantas, también de la tirosina; su síntesis es a través de la ruta fenilpropanoide del ácido shikímico (ruta más utilizada por plantas) y la del acetato-malonato (ruta utilizada por hongos y bacterias). La estructura química básica es un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilos (Kolton et al., 2022) (Fig. 33).

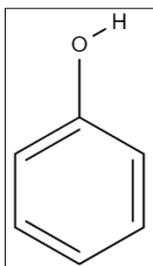


Figura 33. Estructura química básica de un fenol. Imagen extraída de <https://molview.org>

Los compuestos fenólicos son considerados los más efectivos antioxidantes naturales por sus capacidades redox (actuando como agentes reductores) y pueden intensificar la actividad de otros antioxidantes (Sikora et al., 2008). Además, pueden ionizarse en presencia de alguna base o quelar iones metálicos, especialmente hierro y cobre (Rice-Evans et al., 1997). En las plantas, son responsables de los pigmentos de las flores, frutos y participan en la defensa contra patógenos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007), encontrándose ampliamente distribuidos (Kähkönen et al., 1999). Generalmente se almacenan en vacuolas conjugados con azúcares, sulfatos o ambos (Walton & Brown, 1999; Tsao, 2010) y junto con cadenas largas de ácidos carboxílicos, es posible encontrarlos formando parte de la cutina y suberina (Shahidi & Naczki, 2003). Dependiendo de las unidades de fenoles presentes en la molécula, estos compuestos pueden clasificarse en fenoles simples, como los fenilpropanoides, cumarinas y

derivados del ácido benzoico (Fig. 34A) o polifenoles, como estilbenos, flavonoides, taninos, lignanos y lignina (Kennedy & Wightman, 2011) (Fig. 34B).

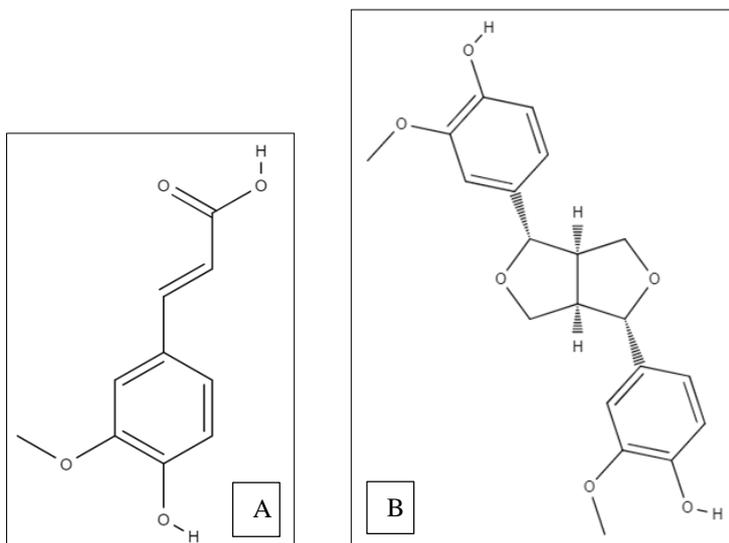


Figura 34. A) Fenol simple, ácido ferúlico presente en *V. laxiflora* DC B) Estructura fenólica más compleja. Lignano pinosilino, presente en *V. microphylla* Kunth (Wang et al., 2010). Imágenes extraídas de <https://molview.org>

Las plantas como fuentes de antioxidantes

Una planta se considera medicinal cuando se utiliza como remedio para prevenir, paliar, curar o modificar un proceso fisiológico normal o patológico, es decir cuando es una fuente de fármacos y sus precursores (Arias, 1999). Parte de las propiedades de las plantas medicinales es atribuida a la actividad antioxidante de sus compuestos químicos, incluidos los fenoles, vitaminas A, E y C (Kiselova et al., 2006). Asimismo, se ha incrementado el interés por investigar antioxidantes naturales con el fin de reemplazar aquellos de origen sintético que poseen efectos indeseables en la salud (Bisbal et al., 2020).

Las formas más tradicionales de uso de las plantas de manera herbolaria son las infusiones y cocimientos. Una infusión se obtiene vertiendo agua hervida sobre la droga vegetal, mientras que en los cocimientos se agrega agua a reflujo y se obtienen mayores compuestos hidrosolubles con respecto a las infusiones (Bandoni, 2003). Asimismo, existen otras formas de preparados como las tinturas, que son soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas preparadas a partir de productos vegetales o de otro origen (*Farmacopea Argentina*, 2003) y cuyo uso es más popular en países con fuerte tradición de utilización de medicinas

herbolarias y con disposiciones legales al respecto, como Alemania, Francia o Suiza (Hamburger & Hostettmann, 1991).

En Argentina se han reportado aproximadamente 10.000 especies de plantas vasculares, de las cuales se estima que 1.529 poseen algún tipo de uso curativo (Barboza et al., 2009). Hasta el año 2014, apenas un poco más del 1% del total de especies había sido estudiado como posibles fuentes de fitofármacos (Alonso & Desmarchelier, 2014). Entre los géneros botánicos que incluyen especies de uso medicinal, se encuentra *Valeriana* con al menos 5 especies utilizadas en la medicina tradicional patagónica: *V. carnosa*, *V. clarionifolia*, *V. gaimanensis*, *V. lapathifolia* y *V. macrorrhiza* (Gusinde, 1936; Niemeyer, 1995; Richeri et al., 2015; Molares et al., 2019). En estas especies se han realizado estudios con perspectivas etnobotánicas (Molares & Ladio, 2009; Richeri et al., 2015), taxonómicas, filogenéticas (Kutschker, 2008, 2011; Bell et al., 2012; Kutschker & Morrone, 2012; Nagahama et al., 2016) y existen pocas investigaciones desde un punto de vista fitoquímico, agronómico y farmacológico (Kutschker, 2009; Nagahama et al., 2019; Marcucci et al., 2020; Nagahama & Bonino, 2020). Entre las especies mencionadas, *V. gaimanensis* es la única valeriana endémica de la provincia de Chubut, con una población registrada en inmediaciones del dique Florentino Ameghino (Nagahama et al., 2016). Por otro lado, *V. moyanoi* y *V. philippiana* no poseen registros etnobotánicos hasta el momento y crecen restringidas a las cumbres y pedreros de montañas. Estos sitios se caracterizan por ser fríos, con alta radiación UV y/o extremadamente áridos, propiciando condiciones de gran estrés para las plantas. Con el fin de aportar un mayor conocimiento sobre estas valerianas nativas, en el presente capítulo se evaluó el potencial antioxidante de estas tres especies y se determinó en qué medida contribuyen los polifenoles a esa importante actividad biológica.

Objetivo general:

Caracterizar desde el punto de vista químico, diferentes poblaciones de *V. philippiana*, *V. moyanoi* y *V. gaimanensis* e identificar la/s especies/poblaciones que presenten mayor potencial para el desarrollo de planes de aprovechamiento sustentable.

Objetivos específicos:

- Cuantificar el contenido total de fenoles de las especies bajo estudio.
- Determinar la actividad antioxidante de extractos etanólicos de los órganos subterráneos de las tres especies.
- Comparar los perfiles químicos a nivel intra e interespecífico.
- Identificar quimiotipos candidatos con potencial uso fitomedicinal.

Materiales y métodos

Los ensayos fitoquímicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigación de Plantas Aromáticas y Medicinales (LIPAM), perteneciente al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Sede Esquel.

Área de estudio y material vegetal

Se recolectaron ejemplares de *V. gaimanensis*, *V. moyanoi* y *V. philippiana* de distintas procedencias geográficas, a partir de información de colecciones previas (herbarios) y bibliografía asociada (Kutschker & Morrone, 2012; Nagahama et al., 2016). Además, se relevaron ambientes montañosos dentro de las áreas de distribución natural de cada una de las especies.

Se seleccionaron 8 poblaciones de *V. philippiana*, 7 de *V. moyanoi* y 1 de *V. gaimanensis* para realizar la caracterización general. Los viajes de recolección se realizaron durante la época estival en dos años consecutivos. En 2018 se obtuvieron las muestras de la mayoría de las poblaciones de *V. philippiana* en una campaña de recolección realizada en Patagonia Norte (poblaciones de Neuquén y Río Negro: Copahue “CO”, Rucachoroi “RU”, Cerro Atravesada “AT”, Cerro Bayo “BA”, Cerro Tronador “TR” y Cerro Lindo “CL”) y dos de las poblaciones de *V. moyanoi* (Río Limay “RL” y Cerro Chalhuaco “CH”); para completar el acopio de material de esta especie, en 2019 se realizó un segundo viaje que incluyó diferentes sitios de Patagonia Sur (poblaciones de Chubut: Cerro Nahuelpan “NA”, Tecka “TE”, Lago Fontana “FO”, Talagapa “TA” y Santa Cruz: Monte Zeballos “ZE”) y se añadieron dos poblaciones más de *V. philippiana* (Cerro Cónico “CC” y Lago Guacho “LG”; Fig. 35, Tabla 1).

Adicionalmente, se seleccionaron dos poblaciones de *V. moyanoi* y dos poblaciones de *V. philippiana* (Tabla 2) con el propósito de evaluar la variabilidad en el contenido de fenoles y la actividad antioxidante en diferentes estadios fenológicos de las plantas. Cabe mencionar que en el caso particular de *V. moyanoi*, al tratarse de una hierba bianual es posible encontrarla en dos estadios fenológicos en la época reproductiva (Fig. 36A), es decir ejemplares en estado vegetativo (plantas de un año de edad), conjuntamente con ejemplares en floración o fructificación (plantas de dos años de edad). En la población del Cerro Nahuelpan (NA) se recolectaron 8 individuos en estadio de floración y 8 en estadio vegetativo en diciembre de 2019, correspondiendo estas últimas a plantas inmaduras de un año. Para las poblaciones de *V. philippiana*, se evaluaron los estadios vegetativo y floración en diferentes épocas del año (Fig. 36B; Tabla 2).

Tabla 12. Datos geográficos de las poblaciones estudiadas por especie, indicando el número de individuos recolectados por población (N).

Especies	N	Provincia	Población	Latitud	Longitud	Altitud msnm
<i>V. gaimanensis</i>	8	Chubut	FA	43°41'46"S	66°28'57"O	180
<i>V. moyanoi</i>	8	Neuquén	RL	40°57'34"S	71°02'40"O	748
<i>V. moyanoi</i>	8	Rio Negro	CH	41°15'25"S	71°17'58"O	1591
<i>V. moyanoi</i>	8	Chubut	TA	42°03'51"S	68°12'14"O	1595
<i>V. moyanoi</i>	8	Chubut	NA	42°59'02"S	71°12'40"O	1376
<i>V. moyanoi</i>	8	Chubut	TE	43°37'37"S	70°44'08"O	1348
<i>V. moyanoi</i>	8	Chubut	FO	44°54'31"S	71°12'59"O	1013
<i>V. moyanoi</i>	7	Santa Cruz	ZE	47°00'55"S	71°48'58"O	1470
<i>V. philippiana</i>	8	Neuquén	CO	37°48'56"S	71°06'35"O	2146
<i>V. philippiana</i>	8	Neuquén	AT	38°56'34"S	70°37'08"O	2194
<i>V. philippiana</i>	8	Neuquén	RU	39°16'43"S	71°10'58"O	1905
<i>V. philippiana</i>	8	Neuquén	BA	40°44'38"S	71°36'42"O	1722
<i>V. philippiana</i>	8	Rio Negro	TR	41°11'23"S	71°49'18"O	1559
<i>V. philippiana</i>	8	Rio Negro	CL	41°58'28"S	71°39'11"O	1600
<i>V. philippiana</i>	8	Chubut	CC	43°15'35"S	71°43'13"O	1380
<i>V. philippiana</i>	8	Chubut	LG	43°47'38"S	71°30'11"O	1451

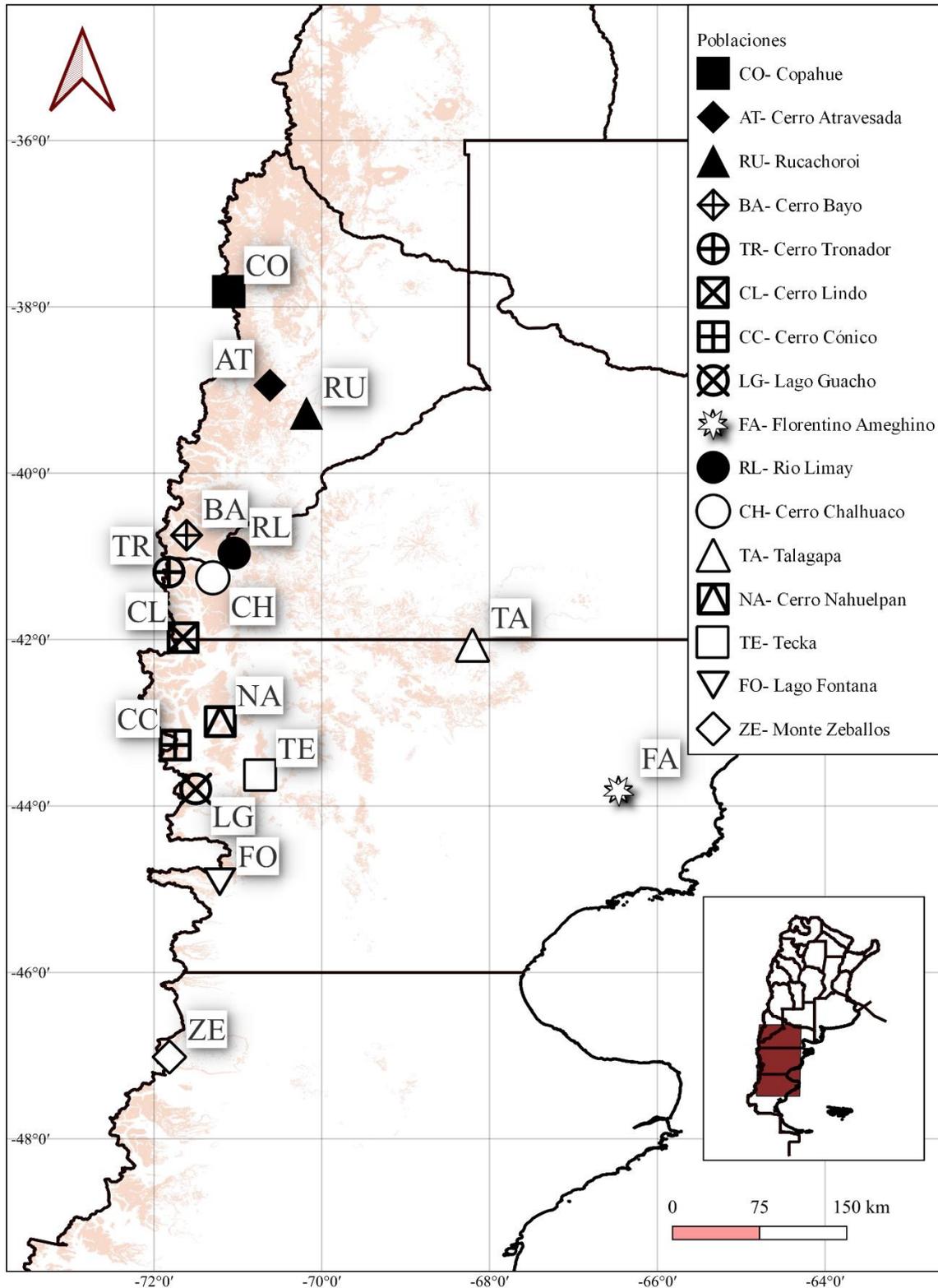


Figura 35. Ubicación geográfica de las poblaciones naturales visitadas. *V. philippiana*: CO; AT; RU; BA; TR; CL; CC; LG. *V. gaimanensis*: FA. *V. moyanoi*: RL; CH; TA; NA; TE; FO; ZE.

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO II: Estudios químicos

Tabla 13. Poblaciones seleccionadas para el estudio de la dinámica química en distintos estadios fenológicos.

Especies	Poblaciones	Provincias	Fecha de recolección	Estadio fenológico
<i>V. moyanoi</i>	Co. Nahuelpan (NA)	Chubut	06/12/19	Vegetativo (VEG)
	Co. Nahuelpan		06/12/19	Floración (FLO)
	Co. Nahuelpan		08/02/19	Fructificación (FRU)
	Lago Fontana (FO)		22/05/19	Vegetativo
	Lago Fontana		14/11/18	Floración
	Lago Fontana		22/01/19	Fructificación
<i>V. philippiana</i>	Co. Tronador (TR)	Rio Negro	01/12/19	Vegetativo
	Co. Tronador		18/01/17	Floración
	Co. Lindo (CL)		14/12/19	Vegetativo
	Co. Lindo		28/12/18	Floración

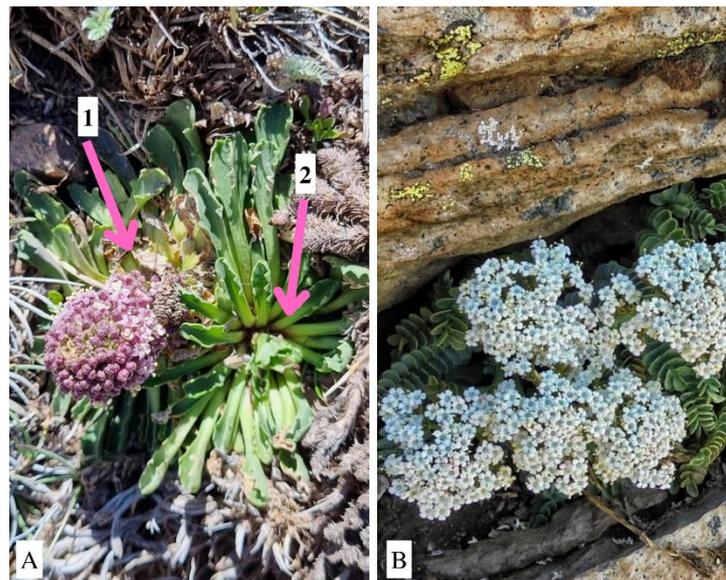


Figura 36. A) ejemplares de *V. moyanoi* en estado de floración (1) y vegetativo (2) en una misma estación del año. B) Ejemplar de *V. philippiana* en floración.

En cada población se recolectaron órganos subterráneos de 7–8 individuos (Fig. 37A) y se guardaron en bolsas de papel para su traslado. Una vez en el laboratorio, se les quitaron las partículas de suelo con un cepillo evitando el lavado. El material se secó a temperatura ambiente al resguardo de la luz y humedad (Fig. 37B). Posteriormente, se utilizó un molinillo eléctrico para moler las raíces (Fig. 38A) y lograr un mayor rendimiento al momento de extraer los compuestos fenólicos (Khoddami et al., 2013).



Figura 37. A) raíces de ejemplares de *V. moyanoi*. B) raíces secas de *V. philippiana*.

Equipos y reactivos

- DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Sigma Alrich Argentina)
- Ácido ascórbico (Anedra)
- Folin Ciocalteu (Biopack)
- Carbonato de sodio (Anedra)
- Ácido gálico anhidro (Anedra)
- Alcohol etílico al 96% (Porta)
- Micropipetas (1000 μ l, 100 μ l, 10 ml)
- Papel de filtro Whatman
- Molinillo eléctrico (Arcano)
- Cubetas de espectrofotometría de 4,5 ml
- Espectrofotómetro UV-Visible, Modelo 325 BD (Metrolab)

Preparación de extractos

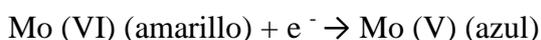
Los extractos etanólicos se prepararon en frascos color caramelo, colocando 1 g de raíces y/o rizomas molidos y 10 ml de etanol. Se dejaron macerar en oscuridad durante 7 días a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtraron con papel de filtro Whatman N° 1 (Fig. 38B) y se conservaron en heladera (4°C) hasta ser analizados. En total se realizaron extractos etanólicos de 56 individuos de *V. philippiana*, 55 individuos de *V. moyanoi* y 8 individuos de *V. gaimanensis*.



Figura 38. A) molienda del material seco. B) filtrado de los extractos.

Determinación del contenido de fenoles totales

Para cuantificar los fenoles totales *in vitro*, se realizó un ensayo espectrofotométrico utilizando el reactivo propuesto por Otto Folin y Vintila Ciocalteu (FC) (Folin & Ciocalteu, 1927), teniendo en cuenta las mejoras propuestas por Singleton & Rossi (1965), quienes proporcionaron mejor especificidad en cuanto a la reducción de fenoles por parte del reactivo, mayor reproducibilidad respecto a la temperatura y tiempo del ensayo, además de incorporar una curva de calibración con ácido gálico (Singleton & Rossi, 1965). La reacción básica general, tomada de Prior et al., (2005), se muestra a continuación:



El método de FC se basa en reacciones de óxido-reducción, es decir en transferencia de electrones entre el reactivo de FC y compuestos de naturaleza fenólica o sustancias reductoras no fenólicas, a pH básico. La reducción del reactivo FC, que originalmente es de color amarillo, puede observarse a simple vista como un cambio en su coloración, ya que vira al color azul (debido a la reducción del molibdeno), y esto es cuantificable por espectrofotometría a 765 nm. Así, el método provee la capacidad reductora de la muestra en cuestión, lo que normalmente se traduce en el contenido fenólico de la misma (Prior et al., 2005). Como ventaja, esta técnica colorimétrica resulta relativamente económica, simple y ha sido ampliamente utilizada en estudios clínicos y nutricionales para medir el contenido fenólico total de muestras biológicas o productos alimenticios derivados de plantas (Singleton et al., 1999; Lamuela-Raventós, 2018). Sin embargo, hay que considerar que sólo nos brinda una estimación de la concentración de los compuestos fenólicos por encima de un cierto nivel mínimo y claramente, no cuantifica los fenoles de forma individual (Khoddami et al., 2013).

En este trabajo el procedimiento se realizó de acuerdo con Singleton et al. (1999), con ligeras modificaciones (Gastaldi, 2018). En cada cubeta de espectrofotometría se añadieron 2 ml de agua destilada, luego 20 µl del extracto etanólico de las muestras, 0,2 ml del reactivo de FC (Biopack®) y por último 0,8 ml de solución salina de carbonato de sodio al 16%. Se prepararon 3 réplicas por individuo y se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente para favorecer la reacción química. Se midieron los valores de absorbancia a 765 nm en espectrofotómetro UV-Visible (Metrolab, Modelo 325 BD), teniendo en cuenta que un mayor valor de absorbancia se correlaciona con un mayor contenido de fenoles totales en la muestra (Singleton et al., 1999).

Preparación de la curva de calibración con ácido gálico

El ácido gálico se utiliza como estándar para realizar las comparaciones en numerosos estudios sobre contenido de fenoles de determinadas muestras, presumiblemente porque es soluble en agua, estable en forma seca y de bajo costo (Singleton et al., 1999). A partir de una solución etanólica de ácido gálico, denominada “Solución A” (1 mg/ml), se realizó una dilución 1/10 para preparar una “Solución B”. Se tomaron distintas alícuotas de 10, 20, 40, 60 y 80 µl de la Solución B y 10, 20, 40 y 60 µl de la Solución A, y se agregaron en las cubetas previamente cargadas con 2 ml de agua destilada (Fig. 39). Posteriormente, se

colocaron 0,2 ml del reactivo FC (diluido 1:4) y 0,8 ml de solución salina (160 g/L). Luego de 20 minutos a temperatura ambiente, se procedió a la lectura a 765 nm en espectrofotómetro.

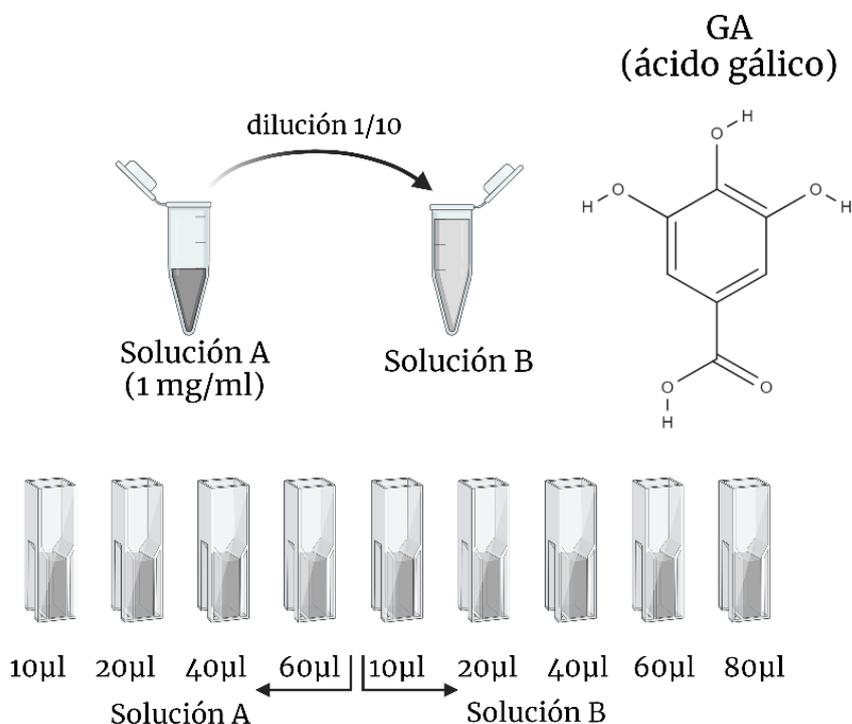


Figura 39. Preparación de la curva de calibración de ácido gálico.

Se trabajó con dos curvas de calibración de ácido gálico de acuerdo con cada campaña de recolección, donde se graficó absorbancia vs concentración. La expresión final de los resultados se calculó en términos de mg equivalentes de ácido gálico (GAE, siglas en inglés) por gramo de muestra seca (mg GAE/g). La concentración de compuestos fenólicos de cada individuo se calculó de acuerdo con las siguientes ecuaciones, obtenidas de las curvas anteriormente mencionadas:

– Para las poblaciones AT, BA, CO, CL, RU, TR de *V. philippiana* y RL, CH, TE y FO de *V. moyanoi* (recolectadas en 2018):

$$\text{Absorbancia} = 0,05 \mu\text{g GAE} + 0,03$$

– Para las poblaciones CC y LG de *V. philippiana* y para las poblaciones NA, TA y ZE de *V. moyanoi* (recolectadas en 2019):

$$\text{Absorbancia} = 0,04 \mu\text{g GAE} + 0,08$$

Determinación de la actividad antioxidante

Uno de los métodos más frecuentemente utilizado para medir la capacidad antioxidante de una muestra dada, es el del radical estable 2,2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH), propuesto por Brand-Williams et al. (1995). La capacidad del DPPH de neutralizar radicales libres, depende del número y las posiciones de sustitución de los grupos hidroxilo en la molécula del compuesto con el que interactúa (Chiou et al., 2017).

Este reactivo de naturaleza sólida, puede ser disuelto en un solvente orgánico (especialmente etanol o metanol) lo que, según algunos autores, implicaría cierta limitación al momento de interpretar el rol de los antioxidantes hidrofílicos (Wojdyło et al., 2007). Una vez que la solución etanólica de DPPH (de intensa coloración violeta) se reduce en presencia de un antioxidante donador de hidrógeno, provoca la formación de la forma no radical DPPH-H, que es de color amarillo (Fig. 40) y el cambio colorimétrico es medible por espectrofotometría a 517 nm. De modo que el ensayo se basa en medir la pérdida de color del DPPH en esa longitud de onda, luego de reaccionar con la muestra de interés (Prior et al., 2005).

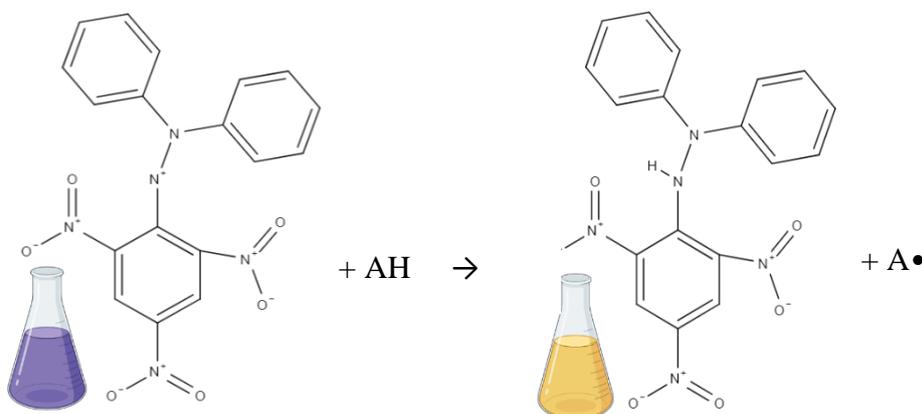


Figura 40. Esquema de reacción del reactivo DPPH, adaptado de Arteaga et al. (2012). AH= compuesto antioxidante.

Por otro lado, cuando se caracterizan extractos vegetales con respecto a su actividad antioxidante, es usual la expresión de los resultados en términos de equivalentes de vitamina C (VCE, siglas en inglés) por gramo o cada 100 g de muestra seca. El ácido ascórbico (vitamina C) es un potente antioxidante natural hidrosoluble presente en frutas y vegetales (Lourenço et al., 2019), y por ello se lo toma como referencia al trabajar con matrices

alimenticias. Con frecuencia también se encuentra en la bibliografía la utilización de otros estándares, como por ejemplo el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, expresándose los resultados en “equivalentes de Trolox” (Kiselova et al., 2006), o en menor medida la actividad antioxidante también puede ser expresada en porcentaje de DPPH neutralizado (Leja et al., 2007). En este trabajo, los resultados se expresaron como “mg equivalentes de vitamina C cada 100 g de muestra seca” (mg VCE/100 g) y en porcentaje de DPPH neutralizado, teniendo en cuenta que un porcentaje mayor de DPPH neutralizado implica una mayor actividad antioxidante. El procedimiento se realizó de acuerdo con Gastaldi (2018) de la siguiente manera:

Se preparó una solución etanólica de DPPH (30 mg/L). En cada cubeta de espectrofotometría se agregaron 100 µl de las muestras y 3,9 ml de solución de DPPH. Se realizaron 3 réplicas por individuo y un control, que solo contenía solución etanólica de DPPH. Posteriormente, las muestras fueron conservadas en heladera a 4°C durante 30 min para favorecer la estabilidad de la reacción y luego se midió la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro UV-Visible, tomando la absorbancia del control como absorbancia inicial.

Para cada cubeta se calculó el porcentaje de DPPH neutralizado, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DPPH neutralizado} = [(A_0 - A_1) \div A_0] * 100$$

en la cual “A₀” es la absorbancia inicial y “A₁” es el valor de absorbancia medido de cada muestra.

Preparación de la curva de calibración con ácido ascórbico (Vitamina C)

A partir de una solución acuosa de vitamina C (10 mg/ml) se realizaron diluciones seriadas 1/10, para obtener en principio una “solución B” y posteriormente cada una de las cubetas según se muestra en el esquema (Fig. 41):

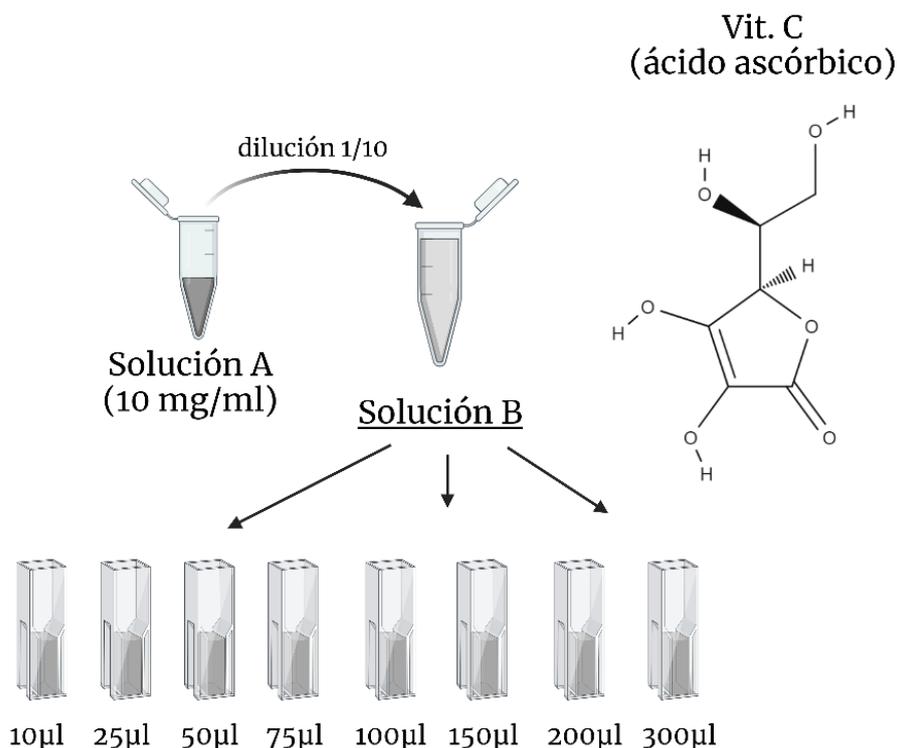


Figura 41. Preparación de la curva de calibración con ácido ascórbico.

De cada una de estas soluciones se tomaron 100 µl y se colocaron en las cubetas de espectrofotometría. Se agregaron 3,9 ml de solución etanólica de DPPH (30 mg/L) y se dejaron reaccionar a 4°C durante 30 minutos. Se realizaron tres repeticiones y se midió la absorbancia a 517 nm. Posteriormente, se graficó la absorbancia versus la concentración, se ajustó a una función lineal y se obtuvo la ecuación. De esta manera, despejando en la ecuación se calculó la concentración de cada muestra en términos de mg de ácido ascórbico por ml de extracto y finalmente, se calculó la actividad antioxidante en mg VCE/100 g.

Análisis estadísticos

Las dos variables en estudio fueron “contenido de fenoles totales” y “actividad antioxidante”, para la variable actividad antioxidante se escogieron análisis no paramétricos al no presentar distribución normal. Asimismo, se consideró la altitud de los sitios de colecta con el fin de correlacionar esta información con el contenido de fenoles totales.

Para evaluar las diferencias interespecíficas en el contenido de fenoles totales se optó por una prueba t de diferencias de medias, con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$. Para caracterizar las poblaciones de *V. moyanoi* y *V. philippiana* se realizaron Análisis de la

Varianza (ANOVA) trabajando con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$. Conjuntamente se realizó una prueba Tukey de comparaciones.

Para analizar el contenido fenólico en distintos estadios fenológicos, en las dos poblaciones seleccionadas de *V. moyanoi* se utilizó ANOVA, con un nivel de significancia de 0,05. En el caso de las dos poblaciones seleccionadas de *V. philippiana* se realizó una prueba t de dos muestras independientes.

Para la comparación de la actividad antioxidante entre especies se realizó una prueba no paramétrica de Mann Whitney, se trabajó con $\alpha=0,05$. Para el estudio general de las poblaciones de *V. moyanoi* y *V. philippiana* se realizó la prueba de Kruskal Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) trabajando con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$. Para evaluar la actividad antioxidante en los distintos estadios fenológicos de *V. moyanoi* se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido de una prueba Tukey de comparaciones, mientras que para evaluar diferencias entre estadios fenológicos en las poblaciones de *V. philippiana*, se utilizó una prueba de Wilcoxon para dos muestras independientes.

Para determinar si existe correlación entre variables en ambas especies se optó por la prueba de Correlación de Spearman (Spearman, 1904), al no cumplirse los supuestos para una prueba paramétrica. El nivel de significancia fue de $\alpha=0,001$. Asimismo, esta prueba se llevó cabo a los fines de evaluar la correlación entre el contenido de fenoles totales considerando la altitud de los sitios de colecta (poblaciones).

Los diferentes análisis se realizaron mediante los softwares Infostat (Di Renzo et al. 2020) y R studio v. 1.3.1073 (R Core Team, 2020). El resumen de los análisis utilizados se observa en el Anexo II.

Resultados

Comparación de contenido de fenoles y actividad antioxidante entre especies

Los valores medios del contenido de fenoles y actividad antioxidante se resumen en la Tabla 14. Para *V. moyanoi*, teniendo en cuenta todos los individuos evaluados, se obtuvo un rango de 0,20 a 2,26 mg GAE/g de fenoles totales y 5,82–273,74 mg VCE/100 g de actividad antioxidante, mientras que para *V. philippiana* el contenido de fenoles totales varió entre 3,39 y 9,64 mg GAE/g y la actividad antioxidante entre 65,83 y 345,75 mg VCE/100 g entre todos los individuos. El contenido medio de fenoles totales para *V. gaimanensis* fue de 3,45 mg GAE/g y la actividad antioxidante de 20% de DPPH neutralizado. Se observaron diferencias significativas entre especies ($p < 0,05$; ver Anexo II), siendo los extractos etanólicos de *V. philippiana* los que presentaron mayor contenido fenólico y actividad antioxidante en comparación a los extractos de *V. moyanoi* (Fig. 42) y de *V. gaimanensis*.

Tabla 14. Contenido medio de fenoles totales (FT) y actividad antioxidante (AA) de todas las poblaciones analizadas por especie. Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar. Se resaltan en negrita los valores más altos.

Especie	Población	FT (mg GAE/g)	AA (mg VCE/100 g)	% DPPH neutralizado
<i>V. gaimanensis</i>	FA	3,45 \pm 0,82	-	20,00
<i>V. moyanoi</i>	CH	1,15 \pm 0,16	84,72 \pm 7,08	12,61 \pm 2,19
<i>V. moyanoi</i>	FO	0,78 \pm 0,23	74,78 \pm 24,19	31,21 \pm 5,70
<i>V. moyanoi</i>	NA	0,54 \pm 0,26	139,73 \pm 30,61	46,52 \pm 7,21
<i>V. moyanoi</i>	RL	1,50 \pm 0,43	36,61 \pm 26,50	11,76 \pm 5,37
<i>V. moyanoi</i>	TA	0,54 \pm 0,20	121,79 \pm 26,61	42,29 \pm 6,27
<i>V. moyanoi</i>	TE	1,01 \pm 0,24	204,17 \pm 4160	61,72 \pm 9,80
<i>V. moyanoi</i>	ZE	0,51 \pm 0,31	130,49 \pm 30,74	44,34 \pm 7,24
<i>V. philippiana</i>	AT	4,28 \pm 0,51	125,10 \pm 64,58	55,20 \pm 11,98
<i>V. philippiana</i>	BA	4,51 \pm 0,91	150,43 \pm 65,01	59,90 \pm 12,06
<i>V. philippiana</i>	CO	5,78 \pm 1,31	225,30 \pm 54,13	73,80 \pm 10,04
<i>V. philippiana</i>	CC	5,61 \pm 0,83	333,37 \pm 9,54	92,18 \pm 2,25
<i>V. philippiana</i>	CL	6,15 \pm 1,34	336,21 \pm 11,02	92,85 \pm 2,59
<i>V. philippiana</i>	LG	6,58 \pm 1,35	327,48 \pm 6,30	90,80 \pm 1,48
<i>V. philippiana</i>	RU	5,92 \pm 1,05	229,02 \pm 72,65	74,49 \pm 13,48
<i>V. philippiana</i>	TR	6,46 \pm 1,50	210,21 \pm 54,75	71,10 \pm 10,15

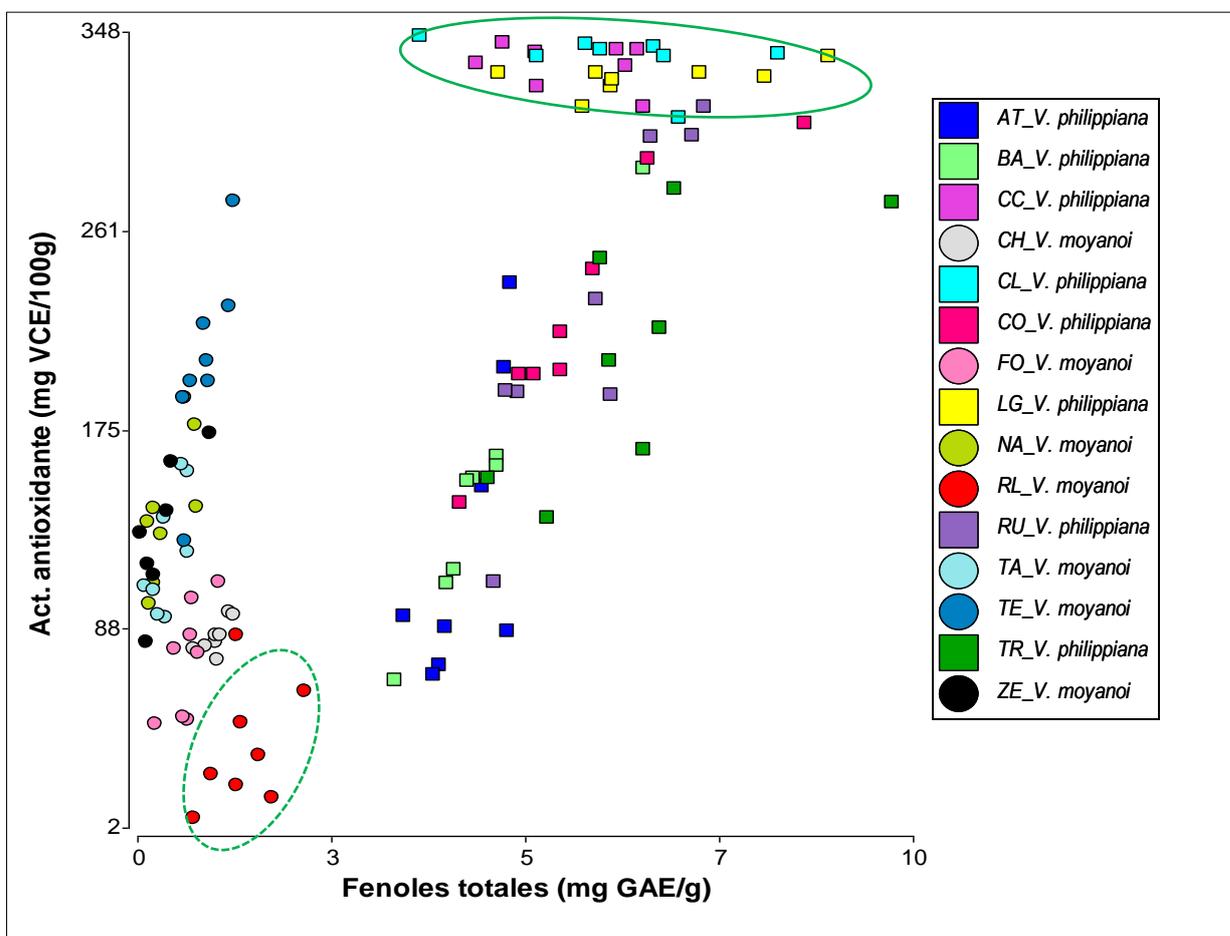


Figura 42. Fenoles totales y actividad antioxidante de las valerianas de montaña. Se ilustran los resultados de la caracterización general de *V. moyanoi* (círculos) y *V. philippiana* (cuadrados). Además, se señalan la mayoría de los individuos de **RL** (elipse punteada), que presentaron mayor contenido fenólico (junto a **CH**) y menor actividad antioxidante y con la otra elipse, se señalan a los individuos de las poblaciones de *V. philippiana* (**CC**, **CL** y **LG**), con mayor contenido fenólico y mayor actividad antioxidante.

Los resultados del contenido de fenoles se obtuvieron mediante cálculos utilizando las curvas de calibración con ácido gálico ($R^2=0,99$), mientras que para los resultados de actividad antioxidante *in vitro* se utilizó una curva de calibración con vitamina C. Dicha curva mostró una relación lineal ($R^2=0,98$) con pendiente negativa, entre las concentraciones de vitamina C y la reducción de la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm (ver Anexo II).

Contenido de fenoles totales en *Valeriana moyanoi*

Una baja cantidad de fenoles totales fueron detectados en todas las muestras de *V. moyanoi*, observándose variabilidad según las diferentes procedencias geográficas ($p < 0,05$; Anexo II). En las poblaciones RL y CH se registraron los valores promedios más altos de contenido de fenoles (1,50 y 1,15 mg GAE/g, respectivamente), mientras que la población ZE registró el valor promedio más bajo (0,51 mg GAE/g), aunque sin diferencias significativas con las poblaciones TA, NA y FO (Fig. 43, Tabla 15).

Tabla 15. Resultados de la prueba de comparaciones de Tukey del contenido de fenoles entre poblaciones de *V. moyanoi*. Letras diferentes implican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Poblaciones	Medias \pm desvío estándar	Grupos
RL	1,50 \pm 0,43	a
CH	1,15 \pm 0,16	ab
TE	1,01 \pm 0,24	b
FO	0,78 \pm 0,23	bc
NA	0,54 \pm 0,26	c
TA	0,54 \pm 0,20	c
ZE	0,51 \pm 0,31	c

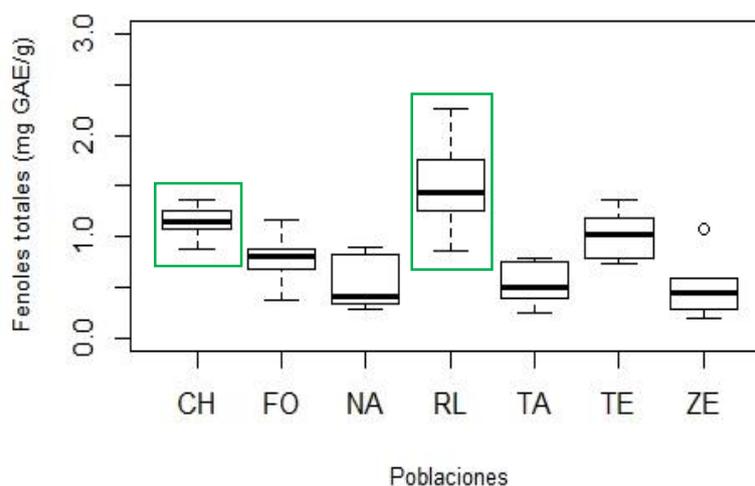


Figura 43. Contenido de fenoles totales en las poblaciones estudiadas de *V. moyanoi*. Se destacan las poblaciones **CH** y **RL** por poseer los contenidos medios más altos.

Variabilidad intra-poblacional del contenido de fenoles totales en *Valeriana moyanoi*

El contenido de fenoles totales en todos individuos de *V. moyanoi* fue relativamente bajo y variable dentro de cada población (Tabla 16). En la población CH (CV= 14%) se observaron valores entre 0,87-1,37 mg GAE/g en los individuos 8 y 6 respectivamente (Fig. 44a). En la población FO (CV= 29%) el valor mínimo se registró en el individuo 5 con 0,38 mg GAE/g y el mayor contenido fenólico fue de 1,17 mg GAE/g, registrado en el individuo 2 (Fig. 44b). La variabilidad en la población NA fue mayor (CV= 49%), observándose en el individuo 3 el valor mínimo para la variable (0,29 mg GAE/g) y en el individuo 6 el valor máximo de 0,90 mg GAE/g (Fig. 44c). En la población RL (CV= 29%) el contenido de fenoles varió entre 0,87 y 2,26 mg GAE/g, valores observados en los individuos 3 y 6 respectivamente (Fig. 44d). Por otro lado, en la población TA se observó un CV= 38%, donde el individuo 6 presentó menor contenido fenólico (0,25 mg GAE/g) y el individuo 4 el valor máximo de 0,79 mg GAE/g (Fig. 44e). Para la población TE (CV= 24%) se registró un valor mínimo de 0,74 mg GAE/g en el individuo 3 y un valor máximo de 1,36 mg GAE/g en el individuo 7 (Fig. 44f). Por último, en la población ZE se observó una mayor variabilidad en el contenido fenólico entre individuos (CV= 61%), presentando 0,20 mg GAE/g como valor mínimo en el individuo 8 y 1,07 mg GAE/g como el valor máximo, en el individuo 2 (Fig. 44g).

Tabla 16. Medidas de dispersión del contenido de fenoles totales particionadas por población de *V. moyanoi*. Poblaciones: **CH**, Cerro Chalhuaco; **FO**, Lago Fontana; **NA**, Cerro Nahuelpan; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **TE**, Tecka; **ZE**, Monte Zeballos.

Poblaciones	Varianza	Error estándar	Coefficientes de variación	n
CH	0,02	0,06	0,14	8
FO	0,05	0,08	0,29	8
NA	0,07	0,09	0,49	8
RL	0,19	0,15	0,29	8
TA	0,04	0,07	0,38	8
TE	0,06	0,08	0,24	8
ZE	0,10	0,13	0,61	7

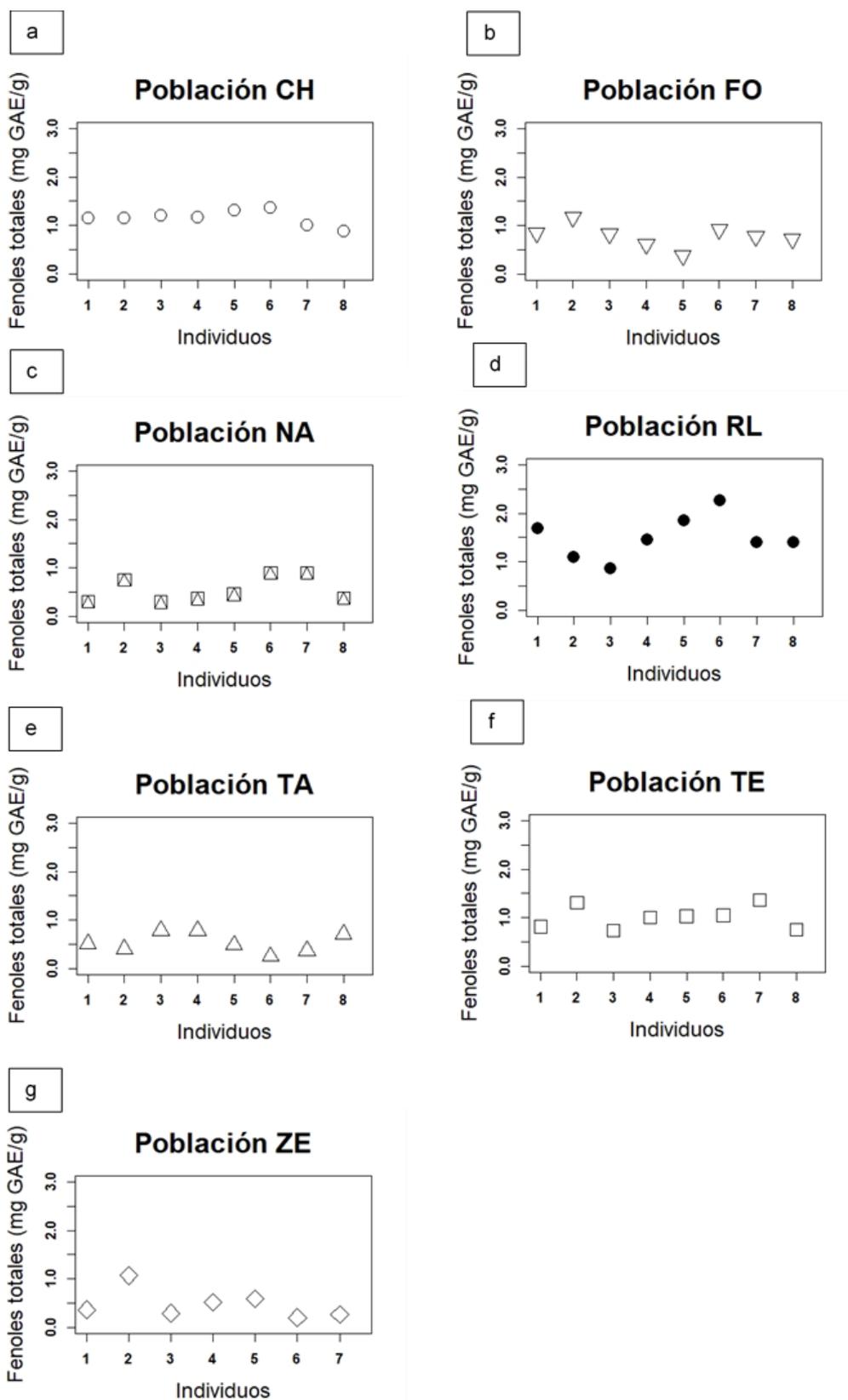


Figura 44. Contenido de fenoles totales en cada una de las poblaciones de *V. moyanoi*: **CH**, Cerro Chalhuaco; **FO**, Lago Fontana; **NA**, Cerro Nahuelpan; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **TE**, Tecka y **ZE**, Monte Zeballos.

Actividad antioxidante en *Valeriana moyanoi*

Se registraron diferencias significativas en cuanto a la actividad antioxidante entre las poblaciones de *V. moyanoi* ($p < 0,05$; ver Anexo II). El valor promedio de actividad antioxidante expresado en equivalentes de vitamina C, fue mayor en la población TE (204,17 mg VCE/100 g), mientras que el menor valor promedio se registró en la población RL (36,61 mg VCE/100 g). El resto de las poblaciones se diferenciaron en dos grupos, por un lado, las poblaciones NA, ZE y TA (grupo b) y por el otro las poblaciones CH y FO en el grupo c (Fig. 45, Tabla 6).

Tabla 17. Comparación de la actividad antioxidante de las poblaciones de *V. moyanoi*. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Poblaciones: **TE**, Tecka; **NA**, Cerro Nahuelpan; **ZE**, Monte Zeballos; **TA**, Talagapa; **CH**, Cerro Chahuaco; **FO**, Lago Fontana; **RL**, Rio Limay. **VR**= varianza de los rangos.

Poblaciones	VR	AA (mg VCE/100g) Media ± desvío estándar	Grupos
TE	49,75	204,17 ± 41,60	a
NA	38,62	139,73 ± 30,61	b
ZE	35,71	130,49 ± 30,74	b
TA	32,87	121,79 ± 26,61	b
CH	17,81	84,72 ± 7,08	c
FO	15,75	74,78 ± 24,19	c
RL	6,43	36,61 ± 26,50	d

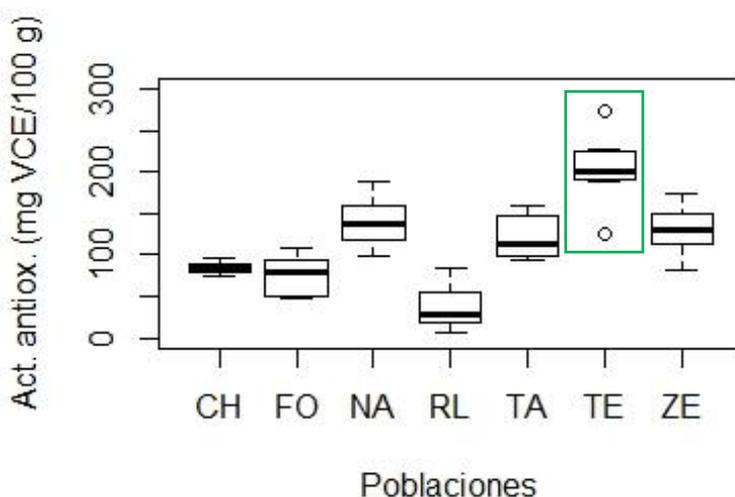


Figura 45. Actividad antioxidante en las poblaciones de *V. moyanoi*. Se destaca la población **TE** en el recuadro, por presentar mayor actividad antioxidante que el resto de poblaciones. Poblaciones: **CH**, Cerro Chahuaco; **FO**, Lago Fontana; **NA**, Cerro Nahuelpan; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **TE**, Tecka y **ZE**, Monte Zeballos.

Variabilidad de actividad antioxidante a nivel intra-poblacional en *Valeriana moyanoi*

Teniendo en cuenta los coeficientes de variación, las poblaciones se pueden ordenar de manera decreciente: RL, FO, ZE, TA, NA, TE y CH (Tabla 18). En la población RL (CV= 72%) el individuo 3 presentó menor actividad antioxidante (5,82 mg VCE/100 g) y el individuo 6 un valor máximo de 85,27 mg VCE/100 g (Fig. 46d). En la población FO (CV= 32%) el individuo 5 registró menor actividad antioxidante (46,99 mg VCE/100 g) y el individuo 2 el máximo valor para esta población (108,83 mg VCE/100 g; Fig. 46b). En la población ZE (CV= 24%) los valores variaron entre 82,62 y 173,32 mg VCE/ 100 g (Fig. 46g). Seguidamente, se observan las poblaciones NA y TA (CVs= 22%), donde el individuo 1 de la población NA exhibió el valor mínimo para esta variable (99,11 mg VCE/100 g), mientras que el individuo 2 registró el valor mayor de actividad antioxidante (188,64 mg VCE/100 g; Fig. 46c). Para la población TA, se observó el valor mínimo en el individuo 1 (93,07 mg VCE/100 g) y el valor máximo en el individuo 8 (159,78 mg VCE/100 g; Fig. 46e). En la población TE (CV= 20%) el individuo 8 registró menor actividad antioxidante (126,50 mg VCE/100 g), mientras que el mayor valor fue observado en el individuo 7 (273,74 mg VCE/100 g; Fig. 46f). Una menor variabilidad en cuanto a la actividad antioxidante entre individuos se observó en la población CH (CV= 8%), con un valor mínimo de 74,96 mg VCE/100 g para el individuo 4 y un valor máximo de 95,58 mg VCE/100 g para el individuo 5 (Fig. 46a).

Tabla 18. Medidas de posición y dispersión particionadas por población de *V. moyanoi*.

Poblaciones	Mínimo	Máximo	Coefficientes de variación	n
CH	74,96	95,58	0,08	8
FO	46,99	108,83	0,32	8
NA	99,11	188,64	0,22	8
RL	5,82	85,27	0,72	8
TA	93,07	159,78	0,22	8
TE	126,50	273,74	0,20	8
ZE	82,62	173,32	0,24	7

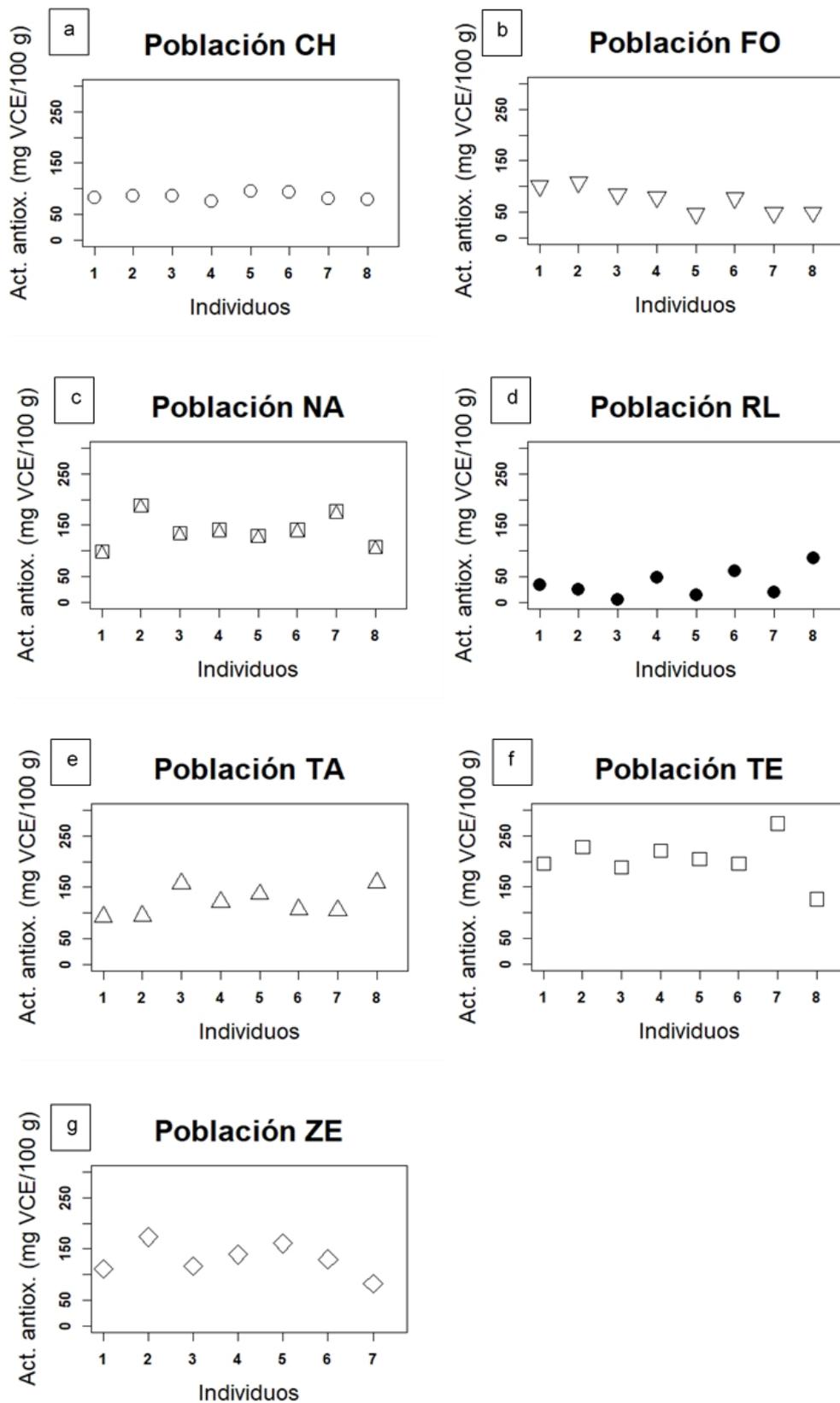


Figura 46. Variabilidad de la actividad antioxidante en las poblaciones de *V. moyanoi*: **CH**, Cerro Chalhuaco; **FO**, Lago Fontana; **NA**, Cerro Nahuelpan; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **TE**, Tecka y **ZE**, Monte Zeballos.

Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en las poblaciones de *Valeriana moyanoi*

La correlación entre variables “contenido de fenoles totales” y “actividad antioxidante” fue negativa y no significativa ($\rho=-0,24$; $p=0,08$) para todas las poblaciones.

Tampoco se observó correlación significativa entre el contenido fenólico y la altitud de los sitios visitados ($\rho=-0,54$; $p=0,24$).

Contenido de fenoles totales en *Valeriana philippiana*

Se registraron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales ($p < 0,05$; Anexo II) entre las poblaciones LG–TR y BA–AT (Tabla 8). El contenido de fenoles totales varió entre 3,39 y 9,64 mg GAE/g (Fig. 47).

Tabla 19. Resultados de la prueba de comparaciones de Tukey del contenido de fenoles entre poblaciones de *V. philippiana*. Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Poblaciones: **LG**, Lago Guacho; **TR**, Cerro Tronador; **CL**, Cerro Lindo; **RU**, Rucachoroi; **CO**, Copahue; **CC**, Cerro Cónico; **BA**, Cerro Bayo; **AT**, Cerro Atravesada.

Poblaciones	FT (mg GAE/g) Medias \pm desvío estándar	Grupos
LG	6,58 \pm 1,35	a
TR	6,46 \pm 1,50	a
CL	6,15 \pm 1,34	ab
RU	5,92 \pm 1,05	abc
CO	5,78 \pm 1,31	abc
CC	5,61 \pm 0,83	abc
BA	4,51 \pm 0,91	bc
AT	4,28 \pm 0,51	c

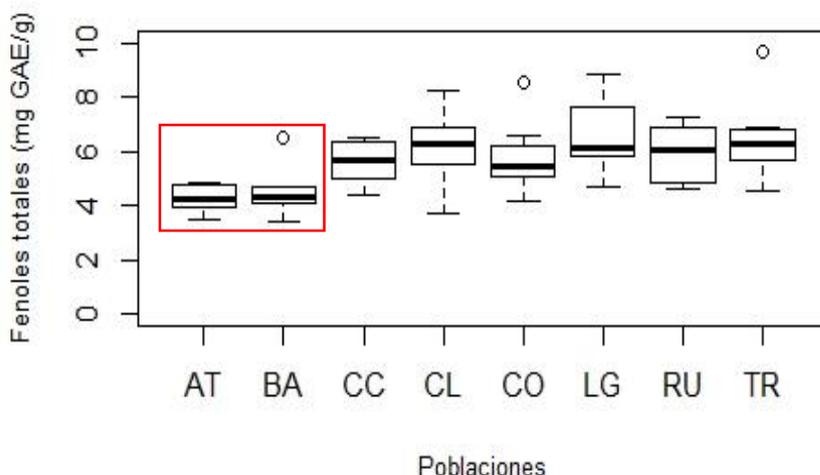


Figura 47. Contenido de fenoles totales en las poblaciones de *V. philippiana*. Se destacan en el rectángulo el par de poblaciones con menor contenido fenólico. Poblaciones: AT, Cerro Atravesada; BA, Cerro Bayo; CC, Cerro Cónico; CL, Cerro Lindo; CO, Copahue; LG, Lago Guacho; RU, Rucachoroi y TR, Cerro Tronador.

Variabilidad intra-poblacional del contenido de fenoles totales en *Valeriana philippiana*

La población menos variable fue AT, mientras que las poblaciones TR, CO y CL presentaron mayor variabilidad entre individuos en el contenido de fenoles (Tabla 20). La población AT (CV= 12%), registró un valor mínimo de 3,51 mg GAE/ g en el individuo 3 y un valor máximo de 4,84 mg GAE/g en el individuo 7 (Fig. 48a). Las poblaciones BA y LG presentaron el mismo coeficiente de variación (CV= 20%), el valor mínimo en la población BA fue de 3,39 mg GAE/g (individuo 5), mientras que el máximo valor fue de 6,52 mg GAE/g en el individuo 2 (Fig. 48b). En la población CC (CV= 15%) el contenido de fenoles totales registrado varió entre 4,42 y 6,52 mg GAE/g en los individuos 3 y 8 respectivamente (Fig. 48c). En la población CL (CV= 22%) los fenoles totales variaron entre 3,70 mg GAE/g y 8,20 mg GAE/g, valores observados en los individuos 7 y 8 respectivamente (Fig. 48d). En la población CO (CV= 23%) se observó el valor mínimo en el individuo 3 (4,20 mg GAE/g) y el valor máximo (8,54 mg GAE/g) en el individuo 2 (Fig. 48e). En cuanto a LG, el rango de valores fue entre 4,70 y 8,83 mg GAE/g, valores observados en los individuos 4 y 6 respectivamente (Fig. 48f). Además, se observó que la población RU (CV= 18%) presentó un valor mínimo de 4,63 mg GAE/g para el individuo 3 y un valor máximo de 7,27 mg GAE/g para el individuo 6 (Fig. 48g). Por último, en la población TR (CV= 23%) el menor contenido fenólico se registró en el individuo 5 con 4,56 mg GAE/g, mientras que el

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO II: Estudios químicos

individuo 6 presentó 9,64 mg GAE/g, valor máximo para esta variable en esta población (Fig. 48h).

Tabla 20. Medidas de posición y dispersión del contenido de fenoles totales en *V. philippiana*, particionadas por población.

Poblaciones	Varianza	Error estándar	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo	n
AT	0,26	0,18	0,12	3,51	4,84	8
BA	0,82	0,32	0,20	3,39	6,52	8
CC	0,69	0,29	0,15	4,42	6,52	8
CL	1,80	0,47	0,22	3,70	8,20	8
CO	1,72	0,46	0,23	4,20	8,54	8
LG	1,81	0,48	0,20	4,70	8,83	8
RU	1,11	0,37	0,18	4,63	7,27	8
TR	2,25	0,53	0,23	4,56	9,64	8

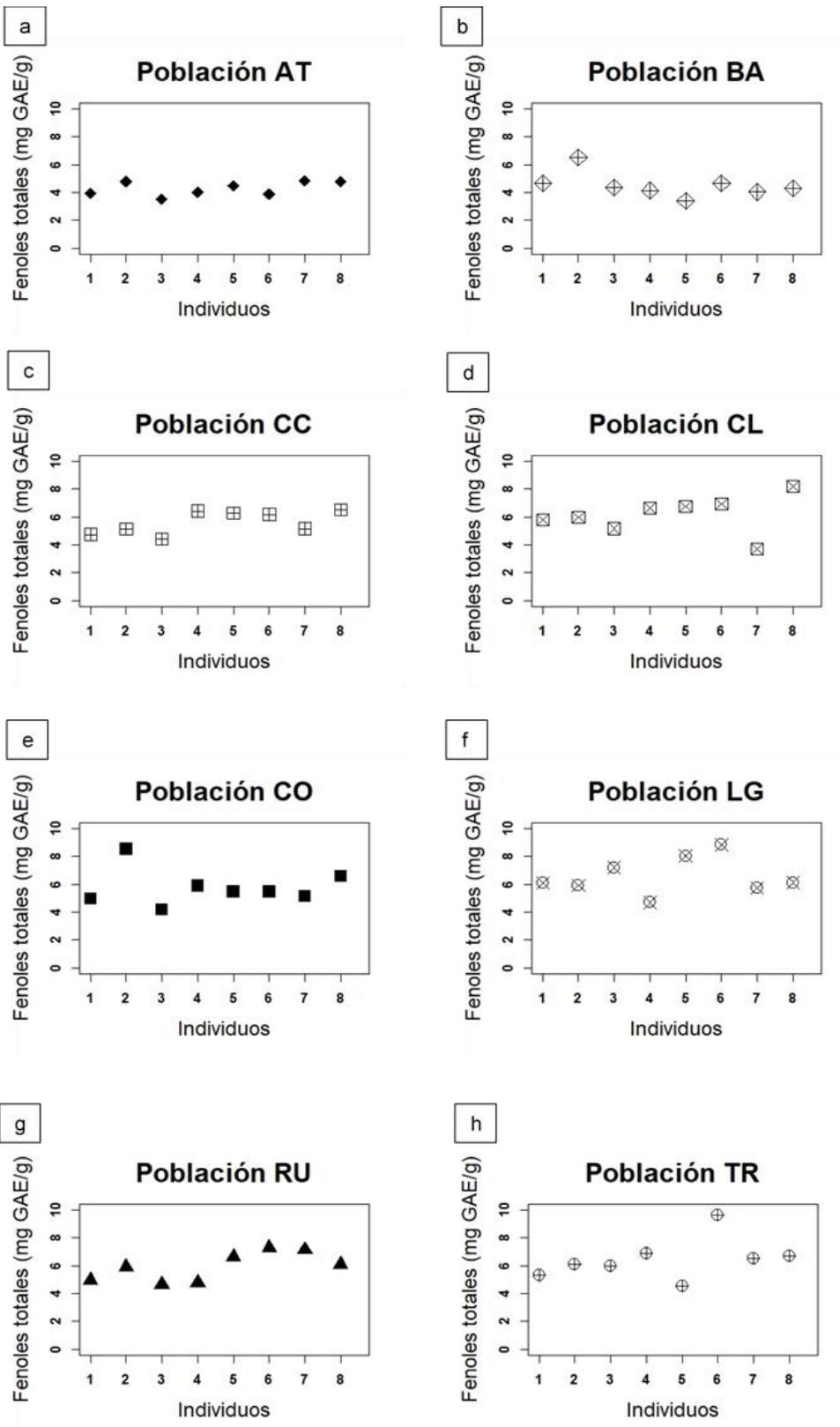


Figura 48. Contenido de fenoles totales en las poblaciones de *V. philippiana*: **AT**, Cerro Atravesada; **BA**, Cerro Bayo; **CC**, Cerro Cónico; **CL**, Cerro Lindo; **CO**, Copahue; **LG**, Laguna Guacho; **RU**, Rucachoroi; **TR**, Cerro Tronador.

Actividad antioxidante en *Valeriana philippiana*

Para esta especie la actividad antioxidante promedio registrada fue de 242,14 mg VCE/ 100 g, con un mínimo de 65,83 mg VCE/ 100 g y un máximo de 345,75 mg VCE/ 100 g.

Se observaron diferencias significativas entre poblaciones ($p < 0,001$; ver Anexo II), resultando CL, CC y LG las poblaciones que presentaron los valores mayores de actividad antioxidante. En las poblaciones BA y AT se observaron los valores promedios más bajos (Fig. 49, Tabla 21).

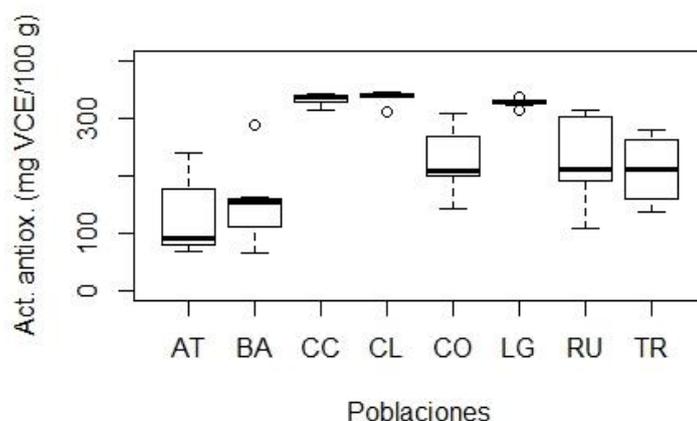


Figura 49. Actividad antioxidante registrada para las poblaciones de *V. philippiana*: **AT**, Cerro Atravesada; **BA**, Cerro Bayo; **CC**, Cerro Cónico; **CL**, Cerro Lindo; **CO**, Copahue; **LG**, Laguna Guacho; **RU**, Rucachoroi; **TR**, Cerro Tronador

Tabla 21. Tabla de comparaciones de la actividad antioxidante entre poblaciones de *V. philippiana*. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). VR= varianza de los rangos.

Poblaciones	VR	Media \pm desvío estándar	Grupos
CL	56,00	336,21 \pm 11,02	a
CC	53,62	333,37 \pm 9,54	a
LG	47,75	327,48 \pm 6,30	a
CO	26,62	225,29 \pm 54,13	b
RU	26,62	229,01 \pm 72,65	b
TR	24,50	210,20 \pm 54,75	b
BA	14,00	150,42 \pm 65,01	c
AT	10,87	125,09 \pm 64,58	c

Variabilidad de actividad antioxidante a nivel intra-poblacional en *Valeriana philippiana*

La actividad antioxidante fue variable en la mayoría de las poblaciones (Tabla 22). En la población AT (CV= 52%) se registró el menor valor de actividad antioxidante en el individuo 6 (68,19 mg VCE/100 g), mientras que el individuo 7 presentó 238,70 mg VCE/100 g, siendo el mayor valor registrado en esta población (Fig. 50a). Por el contrario, las poblaciones CC, CL y LG registraron muy poca variabilidad, con coeficientes de variación muy bajos de 2–3%. El valor mínimo para CC fue de 314,97 mg VCE/100 g registrado en el individuo 8 y 342,95 mg VCE/100 g en el individuo 1 (Fig. 50c), mientras que los valores de la población CL variaron entre 309,97 y 345,75 mg VCE/100 g en los individuos 6 y 7 respectivamente (Fig. 50d). Finalmente, en la población LG la capacidad antioxidante varió entre 314,97 mg VCE/100 g en el individuo 7 y 337,06 mg VCE/100 g en el individuo 6 (Fig. 50f).

Tabla 22. Medidas de dispersión de la actividad antioxidante particionadas por población de *V. philippiana*.

Poblaciones	Varianza	Error estándar	Coefficientes de variación	n
AT	4170,39	22,83	0,52	8
BA	4226,48	22,98	0,43	8
CC	91,06	3,37	0,03	8
CL	121,49	3,90	0,03	8
CO	2930,37	19,14	0,24	8
LG	39,65	2,23	0,02	8
RU	5278,72	25,69	0,32	8
TR	2997,26	19,36	0,26	8

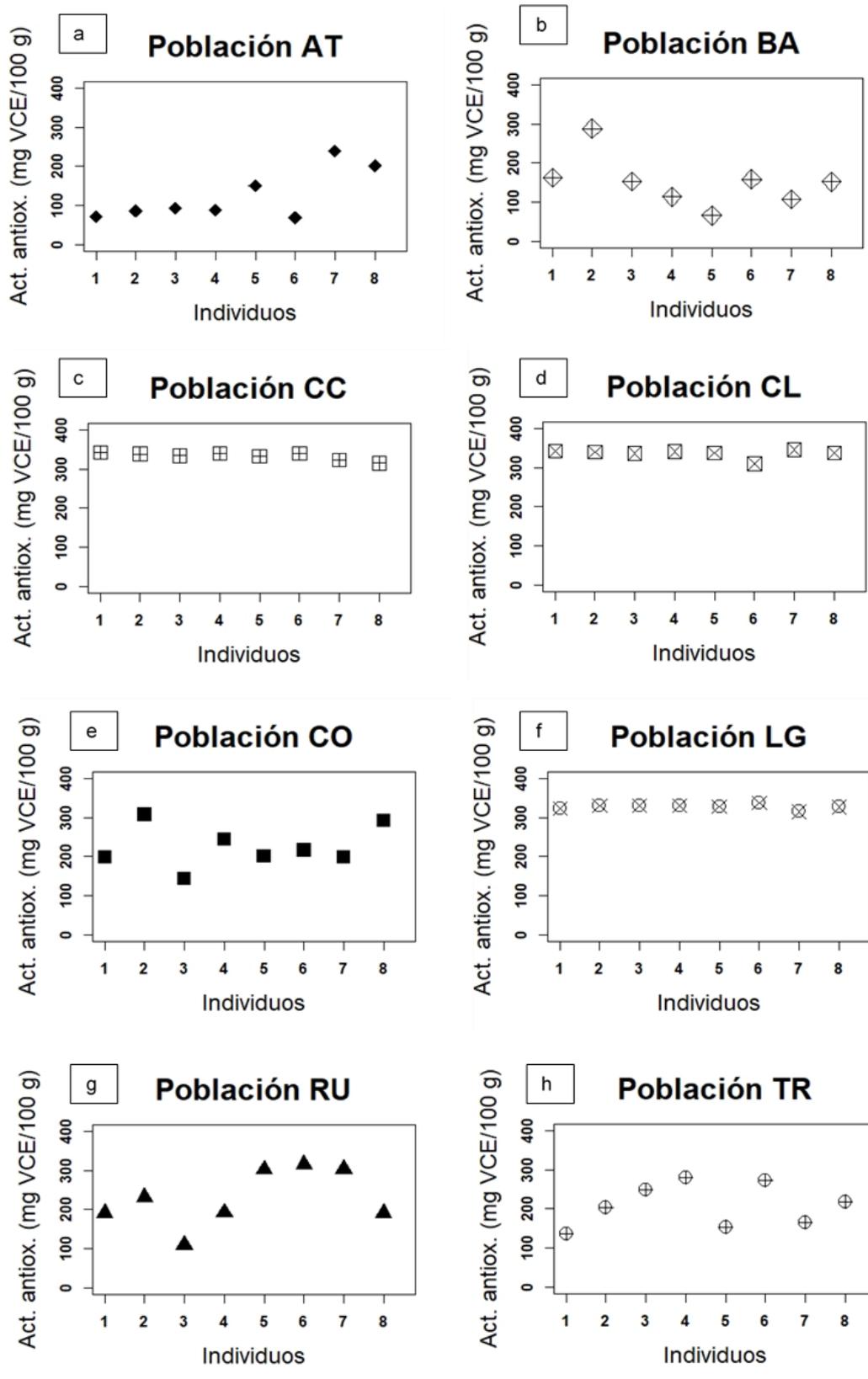


Figura 50. Actividad antioxidante en las poblaciones de *V. philippiana*: **AT**, Cerro Atravesada; **BA**, Cerro Bayo; **CC**, Cerro Cónico; **CL**, Cerro Lindo; **CO**, Copahue; **LG**, Laguna Guacho; **RU**, Rucachoroi; **TR**, Cerro Tronador.

Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en *Valeriana philippiana*

Teniendo en cuenta en el análisis a todas las poblaciones de *V. philippiana*, se observó correlación moderada entre las variables “fenoles totales” y “actividad antioxidante” (Fig. 51) con un coeficiente de Spearman de 0,56 ($p < 0,001$).

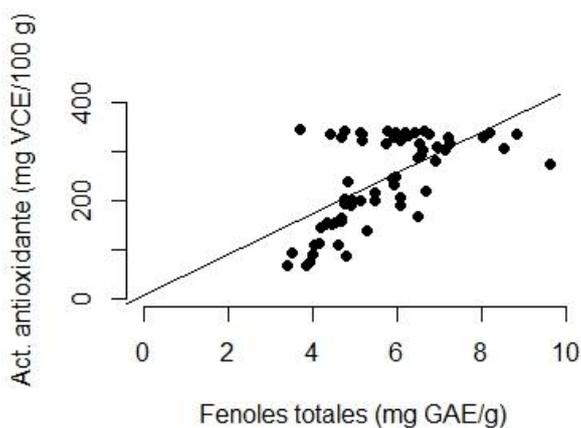


Figura 51. Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en *V. philippiana*.

Cuando se excluyeron del análisis a las poblaciones Cerro Lindo (CL), Cerro Cónico (CC) y Lago Guacho (LG), ubicadas al sur del paralelo 41, la correlación aumenta notablemente con un coeficiente de Spearman de 0,88 ($p < 0,001$; Fig. 52).

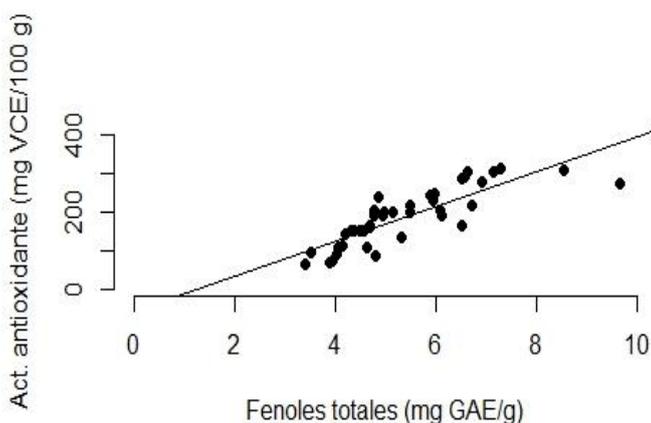


Figura 52. Correlación entre el contenido total de fenoles y la actividad antioxidante en *V. philippiana*, excluyendo del análisis a las poblaciones del sur (CL, CC y LG).

En cuanto a cada población en particular, se observó correlación significativa ($p < 0,001$) entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en las poblaciones del Cerro Bayo (BA) y Copahue (CO; ver Anexo II).

De acuerdo con la prueba de Spearman, el contenido de fenoles totales presente en estas poblaciones no presentó una correlación estadísticamente significativa con la altitud de los sitios de origen de las poblaciones ($\rho = -0,52$; $p = 0,19$).

Variabilidad fitoquímica según estadio fenológico en *Valeriana moyanoi*

Población Lago Fontana (FO):

En el estadio de floración se observó mayor contenido fenólico (0,98 mg GAE/g) que en el resto de estadios (Fig. 53), presentando diferencias significativas con el estadio vegetativo (0,60 mg GAE/g).

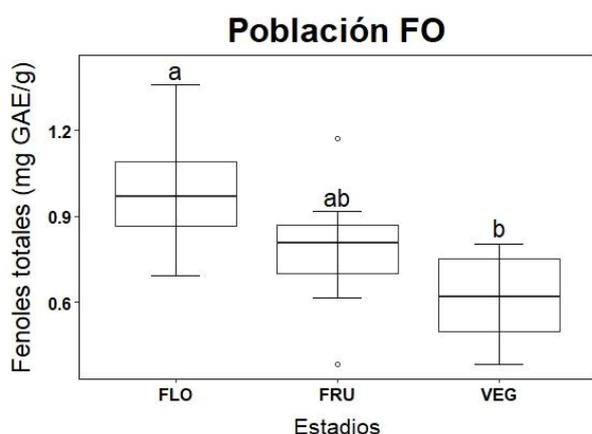


Figura 53. Población FO, Lago Fontana (*V. moyanoi*). Comparaciones del contenido de fenoles totales en los tres estadios analizados: **FLO**, floración; **FRU**, fructificación y **VEG**, vegetativo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

También se observaron diferencias significativas entre estadios fenológicos para la actividad antioxidante ($p < 0,05$). En el estadio vegetativo se observó una mayor actividad antioxidante (170,30 mg VCE/100 g) que los estadios de floración y fructificación. En cuanto a la variación entre individuos, en el estadio de fructificación se observó una mayor variabilidad (Fig. 54; Tabla 23). La prueba de Correlación de Spearman no registró correlación entre variables ($\rho = -0,18$; $p = 0,39$).

Tabla 23. Medidas de posición y dispersión de la actividad antioxidante según estadios, **VEG**, vegetativo; **FLO**, floración; **FRU**, fructificación.

Estadio	Mínimo	Media ± desvío estándar	Máximo	CV	n
FLO	82,32	96,31±12,74	117,66	0,13	8
FRU	46,99	74,78±24,19	108,83	0,32	8
VEG	141,22	170,30±23,46	206,01	0,14	8
Medidas generales	46,99	113,80±46,28	206,01	0,41	24

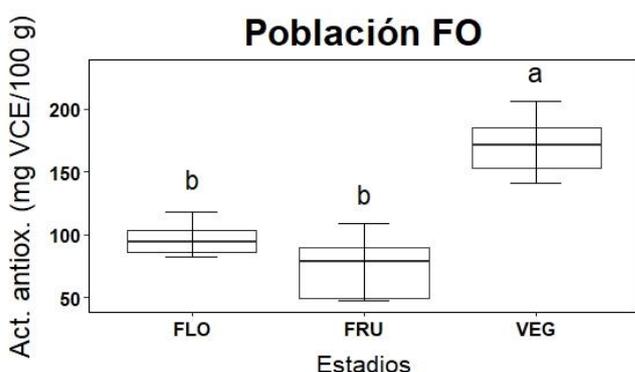


Figura 54. Población **FO**, Lago Fontana (*V. moyanoi*). Actividad antioxidante en los tres estadios analizados: **FLO**, floración; **FRU**, fructificación y **VEG**, vegetativo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Población Cerro Nahuelpan (NA):

En esta población no se observaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales ($p=0,42$) y la actividad antioxidante ($p=0,74$) entre los diferentes estadios fenológicos analizados.

El coeficiente de Correlación de Spearman fue de 0,72 ($p < 0,001$), indicando que el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante se encuentran correlacionadas (ver Anexo II).

Variabilidad fitoquímica según estadio fenológico en *Valeriana philippiana*Población Cerro Lindo (CL):

No se observaron diferencias significativas en el contenido de fenoles entre estadios fenológicos ($p=0,7$). En cambio, para la actividad antioxidante se registraron diferencias significativas ($p<0,05$), observándose en el estadio vegetativo mayor actividad antioxidante (valor promedio 350,70 mg VCE/100 g) que en el estadio de floración (valor medio de 336,21 mg VCE/100g; Fig. 55). La actividad antioxidante y contenido de fenoles totales no se encuentran correlacionadas en esta población ($\rho=-0,005$; $p=0,98$).

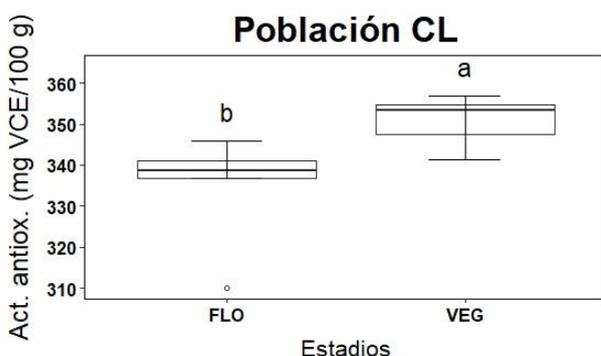


Figura 55. Actividad antioxidante en los estadios analizados **FLO**, floración y **VEG**, vegetativo para la población Cerro Lindo (CL). Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Población Cerro Tronador (TR)

No se registraron diferencias significativas en el contenido fenólico entre los dos estadios analizados ($p=0,20$). Por el contrario, en la actividad antioxidante se observaron diferencias significativas entre estadios ($p<0,05$). En el estadio vegetativo se observó mayor actividad antioxidante (valor promedio de 334,85 mg VCE/100 g) que en el estadio de floración (210,21 mg VCE/100 g; Fig. 56). No se registró correlación lineal entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante para la población del Cerro Tronador ($\rho=-0,69$; $p=0,003$).

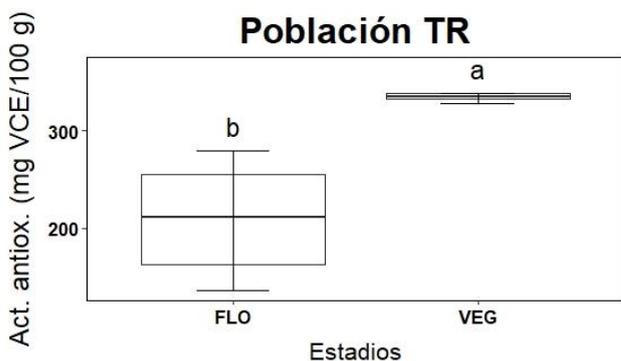


Figura 56. Actividad antioxidante en los estadios estudiados, para la población del Cerro Tronador (TR).

Discusión

A partir de los ensayos desarrollados en este capítulo se determinó que existe una gran variabilidad en el contenido fenólico y actividad antioxidante en *V. moyanoi* y *V. philippiana*, encontrándose diferencias significativas a nivel inter e intraespecífico. Los resultados coinciden con reportes previos sobre otras valerianas (Jugran et al., 2016; Nagahama et al., 2020).

Entre las especies estudiadas, *V. philippiana* presentó los ejemplares con mayor contenido de fenoles totales (3,39–9,64 mg GAE/g), seguida por *V. gaimanensis* (3,45 mg GAE/g) y *V. moyanoi* (0,20 a 2,26 mg GAE/g). Comparando con el contenido de fenoles totales de las valerianas de mayor uso medicinal en Patagonia, ciertos individuos de *V. philippiana* (LG) presentaron contenidos de fenoles similares a los reportados para *V. clarionifolia* (7,3–9,7 mg GAE/g), pero considerablemente menores a *V. carnososa* (5,6–16,2 mg GAE/g; (Nagahama et al., 2020). Asimismo, en Nagahama et al., (2016) *V. gaimanensis* se diferenció de *V. carnososa* mediante estudios morfológicos exhaustivos y con los resultados obtenidos en el presente estudio, también se diferencia de esta especie en cuanto al contenido de fenoles totales y actividad antioxidante (Guajardo et al., 2018; Nagahama et al., 2020). En el caso de *V. moyanoi*, el contenido de fenoles totales resultó relativamente bajo, sin embargo, los valores son similares a los citados para extractos etanólicos de *V. hardwickii* Wall. (0,15 mg GAE/g), especie de importancia medicinal que crece en el Himalaya (Yousuf et al., 2014).

Los compuestos fenólicos son fuertes antioxidantes que complementan a las vitaminas y enzimas antioxidantes, contribuyendo en la defensa contra el estrés oxidativo causado por el exceso de especies reactivas de oxígeno (Tsao, 2010). La correlación positiva entre el

contenido de fenoles de una muestra y su actividad antioxidante ha sido ampliamente reportada tanto para plantas comestibles (Sulaiman et al., 2011; Cantillano et al., 2012) como medicinales (Kiselova et al., 2006; Gastaldi, 2018; Ziarno et al., 2021). Sin embargo, también existen antecedentes que difieren de esta tendencia (Demiray et al., 2009), y en el caso de las poblaciones de *V. moyanoi* analizadas, la correlación entre estas variables fue baja, negativa y estadísticamente no significativa. Existen autores que mencionan que resulta difícil describir, con herramientas estadísticas, la relación entre el contenido de fenoles de una muestra y su actividad antioxidante, debido a que los extractos vegetales son mezclas complejas de compuestos químicos variados, con distinta polaridad y propiedades anti o pro-oxidantes diferentes (Kähkönen et al., 2001). Así, las propiedades antioxidantes de los compuestos individuales dentro de un grupo pueden variar notablemente, y los mismos niveles de fenoles no necesariamente se corresponden con las mismas respuestas antioxidantes (Parejo et al., 2002). Los resultados observados en *V. moyanoi* sugieren que los fenoles podrían no ser los únicos compuestos que contribuyen a la actividad antioxidante, teniendo en cuenta que existen otros compuestos con actividad antioxidante como el β -caroteno o tocoferoles, reportados con anterioridad en otra especie de *Valeriana* (Adel Pilerood & Prakash, 2014).

Teniendo en cuenta que la elección del solvente resulta un paso indispensable para optimizar la extracción de polifenoles, en investigaciones futuras sería interesante utilizar más de un solvente de extracción para comparar la actividad antioxidante potencial y registrar cuál se ajusta mejor a las especies bajo estudio y a los compuestos de interés. Por ejemplo, en *V. hardwickii*, los solventes acetona y hexano mostraron mejores resultados de extracción de antioxidantes frente al etanol y agua (Yousuf et al., 2014). En otras especies de hierbas estudiadas, el cloroformo resultó ser el solvente más efectivo para extraer fenoles totales (Salim et al., 2024). Por otro lado, el método DPPH puede subestimar la capacidad antioxidante, ya que sería menos sensible a los antioxidantes hidrofílicos que otros métodos, y su interacción con los compuestos antioxidantes dependería principalmente de la conformación estructural del compuesto antioxidante (Kaur & Kapoor, 2001). A pesar de sus limitaciones, el DPPH continúa siendo de gran utilidad en la búsqueda de nuevos antioxidantes en procedimientos de bioprospección (Parejo et al., 2002), sin embargo, en próximos ensayos sería deseable trabajar con más de un método de caracterización

antioxidante, así es posible realizar una evaluación más completa y adecuada de los extractos en cuestión.

Por otro lado, se ha reportado que la variabilidad de metabolitos en plantas es influenciada por factores bióticos y abióticos. Por ejemplo, el incremento de la radiación solar y las bajas temperaturas asociadas a sitios de mayor altitud influyen en los perfiles de metabolitos secundarios en plantas superiores, entre otras cosas, estimulando la producción del contenido de flavonoides, que son compuestos de naturaleza fenólica con función fotoprotectora (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). De las poblaciones de *V. moyanoi* analizadas, TA fue la de mayor altitud (1595 msnm); sin embargo, su valor medio de fenoles totales no resultó destacable. En las poblaciones NA (1376 msnm) y ZE (1470 msnm), los contenidos fenólicos registrados también fueron relativamente bajos. Por el contrario, las plantas provenientes de la población RL que crecen a una altitud de 748 msnm sobre afloramientos rocosos y en un sitio caracterizado por una mayor temperatura media y aridez, registraron los valores más altos de contenido fenólico. Estos resultados evidencian la falta de correlación entre el contenido fenólico y la altitud de los sitios de muestreo ($\rho = -0,54$; $p > 0,001$), lo que coincide con reportes previos para poblaciones de *V. jatamansi* en las que se estudió el impacto del rango altitudinal en el contenido de compuestos fitoquímicos, sin encontrar un patrón de relación definido (Jugran et al., 2016).

Para el caso de *V. philippiana*, los valores medios de fenoles totales registrados (3,39–9,64 mg GAE/g) fueron similares a los reportados en *V. officinalis* para extractos etanólicos de raíces (5,53 mg GAE/g; Ivanišová et al., 2020) y extractos acuosos (6,31 mg GAE/g (Bouayed et al., 2007)). Sin embargo, los valores obtenidos en esta tesis son menores a los valores registrados para extractos metanólicos de *V. officinalis* (14,2 mg GAE/g; Surveswaran et al., 2007). Si se tiene en cuenta a otras valerianas medicinales, los valores obtenidos para las valerianas patagónicas de este trabajo son considerablemente menores. Como ejemplo, se puede mencionar a los valores de extractos metanólicos de raíces de *V. jatamansi* (187,13 mg GAE/g; Thusoo et al., 2014), y extractos metanólicos (24,22 mg GAE/g) y acuosos (24,26 mg GAE/g) de partes aéreas de *V. italica* Lam. (Sarikurkcu et al., 2020). Algo importante a tener en cuenta en estas comparaciones es el tipo de solvente empleado, además del tejido vegetal utilizado (raíces, partes aéreas). En general, se ha observado que utilizando como solventes de extracción agua o metanol, se obtiene un mayor rendimiento en la extracción de polifenoles en valerianas (Thusoo et al., 2014; Li et al.,

2015), por lo que es esperable que los valores reportados sean mayores en extractos de esa naturaleza. Sin embargo, en este punto resulta interesante mencionar que en bibliografía los valores de contenido de fenoles totales varían notablemente en una misma especie de *Valeriana* utilizando el mismo método y a veces el mismo solvente de extracción. Por ejemplo, para extractos metanólicos de *V. jatamansi* utilizando el método de Folin-Ciocalteu, se reportan valores desde 6,83 mg GAE/g a 187,13 mg GAE/g (Bhatt et al., 2012; Thusoo et al., 2014; Jugran et al., 2016, 2020;). En el caso de *V. carnososa*, para extractos etanólicos el rango varía entre 3,56 mg GAE/g hasta 75,69 mg GA/100 g según distintos reportes bibliográficos (Guajardo et al., 2018; Marcucci et al., 2020; Nagahama et al., 2020). En algunos casos, estas diferencias en los valores reportados se explican por factores climáticos, respuestas a distintas condiciones de estrés, el momento de cosecha de las plantas o variabilidad genética.

A nivel intra-poblacional, en este trabajo se observó gran variabilidad en el contenido de fenoles totales de *V. moyanoi* y *V. philippiana*. En las poblaciones de *V. philippiana* ubicadas entre las latitudes 37°– 41°S, Copahue (CO), Rucachoroi (RU) Cerro Atravesada (AT), Cerro Bayo (BA), y Cerro Tronador (TR), el contenido de fenoles se correlacionó de manera positiva con la actividad antioxidante, siendo fuerte la correlación en las poblaciones de BA y CO, lo que sugiere en este caso que los compuestos fenólicos podrían ser los que contribuyen principalmente a la actividad antioxidante observada.

Por otra parte, las poblaciones de *V. philippiana* ubicadas al sur del paralelo 41°, incluyendo al Cerro Lindo (CL), Lago Guacho (LG) y Cerro Cónico (CC), se destacaron por presentar una mayor actividad antioxidante y baja variabilidad entre individuos. No obstante, no se registró correlación entre las variables, sugiriendo que los compuestos que aportaron mayoritariamente a la actividad antioxidante podrían no ser de naturaleza fenólica, o quizás podría tratarse de ciertos fenoles con alta actividad antioxidante en poca cantidad. De acuerdo con Kiselova et al. (2006), dado que la actividad antioxidante de las plantas no se encuentra limitada únicamente al contenido de polifenoles, es necesario realizar nuevos estudios para encontrar otros componentes que contribuyan a la actividad antioxidante de los extractos. Resulta difícil comparar los datos de la actividad antioxidante con otros estudios, debido principalmente, a las diferencias entre los métodos utilizados y unidades empleadas. Asimismo, en línea con lo mencionado anteriormente, teniendo en cuenta la complejidad de los procesos de oxidación-antioxidación, ningún método de prueba único es

capaz de proporcionar una imagen completa del perfil antioxidante de una muestra estudiada (Parejo et al., 2002).

En los extractos analizados de *V. philippiana* no se observó correlación significativa entre el contenido de fenoles y la altitud de los sitios de colecta ($\rho = -0,52$, $p = 0,19$), en concordancia con lo observado en *V. moyanoi* y en trabajos previos sobre valerianas medicinales (Nagahama et al., 2020).

La variabilidad del contenido de metabolitos fenólicos observada en *V. moyanoi* y *V. philippiana* podría ser consecuencia de la variabilidad genética, por las diferentes condiciones ambientales de los sitios donde habitan o factores tales como la edad de las plantas (sólo en el caso de *V. philippiana*, ya que *V. moyanoi* es bianual). Por ejemplo, teniendo en cuenta la dinámica de otros compuestos secundarios, algunos de los metabolitos presentes en el aceite esencial de *V. officinalis* como el valerenal, α -humuleno y ácido valerénico, incrementan su contenido en plantas más viejas (Letchamo et al., 2004). La variación observada entre las poblaciones naturales también era esperable teniendo en cuenta la amplia distribución geográfica de las especies estudiadas y la diversidad de ambientes en las que habitan.

Asimismo, se ha reportado que las variaciones estacionales tienen gran impacto en las constituciones químicas entre especies de valerianas (Wang et al., 2010). En este trabajo el análisis de la dinámica del contenido de fenoles totales en las cuatro poblaciones seleccionadas de *V. moyanoi* y *V. philippiana* mostró variabilidad entre estadios. En la mayoría de las poblaciones analizadas, la actividad antioxidante resultó mayor en los extractos de las plantas en estadio vegetativo. La población del Lago Fontana (FO) fue la única que se diferenció en el contenido fenólico entre los estadios analizados, siendo mayor de manera significativa en el estadio de floración, lo que coincide con resultados previos en *V. carnosa* (Guajardo et al., 2018). Las poblaciones FO (*V. moyanoi*), CL y TR (*V. philippiana*) presentaron mayor actividad antioxidante en el estadio vegetativo, así como también la ausencia de correlación entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante. Como se mencionó con anterioridad, otros compuestos antioxidantes de naturaleza no fenólica podrían estar presentes en los extractos, contribuyendo a la actividad antioxidante observada o quizás se trate de algunos fenoles de fuerte actividad antioxidante en baja cantidad. Por el contrario, en la población NA la correlación resultó moderada y

positiva, sugiriendo que los compuestos fenólicos podrían ser los responsables en gran medida de la actividad antioxidante observada en esta población.

De las tres especies analizadas, las plantas de *V. philippiana* en estadio vegetativo resultaron ser las más prometedoras en cuanto al contenido de fenoles y actividad antioxidante de sus extractos etanólicos. Si bien este trabajo es una primera mirada respecto a las variaciones de compuestos fenólicos en un gran número de poblaciones naturales de *V. moyanoi* y *V. philippiana*, para establecer diferencias más rigurosas, es preciso realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de los principales compuestos fenólicos individuales, involucrando técnicas de mayor complejidad como Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC, siglas en inglés), lo que podría aportar más información para ayudar a explicar las relaciones entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico de los extractos.

Conclusiones

En este capítulo se aportan aspectos novedosos sobre el contenido fenólico y actividad antioxidante en dos valerianas de alta montaña, *V. moyanoi* y *V. philippiana*, analizando su variabilidad a lo largo de la Patagonia argentina. Se reportan además los primeros datos fitoquímicos sobre *V. gaimanensis*, especie de la estepa patagónica árida, apoyando sus diferencias con *V. carnososa*, especie afín. El contenido de fenoles de las especies de alta montaña no se correlaciona con la altura a donde crecen las plantas y varía según el estadio fenológico de las mismas. Se destaca *V. philippiana* por su mayor contenido de fenoles y actividad antioxidante, similar al de las valerianas de mayor uso medicinal en Patagonia. Sin embargo, llama la atención que, aunque el contenido de fenoles en esta especie en general se correlaciona con la actividad antioxidante, las poblaciones más australes presentan la máxima actividad antioxidante, pero tienen gran variación en contenido de fenoles totales.

Los resultados obtenidos en este capítulo representan un puntapié inicial importante en la caracterización química de nuestros recursos genéticos nativos en general y de estas valerianas en particular. Asimismo, resultaría interesante poder continuar a futuro con el análisis de otros compuestos de interés medicinal en estas especies, e iniciar estudios de bioprospección en otras valerianas patagónicas.

Capítulo III: Estudios genéticos

Resumen

Se determinó la estructura poblacional y diversidad genética de siete poblaciones naturales de *V. moyanoi* y ocho de *V. philippiana*, con un set de 9 microsatélites de secuencia de repetición simple (EST-SSR) diseñados a partir de otra especie de *Valeriana* patagónica. Los productos obtenidos fueron visualizados en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Los valores de distancias genéticas de Nei entre poblaciones de *V. moyanoi* y *V. philippiana* fueron 0,15–0,66 y 0,04–0,60, respectivamente. Se observó estructuración genética en ambas especies, destacándose la población Rio Limay de *V. moyanoi* que podría tratarse de una variedad, subespecie o especie nueva de *Valeriana*. En el caso de *V. philippiana* la estructura poblacional mostró una correspondencia con la distribución geográfica de los sitios, asociada al gradiente latitudinal Norte–Sur, separándose la población de Cerro Lindo de las demás poblaciones. Los resultados de estos análisis permitieron identificar sitios importantes para la preservación de las especies estudiadas, teniendo en cuenta la presencia de alelos privados y diversidad genética de las poblaciones.

Introducción

La Patagonia argentina presenta gran heterogeneidad ambiental, lo que impulsaría cambios genéticos a diferentes escalas en las especies que habitan esta región (Anderson et al., 2010). Esta variabilidad ambiental, junto con procesos micro evolutivos han influenciado en la dinámica de la vegetación de los diferentes ecosistemas, observándose gradientes clinales asociados a factores como la precipitación y temperatura (Schwinning & Sala, 2004; Jump et al., 2008). En consecuencia, se generan presiones de selección diferenciales en las poblaciones naturales, promoviendo adaptaciones locales y variación genética (Whitford & Duval, 2002; Tyukmaeva et al., 2011). Las oscilaciones climáticas del Pleistoceno y los eventos orogénicos del Plioceno y Mioceno han dado forma a la diversidad y distribución actual de las especies en América del Sur (Turchetto-Zolet et al., 2013), modelando gran parte del rango de distribución de las especies vegetales patagónicas y la composición de la vegetación (Pastorino et al., 2009; Iglesias et al., 2012; Soliani et al., 2017). Durante el Pleistoceno, muchas especies se vieron obligadas a migrar hacia áreas más cálidas y adecuadas para su supervivencia. Algunas utilizaron refugios periglaciales y posteriormente, cuando el hielo retrocedió, fueron colonizando gradualmente otras regiones, como es el caso

de *Calceolaria polyrrhiza* Cav. (Calceolariaceae) (Cosacov et al., 2010). Sin embargo, algunos organismos lograron adaptarse y sobrevivir en Patagonia durante este período, tal es el caso de especies de *Hordeum* L. (Poaceae) que pudieron persistir en la región sin sufrir cambios genéticos importantes o restricciones genéticas (Jakob et al., 2009).

El estudio de la variación genética dentro de especies con áreas de distribución amplia, ofrece la oportunidad de observar la evolución en progreso y es el puntapié inicial para identificar y determinar la importancia relativa de los factores que promueven la diferenciación fenotípica (Chalcoff et al., 2008). En este contexto, dos especies interesantes como casos de estudio, son *V. moyanoi* y *V. philippiana*, que crecen en diferentes ambientes montañosos a lo largo de la Patagonia. *V. moyanoi* se distribuye en Argentina desde Neuquén a Santa Cruz, entre los 1000 y 2500 msnm (Correa, 1999). En Chile, el primer registro de esta especie se reportó en la región de Aysén, a los 1400 y 1600 msnm (Saldivia & Rojas, 2006).

Por otro lado, *V. philippiana* se distribuye en Argentina desde Neuquén a Chubut, entre los 1000 y 2400 msnm (Correa, 1999; Kutschker & Morrone, 2012). En el momento en que se inició esta tesis, la diversidad y estructura genética de las poblaciones naturales de estas valerianas era desconocida y esa información resulta fundamental, ya que puede indicar el potencial de adaptación local o especiación de estas plantas en el futuro (Bohonak, 1999). El mantenimiento de niveles altos de variación genética les proporciona a las poblaciones la potencialidad de adaptación frente a modificaciones en su ambiente, mientras que la pérdida de diversidad se relaciona con el aumento del riesgo de extinción (Jump et al., 2008; Kahilainen et al., 2014). Este tipo de estudios resulta un insumo importante para idear planes de conservación o seleccionar material en caso de explorar programas de mejoramiento, domesticación y cultivo de estas plantas.

Los marcadores moleculares son herramientas útiles para analizar los niveles de variación genética dentro de las poblaciones y el grado de diferenciación entre distintas poblaciones (Pérez De La Vega, 1997). Particularmente, los microsatélites o Secuencias de Repetición Simple (SSR, siglas en inglés) son secuencias repetidas en tándem de 1–4 (Scott et al., 2000); 1–6 (Zane et al., 2002) pares de bases, presentes en genomas procariotas y eucariotas, que al encontrarse ampliamente dispersos evidencian una extraordinaria conservación evolutiva (Hamada et al., 1982). A menudo son altamente polimórficos, debido a la variación en el

número de unidades repetidas de di-, tri- o tetra-nucleótidos, lo que resulta detectable mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, en inglés), utilizando pares de cebadores que flanquean cada SSR (Powell et al., 1996). Los microsatélites son útiles para medir la variación genética y el flujo génico en poblaciones naturales y resultan valiosos en casos forenses o análisis de especímenes de museo. Su estudio responde preguntas sobre éxito reproductivo, niveles de variación poblacional, estructuración genética e hibridación (Bruford & Wayne, 1993).

Existen dos categorías de SSR, las derivadas de secuencias genómicas aleatorias y los EST-SSR derivados de etiquetas de secuencia expresada (EST, siglas en inglés). El desarrollo de marcadores EST-SSR resulta más rentable, precisan menos tiempo para su procesamiento y son más informativos que otros métodos (Varshney et al., 2005).

En valerianas patagónicas se han llevado a cabo estudios de variabilidad genética en poblaciones de *V. carnososa* mediante polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (Amplified fragment length polymorphism, AFLP en inglés) observándose gran variabilidad intra e interpoblacional (Nagahama et al., en prep.). Además, se secuenció una biblioteca de ADNc de *V. clarionifolia*, especie filogenéticamente afín a *V. carnososa* (Bell et al., 2012) y se diseñaron marcadores EST-SSR cuya transferibilidad en otras representantes del género también ha sido evaluada (Manifesto et al., en prep.). La creación de esta herramienta permite identificar genotipos y evaluar la diversidad genética poblacional, además de que posibilitará en el mediano/largo plazo el estudio de genes que participan en las rutas metabólicas de síntesis de principios activos. En otras valerianas existen precedentes sobre la asociación entre marcadores moleculares y rasgos biológicos o agronómicos. Por ejemplo, se han realizado estudios en *V. jatamansi* con el fin de identificar los genes responsables de la actividad antioxidante y el contenido de ácido valerénico en esta especie medicinal (Jugran et al., 2013).

Finalmente, este capítulo se centra en *V. moyanoi* y *V. philippiana*, siendo los primeros estudios genéticos en estas especies. Se espera encontrar patrones de distribución de variabilidad genética poblacional en estas especies de amplia distribución, aportando al conocimiento de la variación morfológica y química que se tiene de estas valerianas.

Objetivo general:

Estudiar y caracterizar genéticamente mediante el empleo de marcadores moleculares (EST-SSR) diferentes poblaciones naturales de *Valeriana moyanoi* y *V. philippiana* en Patagonia.

Materiales y métodos

Todos los ensayos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Instituto de Recursos Biológicos, perteneciente al Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN) del INTA Castelar, con la colaboración de la Dra. María Marcela Maníffesto.

Material vegetal

El material de *V. moyanoi* y *V. philippiana* se obtuvo de 8 plantas por población, de un total de 15 poblaciones (7 de *V. moyanoi* y 8 de *V. philippiana*), cubriendo el área de distribución natural de las especies (Fig. 57). Se seleccionaron hojas en buen estado de cada individuo y se colocaron en bolsas herméticas de polietileno con sílica gel para su deshidratación y conservación. Posteriormente, las muestras fueron preservadas a -20°C en freezer hasta su uso. En total se analizaron 120 individuos, utilizando 8 SSR para *V. moyanoi* y 9 SSRs para *V. philippiana* (Tabla 24). Los primers fueron diseñados específicamente a partir de una especie de *Valeriana* patagónica (*V. clarionifolia*; Maníffesto et al., en prep.).

Tabla 24. Listado de los marcadores utilizados (✓) en base a su transferibilidad en especies de *Valeriana* (Maníffesto et al., s. f.). PICs: Polymorphism Information Content (Contenido de información de polimorfismo); s/d= sin dato; (×) no utilizado.

Locus	PICs	<i>V. moyanoi</i>	<i>V. philippiana</i>
1. Valcla9287	0,63	✓	✓
2. Valcla9255	0,77	✓	✓
3. Valcla4356	0,44	×	✓
4. Valcla4770	0,42	✓	✓
5. Valcla4879	0,65	✓	✓
6. Valcla7794	0,36	✓	✓
7. Valcla7841	0,40	✓	✓
8. Valcla4033	0,51	✓	✓
9. Valcla4800	s/d	✓	✓

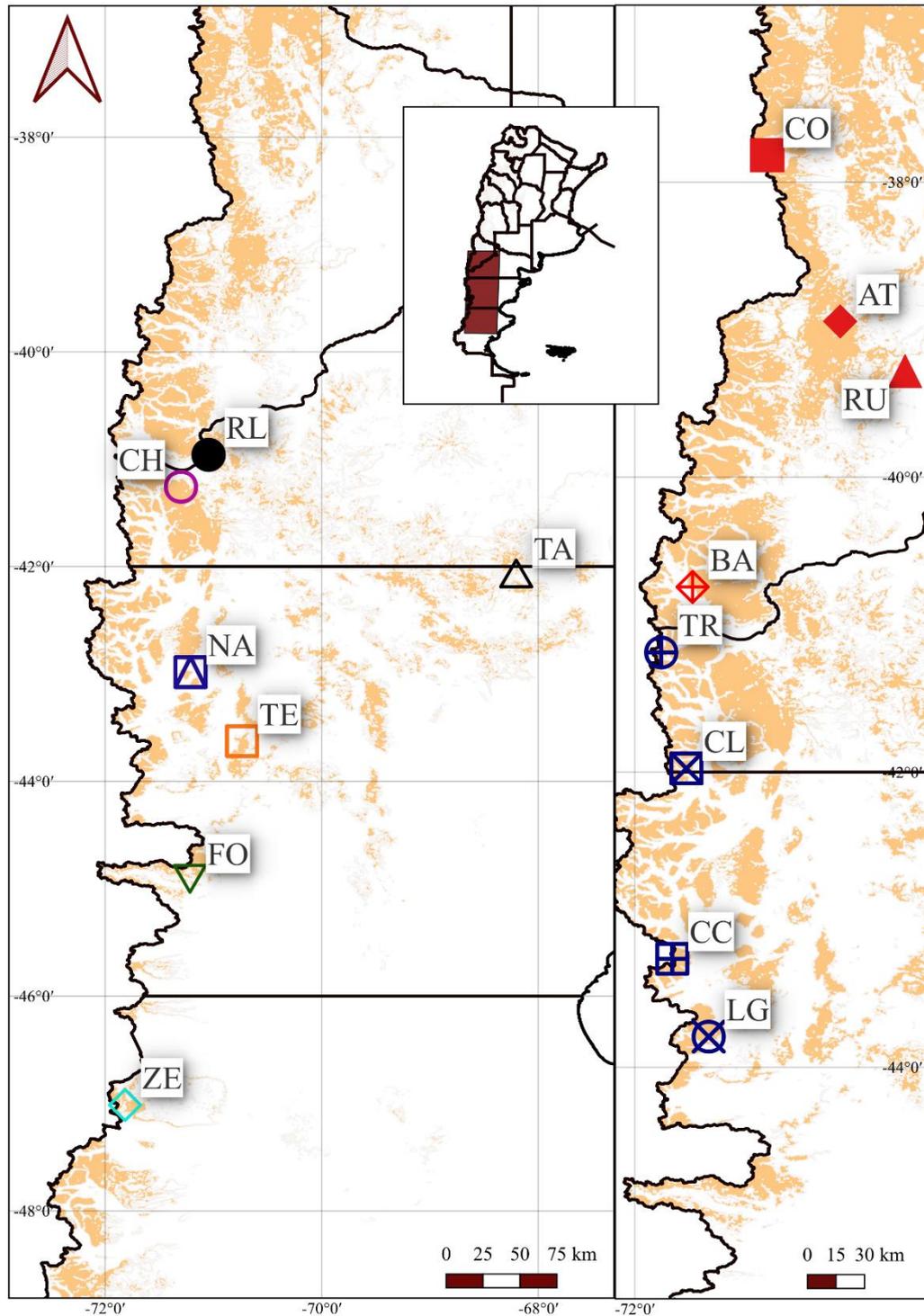


Figura 57. Ubicación de las poblaciones naturales incluidas en este capítulo. Izquierda: poblaciones de *V. moyanoi*, **RL**, Rio Limay; **CH**, Cerro Chahuaco; **TA**, Talagapa; **NA**, Cerro Nahuelpan; **TE**, Tecka; **FO**, Lago Fontana; **ZE**, Monte Zeballos. Derecha: se visualizan las poblaciones de *V. philippiana*, **CO**, Copahue; **AT**, Cerro Atravesada; **RU**, Rucachoroi; **BA**, Cerro Bayo; **TR**, Cerro Tronador; **CL**, Cerro Lindo; **CC**, Cerro Cónico; **LG**, Lago Guacho.

Protocolo de extracción de ADN

El procedimiento de extracción de ADN se llevó a cabo de acuerdo con Lucas et al. (2019) con ligeras modificaciones. En tubos de 2 ml se colocaron aproximadamente 100 mg de tejido vegetal, se añadieron perlas de carburo de tungsteno de 7 mm y se procesaron durante 1 minuto y 30 segundos en homogeneizador de tejidos TissueLyser II (QIAGEN).

En cada tubo se agregó 1 ml de buffer Sorbitol frío (4°C), 1% PVP y 2 µl de β-mercaptoetanol. Se mezcló en vórtex durante 5 segundos y se dejaron en cuba de hielo (4°C) durante 20 minutos. Posteriormente, se llevó a centrifuga a 10000 rpm y 4°C, por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 800 µl de la solución del buffer CTAB (1%), precalentado a 65°C, junto con 20 µl de Sarkosyl (20%). Los tubos se mezclaron en vortex y luego se incubaron a 65°C, agitando cada 10 min, durante 1 hora. Luego del período de incubación, se centrifugaron a 13000 rpm y 22°C, por 15 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml y se agregó 1 µl de proteasa K en cada uno. Se llevaron a baño caliente (37°C) durante 1 hora.

Posteriormente, en cada tubo se añadieron 600 µl de cloroformo y alcohol isoamilico (24:1), se centrifugaron nuevamente a 13000 rpm y 6°C, durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de 1,5 ml.

Precipitación, purificación y elución del ADN

En función del volumen del sobrenadante (700 µl), se agregó 10% de NaCl 5M (70 µl) y 70% de isopropanol (490 µl). Se homogeneizó manualmente y se dejó reposar durante toda la noche en freezer. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 14000 rpm y 16 °C, durante 20 minutos. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se agregó en cada tubo, 1 ml de alcohol etílico 70%, se agitó suavemente hasta que los pellets se desprendieron del fondo de los tubos. Se dejaron reposar durante 10 minutos y luego se llevaron a centrifuga a 14000 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado. Por último, se realizó un tercer lavado con 1 ml de alcohol absoluto y luego de desechar el sobrenadante los pellets fueron secados a temperatura ambiente. Una vez completamente secos, se re-suspendieron en 50 µl de agua ultrapura. Las muestras se preservaron a -20°C hasta su utilización.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Inicialmente, se cuantificó la concentración y pureza del ADN utilizando un espectrofotómetro Nanodrop[®], midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Luego se realizaron diluciones acuosas con una concentración final de ADN de 10 ng/μl y un volumen de 200 μl. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en una mezcla de reacción de 17 μl. Cada tubo de PCR contenía: 10 μM de cada cebador, H₂O; 1X buffer; 1,5 Mm MgCl₂; 0,200 μM dNTPs; 0,5U de taq-polimerasa, 30ng de ADN genómico y una gota de aceite mineral. La amplificación del ADN se realizó utilizando un programa del termociclador de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, temperatura de hibridación (dependiendo del cebador, entre 50 y 61 °C) por 30 s, 72 °C por 1 min, y un paso final de extensión a 72 °C por 10 min.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Preparación de vidrios

Se utilizaron dos vidrios de distinta longitud (“vidrios largos y vidrios cortos”) como soportes del gel de poliacrilamida. El vidrio más largo se trató con una mezcla que contenía: 950 μl de alcohol etílico 96%, 5 μl de acético glacial y 3 μl de binding. Posteriormente se lavó 3 veces con 1 ml de alcohol etílico. Los vidrios se montaron de manera tal, que la parte tratada del vidrio largo quede debajo del vidrio corto, separados por dos espaciadores. Ambos vidrios se sujetaron con broches.

Preparación del gel

El gel de poliacrilamida se preparó mezclando TBE 10X, urea, acrilamida y bis-acrilamida en 1 litro de agua ultra pura. Luego de filtrar la mezcla, se tomaron 55 ml y se agregaron 330 μl del iniciador APS y 33 μl de catalizador TMED (National Center for Biotechnology Information, 2022); ambos reactivos constituyen un sistema iniciador redox que promueve la polimerización de geles (Zhao et al., 2014). Inmediatamente, se procuró verter la mezcla entre los vidrios, evitando la formación de burbujas de aire. Se dejó polimerizar durante 2 horas, tomando como control de polimerización, el remanente de la solución de poliacrilamida.

Preparación de las muestras con el buffer de carga

En cada uno de los tubos con los productos de la PCR, se añadió 3 µl del buffer de carga, compuesto por colorantes (azul de bromofenol y cianol de xileno) y glicerol. Las muestras se desnaturalizaron en el termociclador a 95°C durante 3 minutos. Pasado ese tiempo se depositaron en cuba de hielo hasta su sembrado.

Corrida del gel

Los vidrios con los geles de poliacrilamida se ensamblaron en cubas de electroforesis vertical. Se añadieron los buffers de corrida, TBE 0,5X en la parte de arriba de la cuba y TBE 1X en la bandeja de abajo. Se conectaron los cables de los electrodos y se dejó correr durante unos minutos a un voltaje de 50W. Posteriormente se desenchufaron los cables y cuidadosamente se añadió un peine de 64 calles para proceder al sembrado. En cada calle se sembró 4,6 µl de las muestras y en una calle a la mitad del gel, se sembró 4,6 µl del marcador de peso molecular de 10 pb, que se utilizó para estimar el tamaño de las bandas obtenidas.

Luego de la corrida de los productos de PCR en el gel, se separaron con mucho cuidado los vidrios; el vidrio corto con el gel se fijó con una solución acuosa de ácido acético (10%) durante 20 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con agua ultrapura, durante 2 minutos cada vez.

Teñido del gel

Se pesó 1,5g de nitrato de plata y se colocó en un bidón con 1,5l de agua ultrapura. Se agitó bien la solución. En una nueva bandeja, se agregó la solución de plata junto con 2,25 ml de formaldehído, se sumergió el vidrio corto con el gel, se cubrió todo con una tapa negra y se dejó agitando durante 30 minutos.

Revelado del gel

Se preparó 1,5 litros de solución acuosa de carbonato de sodio en un bidón, se añadió 2,25 ml de formaldehído y 300 µl de tiosulfato, se agitaron durante unos minutos. El vidrio corto se pasó de la solución de plata a una bandeja con agua destilada durante 2 segundos y de allí se transfirió a la bandeja de revelado, que contenía la solución preparada con anterioridad. Se procedió al revelado del gel agitando constantemente la bandeja. Cuando comenzaron a aparecer las bandas, se transfirió a otra bandeja con la misma solución de carbonato. Una vez que las bandas se vieron más nítidamente y cuidando de que no reaccione demasiado, se

fijó nuevamente el gel en una bandeja con acético (10%), durante 2 minutos. Por último, se lavó el gel con agua durante 2 minutos más. El vidrio se dejó secando hasta el día siguiente.

Análisis estadístico

Se calcularon los parámetros de diversidad genética con el programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2006). Se estimó el número de alelos por locus (N_a), el porcentaje de loci polimórficos (P%), la Heterocigocidad esperada (H_e) y observada (H_o), las distancias genéticas entre pares de poblaciones de acuerdo a Nei (1987). Además, se realizaron Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) y Análisis Multivariados de Coordenadas Principales (PCoA) utilizando las matrices de distancias genéticas, para visualizar las similitudes y relaciones genéticas entre poblaciones. El método PCoA reduce las dimensiones ubicando a cada individuo en un espacio de 2 o 3 dimensiones, reteniendo la mayor información de la matriz de datos (Gruber et al. 2018). Para los Análisis Multivariados de Conglomerados se utilizaron las matrices alélicas y fueron realizados con el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2020).

Resultados

Comparación entre especies

De las dos especies de montaña, *V. moyanoi* tuvo en promedio un índice de Shannon más cercano a 1 que *V. philippiana*, lo que indicaría que sus poblaciones fueron más diversas desde un punto de vista genético, de acuerdo a los 8 marcadores moleculares con los que se trabajó en el caso de *V. moyanoi* y los 9 marcadores en el caso de *V. philippiana*.

Estructura poblacional y diversidad genética en *Valeriana moyanoi*

Se identificaron 47 variantes alélicas con un promedio de 2,75 alelos por locus, para los 8 loci analizados. El promedio del número efectivo de alelos fue de 2,02. Teniendo en cuenta el Índice de Shannon, la población con mayor diversidad genética fue CH, mientras que la menos diversa fue RL (Tabla 25). Además, se observaron diferencias genéticas entre poblaciones, con una varianza mayor dentro de las poblaciones (68%) que entre poblaciones (32%; Tabla 26). La población TA registró mayor cantidad de alelos privados para 3 de los 8 marcadores analizados (Tabla 27). Teniendo en cuenta las distancias genéticas, el par de

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO III: Estudios genéticos

poblaciones que resultaron de mayor similitud genética fueron NA y ZE. Otras poblaciones similares para los loci analizados, fueron ZE y FO. Las poblaciones que no tienen alelos en común para ningún locus fueron RL y TA (Tabla 28).

Tabla 25. Media y desvío estándar por cada población, respecto al número de individuos (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), índice de Shannon (I), Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), heterocigosidad esperada imparcial (uHe) e índice de fijación (F). Poblaciones: **TE**, Tecka; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **NA**, Cerro Nahuelpan; **CH**, Cerro Chalhuaco; **ZE**, Monte Zeballos y **FO**, Lago Fontana.

Población		N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
TE	Media	7,375	2,875	2,202	0,833	0,777	0,499	0,537	-0,535
	SE	0,324	0,441	0,274	0,126	0,100	0,056	0,061	0,111
RL	Media	7,000	1,875	1,600	0,477	0,536	0,320	0,346	-0,603
	SE	0,378	0,227	0,168	0,115	0,152	0,078	0,084	0,131
TA	Media	7,000	2,750	2,062	0,780	0,688	0,472	0,512	-0,435
	SE	0,627	0,313	0,236	0,108	0,100	0,057	0,060	0,116
NA	Media	6,750	3,000	2,124	0,790	0,566	0,460	0,500	-0,205
	SE	0,412	0,535	0,269	0,154	0,121	0,082	0,089	0,153
CH	Media	7,500	3,125	2,208	0,881	0,578	0,513	0,550	-0,160
	SE	0,500	0,398	0,213	0,113	0,118	0,053	0,056	0,201
ZE	Media	7,625	3,125	2,040	0,812	0,677	0,473	0,507	-0,333
	SE	0,263	0,350	0,183	0,108	0,139	0,060	0,064	0,172
FO	Media	6,875	2,500	1,966	0,702	0,620	0,439	0,479	-0,384
	SE	0,581	0,378	0,210	0,128	0,160	0,074	0,082	0,243
Total	Media	7,161	2,750	2,029	0,754	0,634	0,454	0,490	-0,374
	SE	0,169	0,149	0,084	0,047	0,047	0,025	0,027	0,062

Tabla 26. Resumen de los parámetros obtenidos en el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con 999 permutaciones.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Desviación cuadrática media	Varianza estimada	Varianza total	Probabilidad
Entre poblaciones	6	120,02	20,00	1,97	32%	0,001
Dentro de poblaciones	49	208,00	4,25	4,25	68%	
Total	55	328,02		6,22	100%	

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO III: Estudios genéticos

Tabla 27. Alelos privados por población. Poblaciones: **TA**, Talagapa; **NA**, Cerro Nahuelpan; **CH**, Cerro Chahuaco; **TE**, Tecka; **FO**, Lago Fontana y **ZE**, Monte Zeballos.

Población	N° de alelos	Locus	Alelo	Frecuencia
TA	5	4770	140	0,06
			147	0,31
		4879	198	0,06
		4800	151	0,18
			156	0,68
NA	4	4033	133	0,07
			141	0,07
		9255	137	0,06
			147	0,06
CH	3	4770	160	0,37
		9255	139	0,06
		4800	169	0,12
TE	3	4770	152	0,50
		4879	184	0,06
		4800	170	0,50
FO	2	9255	132	0,06
		4800	162	0,10
ZE	1	4033	137	0,06

Tabla 28. Matriz de distancias genéticas de Nei por pares de poblaciones. Se destacan en negrita los pares de poblaciones más semejantes y en sombreado gris, aquellas poblaciones más distantes entre sí. Poblaciones: **TE**, Tecka; **RL**, Rio Limay; **TA**, Talagapa; **NA**, Cerro Nahuelpan; **CH**, Cerro Chahuaco; **ZE**, Monte Zeballos; **FO**, Lago Fontana.

TE	RL	TA	NA	CH	ZE	FO	
0,000							TE
0,665	0,000						RL
0,266	0,673	0,000					TA
0,362	0,637	0,318	0,000				NA
0,274	0,601	0,238	0,072	0,000			CH
0,425	0,506	0,352	0,157	0,175	0,000		ZE
0,306	0,379	0,280	0,160	0,179	0,153	0,000	FO

Análisis multivariados con las poblaciones de *Valeriana moyanoi*

El PCoA basado en la matriz de distancias genéticas, reveló diferencias entre la población Rio Limay (RL) y el resto de poblaciones estudiadas. En el gráfico Ejes 1 vs 2 se observaron además dos grupos separados, pero en ambos se distribuyen individuos de las mismas poblaciones, sin encontrarse un patrón definido. En el gráfico Ejes 1 vs 3, los individuos de las poblaciones Tecka (TE) y Talagapa (TA) comparten ubicación espacial similar. Los individuos de las demás poblaciones se ubicaron en su mayoría por debajo del Eje 3, con los

individuos de las poblaciones Fontana (FO) y algunos de Monte Zeballos (ZE) a la izquierda del Eje 1, mientras que la mayoría de los individuos de la población Cerro Nahuelpan (NA) y Cerro Chalhucaco (CH) se visualizan a la derecha del Eje 1 (Fig. 58). Entre los tres primeros ejes se explicó el 41,86% de la variación total.

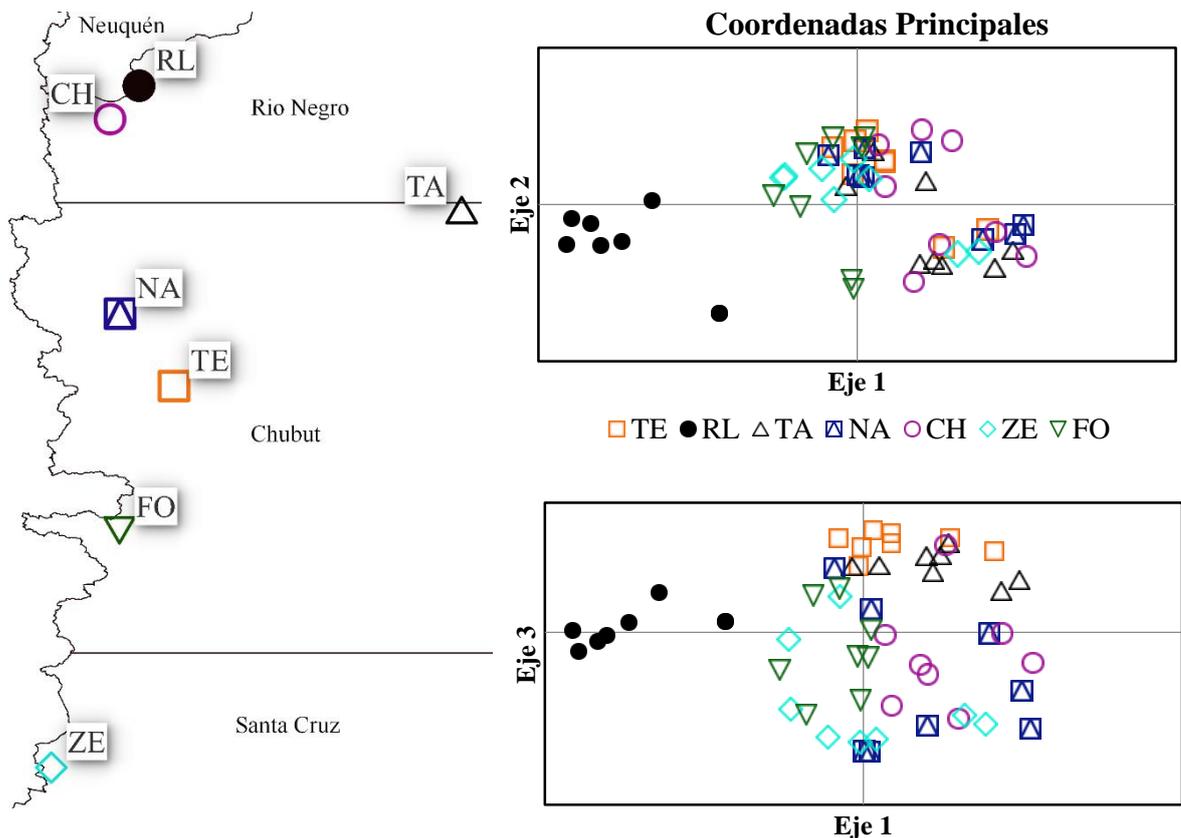


Figura 58. Izquierda, mapa indicando las poblaciones de *V. moyanoi*. Derecha, gráficos de dispersión del PCoA, ejes 1vs 2 y ejes 1vs 3. El eje 1 representó el 16,17%, el eje 2 el 13,27% y el eje 3 el 12,42% de la variación total. Poblaciones **TE**: Tecka; **RL**: Río Limay; **TA**: Talagapa; **NA**: Cerro Nahuelpan; **CH**: Cerro Chalhucaco; **ZE**: Monte Zeballos y **FO**: Lago Fontana.

Posteriormente, se repitió el análisis excluyendo a la población RL y el gráfico obtenido resultó similar al anterior, con individuos de una misma población en uno u otro grupo (Eje 1 vs Eje 2) o bastante dispersos como se observa en los Ejes 1 vs 3, a excepción de la mayoría de los individuos de la población TE (Fig. 59). Lo mismo sucedió con los resultados del Análisis de Conglomerados, donde se observó un cluster agrupando a las poblaciones CH y ZE con la menor distancia entre ellas (Fig. 60).

Coordenadas Principales

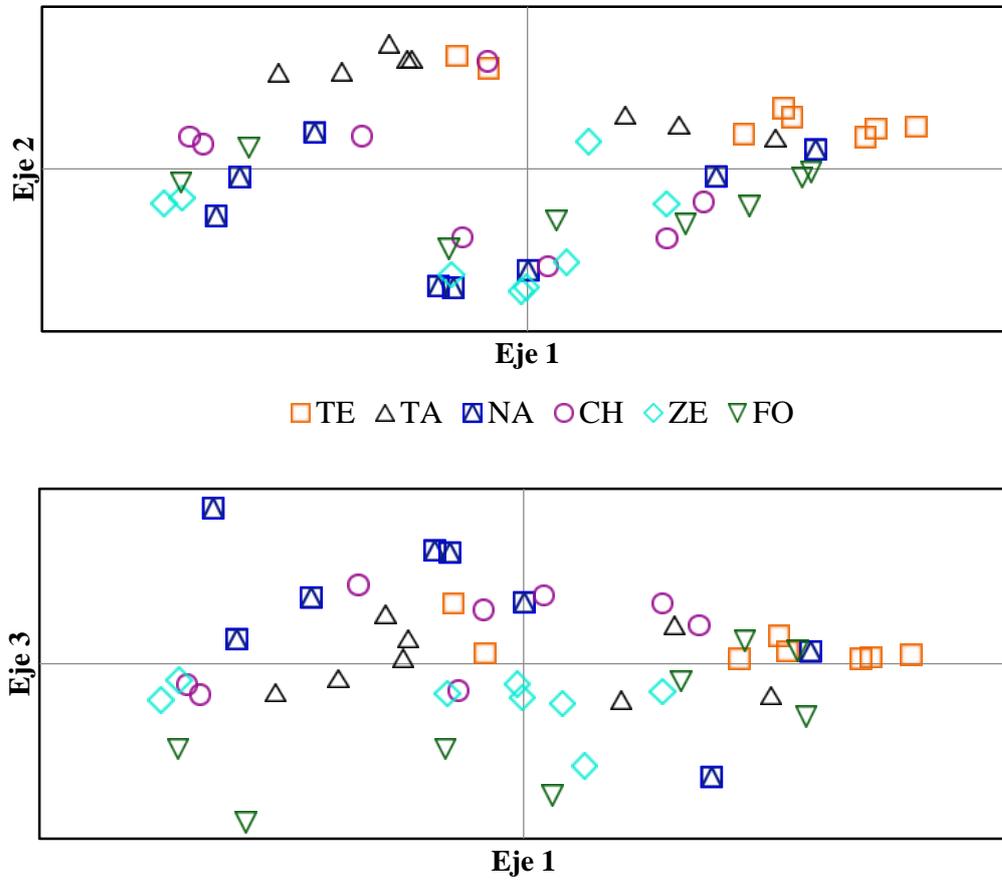


Figura 59. Gráficos de dispersión del PCoA con el que se explica el 41,21% de la variación total. El eje 1 representa el 15,66%, el eje 2 el 15,50% y el eje 3 el 10,05% de la variación. Poblaciones **TE**: Tecka; **TA**: Talagapa; **NA**: Cerro Nahuelpan; **CH**: Cerro Chalhuaco; **ZE**: Monte Zeballos y **FO**: Lago Fontana.

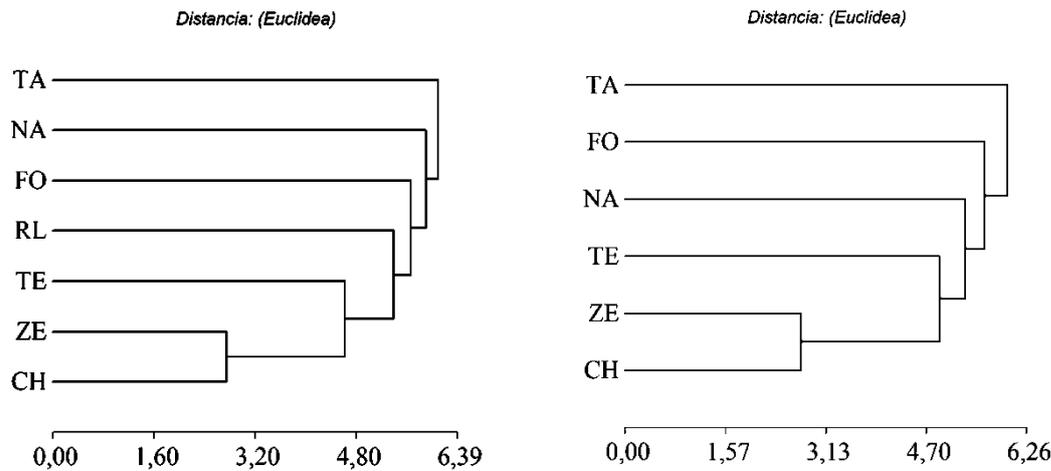


Figura 60. Izquierda, dendograma con todas las poblaciones analizadas. Derecha, dendograma sin la población RL. La correlación cofenética fue de 0,74 con la población RL y 0,78 quitando esta población del análisis. Poblaciones **TA**: Talagapa; **NA**: Cerro Nahuelpan; **FO**: Lago Fontana, **RL**: Rio Limay; **TE**: Tecka; **ZE**: Monte Zeballos y **CH**: Cerro Chalhuaco.

Estructura poblacional y diversidad genética en *Valeriana philippiana*

Se identificaron 37 variantes alélicas con un promedio de 1,98 alelos por locus, para los 9 loci analizados. El promedio del número efectivo de alelos fue de 1,68. Teniendo en cuenta el Índice de Shannon, la población con mayor diversidad genética fue la del Cerro Bayo (BA), mientras que las menos diversas fueron Rucachoroi (RU) y Copahue (CO, Tabla 29). Además, se observaron diferencias genéticas entre poblaciones, con una varianza molecular mayor dentro de cada población (70%) que entre poblaciones (30%, Tabla 30). La población con mayor cantidad de alelos privados fue la del Cerro Tronador (TR, Tabla 31). Las poblaciones que no tienen alelos en común para ningún locus fueron AT y TR, mientras que el par de poblaciones que resultaron genéticamente más parecidas fueron CO y CL (Tabla 32).

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO III: Estudios genéticos

Tabla 29. Media y desvío estándar respecto a la información de los loci para cada población. Número de individuos (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), índice de Shannon (I), Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), heterocigosidad esperada imparcial (uHe) e índice de fijación (F). Poblaciones: **AT**, Cerro Atravesada; **BA**, Cerro Bayo; **RU**, Rucachoroi; **CC**, Cerro Cónico, **LG**, Lago Guacho; **TR**, Cerro Tronador; **CO**, Copahue; **CL**, Cerro Lindo.

Población		N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
AT	Media	6,333	1,778	1,613	0,475	0,419	0,331	0,365	-0,235
	SE	0,687	0,147	0,144	0,097	0,152	0,070	0,078	0,281
BA	Media	6,889	2,556	1,817	0,643	0,491	0,381	0,410	-0,260
	SE	0,588	0,377	0,199	0,138	0,132	0,081	0,086	0,163
CO	Media	6,556	1,667	1,605	0,443	0,389	0,315	0,344	-0,222
	SE	0,475	0,167	0,157	0,112	0,162	0,080	0,087	0,327
RU	Media	5,556	1,778	1,583	0,440	0,415	0,300	0,332	-0,390
	SE	0,669	0,222	0,170	0,119	0,139	0,081	0,089	0,209
CC	Media	7,222	2,000	1,665	0,550	0,487	0,370	0,396	-0,240
	SE	0,364	0,167	0,116	0,077	0,140	0,055	0,058	0,252
LG	Media	7,444	2,111	1,794	0,578	0,553	0,377	0,405	-0,475
	SE	0,242	0,309	0,199	0,123	0,135	0,078	0,084	0,178
CL	Media	7,000	2,000	1,644	0,470	0,322	0,295	0,317	-0,144
	SE	0,553	0,373	0,215	0,155	0,133	0,094	0,101	0,254
TR	Media	6,889	2,000	1,754	0,557	0,587	0,372	0,405	-0,475
	SE	0,484	0,236	0,169	0,117	0,152	0,077	0,084	0,244
Total	Media	6,736	1,986	1,684	0,520	0,458	0,342	0,372	-0,310
	SE	0,189	0,094	0,059	0,041	0,049	0,026	0,029	0,081

Tabla 30. Resumen de los parámetros obtenidos en el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con 999 permutaciones.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Desviación cuadrática media	Varianza estimada	Varianza total	Probabilidad
Entre poblaciones	7	163,50	23,36	2,27	30%	0,001
Dentro de poblaciones	56	292,75	5,23	5,23	70%	
Total	63	456,25		7,5	100%	

Estudios químicos, genéticos y morfológicos de tres especies de *Valeriana*

CAPÍTULO III: Estudios genéticos

Tabla 31. Alelos privados por población. Poblaciones: **TR**, Cerro Tronador; **BA**, Cerro Bayo; **AT**, Cerro Atravesada; **CC**, Cerro Cónico.

Población	N° de alelos	Locus	Alelo	Frecuencia
TR	7	4770	150	0,08
			163	0,08
		9255	143	0,06
		4879	198	1,00
		4800	153	0,25
			155	0,12
			156	0,62
BA	4	4033	134	0,06
		4356	145	0,14
		9255	167	0,10
		4879	184	0,18
AT	2	4770	166	0,12
		9255	150	0,33
CC	1	4770	140	0,37

Tabla 32. Distancias genéticas de Nei por pares de poblaciones. Se destacan en negrita los pares de poblaciones más semejantes y en sombreado gris, aquellas poblaciones más distantes entre sí. Poblaciones: **AT**, Cerro Atravesada; **BA**, Cerro Bayo; **RU**, Rucachoroi; **CC**, Cerro Cónico; **LG**, Lago Guacho; **TR**, Cerro Tronador; **CO**, Copahue; **CL**, Cerro Lindo.

AT	BA	RU	CC	LG	TR	CO	CL	
0,000								AT
0,113	0,000							BA
0,056	0,196	0,000						RU
0,133	0,297	0,070	0,000					CC
0,272	0,244	0,346	0,269	0,000				LG
0,607	0,546	0,541	0,451	0,418	0,000			TR
0,156	0,284	0,133	0,089	0,207	0,464	0,000		CO
0,098	0,155	0,136	0,111	0,177	0,519	0,042	0,000	CL

Análisis multivariados con las poblaciones de *Valeriana philippiana*

Valeriana philippiana mostró una tendencia gradual de separación, no tan definida en los PCoA, a excepción de los individuos de la población CL que se separaron claramente del resto de poblaciones (Fig. 61). Por otro lado, en el AC se obtuvieron dos conglomerados mostrando una estructuración genética que separa a las poblaciones coincidiendo con el gradiente Norte-Sur de la ubicación geográfica, con una correlación cofenética de 0,63 (Fig. 62). Así, se observó la separación de las poblaciones de Patagonia norte (localizadas en la provincia de Neuquén) y las poblaciones ubicadas al sur del paralelo 41° (provincias de Río Negro y Chubut).

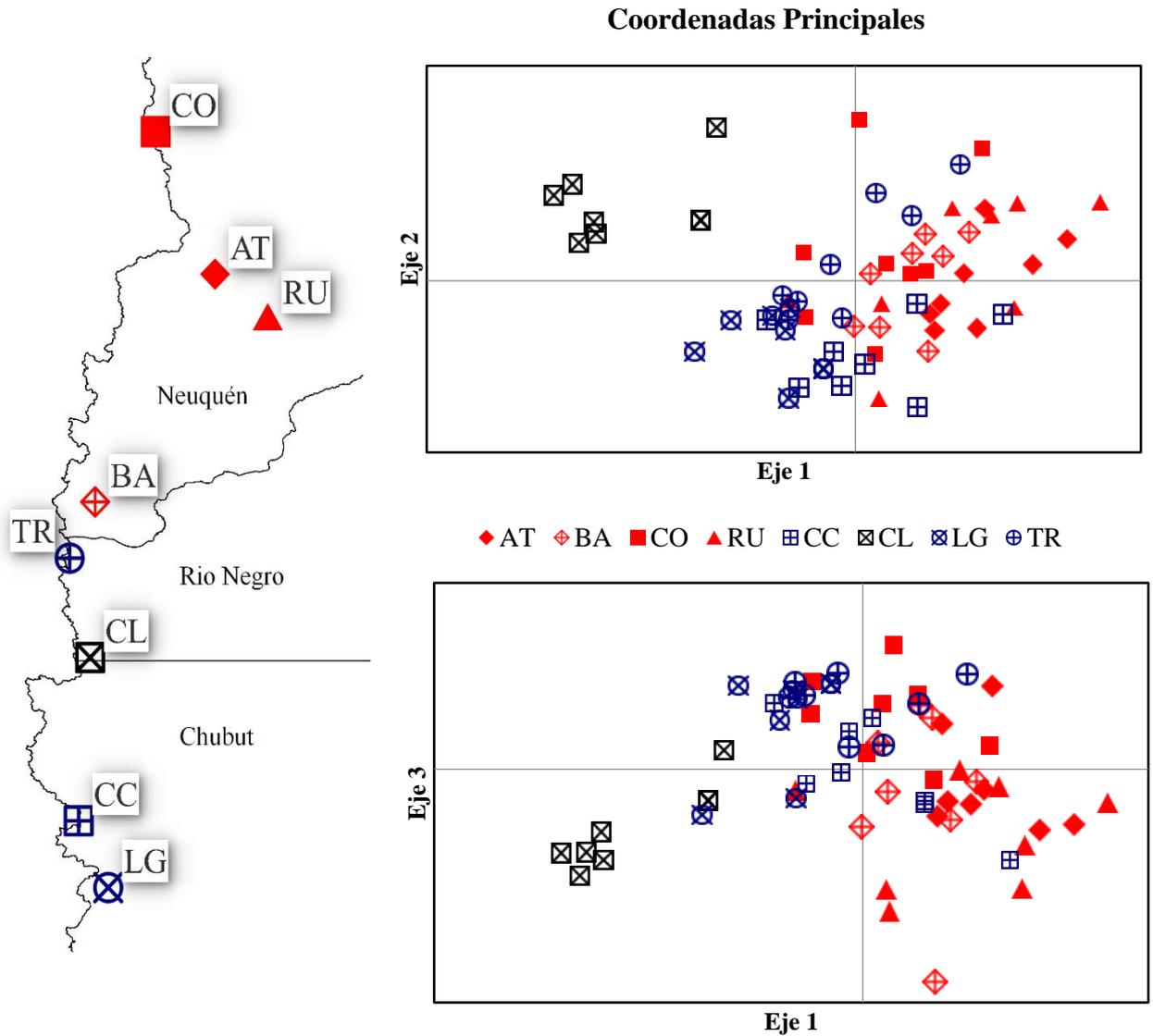


Figura 61. Izquierda, mapa con las poblaciones analizadas de *V. philippiana*. Derecha, gráficos de dispersión del PCoA entre los tres ejes se explicó el 41,02% de la variación total. El eje 1 representó el 19,89%, en el caso del eje 2 fue 11,14% y el eje 3 representó el 9,98% de la variación. Poblaciones norte (AT, Cerro Atravesada; BA, Cerro Bayo; CO, Copahue; RU, Rucachoroi) y poblaciones sur (CC, Cerro Cónico; CL, Cerro Lindo; LG, Lago Guacho; TR, Cerro Tronador).

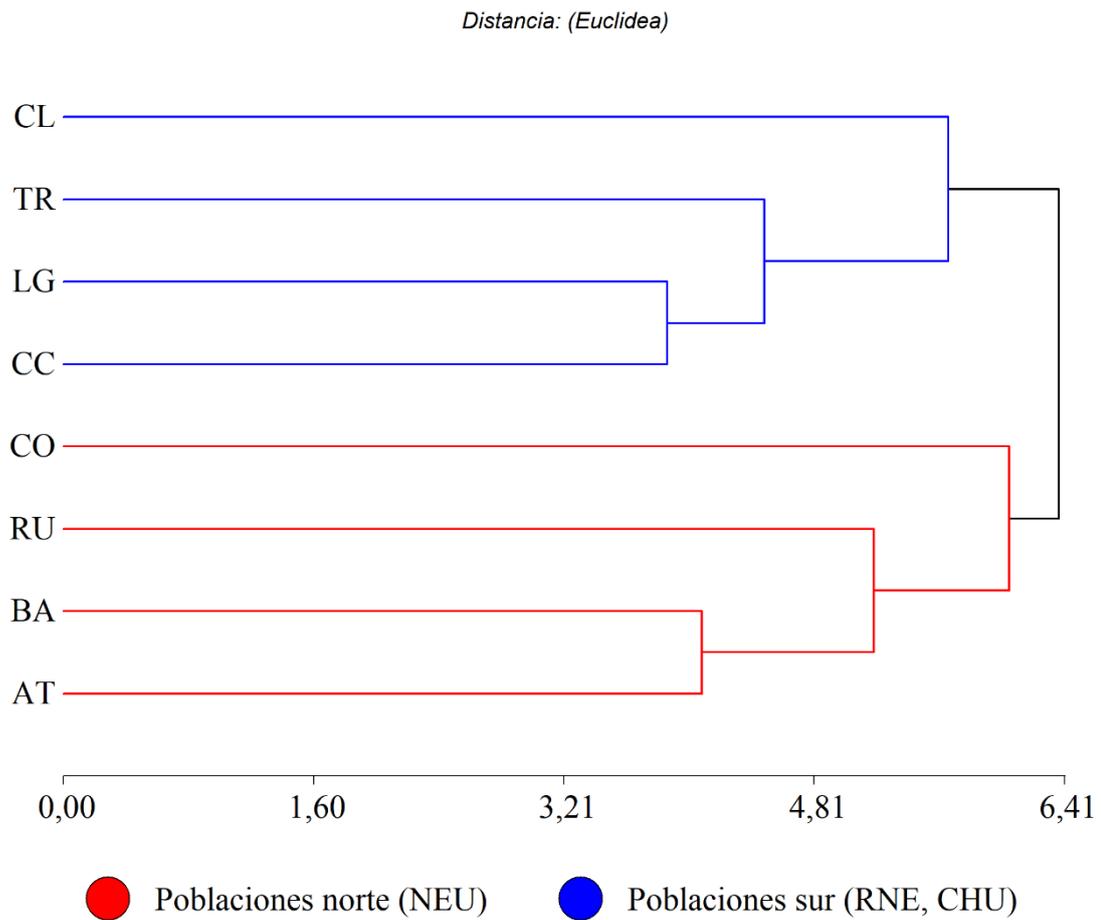


Figura 62. Dendrograma del AC donde se visualizan en distintos colores los conglomerados con las poblaciones norte (**CO**, Copahue; **RU**, Rucachoroi; **BA**, Cerro Bayo; **AT**, Cerro Atravesada) y las poblaciones sur (**CL**, Cerro Lindo; **TR**, Cerro Tronador; **LG**, Lago Guacho; **CC**, Cerro Cónico).

Discusión

Los análisis presentados sobre diversidad y estructura genética con marcadores microsatélites en poblaciones naturales de *V. moyanoi* y *V. philippiana*, constituyen los primeros estudios de este tipo en las especies mencionadas.

En este capítulo se pudo evaluar la transferencia de 9 y 8 marcadores microsatélites, determinar los niveles de diversidad genética en las poblaciones bajo estudio e identificar patrones de estructuración inter poblacional. Las tendencias encontradas en la distribución de la diversidad genética poblacional de *V. moyanoi* mostraron un nivel moderado de diversidad (valor medio $0,75 \pm 0,04$), destacándose las poblaciones CH (Rio Negro), TE (Chubut) y ZE (Santa Cruz) por poseer mayor variabilidad genética. Por otro lado, se registró una menor diversidad en la población de Rio Limay (RL), la cual se separó de manera clara del resto de poblaciones (PCoA). En otros estudios se han reportado que en poblaciones naturales pequeñas y aisladas, la transferencia de polen a nivel inter poblacional se puede ver afectada, resultando en una pérdida de diversidad genética (Faivre & Windus, 2002). Si bien las plantas de RL no se encuentran tan distantes de otros sitios (Ej. a unos 60 km de CH), habitan en un lugar poco usual para la especie, teniendo en cuenta la altitud y tipo de ambiente (afloramientos basálticos en los márgenes del río) en los que generalmente crece (Correa, 1999; Kutschker, 2011). Este resultado (separación de RL de las demás poblaciones de *V. moyanoi*) coincide con lo obtenido en las caracterizaciones morfológicas y químicas (ver Capítulos I y II), respaldando la posibilidad de encontrarnos frente a un ecotipo particular de *V. moyanoi*, clasificable a nivel de variedad botánica o subespecie de *Valeriana*.

En el caso de *V. philippiana*, la diversidad genética media ($0,52 \pm 0,04$) fue menor que en *V. moyanoi*, presentando menor diversidad principalmente en las poblaciones del norte neuquino (RU, CO y AT). Estos resultados coincidirían con áreas de baja diversidad genética identificadas para plantas y vertebrados de Patagonia (Andes del norte de Patagonia, 37° S– 43° S), según Sércic et al. (2011). Los resultados obtenidos sugieren que la estructuración de la diversidad genética actual de *V. philippiana* podría ser producto de diferentes procesos geológicos históricos (Ej. glaciaciones), debido a que se observó un patrón latitudinal de variación genética, diferenciándose las poblaciones del norte de Neuquén respecto a las de Rio Negro y Chubut (Fig. 62). Para Patagonia se ha hipotetizado sobre la potencial existencia de barreras filogeográficas (discontinuidades en la distribución geográfica de linajes dentro

de una especie), que se encontrarían entre las poblaciones de *V. philippiana* del norte neuquino y las ubicadas al sur (Rio Negro y Chubut) (Sérsic et al., 2011). Una estructuración similar se ha reportado en otras especies como *Nothofagus antarctica* (G. Forst.) Oerst., aunque en esta especie forestal se encontraron altos niveles de variación genética en las poblaciones al norte del paralelo 41°S (Pastorino et al., 2009). Esta región particular ha sido propuesta como un refugio glaciario para otras especies como *N. obliqua* (Mirb.) Oerst. y *N. alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst., que habrían colonizado latitudes mayores (hacia el sur), una vez que se retiraron los grandes hielos (Villagran, 1991; Gallo et al., 2006; Azpilicueta et al., 2009). En cuanto a valerianas, entre las latitudes 34° y 37° S de nuestro continente, se sugirió un centro secundario de diversificación del género debido al aislamiento prolongado de las especies, por el levantamiento de los Andes (Kutschker & Morrone, 2012). De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización genética del presente estudio, se podría sugerir que con el paso del tiempo las poblaciones de CO, RU y AT tenderían a desaparecer, debido a que sus potenciales nichos ecológicos se estarían reduciendo en superficie debido al calentamiento global (no encontrarían sitios/refugios a mayor altitud). Esta circunscripción en las cumbres de las montañas provoca que las poblaciones se aislen aún más y su baja variación genética observada actualmente podría ser producto de depresión por endogamia.

En este contexto, en términos de conservación *in situ* se identificaron importantes sitios de preservación de genotipos. Teniendo en cuenta la mayor diversidad genética, proponemos el Cerro Chalhuaco (Rio Negro) para *V. moyanoi*, y la población del Cerro Bayo (Neuquén) para *V. philippiana*. Si se tiene en cuenta la pérdida de información genética por endogamia y/o reducción de nicho ecológico, sugerimos las poblaciones de RL (*V. moyanoi*) y las poblaciones del norte de Neuquén (*V. philippiana*) como las más vulnerables. Por otra parte, la evaluación de los alelos únicos también contribuye a la conservación de genotipos particulares. En general, los alelos únicos son característicos de poblaciones localizadas en el borde del rango de distribución de una especie (Bruederle, 1999). Los sitios periféricos generalmente ofrecen condiciones poco óptimas para especies de amplia distribución, que tienden a formar poblaciones progresivamente más pequeñas, propensas al aislamiento y extinción (Eckert et al., 2008). En el caso de *V. moyanoi*, una mayor proporción de alelos privados fue registrada en la población Talagapa, en una notable formación geomorfológica ubicada en el límite Este de distribución de la especie. Esta población se encuentra en una región que ha sido propuesta como posible refugio o “área de persistencia *in situ*”, donde

algunas especies permanecieron y sobrevivieron durante períodos de cambios ambientales o eventos geológicos en el pasado (Sérsic et al., 2011). Mientras que, en *V. philippiana* se registraron más alelos privados en la población del Cerro Tronador, localizada en una zona intermedia entre la región Norte y Sur de su área de distribución.

En relación a la exploración del cultivo de estas plantas, la población CH (*V. moyanoi*) es una población candidata para incluir en futuros programas de mejoramiento genético y domesticación, ya que resulta genéticamente más diversa que el resto de poblaciones. En el caso de *V. philippiana*, se propone delimitar dos zonas genéticas para trabajar en la domesticación de la especie de acuerdo a los resultados obtenidos. Entre las poblaciones del norte se propone a BA (Neuquén) principalmente por poseer mayor diversidad genética y dentro de las poblaciones sur se sugiere a la población de LG (Chubut), por la misma razón.

Conclusiones

Este estudio proporcionó información valiosa sobre la variabilidad y estructura genética de poblaciones naturales de *V. moyanoi* y *V. philippiana*, dos especies que crecen en sitios montañosos de Patagonia. Se proponen sitios prioritarios para la conservación de estas especies y se identifican aquellas poblaciones con alelos únicos o baja variabilidad por probable endogamia y/o reducción de nicho ecológico. Asimismo, se plantea la necesidad de profundizar en el estudio de la población de *V. moyanoi* del Rio Limay, proponiendo la existencia de un nuevo ecotipo de *V. moyanoi* o una nueva especie o subespecie de *Valeriana* patagónica.

Conclusiones generales

Las regiones montañosas presentan condiciones de suelo y topografía discontinuas que promueven la diferenciación de las poblaciones vegetales de las especies que las habitan, resultando muchas veces en endemismos locales o adaptaciones particulares (Kruckeberg & Rabinowitz, 1985). La Patagonia argentina es una vasta región con ambientes diversos y una historia geológica característica que, junto con procesos micro evolutivos, han modelado la distribución vegetal y el paisaje actual (Pastorino et al., 2009; Tyukmaeva et al., 2011; Iglesias et al., 2012). Esa variabilidad ambiental no sólo influye en la estructuración genética y variación morfológica de las especies y sus poblaciones, sino que además tiene incidencia en la composición química de las plantas que crecen en esta región (Muñoz-Concha et al., 2004; Vogel et al., 2005).

Teniendo en cuenta que el conocimiento sobre plantas medicinales que crecen en el territorio argentino es escaso (Alonso & Desmarchelier, 2014) resulta indispensable ampliar los estudios fitoquímicos sobre plantas nativas patagónicas, evaluando sus potenciales propiedades medicinales.

Para la mayoría de las especies de *Valeriana* de Patagonia, es poco lo que se conoce respecto a su ecología, etnobotánica, fitoquímica y aspectos agronómicos (Kutschker, 2009; Marcucci et al., 2020; Villarroel et al., 2022). A partir de los resultados obtenidos, se pudo comprobar que determinadas poblaciones de *V. moyanoi* y *V. philippiana* provenientes de diferentes ambientes (no se contempla a *V. gaimanensis* por registrarse sólo una población), exhiben diferencias en su morfología, composición química (fenoles totales y actividad antioxidante) y estructuración genética. Esta información es importante ya que permitió distinguir poblaciones con morfologías más adecuadas para la provisión de materia prima de uso medicinal y su cultivo (mayor tamaño de sus órganos subterráneos y frutos). También se identificaron las poblaciones que registraron mayor actividad antioxidante, y el momento fenológico en que esta actividad es más alta. Asimismo, se determinó la variabilidad genética entre poblaciones y entre especies, lo que resulta importante para el desarrollo de futuros planes de conservación y domesticación.

Estudios morfológicos

El estudio morfológico exhaustivo de estas plantas permitió identificar poblaciones particulares de *V. moyanoi*, como por ejemplo la población Cerro Chalhuaco (CH), cuyas plantas se distinguen del resto principalmente por presentar mayor desarrollo radical y aquenios más grandes. Poseer raíces más grandes en *Valeriana* está relacionado a la producción de una mayor cantidad de materia prima con potencial medicinal. En cuanto al mayor tamaño de los aquenios, se encuentra directamente relacionado con la cantidad de reservas disponibles en las semillas y por lo tanto, será muy importante en los primeros estadios de desarrollo (Joseau et al., 2013), en caso de intentarse el cultivo de la especie. Para el caso de *V. philippiana*, las poblaciones localizadas en la provincia de Neuquén se diferenciaron morfológicamente de las poblaciones del sur (principalmente de Chubut), lo que podría indicar un posible aislamiento entre estos dos grupos de poblaciones en el pasado, probablemente debido a numerosos periodos glaciales que pudieron haber influido en la historia evolutiva de esta especie. Los órganos subterráneos de las plantas de Copahue (CO) y Rucachoroi (RU), en la provincia de Neuquén, presentaron mayor diámetro, lo que sería un aspecto importante al momento de seleccionar posibles fuentes de materia prima de *V. philippiana* con fines medicinales.

Además, para *V. moyanoi* se pudieron registrar ciertas poblaciones morfológicamente diferentes del resto, que se proponen como ecotipos novedosos. Si bien esto no era un objetivo específico de la Tesis, resulta un hallazgo importante que contribuye al conocimiento de diversidad de la flora patagónica. Así, se identificaron dos poblaciones particulares con morfotipos de flores amarillas, diferentes entre sí: Rio Limay (RL), en Neuquén, y Cerro Nahuelpan (NA), en Chubut. Las plantas de RL resultaron diferentes desde lo morfológico (plantas más altas, frutos pequeños, múltiples brácteas imbricadas), que coincide con diferencias en lo químico (mayor contenido fenólico) y genético, diferenciándose de manera significativa del resto de las poblaciones naturales en los análisis estadísticos. Estos resultados, junto con la ubicación inusual de la población en un sitio relativamente bajo en comparación con otras poblaciones, ya que las plantas crecen en afloramientos rocosos en las márgenes del río, respaldan la propuesta de un nuevo ecotipo hasta ahora no descripto para la especie. En el caso del morfotipo de flores amarillas de la población NA, aún no se ha realizado la caracterización genética, pero en base a los análisis

morfológicos, podría ser un caso de adaptación fenotípica frente a la presión selectiva por parte de diferentes polinizadores, ya que estas transiciones evolutivas entre diferentes colores de flores son una de las más comunes reportadas en plantas (Johnson et al., 2020).

Estudios químicos

La caracterización fitoquímica de las poblaciones permitió determinar la variabilidad química en los extractos de estas especies e identificar poblaciones prometedoras en cuanto al contenido de fenoles totales y actividad antioxidante. Generalmente, el estrés por sequía en plantas produce una estimulación en la concentración de azúcares solubles, proteínas y metabolitos secundarios (Stagnari et al., 2016). Sin embargo, en el caso de *V. gaimanensis*, que habita un ambiente extremadamente árido en la Patagonia extra andina, el contenido de fenoles totales no resultó mayor respecto al de *V. philippiana*, que crece en cerros húmedos, a mayor altitud y con mayor radiación UV. De las poblaciones naturales de *V. philippiana*, se destacan las plantas de Lago Guacho (LG), Cerro Cónico (CC) y Cerro Lindo (CL), situadas al sur de la distribución de la especie, por presentar alta variabilidad intra poblacional en contenido de fenoles y los valores más altos de actividad antioxidante. Como fuente de fenoles totales, se propone a LG y Cerro Tronador (TR), como poblaciones promisorias, donde algunos individuos de estas poblaciones mostraron contenido fenólico similar al de otras valerianas medicinales (Nagahama et al., 2020). Por el contrario, los valores de contenido de fenoles y actividad antioxidante obtenidos en *V. moyanoi* no fueron destacables en comparación con otras especies de *Valeriana* de uso medicinal.

En base a los resultados de la comparación de actividad antioxidante entre estadios fenológicos, los valores más altos de actividad se registraron en plantas en estadio vegetativo. La misma tendencia (mayor actividad antioxidante en otoño/estadio vegetativo) se ha observado en otras plantas patagónicas, por ejemplo, *Adesmia boronioides* Hook. f. (González et al., 2019) y *Larrea divaricata* Cav. (Varela et al., 2016).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los estudios abordados en esta caracterización química son iniciales y más bien generales, considerando solamente un grupo amplio de moléculas (fenoles totales). Por lo tanto, se propone a futuro estudiar otros grupos químicos específicos (flavonoides, valepotriatos, entre otros), comparar extractos obtenidos con

diferentes solventes de extracción, y emplear técnicas de mayor complejidad y especificidad (ej. HPLC).

Estudios genéticos

La caracterización de las poblaciones mediante marcadores moleculares en esta Tesis, constituye el primer antecedente en estas especies de *Valeriana*. Se encontró una alta diversidad genética en la mayoría de las poblaciones de *V. moyanoi*, mientras que las poblaciones de *V. philippiana* resultaron menos diversas. Esta información resulta relevante, ya que poblaciones con baja diversidad genética, se enfrentan a un mayor riesgo de extinción debido a alteraciones del ambiente (ej. actividades antrópicas) o frente al cambio climático global, por lo que el potencial adaptativo de las poblaciones dependerá de sus atributos genéticos y eco-fisiológicos (Woods et al., 2012). Además, en *V. philippiana* la estructuración genética poblacional mostró una correspondencia con la distribución geográfica, asociada al gradiente latitudinal Norte-Sur, lo que coincide con otros reportes de especies forestales patagónicas (Villagran, 1991; Pastorino et al., 2009). La región del norte neuquino es un sitio particular ubicado en latitudes coincidentes con un “punto caliente” de diversidad biológica en el centro de Chile (Myers et al., 2000). En esta zona, Kutschker & Morrone (2012) propusieron un centro de diversificación secundaria de *Valeriana*, producto de un largo período de aislamiento debido al levantamiento de los Andes. Durante el período comprendido entre el Mioceno y Plioceno, la formación de la cordillera y los procesos tectónicos asociados, podrían haber tenido un papel importante en la historia evolutiva de muchas especies (entre los 35° y 38°S). De hecho, varias especies o géneros de plantas podrían haberse diversificado en estas áreas del norte y luego migrado hacia el sur y sureste, colonizando nuevos sitios a medida que los Andes se elevaban y la estepa se volvía más árida (Sérsic et al., 2011). Esto ha sido propuesto para especies como *C. polyrrhiza*, *Hypochaeris incana* (Hook et. Arn) Macloskie y *Hordeum* (Jakob et al., 2009; Tremetsberger et al., 2009; Cosacov et al., 2010). En el caso de las valerianas, los procesos glaciarios del Pleistoceno, también podrían haber contribuido a la disyunción/segmentación entre poblaciones observada actualmente.

Por otra parte, el libre acopio de material vegetal silvestre para su aprovechamiento, implica un continuo e irreversible exterminio de nuestros recursos genéticos, por lo que resulta

fundamental elaborar prácticas sustentables de cultivo y profundizar sobre la domesticación de especies silvestres, con el fin de conservar las poblaciones naturales (Bandoni, 2003). Debido a que el consumo de especies de *Valeriana* se asocia a prácticas extractivas, resulta de gran importancia identificar poblaciones más susceptibles para que su recolección no genere un impacto irreversible. De las tres especies estudiadas, sólo *V. gaimanensis* posee algún tipo de uso (Nagahama, com. pers.), posiblemente debido a su semejanza con *V. carnososa*, especie ampliamente utilizada en Patagonia, por lo que sería importante comenzar con algún planeamiento de conservación *in situ* o *ex situ* y explorar su propagación sexual y asexual. En cuanto a *V. moyanoi*, a menos que se explore alguna otra cualidad fitoquímica, en base a los resultados obtenidos, no se recomendaría su selección con fines medicinales. Quizás desde una perspectiva ornamental resulte interesante, por el atractivo de sus inflorescencias, pero hay que tener en cuenta que es una planta bianual, por lo que sólo florece una vez y muere. Por último, *V. philippiana* resulta promisoría en cuanto a su alta actividad antioxidante, siendo factible su multiplicación por esquejes. Se sugieren dos poblaciones para explorar el cultivo de esta planta, en base a la estructuración genética encontrada, por un lado, LG (Chubut) y en Patagonia Norte, la población BA (Neuquén).

La integración de los resultados obtenidos en esta tesis representa un gran aporte para la caracterización de nuestros recursos genéticos nativos y un punto de partida importante para el conocimiento de las especies de *Valeriana* estudiadas.

Se logró caracterizar morfológicamente las poblaciones naturales y se identificaron fenotipos con mayor tamaño de frutos y desarrollo de raíces y rizomas que resultan promisorios para ensayar el cultivo de las especies con fines medicinales. Además, se propusieron nuevos ecotipos para *V. moyanoi*, que requieren ser investigados con mayor profundidad y se encontraron diferencias morfológicas entre las poblaciones de *V. philippiana* del norte y el sur de su distribución.

Se cuantificaron los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los extractos etanólicos, identificando quimiotipos interesantes en cuanto a mayor proporción de fenoles y/o actividad antioxidante. La especie con mejores resultados fue *V. philippiana* y en especial las poblaciones australes de esta especie. En el estudio de la dinámica de la actividad antioxidante en poblaciones seleccionadas, se destaca el estadio vegetativo por presentar mayor actividad.

Además, se pudo caracterizar genéticamente a las poblaciones mediante marcadores moleculares, encontrándose estructuración genética asociada a un gradiente geográfico Norte-Sur en *V. philippiana*, con menor diversidad genética en las poblaciones norte. Se propusieron sitios para la conservación de las especies por presentar mayor diversidad genética y/o alelos privados, y se señalaron poblaciones vulnerables por su baja variabilidad genética.

Sería interesante poder continuar con estudios de bioprospección en éstas y otras valerianas patagónicas, por ejemplo, analizando otros compuestos de interés medicinal con otras técnicas experimentales. Asimismo, sería necesario investigar distintos sistemas de propagación sexual y asexual (micro y macro- propagación) para la multiplicación de las poblaciones que resultaron de interés en esta tesis, y para otras valerianas de Patagonia. El uso extractivo de plantas medicinales nativas puede amenazar la conservación de las mismas, por lo que la selección, domesticación y cultivo de este tipo de especies resulta de primordial importancia.

- Adel Pilerood, S., & Prakash, J. (2014). Evaluation of nutritional composition and antioxidant activity of Borage (*Echium amoenum*) and Valerian (*Valeriana officinalis*). *Journal of Food Science and Technology*, 51(5), 845. <https://doi.org/10.1007/S13197-011-0573-Z>
- Almeida, T. M. de, Danielli, L. J., Apel, M. A., Cassel, E., Vargas, R. M., Von Poser, G. L., Müller, L. G., & Rates, S. M. (2019). A valepotriate-enriched fraction from *Valeriana glechomifolia* Meyer inhibits leukocytes migration and nociception in formalin test in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 477-482.
- Alonso, J., & Desmarchelier, C. (2014). *Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina. Bases Científicas para su aplicación en atención primaria de la salud.*
- Anderson, C. D., Epperson, B. K., Fortin, M. J., Holderegger, R., James, P. M. A., Rosenberg, M. S., Scribner, K. T., & Spear, S. (2010). Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. *Molecular Ecology*, 19(17), 3565-3575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04757.x>
- Arias, T. (1999). *Glosario de Medicamentos: Desarrollo, Evaluación y Uso. Organización Panamericana de la Salud.* 333.
- Armbruster, W. S. (2002). Can indirect selection and genetic context contribute to trait diversification? A transition-probability study of blossom-colour evolution in two genera. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(3), 468-486. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00399.x>
- Azpilicueta, M. M., Marchelli, P., & Gallo, L. A. (2009). The effects of Quaternary glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast DNA phylogeography of Southern beech *Nothofagus obliqua*. *Tree Genetics & Genomes*, 5, 561-571.

- Bach, H. G., Varela, B. G., Fortunato, R. H., & Wagner, M. L. (2014). Pharmacobotany of two *Valeriana* species (Valerianaceae) of Argentinian Patagonia known as «Ñancolahuen». *Latin American Journal of Pharmacy*, 33(6), 891-896.
- Bandoni, A. L. (2003). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. (A. L. Bandoni, Ed.).
- Barboza, G., Cantero, J., Núñez, C., Pacciaroni, A., & Ariza Espinar, L. (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34(1-2), 7-365.
- Barrie, F. R. (2003). Seven new species and one new variety of *Valeriana* (Valerianaceae) from Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 62, 31.
<https://doi.org/10.21829/abm62.2003.914>
- Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1229-1240.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert375>
- Bell, C. D., & Donoghue, M. J. (2005). Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Organisms Diversity and Evolution*, 5(2), 147-159. <https://doi.org/10.1016/j.ode.2004.10.014>
- Bell, C. D., Kutschker, A., & Arroyo, M. T. K. (2012). Phylogeny and diversification of Valerianaceae (Dipsacales) in the southern Andes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(3), 724-737. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.02.015>
- Bell, C. D., & Smets, E. F. (2010). Fruits and Seeds of the *Valeriana* Clade (Dipsacales): Diversity and Evolution. *Article in International Journal of Plant Sciences*, 171(4).
<https://doi.org/10.1086/651243>

- Benke, D., Barberis, A., Kopp, S., Altmann, K. H., Schubiger, M., Vogt, K. E., Rudolph, U., & Möhler, H. (2009). GABAA receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of valerian root extracts. *Neuropharmacology*, 56(1), 174-181. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.06.013>
- Berastegui, A., Gratti, A., Fernández, S., Ricci, M., & Belen, R. (2016). Cultivo *Valeriana clarionifolia* (Valerianaceae). Estrategia de cultivo *in vivo* e *in vitro*. *Dominguezia*, 32(2).
- Bezenberger, J. (2020). Plantas mágicas, una episteme en resistencia. *Escrituras americanas*, 4(1/2), 188-246.
- Bhatt, I. D., Dauthal, P., Rawat, S., Gaira, K. S., Jugran, A., Rawal, R. S., & Dhar, U. (2012). Characterization of essential oil composition, phenolic content, and antioxidant properties in wild and planted individuals of *Valeriana jatamansi* Jones. *Scientia Horticulturae*, 136, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.12.032>
- Bianchi, A. R., & Cravero, S. A. C. (2010). *Atlas climático digital de la República Argentina*.
- Bisbal, J. J. S., Lloret, J. M., Lozano, G. M., & Fagoaga, C. (2020). Especies vegetales como antioxidantes de alimentos. *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation.*, 12, 71-90.
- Biswal, B., Joshi, P., Raval, M., & Biswal, U. (2011). Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: Stress signalling and adaptation. *Current Science*, 101(1), 47-56.
- Blanco-Dios, J. B. (2007). Estudio morfométrico de una zona híbrida entre *Armeria beirana* y *A. pubigera* (Plumbaginaceae) en el noroeste de la Península Ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 64(2), 229-234. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2007.v64.i2.180>

- Bohonak, A. J. (1999). Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly review of Biology*, 74(1), 21-45.
- Borsini, O. E. (1942). Valerianáceas de Tucumán. *Lilloa*, 353-377.
- Borsini, O. E. (1944). Valerianaceae: 275–382. *HR Descole, Genera et species plantarum Argentinarum II. –Buenos Aires.*
- Borsini, O. E. (1946). Addenda a las valerianáceas argentinas: II) Nuevos materiales consultados. *Lilloa*, 67-85.
- Bos, R., Woerdenbag, H. J., Van Putten, F. M. S., Hendriks, H., & Scheffer, J. J. C. (1998). Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Medica*, 64(2), 143-147.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-957392>
- Bouayed, J., Piri, K., Rammal, H., Dicko, A., Desor, F., Younos, C., & Soulimani, R. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. *Food Chemistry*, 104(1), 364-368.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.069>
- Brosché, M., Overmyer, K., Wrzaczek, M., & Kangasjärvi, J. (2010). Stress Signaling III: Reactive Oxygen Species (ROS). En A. Pareek, S. Sopory, H. Bohnert, & Govindjee (Eds.), *Abiotic Stress Adaptation in Plants* (pp. 92-100). Springer Netherlands.
<https://doi.org/10.1007/978-90-481-3112-9>
- Bruederle, L. P. (1999). Genetic differentiation of geographically marginal populations in *Carex mitchelliana* (Cyperaceae): Implications for conservation. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 126(1), 1-8. <https://doi.org/10.2307/2997249>

- Bruford, M. W., & Wayne, R. K. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics & Development*, 3(6), 939-943. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(93\)90017-J](https://doi.org/10.1016/0959-437X(93)90017-J)
- Cantillano, R. F. F., Ávila, J. M. M., Peralba, M. do C. R., Pizzolato, T. M., & Toralles, R. P. (2012). Actividad antioxidante, compuestos fenólicos y ácido ascórbico de frutillas en dos sistemas de producción. *Horticultura Brasileira*, 30(4), 620-626. <https://doi.org/10.1590/s0102-05362012000400010>
- Casamiquela, R. (1999). Proyecto etnobotánico de la Patagonia: Primer informe. *Aspectos técnicos, culturales, políticos y legales de la bioprospección en Argentina*, 91-134.
- Chakraborty, S., Mukherjee, D., & Baskey, S. (2015). Indian Valerin, a Highly Endangered Medicinal Plant in North Eastern Himalayan Region. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2(4). <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00058>
- Chalcoff, V. R., Ezcurra, C., & Aizen, M. A. (2008). Uncoupled Geographical Variation between Leaves and Flowers in a South-Andean Proteaceae. *Annals of Botany*, 102(1), 79-91. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCN057>
- Chiapella, J. (2000). The *Deschampsia cespitosa* complex in central and northern Europe: A morphological analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 134(4), 495-512. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8339.2000.TB00547.X>
- Chiou, S.-Y., Sung, J.-M., Huang, P.-W., & Lin, S.-D. (2017). Antioxidant, Antidiabetic, and Antihypertensive Properties of *Echinacea purpurea* Flower Extract and Caffeic Acid Derivatives Using in Vitro Models. *Journal of Medicinal Food*, 20(2), 171-179. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3790>

- Conticello, L., Gandullo, R., Bustamante, A., & Tartaglia, C. (1997). El uso de plantas medicinales por la comunidad mapuche de San Martín de los Andes, Provincia de Neuquén (Argentina). *Parodiana*, 10(1-2), 165-180.
- Correa, M. N. (1963). *Flora Patagónica: Monocotyledoneae (excepto Gramineae)*. Colecciones Científicas Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria.
- Correa, M. N. (1971). *Flora Patagónica: Gramineae*. Colecciones Científicas Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria.
- Correa, M. N. (1984a). *Flora Patagónica: Dicotiledóneas Dialipétalas (Droceraceae a Leguminosae)*. Colecciones Científicas Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria.
- Correa, M. N. (1984b). *Flora Patagónica: Dicotiledóneas Dialipétalas (Salicaceae a Cruciferae)*. Colecciones Científicas Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria.
- Correa, M. N. (1988). *Flora Patagónica: Dicotiledóneas Dialipétalas (Oxalidaceae a Cornaceae)*. Colecciones Científicas Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria.
- Correa, M. N. (1998). *Flora Patagónica (Pteridophytae, Ephedraceae)*. Colecciones Científicas Instituto Nacional Tecnología Agropecuaria.
- Correa, M. N. (1999). *Dicotiledóneas Gamopétalas (Ericaceae a Calyceraceae)*. Colecciones Científicas Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Cosacov, A., Sérsic, A. N., Sosa, V., Johnson, L. A., & Cocucci, A. A. (2010). Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: The phylogeography of *Calceolaria polyrrhiza*. *Journal of Biogeography*, 37(8), 1463-1477.

- Couto, J. A., Campos, F. M., Figueiredo, A. R., & Hogg, T. A. (2006). Ability of Lactic Acid Bacteria to Produce Volatile Phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(2).
- Cuassolo, F., Ladio, A. & Ezcurra, C. (2010). Aspects of marketing and quality control of medicinal plants most sold in an urban community of NW Patagonia, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(3), 166-176.
- Das, G., Shin, H. S., Tundis, R., Gonçalves, S., Tantengco, O. A. G., Campos, M. G., Acquaviva, R., Malfa, G. A., Romano, A., Robles, J. A. H., Clores, M. Q., & Patra, J. K. (2021). Plant species of sub-family valerianaceae—A review on its effect on the central nervous system. *Plants*, 10(5).
<https://doi.org/10.3390/PLANTS10050846>
- de Andrade Salles, L., L. Silva, A., Rech, S. B., Zanatta, N., & Von Poser, G. L. (2000). Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(9), 907-910. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00124-6)
- Demiray, S., Pintado, M., & Castro, P. (2009). Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 312-317.
- Dereli, F. T. G. (2022). Plant-Based Bioactive Components: Phytochemicals: A Review. *Bioactive Components: A Sustainable System for Good Health and Well-Being*, 27-33.

- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). *InfoStat versión 2020*. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>
- Diyabalanage, T. (2022). 2 Plant secondary metabolites as prospective pharmaceuticals and cosmeceuticals. *Chemistry of Natural Products: Phytochemistry and Pharmacognosy of Medicinal Plants*, 19-40.
- Dohzono, I., & Suzuki, K. (2010). Morphological and genetic differentiation in *Isodon umbrosus* by altitudinal variation in bumblebee pollinator assemblages. *Plant Species Biology*, 25(1), 20-29. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2010.00268.x>
- Donoghue, M. J., Bell, C. D., & Winkworth, R. C. (2003). The evolution of reproductive characters in Dipsacales. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S5), S453-S464.
- Drew, B. T., & Sytsma, K. J. (2013). The South American radiation of *Lepechinia* (Lamiaceae): Phylogenetics, divergence times and evolution of dioecy. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(1), 171-190. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8339.2012.01325.X>
- Dweck, A. (1997). An introduction to Valerian, *Valeriana officinalis* and related species. En P. Houghton (Ed.), *Valerian: The Genus Valeriana* (pp. 1-142). <https://doi.org/10.1201/9780203734483>
- Eckert, C. G., Samis, K. E., & Loughheed, S. C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: The central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17(5), 1170-1188. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2007.03659.X>

- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Topical Review Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiology*, 184, 39-52. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00433>
- Eriksen, B. (1989). Notes on generic and infrageneric delimitation in the Valerianaceae. *Nordic Journal of Botany*, 9(2), 179-187. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1989.tb02113.x>
- Ezcurra, C., Premoli, A. C., Souto, C. P., Aizen, M. A., Arbetman, M., Mathiasen, P., Acosta, M. C., & Quiroga, P. (2014). La vegetación de la región Andino Patagónica tiene su historia. En *Ecología e historia natural de la Patagonia Andina: Un cuarto de siglo de investigación en biogeografía, ecología y conservación* (pp. 19-36). Fundación de Historia Natural Félix Azara.
- Faivre, A. E., & Windus, J. L. (2002). Genetic variation among populations of *Valeriana ciliata* T.&G. (Prairie valerian) in midwestern prairie fens. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 129(1), 39-47. <https://doi.org/10.2307/3088681>
- Farmacopea Argentina: Vol. I.* (2003). http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_III/files/assets/basic-html/page3.html
- Fernández, M., Ezcurra, C., & Calviño, C. I. (2017). Species limits and morphometric and environmental variation within the South Andean and Patagonian *Mulinum spinosum* species-group (Apiaceae-Azorelloideae). *Systematics and Biodiversity*, 15(5), 489-505. <https://doi.org/10.1080/14772000.2016.1273975>
- Fernández, S., Wasowski, C., Loscalzo, L., Granger, R., Johnston, G., Paladini, A., & Marder, M. (2006). Central nervous system depressant action of flavonoid

- glycosides. *European Journal of Pharmacology*, 539(3), 168-176.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.04.004>
- Fernández, S., Wasowski, C., Paladini, A. C., & Marder, M. (2004). Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77(2), 399-404.
- Fernández, S., Wasowski, C., Paladini, A., & Marder, M. (2005). Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *European Journal of Pharmacology*, 512(2-3), 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.02.039>
- Ferreira, M., Ezcurra, C., & Clayton, S. (2020). *Flores de Alta Montaña de los Andes Patagónicos* (H. Povedano & G. Delucchi, Eds.). Editorial L.O.L.A.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627-650. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)84277-6)
- Font Quer, P. (1953). *Diccionario de Botánica*. Península.
- Franz, C. (1985). Actual problems on the quality of medicinal and aromatic plants. V *International Symposium on Medicinal, Aromatic and Spice Plants 188*, 21-34.
- Fraunberger, E., Scola, G., Laliberté, V., Duong, A., & Andreazza, A. (2016). Redox Modulations, Antioxidants, and Neuropsychiatric Disorders. *Oxidative Medicine and cellular longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4729192>
- Gallo, L. A., Marchelli, P., Azpilicueta, M. M., & Crego, P. (2006). El uso de marcadores genéticos en el género *Nothofagus* con especial referencia a raulí y roble. *Bosque (Valdivia)*, 27(1), 3-15.

- Gastaldi, B. (2018). Analisis de los compuestos fenólicos y volátiles de plantas medicinales y aromáticas del noreste de la Patagonia Argentina, estudio de las actividades antioxidante y citotóxica. En *Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco*.
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007). Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quimica Nova*, 30(2), 374-381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
- Gonzalez, L. (2014). *Phylogenetics and Mating System Evolution in the Southern South American Valeriana (Valerianaceae)*.
- González, S. B., Ladio, A. H., Gastaldi, B., Silva Sofrás, Fresia Melina, Mazzoni, Ariel, & Sánchez, Gustavo. (2019). Paramela (*Adesmia boronioides* Hook.f.): From Popular Uses to Commercialization. En *Ethnobotany: Application of medicinal plants*. CRC Press, Taylor & Francis group.
- Grundt, H. H., Borgen, L., & Elven, R. (2000). Intraspecific variation in *Cerastium alpinum* s. Lat. (Caryophyllaceae) in Central Norway. *Nordic Journal of Botany*, 20(6), 641-654. <https://doi.org/10.1111/J.1756-1051.2000.TB00752.X>
- Guajardo, J., Gastaldi, B., González, S., & Nagahama, N. (2018). Variability of phenolic compounds at different phenological stages in two populations of *Valeriana carnosa* Sm. (Valerianoideae, Caprifoliaceae) in Patagonia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 17(4).
- Gusinde, M. (1936). Plantas medicinales que los indios araucanos recomiendan. *Anthropos*, 31, 555-873.
- Hadacek, F. (2002). Secondary metabolites as plant traits: Current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 273-322. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044269>

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Hamada, H., Petrino, M. G., & Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(21), 6465-6469.
- Hamburger, M., & Hostettmann, K. (1991). 7. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30(12), 3864-3874. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83425-K](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83425-K)
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Kromhout, D., Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L., & Katan, M. B. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342(8878), 1007-1011. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92876-U](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92876-U)
- Hevia, F., Berti, M., Wilckens, R., & Cifuentes, P. (2005). Quality and yield in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) harvested in different phenological stages. *Acta Agronomica Hungarica*, 50(3), 349-358. <https://doi.org/10.1556/AAGR.50.2002.3.12>
- Holzmann, I., Cechinel Filho, V., Mora, T. C., Cáceres, A., Martínez, J. V., Cruz, S. M., & de Souza, M. M. (2011). Evaluation of behavioral and pharmacological effects of hydroalcoholic extract of *Valeriana prionophylla* Standl. From Guatemala. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

- Houghton, P. (1988). The biological activity of valerian and related plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 22(2), 121-142. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90123-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90123-7)
- Huang, J. ning, Zou, Q., Chen, J., Xu, S. han, Luo, D., Zhang, F. guo, & Lu, Y. yuan. (2018). Phenols and diketopiperazines isolated from Antarctic-derived fungi, *Penicillium citreonigrum* SP-6. *Phytochemistry Letters*, 27, 114-118. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOL.2018.07.013>
- Iglesias, V., Whitlock, C., Bianchi, M. M., Villarosa, G., & Outes, V. (2012). Climate and local controls of long-term vegetation dynamics in northern Patagonia (Lat 41°S). *Quaternary Research*, 78(3), 502-512. <https://doi.org/10.1016/J.YQRES.2012.07.004>
- Ivanišová, E., Vasková, D., Zagula, G., Grynshpan, D., Savitskaya, T. A., & Kačániová, M. (2020). Phytochemical profile and biological activity of selected kind of medicinal herbs. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14, 573-579. <https://doi.org/10.5219/1370>
- Jacobowitz, J. R., & Weng, J.-K. (2020). Exploring uncharted territories of plant specialized metabolism in the postgenomic era. *Annual review of plant biology*, 71, 631-658.
- Jakob, S. S., Martinez-Meyer, E., & Blattner, F. R. (2009). Phylogeographic analyses and paleodistribution modeling indicate Pleistocene in situ survival of *Hordeum* species (Poaceae) in southern Patagonia without genetic or spatial restriction. *Molecular Biology and Evolution*, 26(4), 907-923.
- Jiménez, C. (2022). *Caracterización morfológica y germinativa de tres especies vegetales de la familia Valerianaceae provenientes del Parque Nacional Cayambe-Coca en Ecuador.*

- Johnson, S. D., von Witt, C. G., & Anderson, B. (2020). Floral Color Variation in *Drosera cistiflora* Is Associated with Switches in Beetle Pollinator Assemblages. *Frontiers in Plant Science, 11*, 1785. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.606259/BIBTEX>
- Joseau, J., Conles, M., & Verzino, G. (2013). El cultivo de plantas leñosas en viveros y a campo. *Colección: Conservación de recursos forestales nativos de Argentina*.
- Jugran, A. K., Bahukhandi, A., Dhyani, P., Bhatt, I. D., Rawal, R. S., & Nandi, S. K. (2016). Impact of Altitudes and Habitats on Valerenic Acid, Total Phenolics, Flavonoids, Tannins, and Antioxidant Activity of *Valeriana jatamansi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 179*(6), 911-926. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2039-2>
- Jugran, A. K., Rawat, S., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2020). Essential oil composition, phenolics and antioxidant activities of *Valeriana jatamansi* at different phenological stages. *Plant Biosystems, 155*(4), 891-898. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1810803>
- Jugran, A., Rawat, S., Dauthal, P., Mondal, S., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2013). Association of ISSR markers with some biochemical traits of *Valeriana jatamansi* Jones. *Industrial Crops and Products, 44*, 671-676. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.004>
- Jump, A. S., Peñuelas, J., Rico, L., Ramallo, E., Estiarte, M., Martínez-Izquierdo, J. A., & Lloret, F. (2008). Simulated climate change provokes rapid genetic change in the Mediterranean shrub *Fumana thymifolia*. *Global Change Biology, 14*(3), 637-643. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2486.2007.01521.X>
- Kahilainen, A., Puurtinen, M., & Kotiaho, J. S. (2014). Conservation implications of species–genetic diversity correlations. *Global Ecology and Conservation, 2*, 315-323. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2014.10.013>

- Kähkönen, M., Hopia, A., & Heinonen, M. (2001). Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4076-4082.
<https://doi.org/10.1021/JF010152T>
- Kähkönen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10).
<https://doi.org/10.1021/jf990146l>
- Kancheva, V., & Kasaikina, O. (2013). Bio-Antioxidants – A Chemical Base of Their Antioxidant Activity and Beneficial Effect on Human Health. *Current Medicinal Chemistry*, 20(37), 4784-4805.
- Karlovsky, P. (2008). *Secondary Metabolites in Soil Ecology* (pp. 1-19). Springer.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01592.x>
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology*, 36(7), 703-725.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2001.00513.X>
- Kaur, R., Sood, M., Chander, S., Mahajan, R., Kumar, V., & Sharma, D. R. (1999). *In vitro* propagation of *Valeriana jatamansi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59(3), 227-229.
- Kennedy, D. O., & Wightman, E. L. (2011). Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition*, 2(1), 32-50. <https://doi.org/10.3945/an.110.000117>
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
<https://doi.org/10.3390/molecules18022328>

- Kim, D., Chun, O.K, Jun Kim, Y., Moon, H., & Lee, C. Y. (2003). Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(22), 6509-6515. <https://doi.org/10.1021/jf0343074>
- Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., & Yankova, T. (2006). Correlation between the *in vitro* antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from bulgarian herbs. *Phytotherapy Research*, 20(11), 961-965. <https://doi.org/10.1002/PTR.1985>
- Kolton, A., Długosz-Grochowska, O., Wojciechowska, R., & Czaja, M. (2022). Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. *Scientia Horticulturae*, 291, 110561.
- Kossel, A. (1891). Ueber abkömmlinge der phenylamidoessigsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 24(2), 4145-4156.
- Kruckeberg, A. R., & Rabinowitz, D. (1985). Biological aspects of endemism in higher Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16(1985), 447-479.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>
- Kutschker, A. (2008). Morfología del fruto en especies de *Valeriana* (Valerianaceae) de los Andes Australes. *Darwiniana*, 46(1), 17-35.
- Kutschker, A. (2009). *Valeriana L. (Valerianaceae) en Sudamérica austral: Taxonomía, aspectos biogeográficos y fitoquímicos*. Universidad Nacional de la Patagonia SJB.
- Kutschker, A. (2011). Revision of genus *Valeriana* (Valerianaceae) in southern South America. *Gayana - Botanica*, 68(2), 244-296. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432011000200016>

- Kutschker, A., Ezcurra, C., & Balzaretto, V. (2010). *Valeriana* (Valerianaceae) de los Andes australes: Biodiversidad y compuestos químicos. *Tradiciones y Transformaciones en Etnobotánica*, 219-224.
- Kutschker, A., & Morrone, J. J. (2012). Distributional patterns of the species of *Valeriana* (Valerianaceae) in southern South America. *Plant Systematics and Evolution*, 298(3), 535-547. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0564-6>
- Lamuela-Raventós, R. M. (2018). Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*, 107-115. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>
- Laphitz, R. M. L., & Semple, J. C. (2015). A Multivariate Morphometric Analysis of the *Solidago chilensis* Group in South America and Related Taxa in North America (Asteraceae, Astereae). <https://doi.org/10.3417/2014023>, 100(4), 423-441. <https://doi.org/10.3417/2014023>
- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100(1), 237-240. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.09.047>
- Letchamo, W., Ward, W., Heard, B., & Heard, D. (2004). Essential oil of *Valeriana officinalis* L. cultivars and their antimicrobial activity as influenced by harvesting time under commercial organic cultivation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(12), 3915-3919. <https://doi.org/10.1021/jf0353990>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89.

- Li, Y. M., Liu, Y. R., Xiao, B. K., Yang, J. Y., & Huang, R. Q. (2015). Dynamic comparison of free radical scavenging abilities of *Hypericum perforatum* L., *Herba Verbenae officinalis*, and *valeriana officinalis* L. Extracts. *Pharmacognosy Journal*, 7(3), 198-204. <https://doi.org/10.5530/pj.2015.3.9>
- Linnaeus, C. (1751). *Philosophia botanica* (translated by S. Freer, 2003).
- Lipp, F. J. (1996). *Herbalism (Living Wisdom)*. Little, Brown and Company. 184 pp.
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 14-16. <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>
- Luckner, M. (1984). What is Secondary Metabolism? *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals*, 16-24. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02384-6_1
- Manifesto, M. M., Galvan, F. V., Nagahama, N., Arizio, C. M., & Fortunato, R. H. (s. f.). *Development and characterization of EST based SSR markers in Valeriana clarionifolia and their transferability to other Valeriana sp.*
- Marcucci, C., Manuel Anselmi Relats, J., Bach, H., Kamecki, F., Varela, B. G., Wagner, M. L., Pastore, V., Colettis, N., Ricco, R. A., & Marder, M. (2020). Neurobehavioral evaluation and phytochemical characterization of a series of argentine valerian species. *Heliyon*, 6(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05691>
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Fernández, S., Medina, J. H., & Paladini, A. C. (2003). 6-Methylapigenin and hesperidin: New valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 537-545. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(03\)00121-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(03)00121-7)

- Moghe, G. D., & Last, R. L. (2015). Something old, something new: Conserved enzymes and the evolution of novelty in plant specialized metabolism. *Plant Physiology*, *169*(3), 1512-1523. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00994>
- Molares, S., & Ladio, A. (2009). Ethnobotanical review of the Mapuche medicinal flora: Use patterns on a regional scale. *Journal of Ethnopharmacology*, *122*, 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.003>
- Molares, S., & Ladio, A. H. (2008). Plantas medicinales en una comunidad Mapuche del NO de la Patagonia Argentina: Clasificación y percepciones organolépticas relacionadas con su valoración. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *7*(3), 84-91.
- Molares, S., Ladio, A., & Nagahama, N. (2019). Recent Reports on Ethnopharmacological and Ethnobotanical Studies of *Valeriana carnos*a Sm. (Valerianaceae). *Ethnobotany*, 90-102. <https://doi.org/10.1201/9780429424069-6>
- Muñoz-Concha, D., Vogel, H., & Razmilic, I. (2004). Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drimys* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile. *Revista chilena de historia natural*, *77*(1), 43-50. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2004000100005>
- Myers, N., Mittermeller, R. A., Mittermeller, C. G., Da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* *2000* *403*:6772, *403*(6772), 853-858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nagahama, N., Bach, H. G., Manifesto, M. M., & Fortunato, R. H. (2016). *Valeriana gaimanensis* (Valerianaceae nom. Conserv.), a new species from the Patagonian Semi-Arid Desert, Argentina. *Systematic Botany*, *41*(1). <https://doi.org/10.1600/036364416X690714>

Nagahama, N., Bach, H. G., Manifesto, M. M., Wagner, M. L., & Fortunato, R. H. (2017).

Searching for New Sources of Phytopharmaceuticals in Native Valeriana from Patagonia, Argentina.

Nagahama, N., & Bonino, M. F. (2020). Modeling the potential distribution of *Valeriana*

carcosa Sm. In Argentinean Patagonia: A proposal for conservation and *in situ* cultivation considering climate change projections. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *16*, 100240.

Nagahama, N., Gastaldi, B., Clifford, M., Manifesto, M., & Fortunato, R. (2020). The

influence of environmental variations on the phenolic compound profiles and antioxidant activity of two medicinal Patagonian valerians (*Valeriana carcosa* Sm. and *V. clarionifolia* Phil.). *AIMS Agriculture and Food*, *6*(1), 106-124. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2021007>

Nagahama, N., Manifesto, M., Arizio, M., & Fortunato, R. (2014). Estudio de variabilidad

genética en poblaciones norpatagónicas de “Ñancolahuén” mediante AFLP. *XLIII Congreso Argentino de Genética.*

Nagahama, N., Manifesto, M. M., & Fortunato, R. H. (2019). Vegetative propagation and

proposal for sustainable management of *Valeriana carcosa* Sm., a traditional medicinal plant from Patagonia. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *14*, 100218. <https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2019.100218>

Nagano, Y., Abe, K., Kitazawa, T., Hattori, M., Hirao, A. S., & Itino, T. (2014). Changes in

pollinator fauna affect altitudinal variation of floral size in a bumblebee-pollinated herb. *Ecology and Evolution*, *4*(17), 3395. <https://doi.org/10.1002/ECE3.1191>

Nandhini, S., Narayanan, K. B., & Ilango, K. (2018). *Valeriana officinalis*: A review of its

traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Asian Journal of*

- Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(1), 36-41.
<https://doi.org/10.22159/AJPCR.2018.V11I1.22588>
- National Center for Biotechnology Information. (2022). *N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine* / *C6H16N2*—PubChem.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8037>
- Niemeyer, H. M. (1995). Biologically Active Compounds from Chilean Medicinal Plants. *Phytochemistry of Medicinal Plants*.137-159 https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1778-2_7
- Nishida, R. (2014). Chemical ecology of insect–plant interactions: Ecological significance of plant secondary metabolites. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(1), 1-13.
- Oliva, I., González-Trujano, M. E., Arrieta, J., Enciso-Rodríguez, R., & Navarrete, A. (2004). Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(4), 290-296.
- Orhan, I. E. (2021). A Review Focused on Molecular Mechanisms of Anxiolytic Effect of *Valerina officinalis* L. in Connection with Its Phytochemistry through in vitro/in vivo Studies. *Current Pharmaceutical Design*, 27(28), 3084-3090.
<https://doi.org/10.2174/1381612827666210119105254>
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6882-6890.

<https://doi.org/10.1021/JF020540A/ASSET/IMAGES/LARGE/JF020540AF00002>.

JPEG

Pastorino, M. J., Marchelli, P., Milleron, M., Soliani, C., & Gallo, L. A. (2009). The effect of different glaciation patterns over the current genetic structure of the southern beech *Nothofagus antarctica*. *Genetica*, 136(1), 79-88.

<https://doi.org/10.1007/S10709-008-9314-2/TABLES/3>

Patočka, J., & Jakl, J. (2010). Biomedically relevant chemical constituents of *Valeriana officinalis*. *Journal of Applied Biomedicine*, 8(1), 11-18.

<https://doi.org/10.2478/V10136-009-0002-Z>

Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). Genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288-295.

<https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2005.01155.X>

Pérez De La Vega, M. (1997). *Marcadores moleculares, variabilidad genética y Evolución*.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.

<https://doi.org/10.1021/jf0502698>

R Core Team. (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.

<https://www.r-project.org/>

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Richeri, M., Ladio, A., & Beeskow, A. (2015). Conocimiento tradicional y autosuficiencia: La herbolaria rural en la Meseta Central del Chubut (Argentina). *Blacpma*, 14(2), 99-112.
- Rickett, H. W. (1954). Materials for a dictionary of botanical rTerms-I. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 81(1), 1-15.
- Robert-Seilaniantz, A., Bari, R., & Jones, J. D. (2010). A biotic or abiotic stress? *Abiotic stress adaptation in plants: physiological, molecular and genomic foundation*, 103-122.
- Saldivia, P., & Rojas, G. (2006). *Valeriana moyanoi* Speg. (Valerianaceae), nuevo registro para la flora de Chile. *Gayana - Botanica*, 63(2), 183-186. <https://doi.org/10.4067/s0717-66432006000200006>
- Salim, M., Saeed, A., Iqbal, M., Khan, B. A., Khan, N., Rabbani, I., Alsenani, F., & Rasul, A. (2024). Phytochemical screening and evaluation of antioxidant, total phenolic and flavonoid contents in various weed plants associated with wheat crops. *Brazilian Journal of Biology*, 84. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.256486>
- Sánchez, G., & Riat, M. (2021). Propagación por semillas y cultivo en maceta de *Valeriana carnos*a SM. (Valerianoideae, Caprifoliaceae) en San Carlos de Bariloche. Rio Negro. *FAVE Sección Ciencias Agrarias*, 20(1), 205-218. <https://doi.org/10.14409/fa.v20i1.10259>
- Santos-Gomes, P. C., & Fernandes-Ferreira, M. (2001). Organ- and Season-Dependent Variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2908-2916. <https://doi.org/10.1021/JF001102B>

- Sarikurkcü, C., Jeszka-Skowron, M., & Ozer, M. S. (2020). *Valeriana dioscoridis* aerial parts' extracts—A new source of phytochemicals with antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Industrial Crops and Products*, 148. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2020.112273>
- Schenck, C. A., & Busta, L. (2022). Using interdisciplinary, phylogeny-guided approaches to understand the evolution of plant metabolism. *Plant Molecular Biology*, 109(4), 355-367. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01220-1>
- Schiffrin, E. L. (2010). Antioxidants in Hypertension and Cardiovascular Disease. *Molecular Interventions*, 10(6), 354. <https://doi.org/10.1124/MI.10.6.4>
- Schwinning, S., & Sala, O. E. (2004). Hierarchy of responses to resource pulses in arid and semi-arid ecosystems. *Oecologia*, 141(2), 211-220. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1520-8>
- Scott, K. D., Egger, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E. M., Lee, L. S., & Henry, R. J. (2000). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(5), 723-726. <https://doi.org/10.1007/s001220051344>
- Sérsic, A. N., Cosacov, A., Cocucci, A. A., Johnson, L. A., Pozner, R. E., Ávila, L., Sites, J. W., Jr., & Morando, M. (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(2), 475-494. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01656.x>
- Shahidi, F., & Naczki, M. (2003). Phenolics in food and nutraceuticals. En *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. <https://doi.org/10.1201/9780203508732>
- Sikora, E., Cieřlik, E., & Topolska, K. (2008). The sources of natural antioxidants. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 7(1), 5-17.

- Silva, A. L., Rech, S. B., & von Poser, G. L. (2002). Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to south Brazil. *Planta Medica*, 68(06), 570-572.
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods*, 299(1974), 152-178.
- Singleton, V., & Rossi, J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Soliani, C., Mondino, V., Thomas, E., Pastorino, M., Gallo, L., & Marchelli, P. (2017). Zonas genéticas de Lenga y Ñire en Argentina. Ediciones INTA. <http://repositorio.inta.gob.ar:80/handle/20.500.12123/2340>
- Spearman, C. (1904). «General Intelligence, » Objectively Determined and Measured. *The American Journal of Psychology*, 15(2), 201. <https://doi.org/10.2307/1412107>
- Stagnari, F., Galieni, A., & Pisante, M. (2016). Drought stress effects on crop quality, 375-392. <https://doi.org/10.1002/9781119054450.ch23>
- Streinzer, M., Roth, N., Paulus, H. F., & Spaethe, J. (2019). Color preference and spatial distribution of glaphyrid beetles suggest a key role in the maintenance of the color polymorphism in the peacock anemone (*Anemone pavonina*, Ranunculaceae) in Northern Greece. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 205(5), 735-743. <https://doi.org/10.1007/S00359-019-01360-2/TABLES/1>
- Sulaiman, S. F., Sajak, A. A. B., Ooi, K. L., Supriatno, & Seow, E. M. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables.

- Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4-5), 506-515.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.020>
- Surveswaran, S., Cai, Y. Z., Corke, H., & Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102(3), 938-953. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.033>
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International*, 2013, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/251754>
- Thies, P. W., & Funke, S. (1966). Über die wirkstoffe des baldrians: 1. Mitteilung Nachweis und isolierung von sedativ wirksamen isovaleriansäureestern aus wurzeln und rhizomen von verschiedenen valeriana- und kentranthus-arten. *Tetrahedron Letters*, 7(11), 1155-1162. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)72388-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)72388-4)
- Thusoo, S., Gupta, S., Sudan, R., Kour, J., Bhagat, S., Hussain, R., & Bhagat, M. (2014). Antioxidant activity of essential oil and extracts of *Valeriana jatamansi* Roots. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/614187>
- Tremetsberger, K., Urtubey, E., Terrab, A., Baeza, C. M., Ortiz, M. A., Talavera, M., Koenig, C., Tensch, E. M., Kohl, G., & Talavera, S. (2009). Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Ecology*, 18(17), 3668-3682.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients 2010*, Vol. 2, Pages 1231-1246, 2(12), 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/NU2121231>

- Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., & Palma-Silva, C. (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22(5), 1193-1213. <https://doi.org/10.1111/MEC.12164>
- Tyukmaeva, V. I., Salminen, T. S., Kankare, M., Knott, K. E., & Hoikkala, A. (2011). Adaptation to a seasonally varying environment: A strong latitudinal cline in reproductive diapause combined with high gene flow in *Drosophila montana*. *Ecology and Evolution*, 1(2), 160-168. <https://doi.org/10.1002/ECE3.14>
- Varela, M. C., Arslan, I., Reginato, M. A., Cenzano, A. M., & Luna, M. V. (2016). Phenolic compounds as indicators of drought resistance in shrubs from Patagonian shrublands (Argentina). *Plant Physiology and Biochemistry*, 104, 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.03.014>
- Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1), 48-55. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2004.11.005>
- Villagran, C. (1991). History of the temperate forests of southern Chile during the Late-Glacial and Holocene. *Revista Chilena de Historia Natural*, 64, 447-460.
- Villarroel, A. E., Menegoz, K., Le Quesne, C., & Moreno-Gonzalez, R. (2022). *Valeriana praecipitis* (Caprifoliaceae), a species new to science and endemic to Central Chile. *PhytoKeys*, 189, 81-98. <https://doi.org/10.3897/PHYTOKEYS.189.73959>
- Vogel, H., Razmilic, I., Acevedo, P., & González, B. (2005). Alkaloid and essential oil concentration in different populations of *Peumus boldus*. *Acta Horticulturae*, 676, 181-184. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.676.24>
- Walton, N. J., & Brown, D. E. (1999). Chemicals from Plants. En *Chemicals from Plants*. World Scientific / Imperial College Press. <https://doi.org/10.1142/3203>

- Wang, Y., Jin, L., Yu, S., Shi, Q., Gu, Y., & Kiyota, H. (2010). Chemical Constituents of Plants from the Genus *Valeriana*. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 7(2), 161-172. <https://doi.org/10.2174/157019310791065537>
- War, A. R., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ahmad, T., Nair, R. M., & Sharma, H. C. (2020). Plant defense and insect adaptation with reference to secondary metabolites. *Coevolution of secondary metabolites*, 795-822.
- Whitford, W., & Duval, B. (2002). *Ecology of desert systems*. Academic Press.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19.
- Wink, M. (2010). Introduction: Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. *Annual plant reviews volume 40: Biochemistry of plant secondary metabolism*, 1-19.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940-949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
- Wright, S. (1943). An analysis of local variability of flower color in *Linanthus parryae*. *Genetics*, 28(2), 139-156. <https://doi.org/10.1093/genetics/28.2.139>
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejeriyè, E., & Wangchuk, P. (2022). Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development. *Molecules*, 27(1), 313.

- Yousuf, S., Bachheti, R. K., Joshi, A., & Mathur, A. (2014). Antioxidant activity of different extracts of *Valeriana hardwickii*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *24*(2), 297-301.
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology*, *11*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x>
- Zhao, J., Zhao, X., Guo, B., & Ma, P. X. (2014). Multifunctional interpenetrating polymer network hydrogels based on methacrylated alginate for the delivery of small molecule drugs and sustained release of protein. *Biomacromolecules*, *15*(9), 3246-3252. <https://doi.org/10.1021/BM5006257>
- Ziarno, M., Kozłowska, M., Scibisz, I., Kowalczyk, M., Pawelec, S., Stochmal, A., Szleszyński, B., Szleszyński, S., & Daniela, G. (2021). The Effect of selected herbal extracts on lactic acid bacteria activity. <https://doi.org/10.3390/app11093898>