



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS MENCIÓN QUÍMICA ESPECIALIDAD
PRODUCTOS NATURALES**

TESIS

**PATRONES FENOTÍPICOS, CITOGENÉTICOS Y CONTENIDO DE
SILIMARINA EN *Silybum marianum* L. Gaertner EN TRES
GRADIENTES ALTITUDINALES DE CUSCO**

**PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS
MENCION QUÍMICA ESPECIALIDAD PRODUCTOS NATURALES**

AUTOR

Br. OLGA LIBIA CJUNO HUANCA

ASESOR:

Dra. YOLANDA CALLO CHOQUEVILCA

CODIGO ORCID:

0000-0001-9543-8547

CUSCO – PERU

2026

Dedicatoria

A mis padres por enseñarme a perseverar

A mi familia, por su apoyo constante y fe en mis metas

A mis hermanos y sobrinos

Dedico este trabajo a Ustedes

Agradecimientos

A Dios, por darme fuerza, salud y sabiduría para culminar este trabajo.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, institución que me acogió y me brindó las herramientas académicas y humanas para culminar esta etapa.

A mi asesora, Dra. Yolanda Callo Choquevilca, por su orientación, su disposición y por confianza. Sus observaciones fueron clave para el rigor y la calidad de este trabajo.

A mi hermano, Dr. Américo Cjuno, por su acompañamiento técnico, por las discusiones metodológicas y por su generosidad al compartir conocimiento.

A los miembros del jurado dictaminador Mgt. Carmen Sonia Alosilla Robles y Mgt. Ciro Tomaylla Cruz, por su tiempo dedicado, su disposición y las valiosas observaciones realizadas durante la evaluación, que contribuyeron a mejorar la calidad académica y el rigor del presente trabajo de investigación.

A mi familia por su amor incondicional, su paciencia y su fe en mí, sin su apoyo, este logro no habría sido posible.

A mis amigos por su apoyo e incentivo constante.

Índice

Resumen	
Abstrac	
Introducción	
CAPITULO I	2
GENERALIDADES	2
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Formulación del problema.	3
1.3. Justificación de la investigación	3
1.4. Objetivos de la investigación	5
CAPITULO II	6
MARCO TEORICO CONCEPTUAL	6
2.1. Bases teóricas	6
2.1.1. <i>Silybum marianum</i> L. Gaertner	6
2.1.2. Distribución geográfica y hábitat	9
2.1.3. Descripción Botánica.	10
2.1.4. Metabolismo secundario de <i>Silybum marianum</i> L.	12
2.1.5. Síntesis de flavonoides y flavonolignanos	16
2.1.6. Extracción y Análisis de Silimarina	21
2.1.7. Citogenética de <i>Silybum marianum</i> L. Gaertner	27
2.1.8. Técnicas citogenéticas con material vegetal	28
2.1.9. Fenotipo y fenología vegetal	29
2.1.10. Gradientes altitudinales y las plantas	32
2.2. Conceptos básicos	34
2.3. Antecedentes empíricos (Estado del arte).	35
2.3.1. Variabilidad fenotípica y citogenética de <i>Silybum marianum</i> L. Gaertner	36
2.3.2. Composición fitoquímica de <i>Silybum marianum</i> L. Gaertner	38
2.3.3. Caracterización de Silimarina	40
2.3.4. Influencia ambiental (altitudinal) en el contenido de silimarina	41
2.3.5. Estudios comparativos en gradientes altitudinales en otras especies	42
2.4. Hipótesis	44
2.4.1. Hipótesis general	44
2.4.2. Hipótesis específicas	44
2.5. Identificación de variables e indicadores	44
2.6. Operacionalización de variables	45
CAPITULO III	46
METODOLOGIA	46
3.1. Ámbito de estudio; Localización política y geográfica	46
3.2. Diseño metodológico	47
3.2.1. Tipo y nivel de investigación	47
3.3. Unidad de Análisis	48
3.4. Población de estudio.	48
3.5. Tamaño de muestra	48
3.6. Técnicas de selección de muestra:	48
3.7. Técnicas de recolección de información.	49
3.8. Técnicas de análisis e interpretación de la información	49

3.9.	Técnicas para demostrar la verdad o falsedad de las hipótesis planteadas.	49
3.10.	Procedimiento experimental	50
3.10.1.	Materiales	50
3.10.2.	Ubicación y descripción de los tres gradientes altitudinales	52
3.10.3.	Caracterización de las condiciones abióticas de los tres gradientes altitudinales	57
3.10.4.	Determinación de patrones fenotípicos de <i>Silybum marianum</i> L.	58
3.10.5.	Análisis de los patrones citogenéticos de <i>Silybum marianum</i> L.	59
3.10.6.	Análisis del contenido de silimarina a partir de semillas de <i>Silybum marianum</i> L.	62
3.10.7.	Análisis multivariado y correlacional	68
CAPITULO IV		69
RESULTADOS Y DISCUSION		69
4.1.	Resultados descriptivos	69
4.1.1.	Caracterización de las condiciones abióticas de los gradientes altitudinales	69
4.1.2.	Determinación de los patrones fenotípicos de <i>Silybum marianum</i> L. Gaertner	72
4.1.3.	Análisis de los patrones citogenéticos de <i>Silybum marianum</i> L. Gaertner	81
4.1.4.	Análisis del contenido de silimarina en semillas de <i>Silybum marianum</i> L.	90
4.2.	Prueba de hipótesis	115
4.2.1.	Hipótesis específica H ₁	115
4.2.2.	Hipótesis específica H ₂	117
4.2.3.	Hipótesis específica H ₃	121
4.2.4.	Hipótesis específica H ₄	123
4.2.5.	Discusión	129
CONCLUSIONES		132
RECOMENDACIONES		134
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		135
ANEXOS		143

Índice de Tablas

Tabla 1	Flavonolignanos y fenóles en <i>Silybum marianum</i> L.	14
Tabla 2	Valores de picos FT-IR, intensidades, grupos funcionales en <i>Silybum marianum</i> L.	26
Tabla 3	Técnicas de estudios fenológicos en plantas	30
Tabla 4	Escala BBCH para determinación de los estados fenológicos de <i>Silybum marianum</i> L.	31
Tabla 5	Identificación de variables e indicadores	44
Tabla 6	Operacionalización de variables	45
Tabla 7	Ubicación y descripción de los tres gradientes altitudinales	52
Tabla 8	Gradientes altitudinales según zonas de Vida de Holdridge	52
Tabla 9	Escala BBCH para determinación de los estados fenológicos de <i>Silybum marianum</i> L.	58
Tabla 10	Porcentaje de germinación de semillas de <i>Silybum marianum</i> L. por gradiente altitudinal.....	59
Tabla 11	Prueba de solubilidad del estándar de silimarina	64
Tabla 12	Condiciones de análisis de silimarina a partir de semillas por HPLC-DAD	67
Tabla 13	Descripción de las condiciones abióticas de los tres gradientes altitudinales (Año 2021)	69
Tabla 14	Análisis Físicoquímico de suelos de los tres gradientes altitudinales	71
Tabla 15	Medias y desviación estándar de las características fenotípicas	72
Tabla 16	Características fenotípicas del capítulo y semillas de <i>Silybum marianum</i> (L.)	74
Tabla 17	Media de Peso (g) de 1000 semillas de <i>Silybum marianum</i> L.	75
Tabla 18	Descripción del desarrollo fenológico de <i>Silybum marianum</i> L. según la escala BBCH	76
Tabla 19	Observación fenológica según escala BBCH durante los meses del año 2021	80
Tabla 20	Determinación de Pretratamiento para la determinación de cariotipo.....	82
Tabla 21	Determinación de hidrólisis para determinación de cariotipo	82
Tabla 22	Determinación de técnica de coloración	83
Tabla 23	Índices cromosómicos del cariotipo de <i>Silybum marianum</i> L., procedente de Huaccoto K'ayra	85
Tabla 24	Índices cromosómicos del cariotipo de <i>Silybum marianum</i> L., procedente de Terminal Huancaro	86
Tabla 25	Índices cromosómicos del cariotipo de <i>Silybum marianum</i> L., procedente de Fortaleza de Sacsayhuaman	88
Tabla 26	Índices globales en los cariotipos de los tres genotipos de <i>Silybum marianum</i> L.	89
Tabla 27	Porcentaje (p/p) de silimarina por UV-Vis (289nm) en semillas de <i>Silybum marianum</i> L.,	93
Tabla 28	Análisis comparativo de la señal de IR-FTHR, de silimarina estándar y la muestra 14	95
Tabla 29	Tiempo de retención y % de Área y altura de flavonolignanos identificados estándar 24ppm	96
Tabla 30	Tiempo de retención y % de Área de flavonolignanos mayoritarios – Huaccoto K'ayra	101
Tabla 31	Tiempo de retención y % de Área de flavonolignanos mayoritarios - Terminal Huancaro	103
Tabla 32	Tiempo de retención y % de Área de flavonolignanos mayoritarios – Com.Fortaleza Sacsayhuaman	105
Tabla 33	Ratios de Control R1/R2 de flavonolignanos de silimarina en semillas	107
Tabla 34	Ecuaciones de regresión lineal, R ² , LOD y LOQ de flavonolignanos	108
Tabla 35	Tiempos de retención y área de picos de Silibina A y Silibina B de los estándares de silimarina	110
Tabla 36	Porcentaje (p/p) de silimarina por HPLC – DAD, en tres gradientes altitudinales del Cusco	112
Tabla 37	Media del porcentaje de silimarina por gradiente altitudinal	112
Tabla 38	ANOVA de diferencias fenotípicas Vs Gradiente altitudinal	115
Tabla 39	Comparaciones múltiples de patrones fenotípicos Vs Gradiente Altitudinal.....	116
Tabla 40	ANOVA de Cariotipo Vs variaciones citogenéticas asociadas a la altitud.....	118
Tabla 41	Comparaciones múltiples de cariotipo vs variaciones citogenéticas asociadas a la altitud	119
Tabla 42	Comparaciones múltiples del contenido de silimarina Vs. altitud.....	121
Tabla 43	Comparaciones múltiples del contenido de silimarina Vs. muestra	121
Tabla 44	Comparaciones múltiples del contenido de silimarina Vs. Compuesto identificado	122
Tabla 45	Correlaciones de patrones fenotípicos Vs Huaccoto K'ayra (3207 m)	123
Tabla 46	Correlaciones de patrones fenotípicos Vs Terminal Huancaro (3402 m)	124
Tabla 47	Correlaciones de patrones fenotípicos Vs. Fortaleza Sacsayhuaman (3625 m)	125
Tabla 48	Correlaciones citogenéticas.....	126
Tabla 49	Correlaciones del contenido de silimarina y gradiente altitudinal	128
Tabla 50	Matriz de consistencia	144
Tabla 51	Registro de los componentes bióticos acompañantes de <i>Silybum marianum</i> L.	145
Tabla 52	Temperatura promedio, humedad relativa y precipitación pluvial 2021 en Huaccoto-K'ayra	147

Tabla 53 <i>Temperatura promedio, humedad relativa y precipitación pluvial 2021 en Terminal Huancaro</i>	148
Tabla 54 <i>Temperatura promedio, humedad relativa y precipitación pluvial 2021 en Fortaleza Sacsayhuaman</i>	149
Tabla 55 <i>Registro de características fenotípicas en los tres gradientes altitudinales</i>	152
Tabla 56 <i>Recuento de células en mitosis para la determinación del índice mitótico</i>	155
Tabla 57 <i>Codigos de colección de semillas de Silybum marianum en tres gradientes altitudinales de Cusco-2021</i> .	158
Tabla 58 <i>Semillas de Silybum marianum procedentes de los tres gradientes altitudinales</i>	158
Tabla 59 <i>Rendimiento en la obtención del producto de la semilla de Silybum marianum L.</i>	159

Índice de figuras

Figura 1 Mecanismo antioxidante de <i>Silybum marianum</i> L.	6
Figura 2 Mecanismo antioxidante de la silimarina	7
Figura 3 Actividad antiinflamatoria de la silimarina	8
Figura 4 <i>Silybum marianum</i> L. Gaertner en Cusco	11
Figura 5 Descripción morfológica de <i>Silybum marianum</i> L.	11
Figura 6 Estructura del Aqueño	12
Figura 7 Estructura básica del esqueleto de los flavonoides y sus clases	13
Figura 8 Componentes mayoritarios de Silimarina en <i>Silybum marianum</i> L.	15
Figura 9 Estructura química de silibina A.....	15
Figura 10 Vía de Ácido Shikímico y Corismico	17
Figura 11 Vía metabólica de la silibina	19
Figura 12 HPLC para análisis de silimarina-Cromatograma	23
Figura 13 Espectro UV-Vis de superposición de estándar de silimarina con máximo de absorción a 287 nm	25
Figura 14 FT-IR de silimarina	26
Figura 15 Cariotipo e idiograma de <i>Silybum marianum</i> L.	28
Figura 16 Etapas fenológicas de <i>Silybum marianum</i> L.	32
Figura 17 Mapa de georeferenciación de la Provincia del Cusco	46
Figura 18 Flujograma de la investigación	51
Figura 19 Mapa de georeferenciación de los tres gradientes altitudinales en el valle del Cusco.	53
Figura 20 Huaccoto K'ayra (3207 m.s.n.m.)	54
Figura 21 Terminal de Huancaro (3402 m.s.n.m.)	55
Figura 22 Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (3625 m.s.n.m.)	57
Figura 23 Porcentaje de germinación de semillas de <i>Silybum marianum</i> L.	60
Figura 24 Flujograma de extracción, tamizaje y determinación de contenido de silimarina	63
Figura 25 Prueba de solubilidad del estándar de silimarina	64
Figura 26 Espectrofotómetro de doble haz UV-VIS	65
Figura 27 Espectrómetro FTIR-ATR-BRUKER-ALPHA-2019	66
Figura 28 Sistema de análisis cromatográfico HPLC-DAD OPTIMO Modelo KONIC 560 KONIKRON PLUS	68
Figura 29 Estados fenológicos de <i>Silybum marianum</i> en los tres gradientes altitudinales de Cusco	79
Figura 30 índice mitótico de <i>Silybum marianum</i> L.	81
Figura 31 Observación microscópica - Determinación de índice de metafases en <i>Silybum marianum</i> L.	81
Figura 32 Cromosomas metafásicos de <i>Silybum marianum</i> L. Huaccoto K'ayra	84
Figura 33 Cariotipo de <i>Silybum marianum</i> L. Huaccoto K'ayra	84
Figura 34 Cromosomas metafásicos y cariotipo de <i>Silybum marianum</i> L. Terminal Huancaro.....	86
Figura 35 Cariotipo de <i>Silybum marianum</i> L. Terminal Huancaro	86
Figura 36 Cromosomas metafásicos y cariotipo de <i>Silybum marianum</i> L. Fortaleza Sacsayhuaman	87
Figura 37 Cariotipo de <i>Silybum marianum</i> L. Fortaleza Sacsayhuaman	87
Figura 38 Espectro de superposición estándar de silimarina y silimarina obtenida UV-Visible 287nm	91
Figura 39 Curva de calibración con estándar de silimarina 3,6 y 12 ppm UV-Vis a 287nm	92
Figura 40 Espectro IR-FTHR de estándar de silimarina (30% de silibina) y silimarina extraída en muestra	94
Figura 41 Cromatograma de HPLC-DAD de estándar de 24ppm representativa de silimarina (30% silibina)	97
Figura 42 Perfil espectral 2D de pico a 7.07 min con un máximo de absorbancia a 288nm	98
Figura 43 Espectros de identidad y pureza espectral de los picos cromatográficos por HPLC-DAD	98
Figura 44 Espectros tridimensionales del detector de arreglo de diodos (DAD)	99
Figura 45 Cromatogramas HPLC-DAD de flavonolignanos de silimarina en Huaccoto - K'ayra	100
Figura 46 Pareto de flavonolignanos HPLC-DAD (% Area) Huaccoto K'ayra	101
Figura 47 Cromatogramas HPLC-DAD de flavonolignanos de silimarina Terminal Huancaro	102
Figura 48 Pareto de flavonolignanos HPLC-DAD (% Área) Terminal Huancaro	103
Figura 49 Cromatogramas HPLC-DAD de flavonolignanos de silimarina en Com.Fortaleza Sacsayhuaman	104
Figura 50 Pareto de flavonolignanos HPLC-DAD (% Área) Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman	105
Figura 51 Composición relativa (% Área) de flavonolignanos en tres gradientes altitudinales	106
Figura 52 % p/p de silimarina por condición de semilla	107
Figura 53 Curva de Calibración HPLC-DAD con estándares Silimarina (30% Silibina) a (287nm)	111
Figura 54 Variación del contenido promedio de silimarina (%p/p) en semillas de <i>Silybum marianum</i> L.	113

Figura 55 Fauna y flora acompañante de <i>Silybum marianum</i> L.	146
Figura 56 Temperatura, Humedad y Precipitación pluvial en Haccoto K'ayra 2021	147
Figura 57 Temperatura, Humedad y Precipitación pluvial en Terminal Huancaro 2021	148
Figura 58 Temperatura, Humedad y Precipitación pluvial en Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman 2021	149
Figura 59 Muestras de suelos para análisis físico-químico.....	150
Figura 60 Descripción de los patrones fenotípicos de <i>Silybum marianum</i> y registro de campo	152
Figura 61 Observaciones fenológicas de <i>S. marianum</i> según escala de BBCH	154
Figura 62 Flujograma para la determinación de índice mitótico de <i>Silybum marianum</i> L.	155
Figura 63 Índice mitótico de <i>Silybum marianum</i> L. Figura 64.....	156
Figura 65 Flujograma de análisis cariotípico de <i>Silybum marianum</i> L.	156
Figura 66 Análisis de imágenes fotográficas observadas a 1000x, para organización de cariotipo.....	157
Figura 67 Flujograma de extracción de silimarina a partir de semillas de <i>Silybum marianum</i> L.	160
Figura 68 FTIR-ATR de estándar de silimarina (30% de silibina).....	161
Figura 69 FTIR-ATR de silimarina extraída M14	162

Índice de abreviaturas

ABA	Hormona Abscicina
APX	Ascorbato Peroxidasa
BBCH	<i>Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemische Industrie</i> (Sistema de codificación numérica que describe las Etapas de desarrollo fenológico (crecimiento) de todas las plantas desde su germinación hasta la madurez)
BSEP	Bomba exportadora de sales biliares
CAT	Catalasa
CCR	Cinnamoyl CoA Reductasa
CHI	Chalcona Sintasa Isomerasa
CHS	Chalcona Sintasa
CHS1	Chalcona Sintasa 1
CHS2	Chalcona Sintasa 2
CHS3	Chalcona Sintasa 3
CAT	Catalasa
FT-IR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
FT-IR-ATR	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada
GPS	Global Positioning System (Sistema de posicionamiento global)
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
HCT	Hidroxinamoyl Transferasa
HO-1	Hemo oxigenasa-1
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPLC-DAD	Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta resolución con Espectrometría de Masas
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida de Máxima Selectividad (identificación inequívoca) y sensibilidad
MAE	Extracción Asistida por Microondas
MRP2	Proteína 2 asociada a la resistencia a múltiples fármacos
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NQO1	Quinona deshidrogenasa
Nrf2-ARE	Factor nuclear eritroide 2, relacionado con el factor 2
PAL	Fenilalanina Amino Liasa
POD	Peroxidasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
SOD	Superóxido dismutasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UEA	Extracción Asistida por Ultrasonido

Resumen

Silybum marianum L. Gaertner es una especie medicinal de interés farmacológico por su contenido de silimarina, un complejo de flavonolignanos cuya acumulación puede estar condicionada por factores ambientales. Se evaluaron poblaciones establecidas a 3207, 3402 y 3625 m s.n.m. en el valle del Cusco, integrando caracteres fenotípicos y citogenéticos y fitoquímicos. La caracterización morfológica comprendió altura de planta, número de ramas, número de capítulos y longitud de hoja; el análisis citogenético incluyó recuento cromosómico, morfología e índices cariotípicos, y la silimarina de semillas fértiles e infértiles fue evaluada mediante UV-Vis, FTIR-ATR y HPLC-DAD. La longitud de hoja presentó diferencias significativas entre altitudes ($p=0,003$), mientras que los demás caracteres morfológicos se mantuvieron estables. Las tres poblaciones fueron diploides ($2n = 2x = 34$) y mostraron cariotipos predominantemente metacéntricos y submetacéntricos, sin diferencias citogenéticas significativas. El perfil cromatográfico estuvo dominado por silibina A y silibina B, acompañado de taxifolina, silicristina, silidianina e isosilibinas. El contenido de silimarina varió entre 0,662 y 1,120% p/p, con una tendencia decreciente al aumentar la altitud, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados evidencian plasticidad fenotípica específica, estabilidad citogenética y conservación general del perfil de flavonolignanos en poblaciones altoandinas de *Silybum marianum* L.

Palabras clave: *Silybum marianum*; silimarina, flavonolignanos, gradiente altitudinal.

Abstract

Silybum marianum L. Gaertner is a medicinal species of pharmacological interest due to its silymarin content, a flavonolignans complex whose accumulation may be influenced by environmental conditions. Populations established at 3207, 3402 and 3625 m a.s.l. in the Cusco Valley, Peru, were evaluated by integrating phenotypic, cytogenetic and phytochemical traits. Morphological characterization included plant height, number of branches, number of capitula and leaf length; cytogenetic analysis comprised chromosome counting, chromosome morphology and karyotype indices, whereas silymarin from fertile and infertile seeds was analyzed by UV-Vis, FTIR-ATR and HPLC-DAD. Leaf length differed significantly among elevations ($p = 0.003$), while the remaining morphological traits remained stable. All populations were diploid ($2n = 2x = 34$) and showed predominantly metacentric and submetacentric chromosomes, with no significant cytogenetic differences among altitudes. The chromatographic profile was dominated by silybin A and B, together with taxifolin, silychristin, silydianin and isosilybins. Silymarin content ranged from 0.662–1.120% w/w and showed a decreasing trend with increasing altitude, although differences were not statistically significant. Overall, the results reveal trait-specific phenotypic plasticity, cytogenetic stability and general conservation of the flavonolignan profile in high-Andean populations of *Silybum marianum* L.

Keywords: *Silybum marianum*; silymarin; flavonolignans; altitudinal gradient.

Introducción

Silybum marianum L. Gaertner (cardo Mariano) es una especie herbácea perteneciente a la familia de las Asteráceas, naturalizada en el valle del Cusco, ampliamente distribuida, y utilizada en la medicina tradicional y fitoterapia moderna por su alto contenido de silimarina, un complejo de flavonolignanos (principalmente silibina, isosilibina, silidianina, silicristina y taxifolina) con reconocidas propiedades hepatoprotectoras, antioxidantes y antiinflamatorias. En las últimas décadas, el interés científico por esta especie se ha incrementado no solo por su valor farmacológico, sino también por su potencial de adaptación a condiciones ambientales extremas y su capacidad para acumular metabolitos secundarios de interés industrial.

La producción de metabolitos secundarios en plantas está fuertemente influenciada por factores ambientales. Diversos estudios han evidenciado que variables como la altitud, temperatura, humedad relativa, radiación solar y condiciones edáficas pueden modificar los patrones fenotípicos y el metabolismo secundario de las plantas, actuando como desencadenantes de respuestas adaptativas. Sin embargo, en *Silybum marianum* L. persiste vacío de información respecto a cómo estos factores interactúan para modular el contenido de silimarina en poblaciones silvestres altoandinas. Así mismo, aunque existen reportes citogenéticos que conforman su condición diploide ($2n=2x=34$) no se ha explorado la posible relación entre la variabilidad cromosómica y la acumulación de silimarina en distintos gradientes altitudinales.

En este contexto, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar los patrones fenotípicos, citogenéticos y el contenido de silimarina en poblaciones de *S. marianum*, localizadas en tres gradientes altitudinales del valle del Cusco a 3207, 3402, 3525 metros sobre el nivel de mar (m.s.n.m.) y establecer correlaciones entre dichas variables y la altitud. Se planteó como hipótesis que la altitud influye directamente en la expresión fenotípica y citogenética de *Silybum marianum* L. y en consecuencia en su contenido de silimarina. Los resultados obtenidos permiten discutir el papel relativo de los factores micro ambientales y genotípicos en la síntesis de metabolitos secundarios, aportando información clave para futuros programas de mejoramiento, conservación y aprovechamiento sostenible de esta especie en ecosistemas andinos.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1. Planteamiento del problema

Silybum marianum L. Gaertner, conocido como cardo mariano, es una especie medicinal naturalizada en el Perú y presente en el Cusco, donde se distribuye a lo largo de gradientes altitudinales con condiciones ambientales contrastantes, como la temperatura ambiental, disponibilidad hídrica, características del suelo, que pueden inducir respuestas adaptativas en las plantas, expresadas como cambios fenotípicos, variación citogenética, modificaciones en la fenología y alteraciones en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

El cardo mariano es cultivado con fines farmacéuticos en diversos países, muy valorado en la medicina europea por más de dos mil años debido a su contenido de silimarina, un complejo de flavonolignanos asociado a efectos antioxidantes, antiinflamatorios y hepatoprotectores. (Abenavoli et al., 2018a)

Si bien existen numerosos estudios fitoquímicos y farmacológicos sobre *Silybum marianum* L. en poblaciones de Europa y Asia, en el contexto andino y específicamente en el Cusco, persiste una brecha de conocimiento que establezca con claridad si la altitud se asocia a diferencias significativas en el fenotipo, la citogenética y el contenido de silimarina de las poblaciones locales.

Esta ausencia de evidencia integrada limita, por un lado, la comprensión del potencial adaptativo y la variabilidad intraespecífica del cardo mariano en ambientes andinos y por otro, dificulta sustentar criterios técnicos para su aprovechamiento farmacológico, así la altitud emerge como un factor ambiental clave que modula la expresión morfológica, la dinámica fenológica, la variabilidad genética y biosíntesis de metabolitos secundarios de las plantas. En congruencia con ello, se ha documentado que los gradientes altitudinales regulan la producción de compuestos bioactivos en otras especies medicinales, lo que refuerza la hipótesis de un efecto altitudinal sobre el perfil fitoquímico del cardo mariano en la región (Guevara-Terán et al., 2024).

En consecuencia, se requiere una evaluación comparativa en gradientes altitudinales del Cusco que articule el análisis fenotípico, la caracterización citogenética, el seguimiento fenológico y la cuantificación de silimarina, a fin de determinar si la altitud

constituye un factor determinante en la variabilidad biológica y fitoquímica en el contenido de silimarina de esta especie.

1.2. Formulación del problema.

a. Problema general

¿Cómo influye la altitud geográfica (3 200, 3 400 y 3 600 m.s.n.m.) en los patrones fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina en *Silybum marianum* L. Gaertner en Cusco?

b. Problemas específicos

- ¿Qué diferencias fenotípicas (morfología y fenología) presenta *Silybum marianum* L. entre los tres gradientes altitudinales?
- ¿Existen diferencias citogenéticas (cariotipo) de *Silybum marianum* L. asociadas a la altitud?
- ¿Cómo varía el contenido de silimarina en las semillas de *Silybum marianum* L. en función a la diferencia altitudinal?
- ¿Qué relación existe entre los patrones fenotípicos, citogenéticos y el contenido de silimarina en función de la altitud?

1.3. Justificación de la investigación

La presente investigación presenta un carácter relevante ya que busca generar conocimiento integral sobre la variabilidad de *Silybum marianum* L. Gaertner en el contexto altitudinal andino, integrando componentes fenotípicos, fenológicos, citogenéticos y contenido de silimarina, esta aproximación multidimensional permitirá identificar patrones de adaptación a diferentes altitudes, lo cual es un factor importante en el aprovechamiento farmacológico sostenible así como para la conservación de la diversidad genética de esta especie.

En las regiones altoandinas del departamento del Cusco, *Silybum marianum* L., conocido como cardo mariano crece de forma espontánea, considerada como planta ruderal y ofrece un alto potencial para el desarrollo de fármacos y nutraceuticos. A nivel mundial, esta planta es valorada por su contenido de silimarina, un complejo de flavonolignanos con actividades hepatoprotectoras, antioxidantes y antiinflamatorias,

(Abenavoli et al., 2018) pero en el contexto andino sus características morfológicas, citogenéticas y químicas aún no se han evaluado en función de la altitud.

Los gradientes altitudinales determinan variaciones en temperatura, radiación UV, disponibilidad hídrica y presión atmosférica, presiones selectivas que suelen inducir adaptaciones fenotípicas, cambios en el cariotipo y fluctuaciones en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Körner, 2007; Shim et al., 2023). Estudios en otras especies medicinales han documentado que la altitud modula la fenología, la morfología foliar y la acumulación de flavonoides (Liang, 2019, AbouZid et al., 2016), pero estos hallazgos no se han validado en *Silybum marianum* L. en Perú.

En ese sentido caracterizar patrones fenotípicos, citogenéticos y la concentración de silimarina en tres gradientes altitudinales de 3 200, 3 400 y 3 600 m.s.n.m., permitirá comprender la plasticidad adaptativa de la especie en condiciones andinas, fundamentar programas de conservación y selección de ecotipos con alto rendimiento de silimarina, optimizar protocolos de cultivo y extracción para aplicaciones farmacéuticas y nutraceuticas.

Por otro lado, describir las etapas fenológicas de *Silybum marianum* L. mediante la escala de BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie) aportará rigurosidad y comparabilidad al ciclo de vida de la planta. La codificación BBCH de dos y tres dígitos de las fases más representativas, serán una herramienta clave para el manejo agronómico, el control de malezas y futuros programas de mejoramiento (Martinelli et al., 2015).

Finalmente, la caracterización citogenética es esencial para evaluar la estabilidad genómica de las poblaciones vegetales, un aspecto clave en la domesticación y la producción estandarizada de fitofármacos (Tolangi et al., 2024). En conjunto, esta investigación llenará un vacío en la bibliografía local sobre el potencial adaptativo y medicinal de *Silybum marianum* L. en ecosistemas altoandinos, promoviendo su aprovechamiento ecológico, biotecnológico y etno-farmacológico.

1.4. Objetivos de la investigación

a. Objetivo general

Evaluar patrones fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina de *Silybum marianum* L. Gaertner, en tres gradientes altitudinales del Cusco.

b. Objetivos específicos

- Caracterizar los rasgos fenotípicos (morfología y fenología) de *Silybum marianum* L., a 3200, 3400 y 3600 m.s.n.m.
- Determinar el cariotipo de *Silybum marianum* L., a partir de semillas procedentes de cada altitud.
- Cuantificar el contenido de silimarina en las semillas de *Silybum marianum* L. mediante HPLC-DAD (Cromatografía líquida de alta eficiencia, con detección de arreglo de diodos).
- Evaluar, mediante análisis estadístico multivariante y correlacional, las relaciones entre los patrones fenotípicos, citogenéticos y el contenido de silimarina en función a la altitud.

CAPITULO II

MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1. Bases teóricas

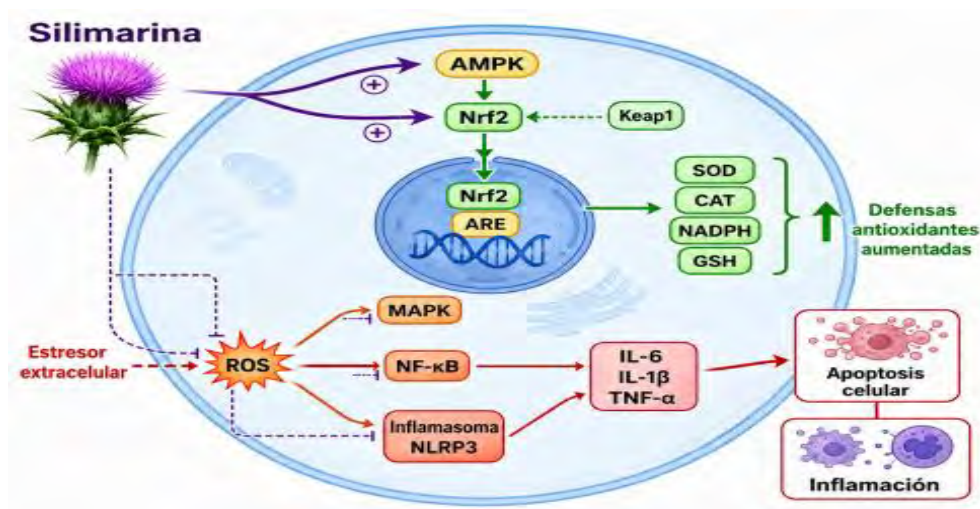
2.1.1. *Silybum marianum* L. Gaertner

Silybum marianum L. Gaertner, conocido como “cardo bendito” o “cardo mariano”, es una planta medicinal originaria del Mediterráneo, ampliamente distribuida en regiones templadas y usada tradicionalmente por sus propiedades hepatoprotectoras. Su principio activo más importante es la silimarina, un complejo de flavonolignanos (silibina, silidianina, silicristina, isosilibina y taxifolina) que actúa como antioxidante, antiinflamatorio y regenerador hepático (Abenavoli et al., 2018a).

Desde el punto de vista antioxidante, la silimarina actúa mediante mecanismos directos e indirectos, presenta capacidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), reduciendo peroxidación lipídica en membranas celulares y mitocondriales de los hepatocitos. Atribuible a la estructura fenólica de sus flavonolignanos, que permite la donación de electrones y la estabilización de radicales libres, en paralelo la silimarina incrementa los niveles intracelulares de glutatión reducido (GSH) y estimula la actividad de enzimas antioxidantes endógenas por el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), reforzando el sistema de defensa antioxidante celular. (Aghemo et al., 2022; García-Muñoz et al., 2024)

Figura 1

Mecanismo antioxidante de Silybum marianum L.

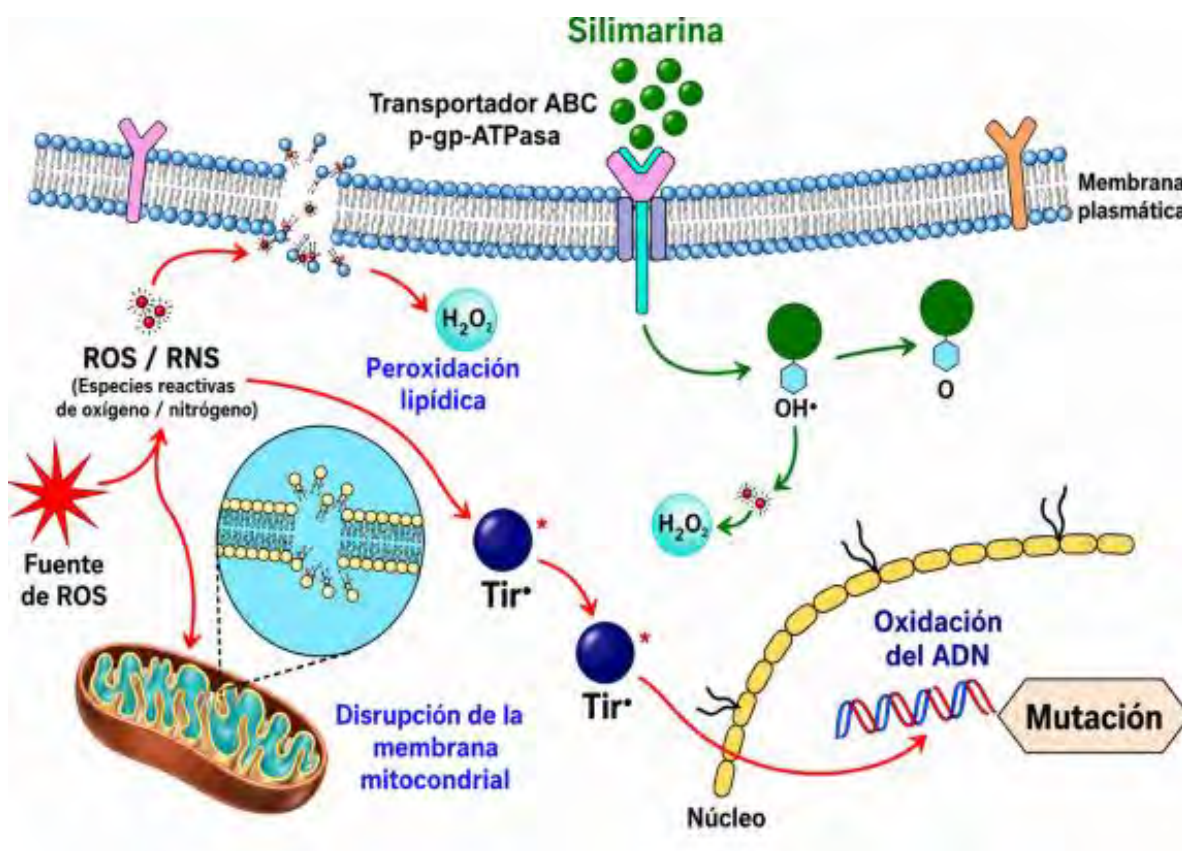


Nota: Tomado de García-Muñoz et al., (2024)

En el mecanismo antioxidante la activación de la vía Nrf2-ARE (factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2, responsable de la respuesta antioxidante), la silimarina favorece la traslocación nuclear del Nrf2 y la posterior expresión de genes citoprotectores como HO-1 (hemo oxigenasa-1) y NQO1 (NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1) que desempeñan un papel en la detoxificación celular y la protección frente al daño oxidativo.(Mardani-Nafchi et al., 2025; Sayyad et al., 2025).

Figura 2

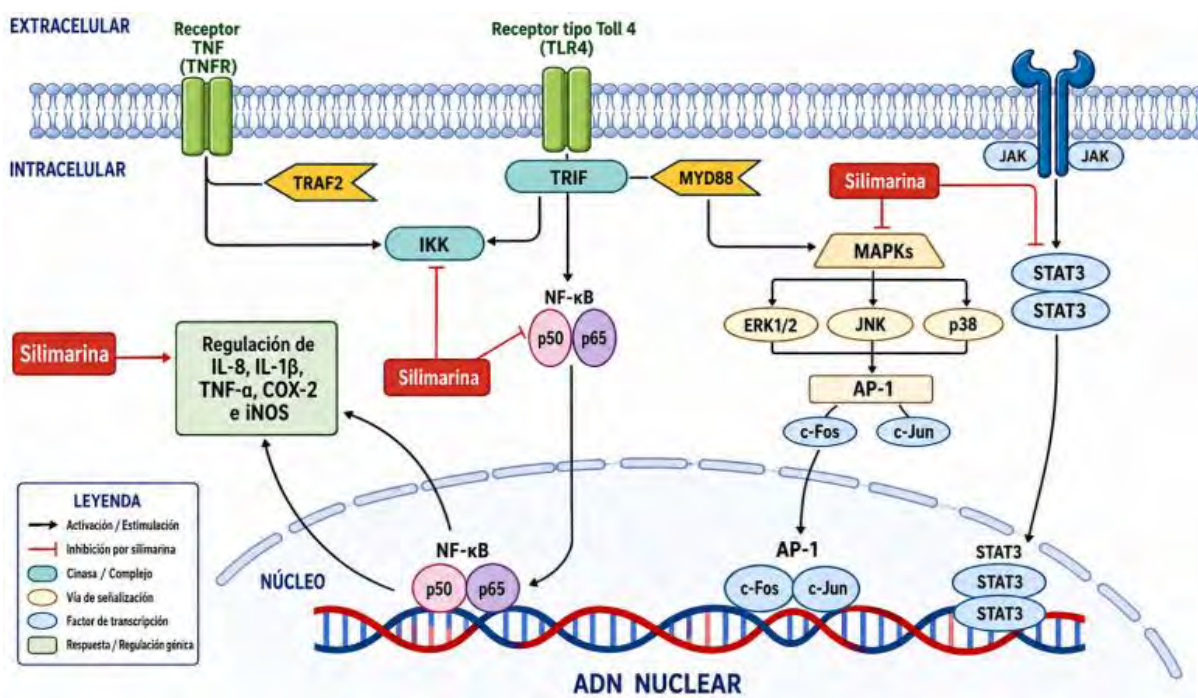
Mecanismo antioxidante de la silimarina



Nota: La silimarina neutraliza directamente las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), al prevenir el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Tomado de Sayyad et al., (2025)

La actividad antiinflamatoria se basa en la inhibición de la vía NF-κB (factor nuclear kappa B), un regulador clave en la respuesta inflamatoria. Al reducir la activación de NF-κB, se disminuye la transcripción de citocinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucina-1 beta (IL-1β) e interleucina-6 (IL-6), así como la expresión de enzimas proinflamatorias como óxido nítrico sintasa inducible (Inos) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Gillessen et al., 2022; Zhao et al., 2024).

Figura 3
Actividad antiinflamatoria de la silimarina



Nota: La silimarina mejora la inflamación al inhibir la activación de NF-Kb, MAPK, JAK-STAT3 y otras vías e induce la regulación de la secreción de factores inflamatorios. Tomado de Zhao et al., (2024).

Ambos efectos antioxidantes y antiinflamatorios explican la marcada acción hepatoprotectora de la silimarina. A nivel celular, este compuesto disminuye el daño inducido por toxinas, alcohol, fármacos y agentes colestásicos, preservando la integridad de las membranas de los hepatocitos y reduciendo la apoptosis. Así mismo, se ha demostrado que la silimarina protege la función de transportadores de canales clave para la secreción biliar, como BSEP (Bomba exportadora de sales biliares) y MRP2 (proteína 2 asociada a la resistencia a múltiples fármacos), lo que resulta particularmente relevante en modelos experimentales de colestasis (Crocenzi & Roma, 2006).

La atenuación del estrés oxidativo crónico y la inflamación persistente por parte de la silimarina equivale a la reducción de la activación de células estrelladas hepáticas, limitando la deposición de matriz extracelular y por ende la progresión de la fibrosis hepática. Estos mecanismos posicionan a la silimarina como fitocompuesto de valor terapéutico en las enfermedades hepáticas (Dhande et al., 2024).

Posición taxonómica

Dominio : Eukaryota

Reino : Plantae

Phylum : Trachaeophyta

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliposida

Orden : Asterales

Familia : Asteraceae

Sub familia : Carduinae

Género : *Silybum*

Especie : *Silybum marianum* (Linneus) Gaertner, 1791

Cronquist, 1981.

(Anexo 4 identificación taxonómica de la especie)

Nombres comunes: Cardo mariano, cardus marianus, cardo variegado, cardo de Santa María, cardo mariano mediterráneo, alcachofa silvestre, corona de Cristo, cardo de Nuestra Señora, cardo de venus, cardo curativo, abrepuño, alcachofa, cardo de argolla, cardo blanco, cardo borde, cardo borriquero, cardo lechero, cardo manchado, cardo capotero, cardo pelotero, cardo pinto, cardo platero, entre otros (Eskandari Nasrabadi et al., 2014; Porwal et al., 2019)

2.1.2. Distribución geográfica y hábitat

Silybum marianum L. Gaertner, es originaria de la región mediterránea (sur de Europa, oeste de Asia y norte de África). Se ha naturalizado en partes de Europa, América del Norte, América del Sur (Perú, Argentina, Chile), Australia y Nueva Zelanda. En la actualidad la planta se ha extendido por todo el mundo. Se considera planta introducida y naturalizada en el centro y norte de Europa, Macaronesia, Azores, Madera y Canarias, América y Australasia. Casi toda la Península Ibérica y Baleares (Marceddu et al., 2022).

En condiciones naturales, crece como maleza invasiva de clase A, comúnmente es denominado especie ruderal, se propaga fácilmente a los campos cultivados, facilitado por su notable producción de semillas, su fácil dispersión por el viento y su viabilidad. Puede encontrarse en ambientes fértiles y muy alterados (por ejemplo, pastizales o campos de ovejas dotados de altos niveles de nitrógeno en el suelo), pero también en lugares antropizados como los bordes de cultivos, caminos, carretera, baldíos, cardunales,

escombreras, barbechos y orillas de campos, pueden ser muy agresivas y competitivas con los cultivos en muchas zonas cultivadas, tanto en climas más cálidos (donde las temperaturas rara vez caen por debajo de 0 °C), como en regiones muy frías. Su hábitat se desarrolla en bordes, en suelos muy nitrificados, indiferente edáfica entre 0-1300 m. de altitud, hemicriptófito bienal. Las poblaciones suelen estar aisladas entre sí, pero son vigorosas, sin problemas de conservación (Porwal et al., 2019).

2.1.3. Descripción Botánica.

Silybum marianum L. Gaertner, es una planta herbácea anual o bienal con una altura de 1 a 2.5 m. Los tallos son erectos, rayados y multiformes, ramificados, con pelos finos escasos o sin pelos. Presentan una roseta basal de sus hojas y los tallos inferiores. Las hojas tienen pecíolos, con forma ovalada o lanceolada invertida, de unos 0,5 m de largo y 0,3 m de ancho, la forma del margen de la hoja es de lóbulos plumosos poco profundos o completo. Los tallos y las hojas de las partes media y superior son pequeños, la forma de la hoja es lanceolada u ovada larga, el margen de la hoja es pinnado con grieta poco profunda y el borde es poco profundo ondulado con grieta dentada redonda, la base es gradualmente puntiaguda y en forma de corazón, los tallos y las hojas superiores son pequeños, indivisos, lanceolados, y la base amplexicaule muestra forma de corazón. Las hojas de color verde variegado y el blanco son glabros, de textura fina y con bordes con agujas amarillas duras de unos 5 mm de largo. La planta presenta un capítulo grande, y las brácteas miden 3-5 cm de largo, son esféricas u ovoides. Las capas medias y externas de las brácteas enteras son de ovales a lanceoladas, con agujas en la parte superior y el borde, y sin agujas en el borde de la base. La parte superior puede tener inserciones duras, y sus bordes y bases tienen espinas afiladas, de unos 1-2 mm de longitud, y las espinas afiladas de la parte superior miden unos 5 mm de longitud; las brácteas de la capa interna son lanceoladas, de unos 25-30 mm de longitud. Las brácteas no tienen bordes aciculares, ni inserciones apicales, y el ápice es puntiagudo (Zhang et al., 2024)

Figura 4

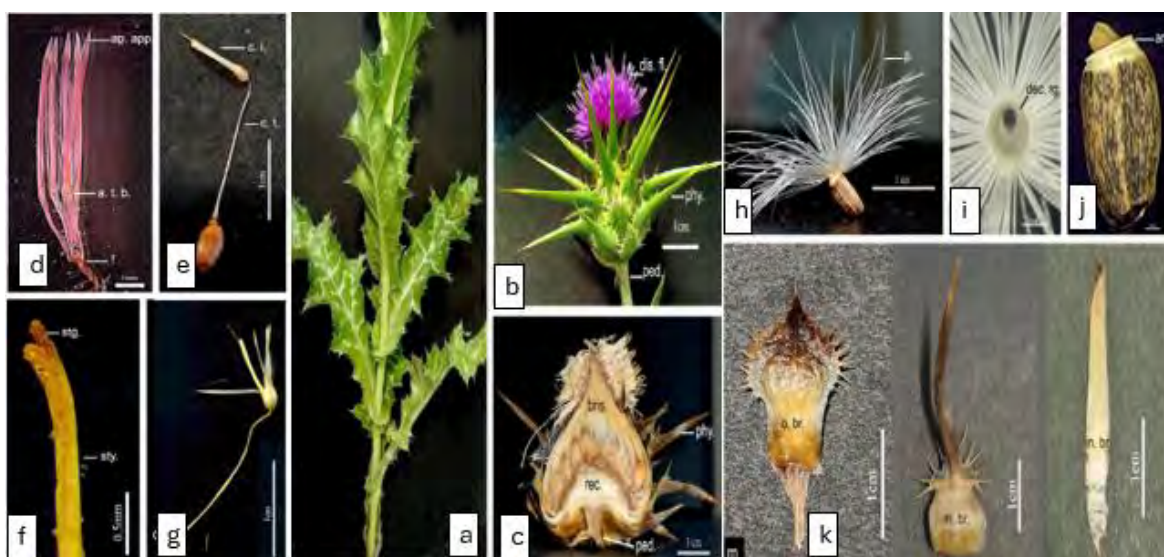
Silybum marianum L. Gaertner en Cusco



Nota: a) Planta b) Flor c) semilla

Figura 5

Descripción morfológica de *Silybum marianum* L.



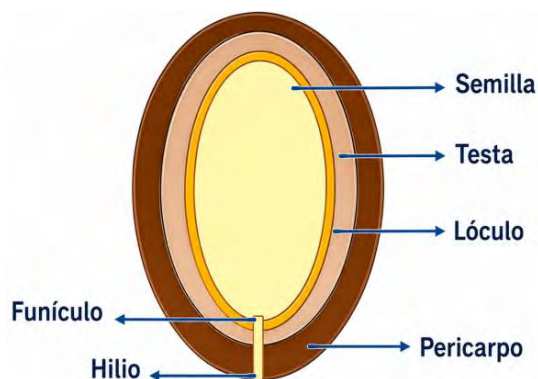
Nota: a) Hojas b) Capítulo c) Sección vertical del capítulo d) Androceo e) Flósculo del disco sin vilano f) Parte distal del estilo con estigma g) Corola h) Cipsela i) Vello j) Aquenio k) Brácteas externa, media e interna. Tomado de (Sharma, 2023)

Las flores son principalmente de color rojo púrpura, con un toque de blanco, de unos 30 mm de largo, y la sección tubular delgada mide unos 20 mm de largo. El filamento es grueso y corto. **Los aquenios** son aplanados, de color marrón y finamente elipsoidales, de unos 6-8 mm de largo y 2-3 mm de ancho, con manchas o rayas de color marrón oscuro. En el extremo superior puede observar una protuberancia cartilaginosa, anular de color amarillento, vilano con un promedio de 100 cerdas blanquecinas, desiguales, de 1.2 a 2.0

cm de largo. Son inodoras, sabor aceitoso y amargo. El período de floración y fructificación es de mayo a agosto (Bijak, 2017; Zhang et al., 2024; Sharma, 2023).

Figura 6

Estructura del Aquenio



Nota: Estructura de aquenio típico de asteráceas

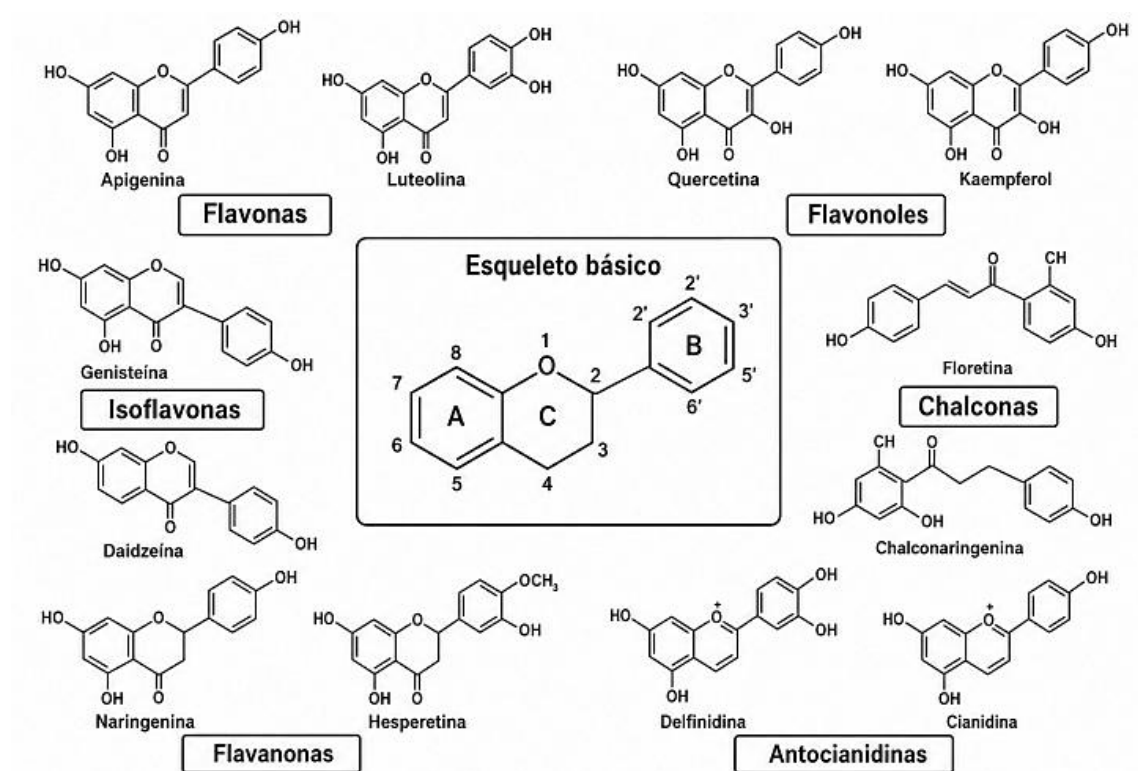
2.1.4. Metabolismo secundario de *Silybum marianum* L. Gaertner

El metabolismo secundario en las plantas comprende la síntesis de compuestos que, a diferencia de los metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos), no son imprescindibles para la supervivencia inmediata de la célula vegetal, pero cumplen funciones ecológicas esenciales, como la defensa contra herbívoros, la protección frente a estrés abióticos, la atracción de polinizadores o la inhibición de competidores. Entre los metabolitos secundarios se incluyen grupos como alcaloides, terpenos y fenólicos. (Martinelli et al., 2017).

Los flavonoides constituyen una de las familias más extensas y diversas de los compuestos fenólicos en plantas, estructuralmente poseen un esqueleto de C₆-C₃-C₆, conformado por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una cadena heterocíclica, en este grupo incluye subclases bien definidas (flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, flavanoles (catequinas) y antocianinas), distribuidas en frutas, verduras, leguminosas y flores, cumplen funciones biológicas de protección frente a radiación UV, atracción a polinizadores, defensa frente a patógenos. Su biosíntesis se origina principalmente a partir de la vía del Ácido Shikímico y la vía de los fenilpropanoides, con participación de la sintasa chalcona y enzimas asociadas (Panche et al., 2016)

Figura 7

Estructura básica del esqueleto de los flavonoides y sus clases



Nota: Tomado de Panche et al. (2016)

Los flavonolignanos representan un grupo más restringido y especializado de polifenoles, resultantes de la conjugación de un flavonoide y un lignano, son relativamente poco comunes en el reino vegetal. Estructuralmente se caracterizan por la unión covalente entre un flavonoide (generalmente un flavanonol como la taxifolina) y un derivado lignano o monolignol (alcohol coniferílico). Esta combinación le confiere una estructura compleja (Abenavoli et al., 2018a)

En *Silybum marianum* L., los flavonolignanos constituyen el principio activo denominado silimarina, un complejo de isómeros bioactivos. La silimarina se acumula principalmente en los frutos (aquenio o semillas) de esta especie, alcanzando allí su mayor concentración, de hecho, las semillas de *Silybum marianum* L. son la fuente principal de silimarina utilizada farmacológicamente (Eskandari Nasrabadi et al., 2014)

La silimarina representa entre el 1,5% y el 3% del peso seco del fruto, los principales representantes de este grupo presentes en la silimarina son silibina A y B, isosilibina A y B, silicristina, isosilicristina, silidianina y la silimonina. La composición química del fruto del cardo mariano, además de flavonolignanos, incluye otros flavonoides (como taxifolina, quercetina, dihidrokaempferol, kaempferol, apigenina,

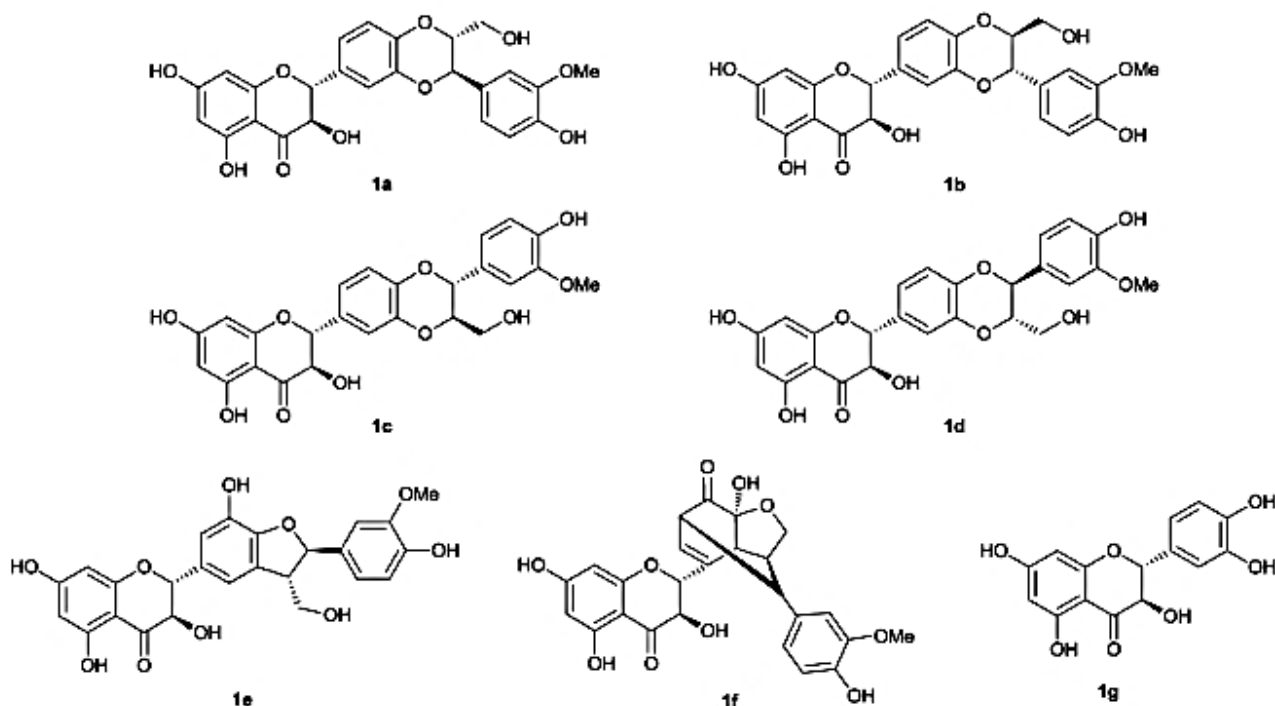
naringina, eriodictiol y crisoeriol), 5,7-dihidroxicromona, alcohol deshidroconiferílico, aceite fijo (60% de ácido linoleico; 30% de ácido oleico; 9% de ácido palmítico), tocoferol, esteroides (colesterol, campesterol, estigmasterol y sitosterol), azúcares (arabinosa, ramnosa, xilosa y glucosa) y proteínas. Sin embargo, la mayor concentración, que representa aproximadamente el 50-70% del extracto, es la silibina, el principal componente bioactivo del extracto, confirmado en diversos estudios (Aziz et al., 2021). Cada uno de estos componentes presenta actividades biológicas semejantes, destacando la silibina por ser cuantitativamente dominante y por mostrar la mayor actividad hepatoprotectora (Giuliani et al., 2018).

Tabla 1
Flavonolignanos y fenoles en Silybum marianum L. Gaertner

Compuesto	% aproximado en extracto de Silimarina	Matriz	Método Analítico	Referencia
Flavonolignanos				
Silibina A / Silibina B	50-60%	Frutos (semillas)	HPLC-UV (288nm)	(Abad-Gil et al., 2025; Aziz et al., 2021)
Isosilibina A / Isosilibina B	5-10%	Semillas	LC-ESI/MS Comparación con estándares	(Chambers et al., 2017)
Silicristina A/B	10-15%	Frutos	HPLC con calibración qNMR	(Giuliani et al., 2018)
Isosilicristina	3-6%	Semillas	HPLC-DAD/LC-MS	(Biedermann et al., 2014)
Silidianina	5-10%	Frutos (semillas)	UHPLC-MS/MS	(Muchiri & van Breemen, 2024)
2,3-Dehydrosilibina / 2,3-Dehidrosilicristina	1-3%	Extracto comercial de semillas	HPLC-DAD / LC-MS	(Biedermann et al., 2014)
Silimonina	1-2%	Extracto etanólico de semillas	HPLC-DAD cuantitativo	(Zhang et al., 2024)
Flavonoides				
Taxfolina (dehidroquercetina)	10-20%	Flores y frutos	HPLC-UV (290nm)	(Lv et al., 2017)
Quercetina	1-3%	Semillas y hojas	LC-MS / MS / HPLC-DAD	(Abenavoli et al., 2018)
Kaempferol	1-2%	Semillas	LC-MS / MS Cualitativo	(Abenavoli et al., 2018)
Epicatequina	<1%	Hojas jóvenes y flores	HPLC-DAD (330nm)	(Zhang et al., 2024)

Figura 8

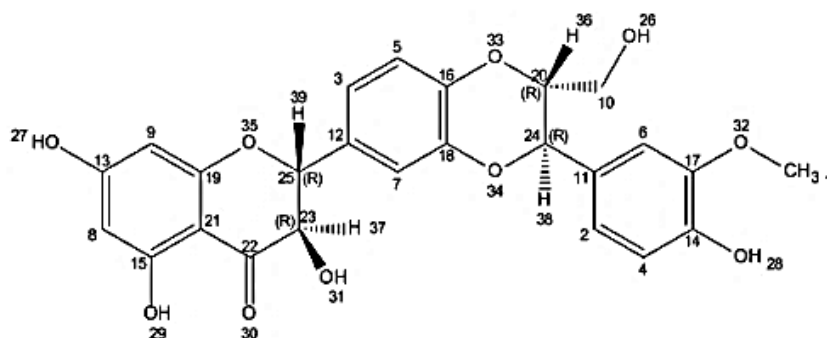
Componentes mayoritarios de Silimarina en Silybum marianum L. Gaertner



Nota: Silibina A (1a), silibina B (1b), isosilibina A (1c), isosilibina B (1d), silicristina A (1e), silidianina (f) y Taxifolina (1g). Tomado de Biedermann et al. (2014).

Figura 9

Estructura química de silibina A



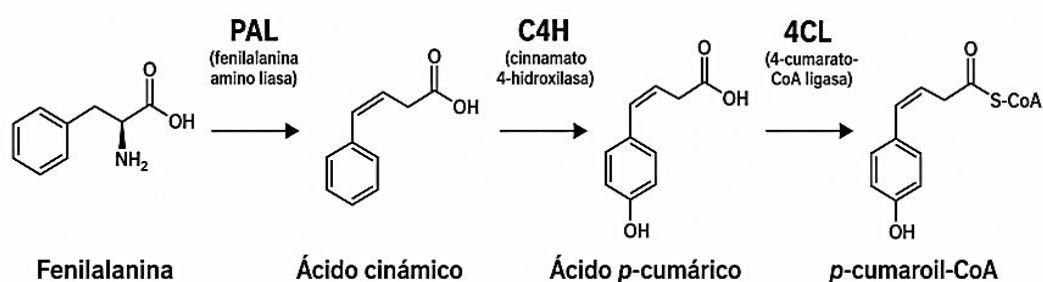
Nota: Flavonolignano mayoritario de *Silybum marianum* L. Tomado de Bijak, (2017)

La variación en la composición de la mezcla de silimarina y su contenido de flavonolignanos está altamente influenciada por diversos factores intrínsecos y extrínsecos de *Silybum marianum* L. incluyendo el genotipo, el cultivar, el origen geográfico (tipo de suelo y clima) y las condiciones agronómicas (época de siembra, riego, fertilización, postcosecha, madurez). Sin embargo, hasta la fecha, no existe una

evaluación clara de los perfiles completos de flavonolignanos en diversas preparaciones de silimarina (Marmouzi et al., 2021)

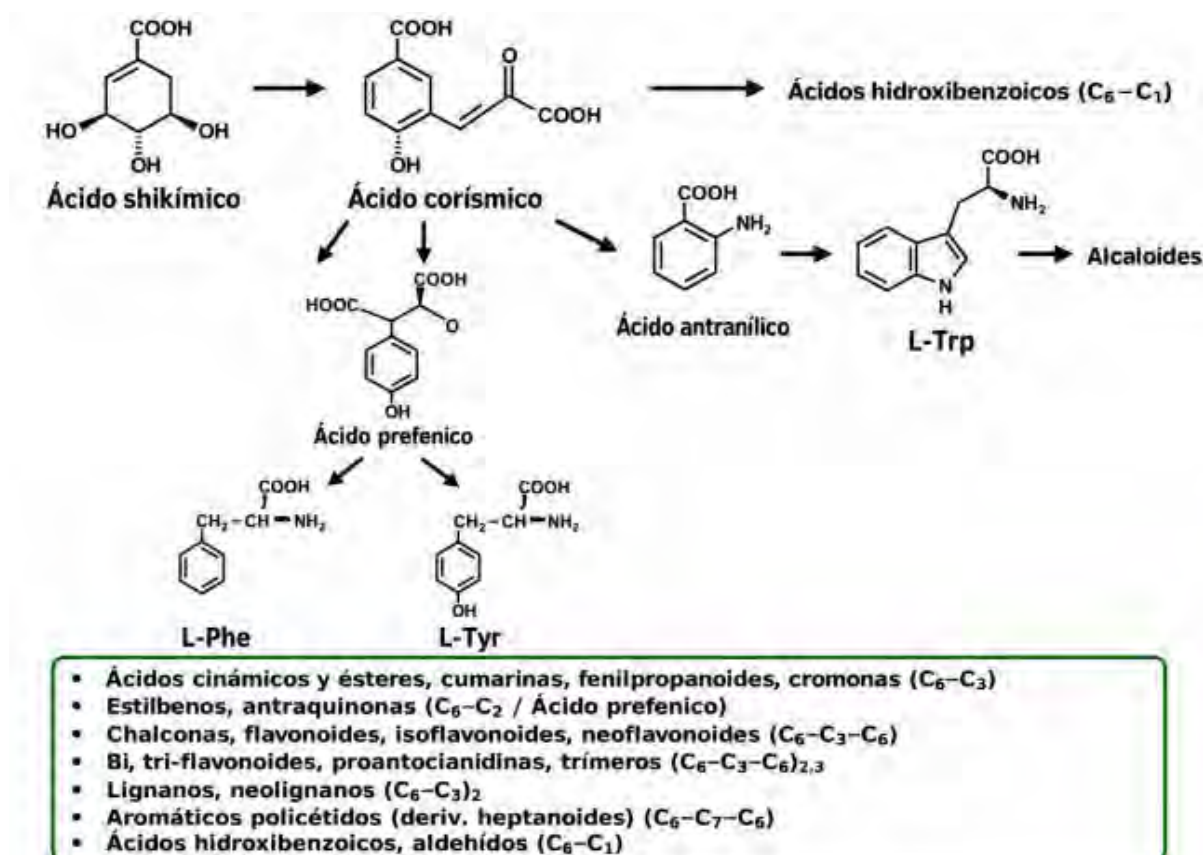
2.1.5. Síntesis de flavonoides y flavonolignanos

El inicio de la síntesis de los flavonoides y flavonolignanos inicia en los cloroplastos y el citoesqueleto del retículo endoplasmático, donde la fenilalanina, producto de vía del shikimato es convertido por la fenilalanina amino-liasa (PAL) en ácido cinámico, que luego es hidroxilado y activado por C4H y 4CL, generando 4-cumaril-CoA, el punto de partida de la biosíntesis de flavonoides y lignanos (Liu et al., 2021).



Los flavonolignanos de la silimarina, se forman por la unión entre taxifolina (derivado flavonoide) y fenilpropanoides como alcohol coniferílico. Este proceso ocurre mediante una reacción de radicales libres mediada por peroxidasas, siguiendo la vía de los fenilpropanoides, cuya base es la vía del Ácido Shikimico y corísmico (figura 6), la ruta provee los aminoácidos aromáticos esenciales como la fenilalanina (L-Phe) y tirosina (L-Tyr), precursores clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos (Santos-Sánchez et al., 2019).

Figura 10
Vía de Ácido Shikímico y Corísmico



Nota: Los ácidos shikímico y corísmico son precursores comunes de la síntesis de L-fenilalanina (L-Phe), L-tirosina (L-Tyr) y L-triptófano (L-Trp), así como compuestos fenólicos. Tomado de Santos-Sánchez et al., (2019)

Según Elateeq et al., (2020) la biosíntesis de los flavonolignanós de la silimarina integra de manera coordinada la vía del fenilpropanoides y la biosíntesis de flavonoides, combinando precursores derivados de fenilalanina y malonil-CoA para generar así los compuestos bioactivos característicos del cardo mariano que se describe a continuación:

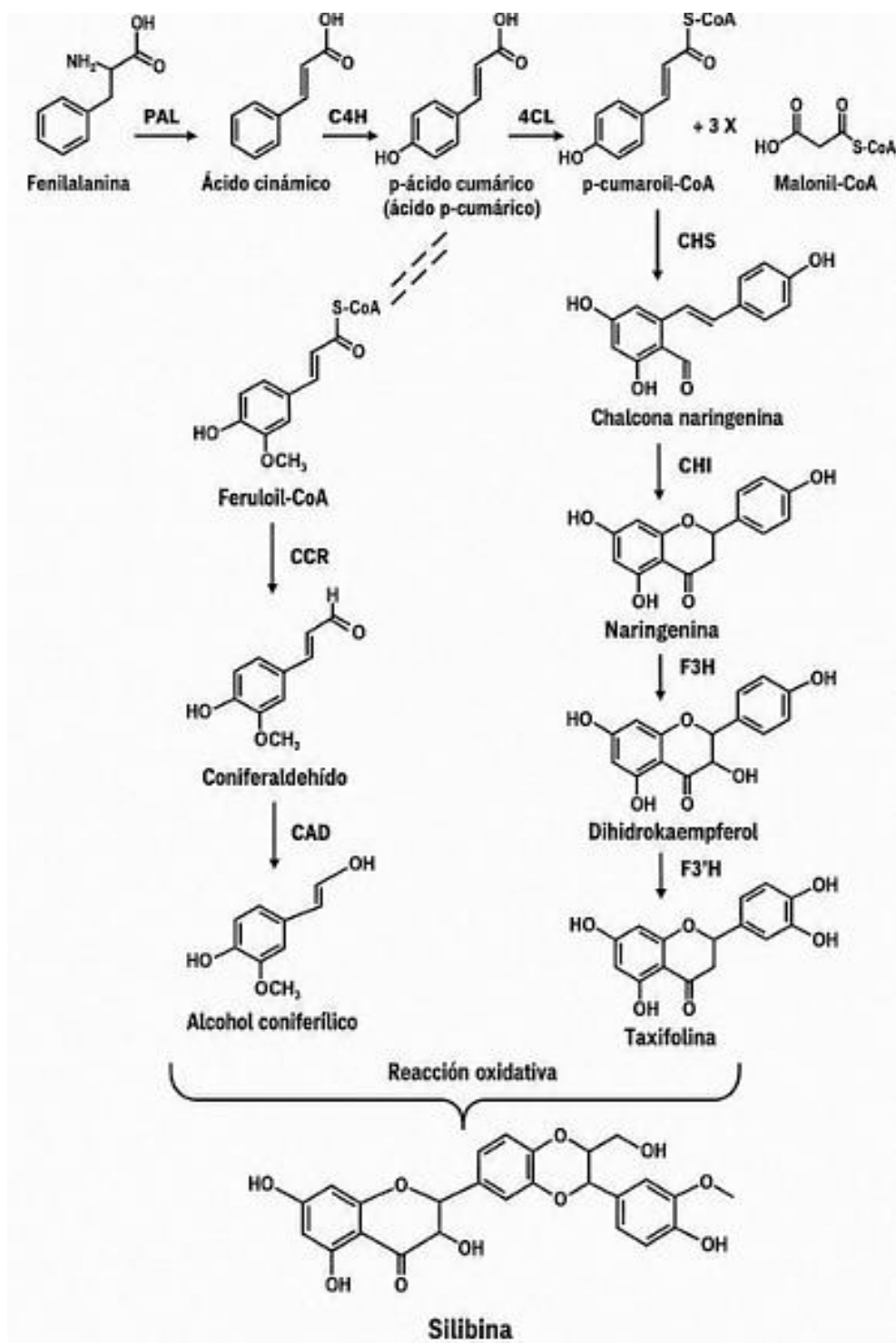
Vía del alcohol coniferílico: La L-fenilalanina, derivada de la vía del shikímico es desaminada por la fenilalanina amonio liasa (PAL), dando lugar al ácido cinámico. El ácido cinámico es hidroxilado en posición 4 por el cinamato 4-hidroxilasa (C_4H) para formar ácido p-cumárico. Posteriormente la 4 cumarato-CoA ligasa (4CL) activa este compuesto mediante su unión a coenzima A, originando p-cumaroil-CoA. El p-cumaroil-CoA es transformado por cafeoil-CoA mediante la acción coordinada de la hidroxycinamoil-CoA:shikimato hidroxycinamoil transferasa (HCT) y la p-cumarato 3'-hidroxilasa ($C_3'H$). La cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasa (CCoAOMT) cataliza la

metilación del cafeoil-CoA, formando feruloil-CoA. Finalmente, la cinamoil-CoA reductasa (CCR) reduce el feruloil-CoA a coniferaldehído, que posteriormente es reducido por el alcohol cinámico deshidrogenasa (CAD) para producir alcohol coniferílico.

Vía de la taxifolina: Una molécula de p-cumaroil-CoA se condensa con tres moléculas de malonil-CoA mediante la acción de la chalcona sintasa (CHS), formando inicialmente una chalcona. La chalcona isomerasa (CHI) cataliza posteriormente la ciclación de esta chalcona para producir naringenina. La flavanona 3-hidroxilasa (F3H) hidroxila la naringenina y origina dihidrokaempferol. Posteriormente, el flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) introduce un grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo B del dihidrokaempferol, formando taxifolina, también denominada dehidroquercetina.

Acoplamiento oxidativo: Durante la maduración del achenio, particularmente en el Pericarpo, la taxifolina y el alcohol coniferílico participan en reacciones de oxidación que generan intermediarios radicalarios. Estos radicales experimentan un acoplamiento oxidativo, mediado principalmente por peroxidasas y posiblemente por lacasas, dando origen a los diferentes flavonolignanos que constituyen la silimarina.

Figura 11
Vía metabólica de la silibina



Nota: PAL: fenilalanina amonioliasa; C4H: cinamato 4-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato:CoA ligasa; CCR: cinamoil CoA reductasa; CAD: cinamil alcohol deshidrogenasa; CHS: chalcona sintasa; CHI: chalcona isomerasa; F3H: flavanona 3-hidroxilasa; F3'H: flavonoide 3'-hidroxilasa de flavonoides. Tomado de Elateeq et al. (2020)

Regulación y localización

- La síntesis de silimarina ocurre “in situ” en el pericarpo durante la maduración del fruto, regulada por la actividad de PAL, CHS y peroxidasa, y posiblemente bajo el control de la hormona abscisina (ABA) (Tolangi et al., 2024)
- La taxifolina se produce en la flor y se transfiere al pericarpo, mientras que el alcohol coniferílico está presente en toda la planta; los flavonolignanos acaban acumulándose especialmente en la envoltura del fruto y el embrión (Lv et al., 2017)

Complejidad estructural

- El acoplamiento oxidativo puede dar lugar a múltiples regioisómeros y diastereoisómeros (silibina A/B, isosilibina A/B, silicristina, isosilicristina, silidianina), cuya proporción depende de la disponibilidad del sustrato, la actividad enzimática y la presencia de proteínas dirigidas (dirigent) que guían el emparejamiento radicalario (Kim et al., 2003; Martinelli et al., 2017)

Regulación genética y efecto de condiciones ambientales

La expresión de genes codificados como chalcona sintasa (CHS) CHS1, CHS2 y CHS3 asociadas con la vía biosintética de la silibina en las hojas y frutos se regula por factores como luz, estrés abiótico o elicitores, lo que afectan la síntesis de taxifolina y a su vez de flavonolignanos (Elsayed et al., 2019).

Bajo estrés hídrico la planta activa mecanismos antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD), ascorbato peroxidasa (APX) y aumenta la expresión de CHS, disparando la biosíntesis de compuestos con silibina (60% de la silimarina)(Abenavoli et al., 2018a; Elsayed et al., 2019).

El estrés ambiental influye en las vías metabólicas relacionadas con los metabolitos secundarios y, por lo tanto, altera la síntesis y acumulación de compuestos naturales en las plantas. En especial la sequía limita el crecimiento y desarrollo de las plantas en todo el mundo, especialmente en regiones áridas y semiáridas. Debido a los efectos beneficiosos del estrés hídrico en la acumulación de metabolitos secundarios, especialmente compuestos fenólicos (Keshavarz Afshar et al., 2015). Recientemente, se ha reportado que la deficiencia hídrica incrementó la acumulación del contenido total de fenólicos y flavonoides en el cardo mariano (Zahir et al., 2014)

En cuanto a la función biológica de la silimarina y compuestos afines dentro de la planta, se ha propuesto que actúan como antioxidantes y agentes defensivos. Su acumulación podría brindar protección ante el estrés oxidativo, causando por radiación UV intensa, sequía u otras condiciones adversas. De hecho, se ha observado que la biosíntesis y acumulación de sustancias activas como la silimarina en los tejidos vegetales está altamente influenciada por las condiciones ambientales. La producción de flavonolignanos puede incrementarse cuando la planta enfrenta estrés, en concordancia con el rol adaptativo de muchos metabolitos secundarios. En términos cuantitativos, el contenido de silimarina en frutos de *Silybum marianum* L. típicamente oscila entre 1.5 y 4% de peso seco (15-40 mg por gramo de semilla), dependiendo del genotipo y del ambiente de cultivo. Diferentes variedades o poblaciones de *Silybum marianum* L. han mostrado variación tanto en la concentración total de silimarina como en la proporción de sus componentes individuales. Se ha reportado un rango de 10-30 g de silimarina por Kilógramo de semilla (1-3%) al comparar diversos genotipos bajo distintas condiciones ambientales (Keshavarz Afshar et al., 2015). Estas diferencias sugieren que factores como el clima, el suelo, la disponibilidad hídrica y las prácticas agronómicas pueden modular la vía metabólica de los flavonolignanos.

Un aumento en la acumulación de silimarina bajo condiciones de estrés podría interpretarse como una respuesta adaptativa de la planta: efectivamente, se ha observado que el estrés abiótico tiende a potenciar el metabolismo secundario de las plantas como mecanismo para sobrellevar fluctuaciones ambientales severas. Esto se ha demostrado experimentalmente en *Silybum marianum* L. bajo estrés hídrico: la carencia de agua inhibe el crecimiento, pero induce una mayor acumulación de compuestos fenólicos (incluyendo silimarina) y enzimas antioxidativas, lo que sugiere una secreción de estos compuestos como defensas químicas cuando las condiciones son adversas (Pant et al., 2021; Zahir et al., 2014).

2.1.6. Extracción y Análisis de Silimarina

La fuente principal para la extracción de silimarina, son los frutos secos o semillas (aquenios) de *Silybum marianum* L. que contienen los flavonolignanos como la silibina A y B, isosilibina A y B, silicristina, isosilicristina, silidianina y taxifolina (Petrásková et al., 2020). Y se usan las siguientes etapas:

2.1.6.1. Molienda y desengrasado

Generalmente se trituran las semillas secas de *Silybum marianum* L., hasta obtener un polvo fino, asegurando homogeneidad, en vidrio oscuro evitando oxidación, y para el desengrasado, frecuentemente se realiza con n-hexano para remover lípidos y aceites esencial que podrían interferir en la extracción de compuestos fenólicos (Fallah Huseini et al., 2008)

2.1.6.2. Extracción con disolventes

- Extracción Soxhlet (técnica clásica): Después del desengrasado, se utiliza metanol, etanol o una mezcla de metanol-agua (50:50 ó 80:20), como disolvente en Soxhlet durante 2-6 horas. Este método permite una extracción eficiente de los flavonolignanos, aunque puede inducir a cierta degradación térmica (Kim et al., 2003).
- Extracción con ultrasonido (UAE): La aplicación de ultrasonido mejora la penetración del disolvente y acelera la liberación de metabolitos secundarios. Se usa etanol o metanol como disolvente a temperatura ambiente o ligeramente elevada. Es más rápida (15-60) minutos y evita degradación térmica (Fallah Huseini et al., 2008).
- Extracción asistida por microondas (MAE): Utiliza pulsos de microondas para calentar el disolvente (por ejemplo, etanol-acetato de etilo) y extraer flavonolignanos. Es eficiente, pero requiere equipos específicos y un estricto control de temperatura (Makouie et al., 2024).

2.1.6.3. Purificación y fraccionamiento.

- Precipitación con disolventes orgánicos: Algunas fracciones pueden ser precipitadas con acetona o etanol frío para concentrar compuestos como silibina y taxifolina.
- Cromatografía preparativa (RP-HPLC): Se utiliza HPLC preparativa con columnas C18 para separar individualmente silibina A y B, isosilibina, silicristina y silidianina. Se logra separación completa de los estereoisómeros con altos rendimientos mediante HPLC reversa (Kim et al., 2003). La columna C18 corresponde a una fase estacionaria apolar de sílice modificada con cadenas octadecilo que separa los analitos en función de su hidrofobicidad mediante interacciones hidrofóbicas, siendo especialmente adecuada para el análisis de polifenoles, alcaloides y flavonolignanos en matrices vegetales.

- Cromatografía en columna (Sephadex LH-20): En estudios recientes se utilizó una columna de Sephadex LH-20 (metanol como eluyente) para obtener una fracción enriquecida en derivados oxidados de silimarina (2,3-dehidrosilibina) (Petrásková et al., 2020).

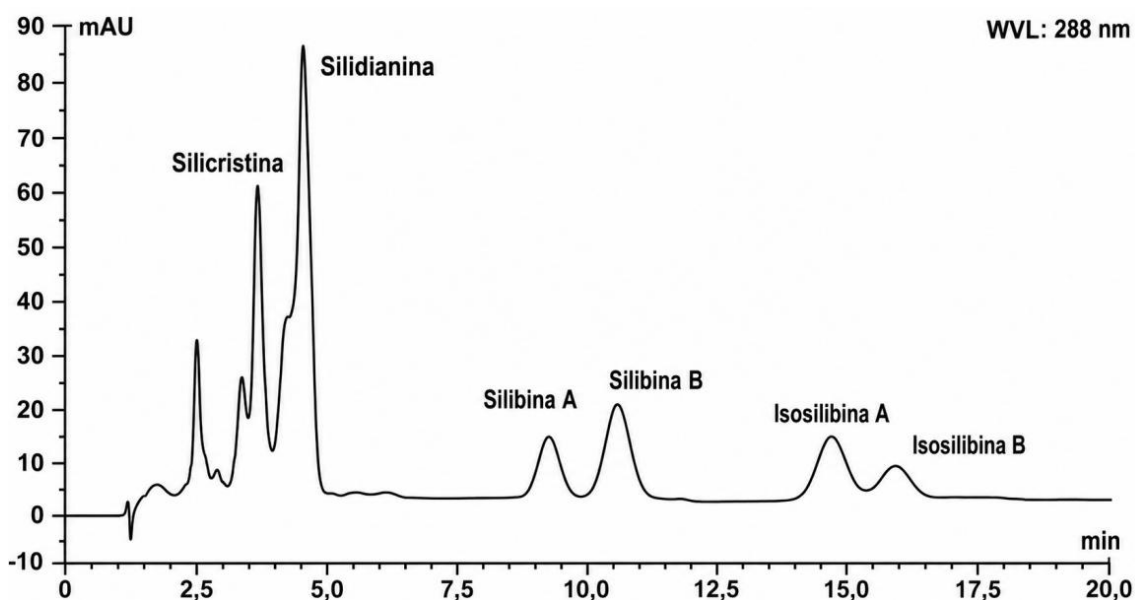
2.1.6.4. Métodos analíticos para cuantificación de silimarina

Los métodos analíticos requieren de estándares analíticos de silimarina, silibina A y B, taxifolina y otros dependiendo del análisis, entre los métodos analíticos para la cuantificación de silimarina se tiene:

HPLC-DAD: La cromatografía líquida de alta eficiencia, con detección de arreglo de diodos es hoy el referente para cuantificar cada flavonolignano de la mezcla. El método pionero de Kvasnička et al., (2003), quienes separaron silibina, isosilibina, silidianina y silicristina en una columna C18, usando gradiente acuoso-metanol y detección a 288 nm, con linealidades $R^2 < 0,999$ y límites de detección $\text{sub } \mu\text{g mL}^{-1}$, estableciendo parámetros de pureza en productos farmacéuticos europeos.

Figura 12

HPLC para análisis de silimarina-Cromatograma



Nota: Cromatograma de silimarina (200 mg mL^{-1}). Análisis por HPLC se realizó en una columna Purospher RP18 (150x4 mm, 5 mm) utilizando una mezcla de ácido fosfórico al 85%, metanol y agua (0,5:46:64, v/v) como fase móvil (elución isocrática) a un caudal de 1 mL min^{-1} . Se detectaron flavonolignanos de silimarina a 288 nm. Tomado de (Kvasnička et al., 2003)

Petrásková et al., (2020), desarrollaron un protocolo HPLC-DAD rápido que logra resolución de todos los flavonolignanos y sus 2,3- deshidro-análogos en 12 minutos, incluso separando diastereómeros y enantiómeros difíciles de silibina con LOQ de 0,3-0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Hoy en día se utiliza mayormente HPLC-DAD (detector de arreglo de diodos) y HPLC-MS, ya que proporcionan cuantificación selectiva y trazable de los componentes de silimarina y de cada uno de los flavonolignanos, la columna más usada es C18, y los disolventes típicos incluyen acetonitrilo/metanol y ácido fórmico con fase móvil (Petrásková et al., 2020).

En el ámbito de la investigación y control de calidad se ha optimizado los métodos como **UHPLC-DAD** que acortan tiempos de retención y mejorar la resolución de diastereo-isómeros (silibina A/B, isosilibina A/B), manteniendo compatibilidad con los gradientes y detectores descritos por farmacopeas y trasladados a equipos modernos. Los parámetros suelen incluir columnas sub-2 μ (2.1-3.0 mm), gradientes de 15-20 min y cuantificación externa con estándares individuales mg/g por componente y silimarina total (Severin, 2013)

Para matrices complejas o conformación estructural, la **LC-MS/MS**, aportan selectividad y sensibilidad superiores (ng mL^{-1}) resolviendo co-eluciones y permitiendo bioanálisis (plasma/tejido) cuando se estudia farmacocinética y biodisponibilidad de silibina (Brinda et al., 2012).

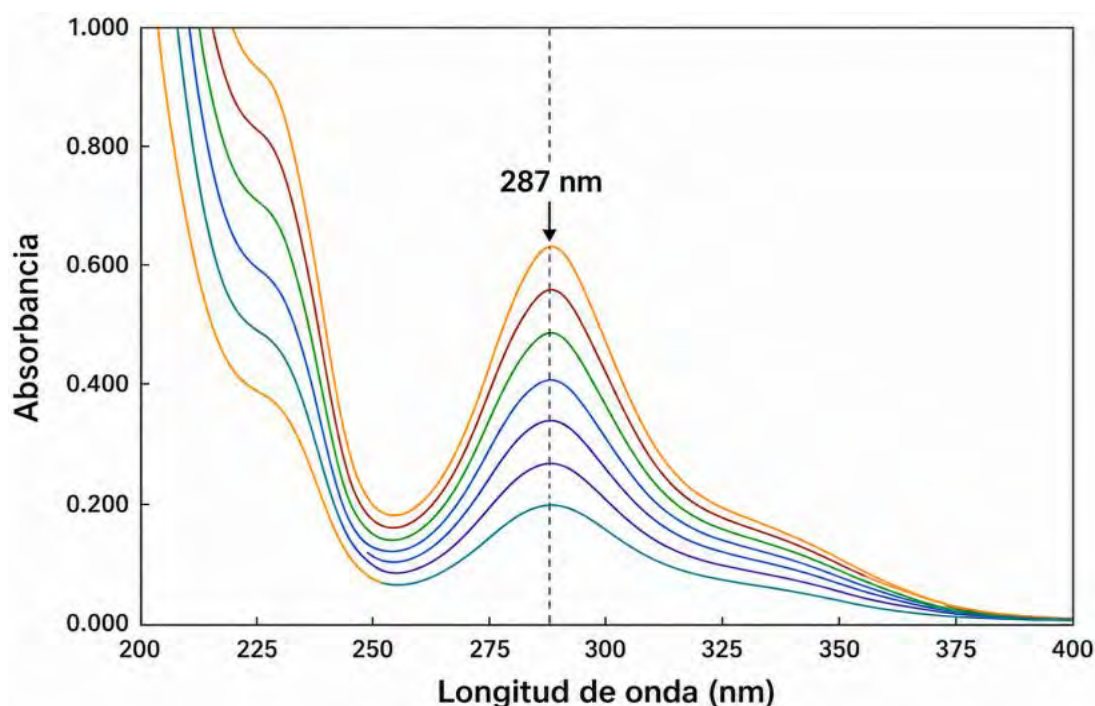
2.1.6.5. Métodos de tamizaje previos al HPLC

Los métodos de tamizaje previos al método de cuantificación por HPLC, cuya finalidad son controlar extractos y ajustar condiciones, pero que no sustituye la separación y cuantificación de HPLC (no resuelve isómeros ni componentes superpuestos), principalmente son:

Espectrometría UV-Vis: Cuya finalidad es verificar la presencia del complejo de flavonolignanos y estimar el contenido total antes del análisis cromatográfico, la silimarina presenta una máximo de absorción a 287nm en metanol (Moin et al., 2010).

Figura 13

Espectro UV-Vis de superposición de estándar de silimarina con máximo de absorción a 287 nm



Nota: Tomado de Moin et al., (2010)

El UV-Vis, permite estimar de manera rápida el contenido total de silimarina (flavonolignanos combinados), útil para validación lineal, estabilidad y disolución preliminar, rápido sin necesidad de extracción compleja (Rahman et al., 2004).

FT-IR: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier, es una técnica utilizada principalmente para la caracterización y confirmación de la presencia de silimarina. En muchos estudios, el análisis de FT-IR ha permitido identificar los grupos funcionales característicos de silimarina como los grupos funcionales característicos, fenoles, carbonilos, ésteres, cuyas señales típicas se observa a 3400 cm^{-1} grupos -OH (fenólico), 1660 cm^{-1} C=O (Cetonas y lactonas), $1510\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ anillos aromáticos.

Saiyyad et al., (2017), utilizaron FT-IR-ATR para confirmar que las nanopartículas PLGA conservaban los picos propios del flavonolignano $\sim 1732\text{ cm}^{-1}$ (C=O), 1508 cm^{-1} (C=C aromático) y la banda ancha O-H entre $1269\text{-}1083\text{ cm}^{-1}$, demostrando que no había degradación química tras la encapsulación.

Sumatri et al., (2024) obtuvieron una huella digital “Fingerprint” de extractos metanólicos aminas salinas, ésteres y sulfoxidos como marcadores de calidad del producto vegetal, estos estudios sustentan el uso de FT-IR (especialmente en modo ATR),

junto con quimiometría como control no destructivo para verificar pureza, detectar adulteraciones y seguir procesos de formulación de silimarina.

Tabla 2

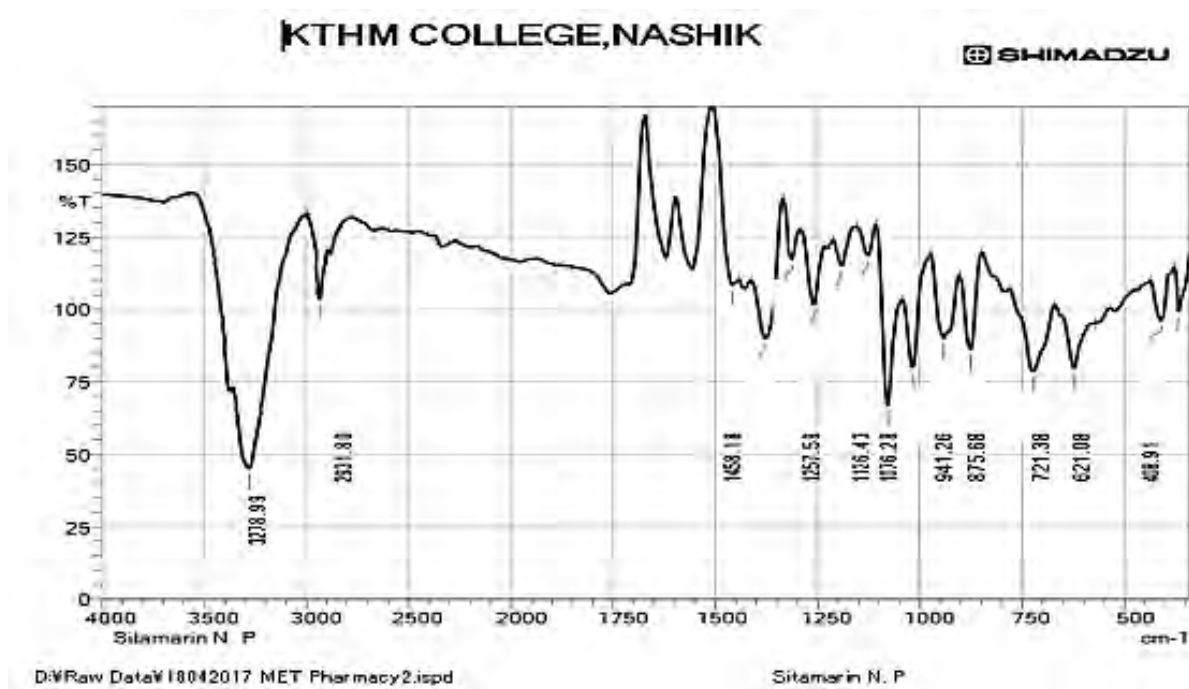
Valores de picos FT-IR, intensidades, grupos funcionales e identificación de fitocompuestos identificados en el extracto metanólico de Silybum marianum L.

Nº	Nº de onda de referencia (cm ⁻¹)	Nº de onda (cm ⁻¹) muestra de ensayo	Asignación del grupo funcional	Intensidad	Fitocompuesto identificado
1	3000-2800	2926	Estiramiento N-H	Fuerte, ancha	Sal de amina
2	3000-2800	2854	Estiramiento N-H	Fuerte, ancha	Sal de amina
3	1750-1735	1739	Estiramiento C=O	Fuerte	Ésteres
4	-	1464	-	-	Desconocido
5	1070-1030	1055	Estiramiento S=O	Fuerte	Sulfóxido
6	995-985	992	Flexión C=C	Fuerte	Alqueno
7	-	928	-	-	Desconocido
8	850-550	836	Estiramiento C-Cl	Fuerte	Compuesto halogenado
9	730-665	730	Flexión C=C	Fuerte	Alqueno

Nota: Tomado de Sumatri et al., (2024)

Figura 14

FT-IR de silimarina



Nota: Tomado de (Saiyyad et al., (2017)

2.1.7. Citogenética de *Silybum marianum* L. Gaertner

La citogenética vegetal es la disciplina que estudia el número, la estructura y el comportamiento de los cromosomas en las plantas. Los cromosomas portan la información genética y su dotación suele ser característica de cada especie. Las técnicas citogenéticas como conteo cromosómico, cariotipado, bandeo, hibridación in situ, etc. Permiten determinar los números cromosómicos, tamaños, formas de los cromosomas, presencia de organizadores nucleolares (satélites), patrones de bandeo y otras características. La información obtenida en el cariotipo, sirven para el diagnóstico taxonómico y filogenético (Asghari-Zakaria et al., 2008), la evolución y el mejoramiento genético, ya que variaciones cromosómicas como las poliploidías, aneuploidías, reordenamientos estructurales, pueden dar lugar a nuevas especies o influir en la expresión fenotípica (Falsini, 2023; Ganjkanloo, 2021).

Los cambios en el cariotipo pueden reflejar adaptaciones locales, procesos evolutivos o condiciones de estrés ambiental. Estas variaciones son fundamentales en programas de mejoramiento genético, conservación y biotecnología vegetal (Sarrami et al., 2012).

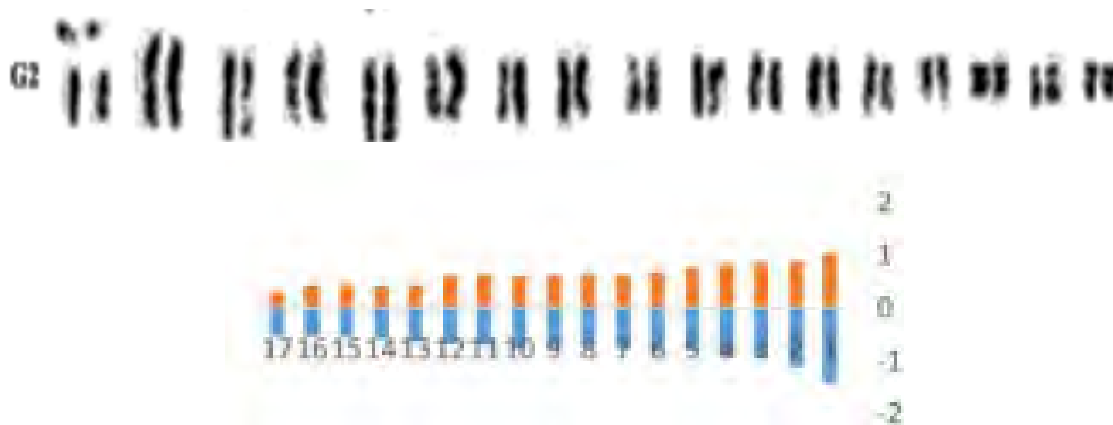
En las angiospermas es común la poliploidía (múltiplos del juego básico de cromosomas), pero *Silybum marianum* L., es citogenéticamente conservador, estudios previos han demostrado que se trata de una especie diploide con $2n=34$ cromosomas el número básico $x=17$, número constante reportado en poblaciones de diversas regiones y se ha descrito que es autógama con una tasa media de entrecruzamientos de 2% en condiciones de campo. El cariotipo, consta principalmente de 6 pares de cromosomas metacéntricos y 10 pares de cromosomas sub metacéntricos con un par de cromosoma acrocéntrico, portador de satélite (cromosoma SAT). Su fórmula cariotípica corresponde a $2n = 34 = 12m + 20sm + 2st$. (Asghari-Zakaria et al., 2008)

Se han observado variaciones menores entre genotipos, por ejemplo, en índices de brazos cromosómicos o longitudes relativas, pero en general la constitución cromosómica es similar entre distintas procedencias de *Silybum marianum* L. La estabilidad cromosómica sugiere que grandes diferentes fenotípicas en esta especie probablemente se deban más a factores ambientales o genéticos micro evolutivos que diferencias en número cromosómico, el análisis citogenético permite detectar si poblaciones separadas por gradientes como la altitud, presentan diferencias en ploidía o estructura cromosómica,

lo cual podría indicar procesos de adaptación o diferenciación poblacional (Ganj Khanloo, 2021).

Figura 15

Cariotipo e idiograma de Silybum marianum L.



Nota: Cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y satelitado de *Silybum marianum L.*
Tomado de Asghari-Zakaria et al., (2008) & Ganj Khanloo, (2021).

2.1.8. Técnicas citogenéticas con material vegetal

La preparación de metafases requiere de ápices radiculares, frescos y luego utiliza tinción aceto-hematoxilina férrica, Orceína acética clorhidra al 2% (Sarrami et al., 2012) La medición y análisis de cariotipo puede utilizar software como MicroMeasure para determinar la longitud total cromosómica (TL), longitud sumada de brazos largos (SL) y cortos (SS), los índices de asimetría (As1, As2, TF%, S%, AI), índice de constricción centromérica (CVci) (Ganj Khanloo, 2021). Las técnicas de estudio de cariotipo implican varias etapas que se describen a continuación:

- **Obtención de metafases:** Para lo cual se requiere germinación de semillas y cultivo de raíces en condiciones controladas.
- **Pretratamiento:** Utiliza la colchicina al 0.05-0.1% durante 2-4 horas para acumular células en metafase (Asghari-Zakaria et al., 2008)
- **Fijación y extensión cromosómica:** La fijación de puntas radiculares, generalmente se realizan en mezcla etanol:ácido acético (carnoy) 3:1 o ácido crómico-formaldehído a 4°C durante 12-24 horas.
- **Hidrólisis:** Generalmente utiliza HCl 1N 60°C y maceración con enzimas (pectinasa) o ácido (ácido ósmico) para extender cromosomas (Ganj Khanloo, 2021)

- **Tinción convencional y montajes:** utiliza, tinción de portaobjetos con hematoxilina-férrica o Giemsa para visualizar cromosomas y el montaje con bálsamo de Canadá o medio acuoso.
- **Análisis de imágenes:** Consiste en fotografías al microscopio a 1000x de varias metafases y la medición de longitudes de brazos (brazo corto y largo) y longitudes totales con software (MicroMeasure, ImageJ/KaryoType).
- **Cálculo de índices citogenéticos:** Según Levan, 1964 se realizan los siguientes índices:
 - Índice mitótico (IM%): Índice mitótico
 - Relación de brazos de Levan (RB) q/p
 - Relación de brazos (AR) p/q
 - Índice centromérico (IC%) = $p/(p+q) \times 100$
 - Longitud Relativa (LR%) = $(p+q) / \Sigma((p+q) \times 100$
 - Proporción total de brazos cortos respecto a la longitud haploide total (TF%) = $\Sigma p / \Sigma(p+q) \times 100$
 - Diferencia relativa de longitud (DRL%) = $SD(RL) / RL \times 100$
 - Desviación estándar (SD) = Desviación estándar de los RL,
 - Índice de Simetría de Stebbins: Clasifica los cariotipos en categorías (1A,2A,2B, 3A, etc.) según la longitud cromosómica y posición del centrómero: A = cariotipos más simétricos/primitivos, B = cariotipos más asimétricos/evolucionados.

2.1.9. Fenotipo y fenología vegetal

Fenotipo vegetal

El fenotipo vegetal se refiere al conjunto de características observables de una planta resultado de la expresión de su genotipo en la interacción con su medio ambiente, incluye rasgos morfológicos (tamaño, forma de hojas, arquitectura de la planta), anatómicos, fisiológicos y también **fenológicos** (etapas y tiempo de desarrollo). Los modelos fenológicos se basan en las relaciones conocidas entre los eventos fenológicos y los correspondientes cambios ambientales estacionales dentro de un período anual. Se sabe que la variación de temperatura es un factor más influyente del cambio fenológico, dado que la mayoría de las actividades de plantas y animales se ven favorecidas por temperaturas cálidas favorables y estresadas por temperaturas frías (Liang, 2019)

Estos rasgos pueden presentar variabilidad considerable incluso dentro de una misma especie, ya sea por diferencias genéticas o por plasticidad fenotípica frente a

distintas condiciones ambientales, como los factores de disponibilidad de nutrientes, agua, luz y temperatura que influyen en el crecimiento y ciclo de vida de las plantas, modificando la altura, el número de ramas, el tamaño foliar o el tiempo hasta la floración. En el caso de plantas anuales o bienales como *Silybum marianum* L., las condiciones del entorno pueden determinar la duración de su ciclo vital y la velocidad con la que transita sus fases fenológicas. (Giuliani et al., 2018)

Fenología

La fenología estudia los eventos periódicos del ciclo de vida de las plantas como la brotación, floración y fructificación, influenciados por factores ambientales como temperatura, altitud y fotoperiodo (Eskandari Nasrabadi et al., 2014). A mayor altitud, se registran condiciones de menor temperatura y mayor radiación UV, lo que puede alterar significativamente el desarrollo morfológico y fisiológico de las plantas (Körner, 2007; Liang, 2019). En suma, el estudio del fenotipo vegetal abarca no solo la descripción de los caracteres visibles de la planta, sino también la comprensión de cómo dichos caracteres varía bajo diferentes escenarios ambientales. (Martinelli et al., 2015)

Técnicas de estudio fenológicos

Permiten cuantificar y comparar la forma estandarizada el desarrollo de plantas, facilitando la toma de decisiones agronómicas, selección de variedades adaptadas y predicciones de rendimientos en diferentes entornos. Una de las técnicas aplicadas en estudios fenológicos de plantas es la escala de BBCH.

Tabla 3

Técnicas de estudios fenológicos en plantas

Técnica	Que mide / como se aplica	Ventajas principales
Escala BBCH (observación visual)	Asigna códigos estándar a cada fase de germinación, senescencia a nivel de planta o cultivo	Comparabilidad entre ensayos soporte gráfico y fotográfico
Listas descritas morfológicas	Puntajes de hábito, altura, ramificación, etc. en etapas definidas (por ej. floración plena)	Permite evaluar diversidad genética y seleccionar germoplasma
Grados de crecimiento (GDD)	Suma térmica necesaria para pasar de una fase a otra	Permite predecir fechas de elongación (846 GDD) y floración (100GDD) bajo distintos manejos nutricionales
Indicadores morfológicos de los capítulos	Número de capítulos maduros (2,4,6,10) y color externo para decir cosecha	Relaciona directamente la fenología con rendimiento y % silimarina

Escala BBCH extendida

La escala BBCH (Biologische Bundesantalt, Bundessortenamt and Chemische Industrie) que fueron adaptados en base a los estadios principales de crecimiento para plantas monocotiledoneas (Meier, 2001), (Código decimal) para *Silybum marianum* L., definiendo 10 etapas principales (0-9) y códigos de 2 y 3 dígitos para distintos niveles. Martinelli et al., (2015)

Tabla 4

Escala BBCH para determinación de los estados fenológicos de Silybum marianum L.

ESCALA DE BBCH	Descripción	Cultivo típico (Mediterráneo)
0	Germinación, brotación, desarrollo de yema	Octubre-Noviembre
1	Desarrollo de hojas (brote o tallo principal)	Noviembre-Diciembre
2	Formación de brotes laterales/macollamiento (ahijamiento)	Diciembre-enero
3	Crecimiento longitudinal del tallo o crecimiento en roseta, desarrollo de brotes (retoños) y encañado (tallo principal)	Enero-Febrero
4	Desarrollo de las partes vegetativas cosechables de la planta o de órganos vegetativos tallo, hojas y capítulos.	Febrero-Marzo
5	Emergencia de inflorescencia. Cabeza central visible hasta alargamiento de brácteas	Marzo
6	Floración (tallo principal) apertura de flores tubulosas y liguladas	Abril
7	Desarrollo de Capitulo. Desarrollo de fruto(aquenio) y llenado de silimarina.	Abril-Mayo
8	Coloración y maduración de frutos pardo claro a pardo oscuro, dispersión posible de semillas	Mayo
9	Senescencia de hojas, tallos y capítulos, comienzo de dormancia	Mayo-Junio

Nota: Tomado de Martinelli et al., (2015)

Figura 16

Etapas fenológicas de Silybum marianum L.



Nota: Etapas fenológicas de crecimiento de *Silybum marianum* L. en condiciones de campo, tomado de Martinelli et al. (2015)

2.1.10. Gradientes altitudinales y las plantas.

Los gradientes altitudinales representan cambios continuos en la elevación sobre el nivel del mar y conllevan variaciones ambientales abruptas en relativamente poca distancia horizontal. La altitud influye fuertemente en parámetros climáticos: en promedio por cada 1000 metros de elevación la temperatura del aire disminuye alrededor de 5-6°C. (Körner, 2007), aunque este gradiente térmico puede variar según la humedad y la topografía. A mayores altitudes, el aire es más frío y enrarecido (menor presión atmosférica y ligera reducción en la concentración del CO₂), la irradiación solar es más intensa (especialmente la radiación UV, debido a una atmósfera más delgada), y generalmente se observa mayores fluctuaciones térmicas diurnas. precipitaciones locales, agua puede aumentar o disminuir con la altitud dependiendo del régimen de

precipitaciones locales y de la capacidad de retención del suelo; en regiones andinas, es común encontrar zonas más húmedas en alturas intermedias y condiciones más áridas cerca de los límites superiores de vegetación. Asimismo, los suelos a diferentes altitudes pueden diferir en suelos orgánicos, nutrientes y profundidad (Zahir et al., 2014).

El metabolismo también suele ajustarse, así las especies alpinas muestran óptimas fotosíntesis a temperaturas similares a las de la especie de altitudes bajas, gracias a adaptaciones fisiológicas que compensan el frío (Körner, 2007). La corta duración de la temporada de crecimiento en altitudes elevadas (debido a inviernos largos o clima impredecible) puede condicionar la fenología, las plantas de mayor altitud a menudo florecen y fructifican más rápidamente una vez superado el invierno, o bien desarrollan mecanismos de dormancia prolongada, es decir el calendario de desarrollos debe sincronizarse con un periodo favorable más estrecho, lo que puede llevar a patrones fenológicos distintos a diferentes alturas. Uno de los factores destacados en altitud es el incremento de la radiación UV-B, que puede afectar tejidos y moléculas. Muchas plantas contrarrestan este efecto acumulando compuestos fenólicos como flavonoides y pigmentos antociánicos, que actúan como protectores solares naturales, absorbiendo radiación UV y neutralizando radicales libres (Pant et al., 2021).

Tal como se han documentado que las concentraciones de compuestos fenólicos pueden variar sistemáticamente con la altitud en diversas especies, en *Arnica montana* (planta medicinal de las zonas montañosas europeas) el contenido fenólico mostró una tendencia altitudinal vinculada principalmente a la temperatura ambiental, sugiriendo que el frío de la altura fue el factor determinante en la acumulación de compuestos fenólicos, más que la radiación. En otros casos, la mayor radiación si se correlacionó con un incremento de antioxidantes en plantas altoandinas, evidenciando estrategias defensivas frente a este estrés (Waizel-Bucay et al., 2014). No obstante, es importante señalar que no existe un patrón altitudinal universal aplicable a todas las especies o tipos de plantas (Körner, 2007).

Las respuestas adaptativas a la altitud son específicas de cada biotipo, mientras en algunas especies aumentan ciertos compuestos a mayor altitud, otras pueden mostrar efecto contrario, si, por ejemplo, las condiciones de humedad y suelo son más favorables en cotas inferiores. Las interacciones entre factores de temperatura, radiación, disponibilidad hídrica, tipo de vegetación, producen respuestas complejas, así el gradiente altitudinal ofrece un “laboratorio natural” para estudiar cómo las variaciones ambientales

moldean tanto el fenotipo (morfología), como la fisiología y bioquímica (metabolitos secundarios) de las plantas (Pant et al., 2021).

2.2. Conceptos básicos

- *Silybum marianum* L. Gaertner: Planta medicinal comúnmente llamada “cardo mariano”, “cardo santo”, perteneciente a la familia Asteraceae, rica en silimarina.(Sayyad et al., 2025)
- Silimarina: Complejo de flavonolignanos, con acción antioxidante y hepatoprotector. (Sayyad et al., 2025)
- Fenotipo: Conjunto de rasgos observables morfológicos (tallos, hojas, flores, frutos) fisiológicos de la planta, es el resultado de la interacción entre su genotipo y el ambiente. (Martinelli et al., 2015)
- Variabilidad fenotípica: Cambios morfológicos de una zona geográfica, que implica cambios ecológicos y climáticos. (Martinelli et al., 2016)
- Fenología vegetal: Estudio de eventos periódicos del ciclo de vida vegetal de la planta (germinación, floración, fructificación, etc.) y su relación las variaciones estacionales y climáticas. (Liang, 2019)
- Cariotipo: Conjunto de características cromosómicas de una especie o descripción completa y ordenada del número, tamaño y forma de los cromosomas de una especie u organismo. (Falsini, 2023)
- Metabolitos secundarios: Compuestos no esenciales para el metabolismo primario, pero relevantes para la defensa o adaptación de la planta. (Bijak, 2017)
- Escala BBCH: Sistema estandarizado de codificación de fases de desarrollo fenológico en plantas. (Meier, 2001)
- Gradiente altitudinal: Variación continua de las condiciones ambientales (temperatura, presión, humedad, composición de especies) que se observa al ascender o descender en altitud sobre un relieve. (Guevara-Terán et al., 2024)
- HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos, sirve para separar los diferentes compuestos de la mezcla de flavonolignanos que forman la silimarina. El DAD registra el espectro UV-Vis de cada compuesto en múltiples longitudes de onda de manera simultánea. Esta técnica sirve para separar y cuantificar los flavonolignanos, identificar extractos farmacéuticos. Es el método oficial y más usado para control de calidad de silimarina. (Petrásková et al., 2020)

- IR-TF: Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, permite obtener un espectro de absorción en el rango infrarrojo, que corresponde a los grupos funcionales presentes en la molécula, sirve para la identificación cualitativa rápida, confirma la presencia de flavonolignanos por sus grupos fenólicos y aromáticos, no cuantifica isómeros ni cantidades exactas, pero da una huella digital global del extracto. (Saiyyad et al., 2017)

2.3. Antecedentes empíricos (Estado del arte).

Karkanis et al. (2011) describe a *Silybum marianum* L. Gaertner, conocido comúnmente como cardo mariano, como una especie herbácea perteneciente a la familia asterácea, ampliamente reconocida por su uso en la medicina tradicional gracias a su alto contenido de silimarina, es un complejo de flavonolignanos con propiedades hepatoprotectoras, antiinflamatorias y antioxidantes.

Hurtado et al. (2021) menciona que es originaria del mediterráneo, la especie ha sido introducida y cultivada en diversas zonas templadas y subtropicales del mundo, encontrando condiciones favorables para su desarrollo en regiones del sur del Perú.

Marceddu et al. (2022) en términos morfológicos la describe como herbácea anual o bienal, exhibe una notable variabilidad fenotípica en sus rasgos morfológicos, influenciada por factores genéticos y ambientales, dependiendo de las condiciones de suelo y clima, esta especie puede alcanzar alturas desde 40cm a 2m, con tallos erectos y ramificados, hojas basales grandes desde 50 a 60 cm de largo por 20-30 cm de ancho, de borde espinoso, típicamente presenta venación blanquecina marmoleada, aunque se han reportado individuos con hojas uniformemente verdes, evidenciando variabilidad foliar, cada tallo y sus ramas terminan en un capítulo (inflorescencia) de aproximadamente 5cm de diámetro, generalmente de color púrpura. El número de capítulos por planta varía ampliamente según el genotipo y el ambiente, bajo condiciones favorables, una planta puede producir decenas de capítulos, lo que se refleja en una producción de semillas que supera las 6 000 por individuo.

Martinelli et al. (2016) menciona que en poblaciones invasoras de Pakistán se ha observado que con el aumento de altitud las plantas reducen significativamente su talla, tamaño foliar y número de capítulos, mostrando plasticidad fenotípica frente a gradientes ambientales.

Khan et al. (2022) menciona que *Silybum marianum* L. todavía exhibe rasgos que son típicos de especies silvestres tanto en la productividad de frutos como en biomasa.

2.3.1. Variabilidad fenotípica y citogenética de *Silybum marianum* L. Gaertner

Martinelli et al. (2015) desarrollaron una descripción fenológica detallada de *Silybum marianum* L., según la escala BBCH extendida, identificando 10 fases principales, las etapas fenológicas de crecimiento se describieron utilizando tanto el 2º como el 3º sistema de codificación BBCH de 3 dígitos.

Ghassemi-Golezani et al. (2016) adaptaron dicha escala con éxito para *Silybum marianum* L., bajo condiciones de estrés hídrico, estableciendo la utilidad del enfoque fenológico para evaluar el efecto del ambiente en esta especie.

Hevia et al. (2007) identificaron el momento fenológico óptimo para maximizar el contenido de silimarina en semillas, que alcanza con cuatro capítulos florales maduros.

Eskandari Nasrabadi et al. (2014) ha documentado la sincronización de las etapas de desarrollo de *Silybum marianum* L. y puede alterarse con cambios en prácticas agronómicas o ambientales y encontraron que distintas estrategias de fertilización y nutrición modificaron las etapas fenológicas de cardo mariano en experimentos de campo, afectando especialmente el tiempo de floración y maduración de semillas, esto indica que la especie posee cierta plasticidad para ajustar su ciclo de vida según la disponibilidad de recursos, un aspecto relevante al considerar su comportamiento en ambientes contrastantes como los gradientes altitudinales.

Ram et al. (2005) determinaron el coeficiente de variabilidad fenotípica, genotípica y estudios de correlación de *Silybum marianum* L., estudiaron los caracteres de 15 accesiones, encontrando que el rendimiento semilla/planta y número de cápsula/planta, tuvieron las estimaciones más altas de variación genotípica, lo que sugiere que la selección directa de estos rasgos es adecuada para el mejoramiento de este cultivo. El número de cápsulas/planta tuvo correlación positiva, significativa con el número de ramas/planta y longitud de la hoja ($r=0.03398, 0.7547$), mientras que el rendimiento semilla/planta y longitud de hoja ($r=0.03398, 0.7547$), mientras que el rendimiento semilla/planta, tuvo una correlación significativa positiva con la longitud de la hoja, el diámetro del tallo, el diámetro de la cápsula y el contenido de silimarina.

Martinelli et al. (2016) analizaron accesiones italianas y evidenciaron amplia variabilidad fenotípica en tamaño, peso y forma de frutos, identificaron quimio-tipos con perfiles fitoquímicos diferenciados correlacionados con características morfológicas.

Giuliani et al. (2018) observaron diferencias asociadas a la procedencia geográfica y manejo en *Silybum marianum* L. La evaluación de plantas cultivadas en diversas

regiones de Europa y Asia demostró variaciones en su rendimiento de biomasa y semilla, la cual refleja la diversidad genotípica y ambiental.

Martinelli et al. (2016) analizando múltiples accesiones internacionales mediante técnicas multivariadas evidenció una considerable diversidad fenotípica entre ecotipos locales de cardo mariano dichas diferencias se manifiestan en atributos como el tamaño de la planta, la duración del periodo vegetativo, la producción de frutos y el contenido de metabolitos, sugiriendo que existen líneas o poblaciones adaptadas a condiciones particulares.

Liava et al. (2021) permitieron comprender cómo las condiciones del entorno, tales como la densidad de la siembra o el clima, afectan el rendimiento agronómico y el momento óptimo de cosecha.

Asghari-Zakaria et al. (2008) realizaron el primer análisis cariotipo detallado de la especie, confirmando los 17 pares de cromosomas y describiendo un cariotipo compuesto por 6 pares metacéntricos, 10 submetacéntricos y 1 acrocéntrico, con una constricción secundaria conspicua en el brazo corto del par cromosómico, para lo cual examinó múltiples genotipos de distintas localidades en Irán y encontró que el cariotipo es uniforme entre poblaciones, presentando solo variaciones menores en las proporciones de longitud de los brazos cromosómicos. Los parámetros cuantitativos del cariotipo en cuanto a longitudes cromosómicas, índices branquiales, porcentajes de forma, índices de asimetría intra e inter-cromosomal, resultaron muy similares entre genotipos, indicando cariotipos altamente conservados. No hay evidencia de poliploidía natural ni de grandes reordenamientos cromosómicos dentro de *Silybum marianum* L., en los estudios reportados, la especie parece citogenéticamente uniforme en todo su rango.

Sarrami et al. (2012) determinaron la diversidad citogenética en diez poblaciones diferentes de *Silybum marianum* L., en Irán, mediante técnica de descomposición del cariotipo. Los resultados obtenidos mostraron que el número base de cromosomas fue de $x=17$ en todas las poblaciones, y el número de cromosomas fue $2n=2x=34$ y de acuerdo con la clasificación de Stebbin de la simetría, todas las poblaciones se ubicaron en la categoría “2B”, lo que indica las situaciones evolutivas similares de las poblaciones, de acuerdo con análisis de varianza de los datos de las características mostraron que existe una diferencia significativa. En cuanto a la longitud total de los cromosomas (TL) la suma de los brazos largos (Sla), el coeficiente de variabilidad del índice centrómico (Cvci) y el índice asimétrico (AI), existe diferencia significativa ($p<0.05$) con respecto a los cromosomas más largos y cortos, la suma de los brazos cortos, la diferencia en longitudes

relativas y la proporción de los brazos largos y cortos. Esto indica la diversidad en el tamaño y la simetría de los cromosomas en las poblaciones.

Shokrpour et al. (2008) realizaron un análisis de la variación genética en la composición de silimarina y flavonolignanos en frutos (aquenios) de 32 ecotipos de *Silybum marianum* L., recolectadas del norte, noroeste, sur y suroeste de Irán y dos variedades comerciales mejoradas, una de Inglaterra (CN Seeds, Ltd., Ely Kingdom) y otra de Hungría (Budakalaszi, Budakalasz). Observaron un mayor nivel de variación genotípica, heredabilidad y ganancia genética para la silibina A y B en los ecotipos estudiados en comparación con las dos accesiones.

Sin embargo, las técnicas más avanzadas como bandeo cromosómico diferencial o hibridación in situ fluorescente en *Silybum marianum* L., describen más información sobre la citogenética de la planta como los realizados por AbouZid, (2014); Ganjkhanloo, (2021); Puglisi et al., (2024) incluyeron el uso de RAPD, DArTeq y análisis multivariados que permiten evaluar la diversidad genética y proponer estrategias de selección genotípica.

2.3.2. Composición fitoquímica de *Silybum marianum* L. Gaertner

Abenavoli et al. (2018) investigaron sobre la composición química de *Silybum marianum* L. e identificaron varios compuestos bioactivos, como silimarina, silibina y silidianina, han demostrado variaciones en la concentración de estos compuestos entre diferentes poblaciones de la planta, lo que sugiere la existencia de variabilidad química en *Silybum marianum* L.

Hassanen et al. (2021), Zhang et al., (2024) & Abad-Gil et al., (2025) coinciden que la silimarina está compuesta de al menos siete flavonolignanos y un flavonoide, estos son la silibina (mezcla de dos diastereómeros, silibina A y B), isosilibina (A y B), silidianina, silicristina (A y B), isosilicristina y silimonina. La silibina, es el componente mayoritario representando típicamente entre el 50 y 70% del complejo, en la semilla madura, la silimarina suele constituir alrededor de 1.5-3% del peso seco, aunque este contenido puede variar ampliamente según el ecotipo y las condiciones de crecimiento (valores extremos reportados desde 0.06% hasta aproximadamente 2.2% en poblaciones silvestres).

Teleszko et al. (2023) mencionan que además de los flavonolignanos principales, se han identificado compuestos flavonolignanos minoritarios como el 2,3-dehidrosilibina y otros metabolitos fenólicos en *Silybum marianum* L. también se han demostrado la

presencia de flavonoides convencionales como quercetina, kaempferol y naringenina en distintas partes de la planta.

Zhang et al. (2024) mencionan que un flavonoide particularmente notable es la taxifolina (dihidroquercetina), que forma parte del complejo de silimarina en pequeñas proporciones, así mismo las semillas contienen aminoácidos y metabolitos relacionados como la betaína (trimetilglicina), así como abundantes ácidos grasos esenciales y tocoferoles, compuestos que también podrían contribuir a sus efectos bioactivos.

Marceddu et al. (2022) describen que el resto de la semilla está compuesto por otros metabolitos entre ellos un aceite fijo (20-30% de lípidos, rico en ácidos grasos linoleico y oleico), proteínas (20-30%), tocoferoles (0.04%) y esteroides (0.6%), además de mucílagos y trazas de otros compuestos fenólicos. Si bien la silimarina se encuentra en toda la planta, su concentración es mucho mayor en los frutos, específicamente en el integumento de la semilla, con solo cantidades residuales en el pericarpo y otras partes, esto explica que las semillas, sean la fuente comercial y farmacológica primaria de la silimarina

Martinelli et al. (2016) analizaron rasgos morfológicos y químicos de la fruta de una colección de 26 accesiones de cardo lechero, cuyos resultados muestran que los rasgos más variables están relacionados con el contenido de flavonolignano único. Dentro de los ácidos grasos más abundantes presentes en el fruto, el ácido oleico presentó mayor variabilidad entre accesiones. Las correlaciones entre las variables resaltan las relaciones fuertes entre los diferentes flavonolignanos y una fuerte correlación positiva entre la isosilibina y el contenido total de silimarina, lo que sugiere un papel central de flavonolignano menor en la vía biosintética de silimarina.

Giuliani et al. (2018) adoptaron un doble enfoque de investigación para determinar la distribución y cuantificación de la silimarina y otros compuestos fenólicos en las diferentes regiones del fruto (pericarpo, tegumento de la semilla y cotiledón). Se analizaron dos accesiones silvestres de *Silybum marianum* L., con quimio-tipos de silimarina contrastantes (A y B) y una línea mutante (C) con un color de fruto alterado. Se estudiaron frutos de *Cynara cardunculus* como referencia. En primer lugar, se revisó la morfo-anatomía del fruto mediante imágenes digitales de microscopía óptica y, en segundo lugar, se realizó una histo-localización completa de las diferentes clases de polifenoles en el fruto. Las evidencias experimentales confirmaron que la silimarina y su precursor, la taxifolina, solo se acumulan en los tegumentos de las semillas. El color oscuro de los frutos completamente maduros se debe a la acumulación de taninos

condensados en la capa celular subepidérmica del pericarpio, por el contrario, la línea mutante estudiada muestra un contenido reducido de taninos condensados, probablemente debido a una alteración en la vía biosintética de los flavonoides. El contenido de taninos condensados es comparativamente bajo en los frutos de *Silybum marianum* L. y muy bajo en la línea mutante identificada, esto podría representar una ventaja en su posible uso.

Serrano et al. (1988) demostraron que la concentración de silimarina en semillas de *Silybum marianum* L. que crece en Cusco, contienen el mismo principio activo que el pluropon (R9: La silimarina), para su extracción, emplearon hexano, etanol y éter etílico como solvente.

2.3.3. Caracterización de Silimarina

Marceddu et al. (2022) mencionan que la silimarina ha sido ampliamente caracterizada y vinculada con las propiedades medicinales, desde su primer aislamiento en la década de 1960, la silimarina y particularmente su componente principal, la silibina o silibinina, han demostrado un perfil de seguridad alto y una baja toxicidad general, de hecho, se considera el principio activo más potente del extracto de *Silybum marianum* L. y ha sido aprobada por varios países (incluso por la FDA en EE. UU.) como Fito medicina para tratar enfermedades hepáticas.

Dorđevi et al. (2018) compararon la eficiencia de la extracción de silimarina de *Silybimariani fructus*, utilizando diferentes métodos de extracción, la maceración, percolación, extracción al baño maría y extracción asistida por ultrasonido se ha realizado con etanol al 60%. Los extractos se analizaron mediante técnicas UV/Vis y HPLC. Sus resultados demostraron que la mayor concentración de silimarina se detectó en las muestras extraídas en un baño de agua con solvente hirviendo durante 30 y 60 minutos (2,33 y 1,95%, respectivamente). Dado que la extracción en un baño de agua es eficiente y reduce mucho tiempo y consumo de solventes, este método podría representar un reemplazo potencial para el procedimiento de extracción Soxhlet recomendado por la farmacopea.

Zhang et al. (2024) en una revisión de varias investigaciones han identificado más de 20 flavonolignanos diferentes aislados de esta especie, incluyendo análogos y derivados estructurales de los principales isosilidianina, 2,3-dehidrosilibilina y otros y que estos flavonolignanos minoritarios suelen estar presentes en concentraciones bajas, pero contribuyen al espectro fitoquímico completo del extracto y podrían poseer actividades biológicas complementarias, la 2,3-dehidrosilibinina un derivado oxidado de

la silibinina exhibe potentes propiedades antioxidantes, incluso superiores a las de la silibinina en ciertos ensayos, la presencia de dichos compuestos sugiere la efectividad terapéutica del extraído de *Silybum marianum* L. no recae en un solo componente, sino en efectos sinérgicos de múltiples flavonolignanos.

2.3.4. Influencia ambiental (altitudinal) en el contenido de silimarina.

Guevara-Terán et al. (2024) mencionan que la altitud afecta directamente la producción de **metabolitos secundarios**, como flavonoides y alcaloides, por cambios en la radiación UV, temperatura y presión atmosférica.

Khan et al. (2022) señalan que factores como la altitud, la temperatura y la fase fenológica inciden significativamente en la concentración y proporción de los componentes principales de la silimarina.

Abenavoli et al. (2018) & Martinelli et al. (2017) sostienen que el contenido de silimarina suele oscilar entre el 1,5% y el 4,3% del peso del fruto, cuyos principales componentes de la silimarina son la silibina A y B, isosilibina A y B, silidianina y silicristina

Keshavarz Afshar et al. (2015) llevaron a cabo un experimento de campo en Irán sometiendo cultivos de *Silybum marianum* L. a riego óptimo versus déficits controlados, hallaron que, en promedio, las semillas en condiciones bien regadas contenían 19 g de silimarina por kg (1.9%), mientras que las plantas bajo estrés hídrico moderado y severo incrementaron su contenido de silimarina en un 5 y 17% respectivamente, en comparación con las bien hidratadas. Este aumento estuvo asociado específicamente a mayores concentraciones de silibina, isosilibina y silicristina en semillas de plantas estresadas. Como consecuencia, la dosis de compuestos activos por semillas fue mayor con la sequía, aunque cabe mencionar que el rendimiento total de semilla por planta disminuyó bajo estrés, compensando parcialmente el beneficio, desde un punto de vista productivo.

Zahir et al. (2014) en un estudio experimental, indujeron sequía *in vitro* en plántulas de *Silybum marianum* L. mediante manitol, observándose una reducción significativa en el crecimiento (menor biomasa e inhibición radicular), pero un aumento en la acumulación de fenoles y flavonoides totales. La producción de metabolitos secundarios mostró una relación positiva con la intensidad del estrés hídrico, sugiriendo un rol defensivo o de ajuste osmótico. Además, factores como temperatura y radiación UV, especialmente en altitudes elevadas, podrían influir en la biosíntesis de flavonoides. Aunque no existen estudios específicos sobre el efecto de la altitud en la producción de

silimarina, la evidencia disponible respalda que *Silybum marianum* L., modula su perfil fitoquímico frente a condiciones ambientales adversas. Este vacío en la literatura científica posiciona al presente estudio como pionero en explorar la influencia altitudinal sobre la concentración de silimarina en esta especie.

Liava et al. (2021) reportaron que distintas combinaciones de genotipo y ambiente produjeron contenidos de silimarina, dentro de un rango amplio (10-30 g/kg), es conocido que la acumulación de silimarina ocurre principalmente hacia el final del ciclo, durante la formación y llenado de las semillas y el período, podría acortarse o largarse según la altitud y el clima.

Khan et al. (2022) en Khyber Pakhtunkhwa (Pakistán) evaluaron el impacto de *Silybum marianum* L., como especie invasora en la diversidad vegetal y variables ambientales, analizaron 75 sitios clasificados según la intensidad de invasión. Los resultados mostraron que la invasión altera significativamente, la composición y diversidad de las comunidades vegetales ($p < 0,05$). El análisis de correspondencia canónica explicó un 29,9% de la varianza, destacando la textura del suelo, nutrientes y altitud como factores clave. Se concluye que *Silybum marianum* L., representa una amenaza para la biodiversidad local y los sistemas agrícolas por su capacidad de alterar ecosistemas nativos.

Pant et al. (2021) evidenciaron que el ambiente tiene un papel crucial en la biosíntesis y acumulación de metabolitos secundarios en plantas medicinales, factores como temperatura, luz, el CO₂, la radiación UV, la sequía, la salinidad y la fertilidad del suelo influyen significativamente en la expresión de metabolitos como alcaloides, flavonoides y terpenoides, pudiendo aumentarlos o disminuirlos hasta en un 50%, dependiendo de la especie y el tipo de estrés. La respuesta es compleja y específica con variaciones incluso dentro de la misma planta en diferentes entornos.

2.3.5. Estudios comparativos en gradientes altitudinales en otras especies.

Guevara-Terán et al. (2024) evaluaron el efecto de la altitud comparando sitios alrededor de 2360 m versus 3200 m en la sierra de Ecuador sobre la composición química y capacidad antioxidante de los frutos de *Rubus glaucus* Benth (mora andina) un arbusto frutal que crece a diferentes elevaciones, encontraron diferencias significativas, las moras cultivadas a mayor altitud presentaron mayores contenidos de compuestos fenólicos (flavonoides totales y antocianinas) en comparación las de menor altitud, considerando frutos el mismo grado de madurez. Por su parte la capacidad antioxidante (medida en

ensayos ABTS y FRAP) resultó superior en muestras de altitud elevada, particularmente en estados inicial de madurez, sugiriendo que las condiciones de mayor altura favorecen una acumulación temprana de compuesto antioxidantes. Estos resultados respaldan la idea de que el estrés adicional de altitud (posiblemente mayor radiación UV y temperatura más baja) induce en la mora andina una respuesta de síntesis de metabolitos fenólicos protectores.

Zhou et al. (2021) estudiaron gradientes altitudinales fuera de los Andes, en poblaciones silvestres de *Agriophyllum squarrosum* (planta del desierto asiático) a lo largo de amplios gradientes (desde el nivel del mar hasta 4 000 m) combinando experimentos en jardín común y análisis metabolómicos. Hallaron una alta variación en el perfil de 20 flavonoides entre poblaciones de diferentes altitudes. Inicialmente sus datos metabolómicos no dirigidos indicaron que ciertas agro poblaciones de altura acumulaban más flavonoides como quercetina, hesperetina, epigenina que las de menor altitud, sugiriendo una posible adaptación local. Sin embargo, el análisis detallado reveló un matiz interesante; tres compuestos clave quercetina, tricina y rutina estaban significativamente enriquecidos en las poblaciones de baja altitud en comparación con las de altitud media y alta. Este patrón se correlacionó positivamente con la mayor precipitación de los sitios de mejor altitud, mientras que a mayor altitud (más árida) esos flavonoides disminuían. Los autores concluyen que las diferencias observadas en el contenido de flavonoides entre poblaciones de *A. squarrosum*, no se debía únicamente a la altitud, sino a la heterogeneidad ambiental asociada principalmente a gradientes de humedad y temperatura) que ejerce presión de selección distinta en cada zona.

Pan et al. (2023) estudiaron cómo la altitud afecta el metabolismo de *Asarum sieboldii*, mostrando que, a mayor altitud, hay una intensificación del metabolismo nitrogenado en hojas y del metabolismo de carbono en raíces. Además, se incrementa la producción de compuestos fenólicos como el ácido ferúlico y vainílico, asociados a mayor actividad antioxidante. Sin embargo, este incremento de metabolitos secundarios se produce en detrimento del crecimiento, evidenciando un compromiso adaptativo entre desarrollo y defensa.

2.4. Hipótesis

2.4.1. Hipótesis general

Los gradientes altitudinales de 3200, 3400 y 3600 m.s.n.m. inducen diferencias significativas en los patrones fenotípicos, citogenéticos y en el contenido de silimarina de *Silybum marianum* L. Gaertner

2.4.2. Hipótesis específicas

- Existen diferencias fenotípicas significativas entre las poblaciones de *Silybum marianum* L. en los tres gradientes altitudinales
- El cariotipo de *Silybum marianum* L., presenta variaciones citogenéticas asociadas a la altitud.
- El contenido de silimarina en las semillas de *Silybum marianum* L., varía significativamente en función de la altitud.
- Existe una correlación significativa entre los rasgos fenotípicos, citogenéticos y el contenido de silimarina en función del gradiente altitudinal.

2.5. Identificación de variables e indicadores

Tabla 5

Identificación de variables e indicadores

Tipo	Variable	Dimensión/subvariable	Indicadores clave
Independiente	Altitud	Gradiente altitudinal	3200, 3400 y 3600
Dependiente	Patrón fenotípico	Morfológica: Altura de planta, tamaño de hoja, N° de capítulos, Peso, color de semillas Fenológico: Germinación, Inicio de floración, fructificación, senescencia.	Altura media (m) Tamaño de hoja (cm) N° de capítulos Color de semilla Peso de semilla, Germinación, floración, fructificación, senescencia
Dependiente	Patrón citogenético	Cariotipo	Número cromosómico (2n) Fórmula cromosómica, Índice de asimetría
Dependiente	Contenido de silimarina	de ppm	Concentración total ppm/g de semilla seca

2.6. Operacionalización de variables.

Tabla 6

Operacionalización de variables

Indicador	Tipo de dato	Escala	Instrumento/Procedimiento	Unidad	Frecuencia de medición
Altitud	Cuantitativo	Razón	GPS	m	Una vez por gradiente
Altura de planta	Cuantitativo	Razón	Cinta métrica	m	30-50 individuos
Tamaño de hoja	Cuantitativo	Razón	Cinta métrica	cm	30-50 individuos
N° de capítulos	Cuantitativo	Discreta	Conteo directo	unidad	En ántesis
Tamaño de semillas	Cuantitativo	Discreta	Regla milimetrada	mm	100
Color de semilla	Cualitativo	-	Apreciación visual	color	Por colecta
Meses de floración, fructificación,	Cualitativo	-	Apreciación visual en campo	meses	Meses del año
N° cromosómico (2n)	Cuantitativo	Discreta	Ápices radiculares, tinción, observación y cuantificación al microscopio	Número	> 30 células
Fórmula cromosómica	Cualitativo ordinal	-	Observación y cuantificación microscópica	2n	Una vez
Índice de asimetría	Cuantitativo	Intervalo	Cariotipo	%	Una vez
Contenido de silimarina	Cuantitativo	Razón	Extracción de silimarina, metanol, ultrasonido, HPLC-DAD a 287nm	ppm	Con replicas

CAPITULO III

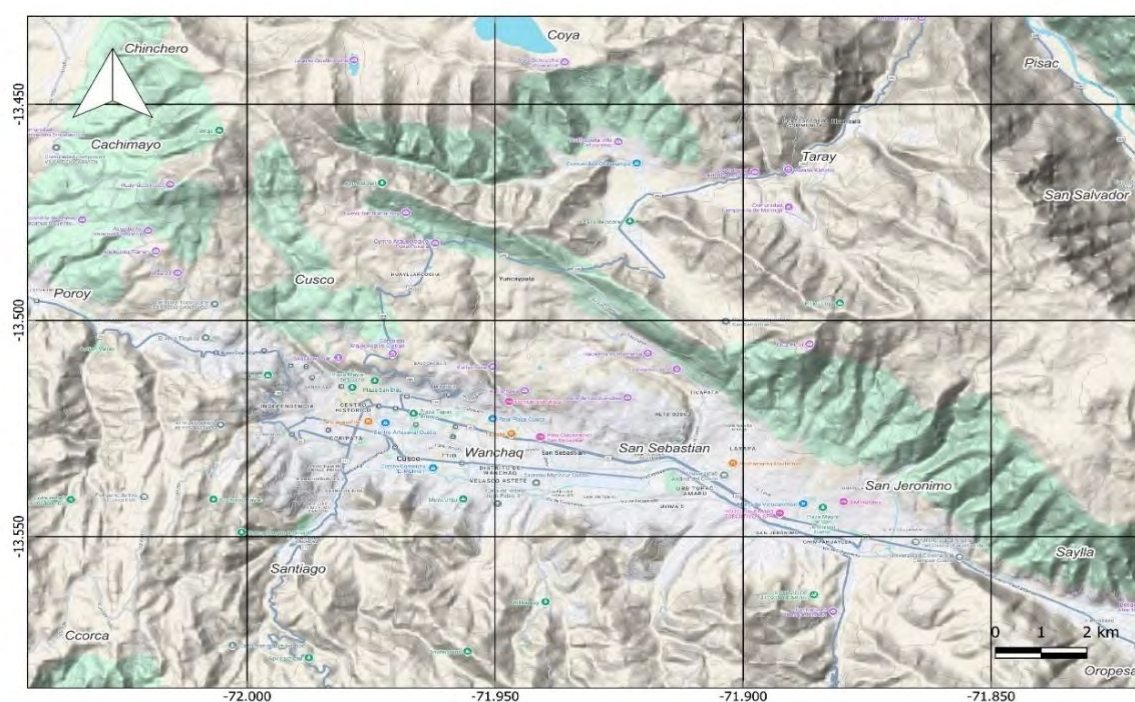
METODOLOGIA

3.1. Ámbito de estudio: Localización política y geográfica

La presente investigación se ejecutó en la provincia del Cusco, ubicada en la parte central del departamento de Cusco, limita por el Norte con las provincias de Calca y Urubamba, por el Sur con la provincia de Paruro, por el Este con la provincia de Quispicanchi, y por el Oeste con la provincia de Anta, su geomorfología conformada por el Rio Huatanay y sus tributarios. A una altitud ubicada entre 3138 m.s.n.m. (distrito Saylla) y 3635 m.s.n.m. (distrito Ccorcca). La ciudad de Cusco se ubica en un valle interandino, entre los 3244 m.s.n.m. (distrito San Jerónimo) y los 3700 m.s.n.m. (Comunidad del Arco de Tica-Tica). Comprende una superficie de 61 700 Ha. y cuenta con 8 distritos (MPC, 2013)

Figura 17

Mapa de georeferenciación de la Provincia del Cusco



Nota: Elaboración con Qgis 3.42

La ciudad imperial del Cusco tiene un clima que fluctúa entre templado del piso Queswa (de los 2500 a los 3600 m.s.n.m.), y el frío seco del piso cercano a la puna. Presenta dos estaciones claramente diferenciadas: Estación seca, de mayo a octubre, y Estación lluviosa, de noviembre a abril. Su temperatura es fría moderada, acentuada en invierno, entre mayo y agosto, cuando se produce heladas intensas sin lluvia, en verano,

de noviembre a marzo, el frío disminuye, aunque es época de lluvias y el grado de humedad se eleva, con fuertes tormentas eléctricas, a veces acompañada de granizo. Escasamente se observa nieve. La temperatura en invierno desciende a 5-7°C bajo cero y al medio día se eleva hasta 28°C (temperaturas acentuadas en la última década). (Junta de Andalucía, 2017). La temperatura media anual es de 11.6°C y una precipitación media anual de 745.9 mm (INEI, 2021) En base a la clasificación propuesta por L. Holdridge, para el Valle del Cusco, se encuentra en zona de vida: Bosque Seco montano Bajo Subtropical (SENAMHI, 2019).

La ciudad del Cusco y alrededores se ubican en esta zona, ahora densamente poblada. La mayor precipitación de setiembre a abril ocasiona que los suelos se comporten recargando agua en este tiempo, para luego en marzo producirse abundante agua de escorrentía. La vegetación natural se presenta en dos estratos bien definidos, uno arbóreo y el otro herbáceo en el cual se incluyen las arbustivas y las gramíneas (Aragón & Chusme, 2018).

3.2. Diseño metodológico

Para la determinación de los patrones fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina en *Silybum marianum* L., se ha desarrollado siguiendo el siguiente diseño metodológico:

3.2.1. Tipo y nivel de investigación

3.2.1.1. Tipo de investigación:

Por su finalidad es **aplicada**, se busca generar conocimiento útil para comprender el efecto de la altitud sobre una planta con interés medicinal *Silybum marianum* L., lo que puede aplicarse a la Fito medicina, biotecnología o producción de metabolitos secundarios y a la agronomía.

Por su enfoque metodológico: Es **cuantitativo**, se evaluó variables medibles: como morfología (altura, hojas, capítulos), citogenética (número de cromosomas, cariotipo) y concentración de silimarina, lo que implica recolección de datos numéricos y análisis estadísticos.

3.2.1.2. Nivel de investigación:

Descriptivo, se caracterizó los patrones fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina en tres gradientes altitudinales a diferentes altitudes.

Es **correlacional**, se examinó la relación entre el gradiente altitudinal y las variaciones fenotípicas, citogenéticas y contenido de silimarina.

3.3. Unidad de Análisis

La unidad de análisis en esta investigación corresponde a los individuos adultos de *Silybum marianum* L. Gaertner, en cada altitud (3207, 3402 y 3625 m.s.n.m.), considerando para cada uno de ellos características fenotípicas, citogenéticas y contenido de silimarina.

Para la parte fenotípica: Se consideraron plantas individuales por cada gradiente altitudinal, observadas *in situ*.

Para la parte citogenética: Se consideraron preparación de células germinales a partir de semillas provenientes de cada gradiente altitudinal.

Para la determinación de silimarina: Se consideraron semillas de cada gradiente altitudinal.

3.4. Población de estudio

Los individuos de *Silybum marianum* L. Gaertner, ubicados en los tres gradientes altitudinales (3207, 3402 y 3625 m.s.n.m.).

3.5. Tamaño de muestra

Para el estudio fenotípico (morfología y fenología) se realizaron mediciones morfológicas de 50 plantas, por cada gradiente altitudinal y observaciones fenológicas en campo durante los años 2020-2021.

Para el estudio citogenético y la determinación del contenido de silimarina se colectaron semillas de 20-30 capítulos florales, por cada gradiente altitudinal.

3.6. Técnicas de selección de muestra

Para esta investigación se utilizó un muestreo no probabilístico de tipo intencional, seleccionando individuos de *Silybum marianum* L. que presenten características fenológicas similares (plantas adultas, en floración o con semillas formadas) en cada uno de los gradientes altitudinales (3207, 3402 y 3625 m.s.n.m.). Esta técnica se justifica por la distribución irregular de la especie en el campo y la necesidad de comparar características homogéneas entre gradientes altitudinales.

3.7. Técnicas de recolección de información

Para la recolección de la información se emplearon tres técnicas según el tipo de variable:

Para los datos fenotípicos, se utilizó observación directa estructurada, empleando fichas de campo y mediciones morfométricas (altura, número de capítulos, forma foliar, número de semillas, etc.)

En el caso de los datos citogenéticos, se recolectaron semillas para la germinación y tratamiento citogenético en laboratorio y tinción analizada bajo microscopia óptica para el conteo y descripción del cariotipo.

Finalmente, para los análisis de silimarina, se recolectaron semillas secas que luego fueron procesadas en laboratorio mediante extracción, tamizaje por UV-VIS, FTIR y determinación del contenido de silimarina por HPLC-DAD.

3.8. Técnicas de análisis e interpretación de la información

Para el análisis de datos se utilizaron técnicas estadísticamente descriptivas e inferenciales. Las medidas de tendencia central y dispersión permitieron resumir las variables evaluadas. Para contrastar hipótesis se empleó la prueba Tukey, según la distribución de los datos, además de Análisis de Varianza (ANVA) y análisis multivariado para identificar diferencias de las altitudes frente a patrones fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina.

3.9. Técnicas para demostrar la verdad o falsedad de las hipótesis planteadas

Para contrastar hipótesis se empleó la prueba de Tukey, según la distribución de los datos, además de Análisis de Varianza (ANOVA), para identificar las diferencias en el contenido de silimarina, los patrones fenotípicos y citogenéticos a gradientes altitudinales.

3.10. Procedimiento experimental

3.10.1. Materiales

Material vegetal:

Plantas y semillas de *Silybum marianum* L. Gaertner procedente de los tres gradientes altitudinales (3207, 3402 y 3625 m.s.n.m.) del valle del Cusco.

Materiales de campo: Bolsas de papel Kraft, tijeras podadoras, pinzas, cámara fotográfica, termohigrómetro, wincha, cuaderno de campo, GPS.

Materiales de Laboratorio: Tubos de ensayo de 12 x 100 mm, tubos eppendorf de 2 mL, placas Petri de 100 x 15 mm, pipetas serológicas de 1, 5 y 10 mL de 1/10, probetas de 50 y 100 mL, fioles de 100 y 250 mL, matraz de 100 mL, láminas portaobjetos y cubreobjetos, gradillas de tubo, vasos de precipitado de 50 y 100 mL, soporte universal, mechero de alcohol, vernier digital, micropipeta de 100-1000 µL, micropipeta de 10 - 100µL, punteras para micropipeta de 10-100 µL y 100-1000 µL, luna de reloj, bisturí, pinza de relojero, pinza universal, frascos de vidrio de 100, papel toalla y lápiz.

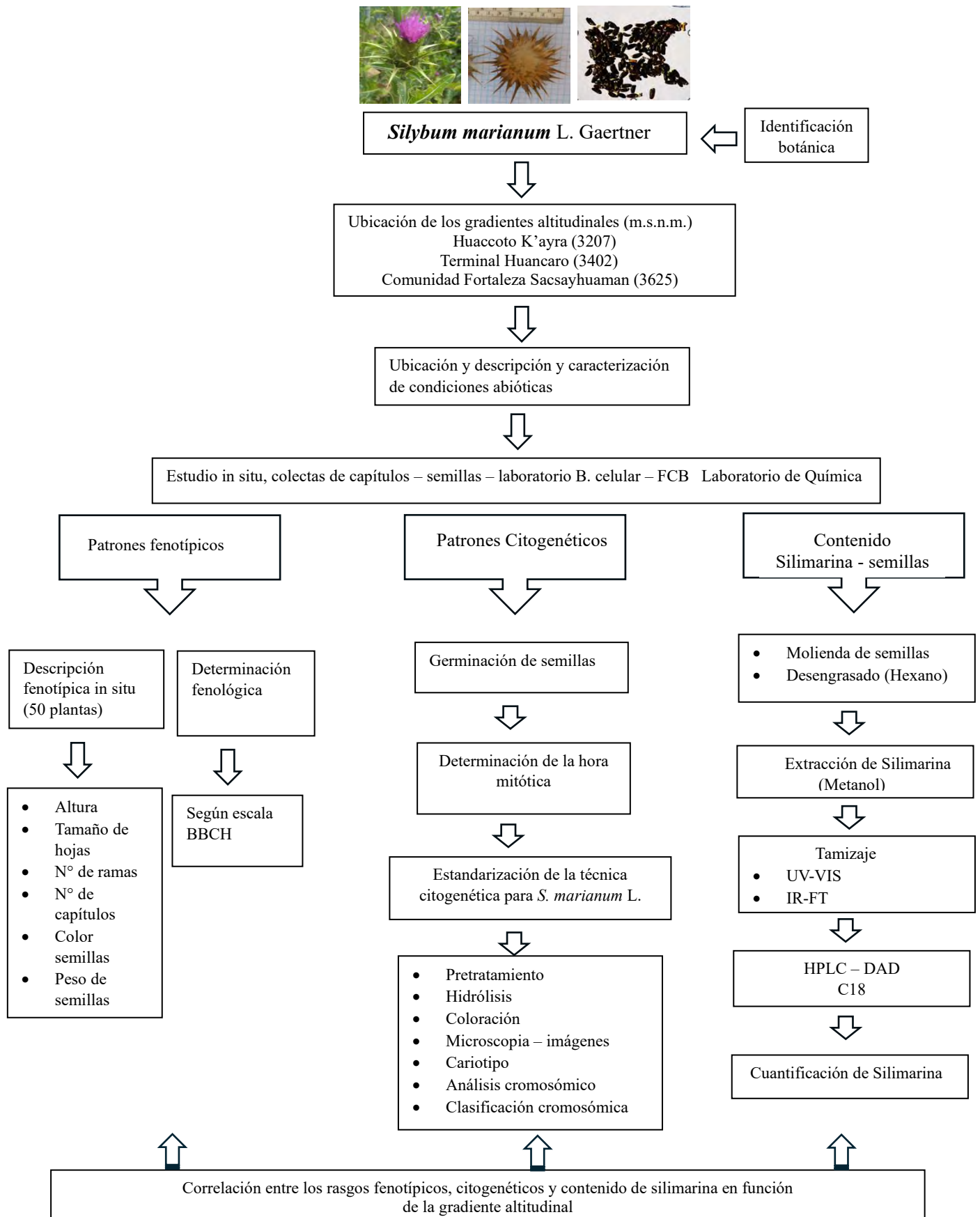
Equipos e instrumentos de laboratorio: Balanza analítica H.W. Kessel SA, balanza de precisión A&D Company. FZ 1200i, termohigrómetro Boeco Germany, GPS Garmin 66s, potenciómetro HANNA, microscopio óptico Leica, microscopio óptico triocular ZEISS Lab. A1, Axiocam 305 color, cronómetro CASIO, destilador de agua BOECO Modelo BOE870800, refrigeradora ELECTROLUX, baño maría BBL, cabina de extracción de vapores Biobase, sonicador Biobase, centrífuga, vortex, espectrofotómetro de doble haz UV/VIS Unico, espectrofotómetro FTIR-ATR-BRUKER-ALPHA-2019, sistema de análisis cromatográfico HPLC-DAD OPTIMO modelo KONIC 560 KONIKRON PLUS.

Reactivos y colorantes: Ácido clorhídrico 1N, 8-hidroxiquinoleína 0.02M, colchicina 0.05% y 0.01%, reactivo de Farmer, reactivo de Shiff, etanol al 70%, etanol absoluto, orceína acética clorhídrica al 2%, colorante de Giemsa al 2%, NaOH 1N Merck, acetona Merck, acetato de etilo Merck, benceno Merck, hexano Merck, metanol Merck grado HPLC, silimarina (≥30% de Silibina) SIGMA Lote #BCBT9170, Cod: S0292. N° CAS 65666-07-1, agua grado HPLC, acetonitrilo Merck grado HPLC.

Recursos e Infraestructura – Laboratorios

Laboratorio de Biología Celular de la EP de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSAAC, Laboratorio FRACTAL QUÍMICOS E.I.R.L. Ubicado en Jesús María, Lima.

Figura 18
Flujograma de la investigación



3.10.2. Ubicación y descripción de los tres gradientes altitudinales

Los tres gradientes altitudinales de estudio se establecieron en base al hábitat natural de *Silybum marianum* L. en el valle del Cusco, para lo cual mediante un GPS se ubicó la altitud, latitud sur, longitud oeste tal como se muestra en la siguiente tabla y en el mapa de georeferenciación figura 20, también se hizo una descripción general, ubicación de zona de vida de Holdridge, y descripción de las características climáticas, tipo de suelo, flora y fauna acompañante de cada lugar (Anexo 2)

Tabla 7
Ubicación y descripción de los tres gradientes altitudinales

Lugar	Código	Altitud (m.s.n.m.)	Latitud Sur	Longitud oeste	Descripción general
Huaccoto K'ayra	HK	3207	13°55'17.29"	71°87'03.61"	Zona ruderal cerca al riachuelo de Huaccoto costado del puente de K'ayra en la Av. La Cultura. San Jerónimo
Terminal Huancaro	TH	3402	13°54'16.74"	71°98'29.71"	Zona ruderal cerca al riachuelo de Huancaro, detrás del terminal terrestre Juan Espinoza Medrano (2do. Puente)
Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman	FS	3625	13°50'29.91"	71°98'11.75"	Comunidad Mollococha, Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman. Frente al letrero del INC.

Nota: Elaboración propia

De acuerdo con las zonas de Vida de Holdridge, los gradientes altitudinales, pertenecen a la zona Subalpina y alpina con una temperatura media anual de -3 a 12°C, con una precipitación anual superior a 1000 mm, tal como se muestra en la siguiente tabla.

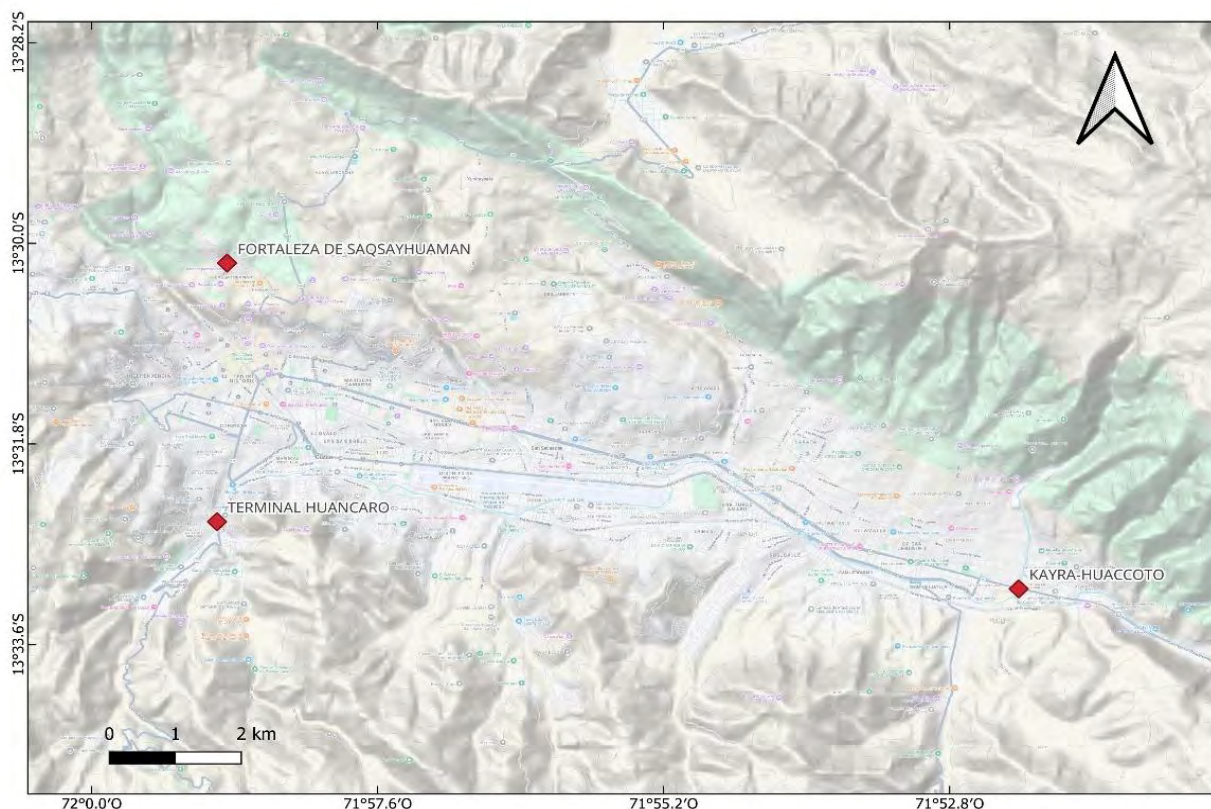
Tabla 8
Gradientes altitudinales según zonas de Vida de Holdridge

Altitud (m.s.n.m.)	Lugar de ubicación	Zonas de vida de Holdridge	Temperatura media anual (°C)	Precipitación anual (mm)
3207	Huaccoto K'ayra	Subalpina	-3° y 12°	> a 1000
3423	Terminal Huancaro	Subalpina y Alpina	-3° y 6°	> a 1000
3625	Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman	Alpina	-3° y 6°	> a 1000

Nota: Tomado de (SENAMHI, 2019)

Figura 19

Mapa de georeferenciación de los tres gradientes altitudinales en el valle del Cusco.



Nota: Elaboración con Qgis 3.42

3.10.2.1. Huaccoto K'ayra (HK)

El hábitat de *Silybum marianum* L. se encuentra cerca al riachuelo de Huaccoto, costado del Puente K'ayra en la Av. La Cultura en San Jerónimo a 3207 m.s.n.m., a 13°55'17.29" latitud sur y 71°87'03.61" longitud oeste, en la clasificación de la zona de vida de Holdrige, se ubica como sub alpina. (Figura 20).

El clima es semi templado seco y frío. La temperatura media mensual es de 12.35 °C y la precipitación total es de 652.14 mm. Se puede inferir que los registros que se obtuvieron en la estación meteorológica de K'ayra, indican que se presenta un periodo de lluvias intenso entre los meses de diciembre a marzo, en los cuales en cada mes se supera los 100 mm de precipitación. Para los meses de mayo a hasta el mes de septiembre, se presenta la época de secas. La dirección promedio anual del viento, predominante es del Noreste, con velocidad promedio de 12,1 Km/h. Se observa que para estas estaciones los vientos son bastante débiles y de acuerdo con la escala de Beaufort se clasifican como "brisa muy débil". Este viento de componente dominante desde el Norte es similar al que hay en el Valle de Urcos. En cuanto a velocidad nunca alcanza magnitudes superiores a

70 u 80 Km/h (“vientos duros a muy duros”). Estas esporádicas ráfagas aparecen a veces algunos años en los meses de julio a octubre, al promediar las tardes. (SENAMHI, 2019)

La comunidad biótica comprendida por cipreses (*Cupressus sp.*), Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), Diente de león (*Taraxacum officinale*), Chillca (*Baccharis buxifolia*). (Anexo 2).

Figura 20

Huaccoto K'ayra (3207 m.s.n.m.)



3.10.2.2. Terminal Huancaro (TH)

El hábitat de *Silybum marianum* L. se encuentra cerca de la microcuenca de Huancaro, detrás del terminal terrestre Juan Espinoza Medarano (segundo puente), a 3402m de altitud, a 13°54'16.74" latitud sur y 71°98'29.71" longitud oeste, en la clasificación de la zona de vida de Holdridge, se ubica como sub alpina y alpina. (Figura 21)

El clima de la microcuenca de Huancaro, es semi templado seco y frío, con deficiencias de lluvias en época de secas bajas temperaturas. El régimen de temperatura promedio en la zona es de 11 a 12°C, siendo el rango mayor de temperatura que se verifica en la estación lluviosa de septiembre a febrero, fecha que coincide con la germinación de semillas. En los meses de mayo a agosto (época de secas) la temperatura promedio es de 9.2 y 10.4°C, valores que pueden descender por las variaciones meteorológicas. La humedad atmosférica es de 60%, llegando a registrarse 71% de humedad durante el mes de febrero del 2005. La precipitación acumulada anual de 760 mm, durante la época de lluvias, que comprende desde los meses de noviembre a marzo. Los meses de junio a julio no se registra precipitación alguna; sin embargo, en los últimos años se han registrado

precipitaciones muy esporádicas durante la época de secas en 5 mm. La dirección predominante de los vientos es de Norte – Noroeste, debido a la orografía dominante en la Subcuenca del Huatanay, la velocidad, del viento acumulado es de 40 Km/ en 24 hrs. siendo la máxima velocidad en el mes de agosto, durante la temporada de secas. El suelo de la microcuenca, constituye un importante recurso natural en especial para la agricultura, comercio y autoconsumo; engloba actividades importantes como: cultivo, pastoreo, forestación. En cuanto a las características físicas del suelo se tiene la textura (grosor o finura de las partículas del suelo), correspondiente a arcillo limoso. (Ascue Cuba, 2018)

La comunidad biótica: Comprendida por vegetación arbustiva como *Colletia espinosissima*, *Baccharis polyanta*, *Berberis boliviana*, y especies de fauna como rabiblanca, gorriones, chihuaco entre otras. (Loayza, 2022) (Anexo 2).

Figura 21

Terminal de Huancaro (3402 m.s.n.m)



3.10.2.3. Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (FS)

El hábitat de *Silybum marianum* L. se encuentra cerca en la comunidad Fortaleza de Sacsayhuaman en un piso altitudinal quechua de 3625 m.s.n.m, a 13°50'29.91" latitud sur y 71°98'11.75" longitud oeste, en la clasificación de la zona de vida de Holdrige, se ubica como alpina. (Figura 22)

El Clima es templado, seco, y se caracteriza por presentar lluvias en verano. Normalmente hace frío en las noches y durante las primeras horas de la mañana, al medio día, en cambio, aumenta considerablemente. Tiene dos estaciones definidas: una seca

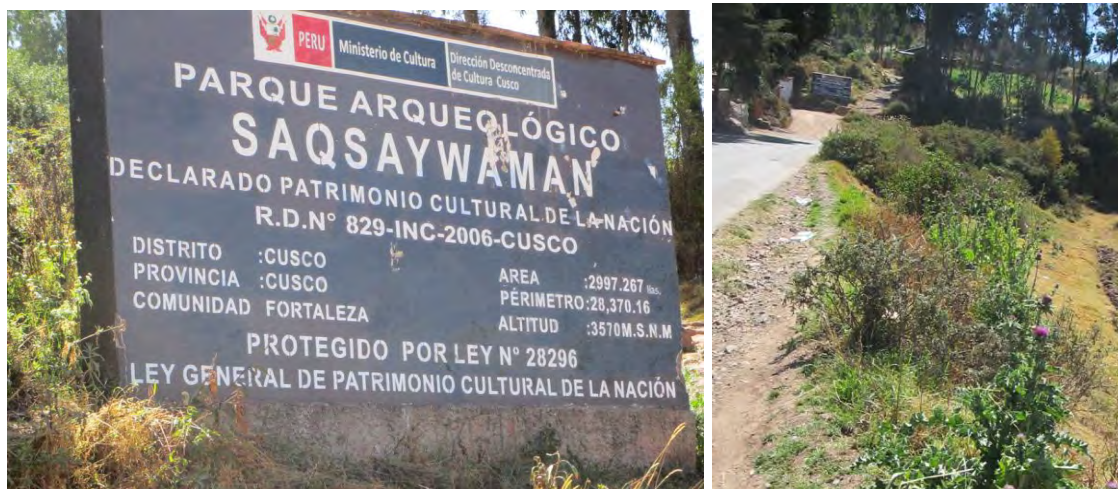
entre abril y octubre, con días soleados, noches frías con heladas y temperatura promedio de 13°C; y otra lluviosa, de noviembre a marzo, con temperaturas promedio de 12°C. En el parque arqueológico de Sacsayhuamán, se pueden encontrar 3 tipos de pisos altitudinales o zonas de vida como son: a) Paramo muy húmedo. Abarca áreas altas del parque por encima de los 3900 m.s.n.m. como son el cerro Senqa, Fortaleza y Salkantay que se caracterizan por sus fuertes pendientes superiores al 35%. b) Bosque húmedo montano Cubre áreas ubicadas entre 3500 y 3900 m.s.n.m. siendo esta la zona de vida más extensa del parque, además de la zona con mayor diversidad de vida; por otra parte, esta zona sufre por la actividad agrícola debido a la presencia de agricultores. c) Bosque seco montano. Comprende el extremo sur del parque, la parte media y baja de la microcuenca del río Cachimayo hoy altamente deteriorado y urbanizado. La topografía en el Parque arqueológico de Sacsayhuaman es principalmente accidentada, teniendo mesetas prolongadas y algunas quebradas profundas. (Moscoso, 2023)

El ambiente del parque arqueológico de Sacsayhuaman constituye un espacio libre y protegido del valle del Cusco, que alberga importantes recursos de flora y fauna silvestre. Presenta un total de 301 especies distribuidas en 58 familias vegetales, siendo así que la familia Asteracea (“chillka”, “Tayanca”, Llauli”, etc.) presenta la mayor diversidad con 76 especies; Poacea (“ichu”, etc.) 35 especies; Rosaceae (“Queuña”, “Canlli”, “Lloque”, etc.) 12 especies; Fabacea (“Molle”, “Tarwi”, etc.) 10 especies; Cactaceae (“Pataquisca”, “Huamancayo”, etc.) 9 especies; y, Lamiaceae (“Ñucchu”, “Ckuñucamuña”, etc.) con 7 especies. (Anexo 2).

En el parque arqueológico de Sacsayhuamán se pueden apreciar muchas zonas erosionadas y deforestadas, muy impactadas, y una introducción indiscriminada de especies exóticas como son el “eucalipto” y el “pino”. En la actualidad las comunidades que pueblan el parque son las siguientes: Comunidad campesina de Huayllarcocha, Comunidad campesina de Yuncaypata, Comunidad campesina de Tambomachay Pucara, Grupo campesino Fortaleza, Grupo campesino San Cristóbal de Pucro, Asociación Civil Pucara (Moscoso, 2023).

Figura 22

Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (3625 m.s.n.m.)



3.10.3. Caracterización de las condiciones abióticas de los tres gradientes altitudinales

3.10.3.1. Registro de Temperatura, humedad y precipitación anual.

Mediante el uso del sistema de datos meteorológicos del Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENAMHI), (<https://www.senamhi.gob.pe/site/descarga-datos/>), se extrajo los registros meteorológicos del año 2021 de temperatura mínima y máxima (°C), humedad relativa (%) y precipitación (mm/día) para los gradientes altitudinales (SENAMHI, 2025)

3.10.3.2. Muestreo de suelo

Según las recomendaciones del (MINAM, 2014), se muestreo el suelo donde crecen las plantas de *Silybum marnianum* L., en los tres gradientes altitudinales, para lo cual se hizo un hueco en forma de “V” en el suelo a una profundidad de 20-30cm, de uno de sus lados se tomó una porción de 2-3cm de espesor, con una pala se quitó los bordes, dejando una parte de 5cm de ancho, se obtuvo una muestra de aproximadamente 500g en bolsa de plástico de primer uso, y esta se envió al laboratorio, para su análisis.

3.10.4. Determinación de patrones fenotípicos de *Silybum marianum* L.

3.10.4.1. Identificación botánica

Se colectaron las especies de plantas de cada gradiente altitudinal, se disecaron y debidamente preparadas se llevó para la identificación botánica en el Herbario Vargas (CUZ). (Anexo 4)

3.10.4.2. Descripción fenotípica de *Silybum marianum* L. Gaertner

Para esta etapa de la investigación se utilizó la metodología propuesta por (Ram et al., 2005 & Dušková et al., 2016), se determinaron las características fenotípicas *in situ* en 50 plantas, en cada gradiente altitudinal durante las salidas de campo, consistentes en la determinación de altura de la planta, tamaño de hojas, número de ramas, número de capítulos, fenotipo de capítulo y aquenios, color tamaño, peso de 1000 semillas según (Hevia et al., 2007).

La determinación fenológica de *Silybum marianum* L. se realizó según escala BBCH, de acuerdo a la metodología desarrollada por (Martinelli et al., 2015) con uso de la escala extendida de BBCH (Biologische Bundesantalt, Bundessortenamt and Chemische Industrie) en base a los estadios principales de crecimiento para plantas monocotiledoneas (Meier, 2001). Las observaciones y registros según la escala BBCH (Tabla 9), se realizó en varias salidas de campo registrando las características fenológicas encontradas durante los meses del 2021 en los tres gradientes altitudinales.

Tabla 9

*Escala BBCH para determinación de los estados fenológicos de *Silybum marianum* L.*

Escala BBCH	Descripción
0	Germinación, brotación, desarrollo de yema
1	Desarrollo de hojas (brote o tallo principal)
2	Formación de brotes laterales/macollamiento (ahijamiento)
3	Crecimiento longitudinal del tallo o crecimiento en roseta, desarrollo de brotes (retoños) y encañado (tallo principal)
4	Desarrollo de las partes vegetativas cosechables de la planta o de 58 granos vegetativos de propagación/embuchamiento
5	Emergencia de inflorescencia
6	Floración (tallo principal)
7	Desarrollo de Capitulo
8	Coloración y maduración de frutos y semillas
9	Senescencia, comienzo de dormancia

3.10.4.3. Muestreo de capítulos de *Silybum marianum* L.

Se realizaron recolectas de capítulos secos de *Silybum marianum* L. durante los meses de junio a julio del 2021 en bolsas de papel Kraft, debidamente identificadas y se llevaron al laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSAAC, para determinación de tamaño y separación de semillas y al mismo tiempo la determinación de características fenotípicas. (Hevia et al., 2007)

3.10.4.4. Muestreo de Semillas de *Silybum marianum* L.

Las semillas se obtuvieron a partir de la colecta de capítulos secos de *S. marianum*, durante los meses de junio a julio del 2021, y se les asignó un código y anotó el color de las semillas. (anexo 7)

3.10.5. Análisis de los patrones citogenéticos de *Silybum marianum* L.

3.10.5.1. Germinación de semillas de *Silybum marianum* L.

Según, Asghari-Zakaria et al. (2008), se realizaron ensayos previos para la determinación de tiempo de germinado y % de germinación de las raíces radicales, se pusieron a germinar 15 semillas en placas de Petri con papel secante, humectadas con 15-20 mL de agua destilada estéril, se esperó el desarrollo de raicillas de 1-1.5cm en 6 a 7 días a temperatura de 18-20°C en cámara oscura, se determinó el rendimiento de la germinación de las semillas la misma que alcanzó 60% de viabilidad de germinación y 40% de semillas infértiles, similares en cada gradiente (Tabla 10).

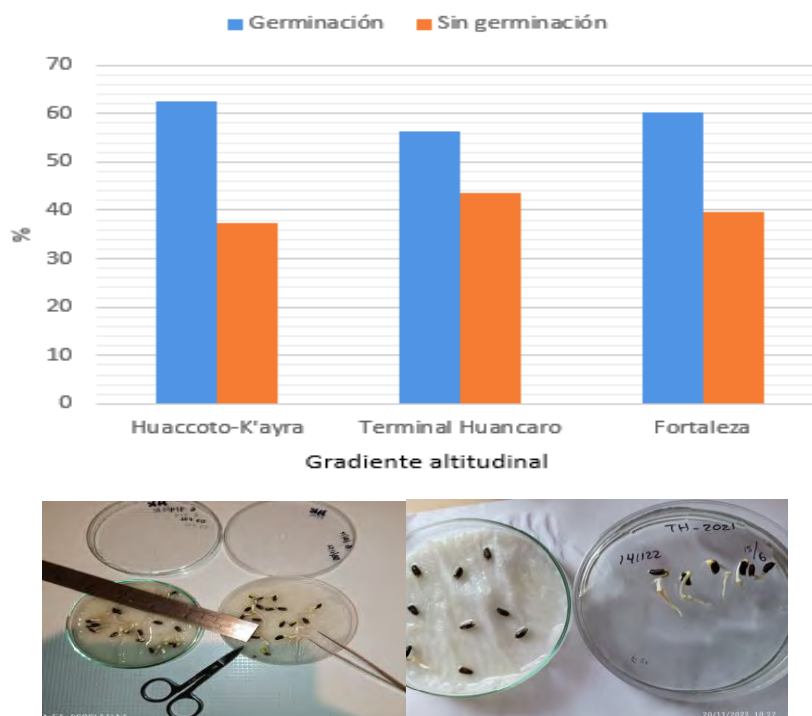
Tabla 10

*Porcentaje de germinación de semillas de *Silybum marianum* L. por gradiente altitudinal*

Gradiente altitudinal	% semillas en germinación	% semillas sin germinación	Total
Huaccoto-K'ayra (3200 m.s.n.m.)	109(62.64%)	65(37.36%)	174(100%)
Terminal Huancaro (3402 m.s.n.m.)	98(56.33%)	76(43.67%)	174(100%)
Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (3625 m.s.n.m.)	105(60.35%)	69(39.65%)	174(100%)
Promedio	104(60%)	70(40%)	-

Figura 23

Porcentaje de germinación de semillas de Silybum marianum L.



3.10.5.2. Determinación de la hora mitótica.

Según las técnicas de Rondón et al., (2013) & Burbano et al., (2011), A partir de raíces meristemáticas apicales de entre 1-1.5cm. de longitud, se realizaron colectas de tres raicillas por cada gradiente altitudinal, durante el periodo de 7:00 a 20:00 horas del día, a intervalos de una hora, se lavaron las raíces con agua destilada, se colocaron en solución de Farmer a 4°C por 24 horas, luego las raicillas se enjuagaron con agua y se colocaron en un portaobjetos se cortaron a 1-2mm del ápice radicular se añadió 2-3 gotas de orceína acética clorhídrica al 2% por 10 minutos, se flameó evitando hacer hervir, se colocó el cubreobjetos, se realizó el golpeteo con la punta de un lápiz y aplastamiento sobre papel secante colocado sobre el cubreobjetos que contenía el ápice radicular, luego se secó el residuo y se llevó a observación microscópica y conteo de células en división a 400x de aumento. Se determinó el índice mitótico, índices de fases parciales, mediante ecuaciones de Poggio et al.

$$\text{IFt}\% = \text{IF} (\%) / \text{Número de horas}$$

$$\text{IMt}\% = \text{IFp} + \text{IFm} + \text{IFa} + \text{If t}$$

Nota:

If t% : Índice de fases totales (promedio de los porcentajes de cada fase y el número de horas empleadas en el estudio)

IMt% : Sumatoria del% de índice de fases
(p) profase, (m) metafase, (a) anafase, (t) telofase

3.10.5.3. Estandarización de la técnica citogenética para *Silybum marianum* L.:

En esta etapa se realizaron ensayos previos para estandarizar la metodología apropiada para *Silybum marianum* L. ya que las técnicas son particulares para cada especie en todas las etapas como son: El pretratamiento, hidrólisis y coloración, respecto a las condiciones de tiempo, temperatura, concentración de reactivos y monitoreadas al microscopio. Siguiendo las metodologías de (Abrahimpour et al., 2011; Asghari-Zakaria et al., 2008; Burbano et al., 2011; Marcela et al., 2010), se realizó los siguientes tratamientos.

- Pretratamiento: se probó con Colchicina 0.01, 0.05, 0.1% por 2 y 3 horas respectivamente y 8-Hidroxiquinoleína 0.02M a 2, 3 y 4 horas a temperatura ambiente de 18-20°C y se determinó el mejor pretratamiento.
- Hidrólisis: Se probó con HCl 1N y 2N por 10,20 y 30 minutos, también se probó la temperatura ambiental y 60°C.
- Coloración: Se determinó el mejor colorante para este caso, para lo cual se probó colorante de orceína acética clorhidra (OAC) al 2%, reactivo de Shiff, doble tinción con OAC 2% más reactivo de Shiff, se evaluó el tiempo a temperatura ambiental.
- Microscopía y captura de imágenes: Se observa las metafases al microscopio óptico a 1000 x con aceite de inmersión y se fotografian las células con mejor extensión.
- Análisis cromosómico, se siguió la metodología propuesta por (Asghari-Zakaria et al., 2008), Las mediciones cromosómicas que comprende las longitudes de brazo largo, brazo corto y longitud total de cromosoma se realizaron a partir de 10 células metafásicas bien extendidas para cada gradiente altitudinal utilizando software Micromesure de la Universidad Estatal de Colorado, disponible en Internet <http://www.colostate.edu.Depts.Biology>.
- La nomenclatura de cromosoma se desarrolló según Levan et al. (1964) y los cromosomas se denominaron 1,2,3,4, ...y 17 en orden descendente de longitud.
- Clasificación del tipo de cromosoma se realizó según Levan, 1964, según la proporción de brazos RB (q/p)

Metacéntrico (m)	:	RB $\leq$ 1.70
Submetacéntrico (sm)	:	RB 1.71 -3.00
Acrocéntrico (a)	:	RB 3.01 – 7.00
Telocéntrico (t)	:	RB > 7.00

La asimetría del cariotipo se estimó utilizando la relación entre brazos (RB) y (AR), la longitud relativa de los brazos (LR%), el índice centromérico (IC%).

$$\begin{aligned} \text{LR\%} &= (p+q)/\Sigma(p+q) \times 100 \\ \text{RB} &= q/p \\ \text{AR} &= p/q \\ \text{IC\%} &= p/(p+q) \times 100 \end{aligned}$$

La diferencia entre la longitud relativa de cromosoma más corto (S), la categoría de asimetría de Stebbin (1971), los índices de asimetría intra cromosómica (A1) y Inter cromosómico (A2) de Romero-Zarco, 1986

A1: Asimetría intra cromosómica: mide quiebre de simetría dentro de cada cromosoma desbalance p Vs q).

$$A1 = 1 - 1/n \sum_{i=1}^n \left(\frac{p_i}{q_i}\right)$$

A2: Índice de asimetría inter cromosómica

$$A2 = \frac{s}{X}$$

Donde:

s = desviación estándar de la longitud de los cromosomas

X = media aritmética de la longitud de los cromosomas

Si A2 es bajo, los cromosomas tienen longitudes semejantes

Si A2 es alto, existe mucha variabilidad entre cromosomas grandes y pequeños

3.10.6. Análisis del contenido de silimarina a partir de semillas de *Silybum marianum* L.

3.10.6.1. Determinación del rendimiento de material pulverizado a partir del aquenio para obtención de silimarina

Los aquenios triturados y tamizados en malla 20, dieron lugar al material pulverizado a este se determinó el rendimiento de la diferencia de peso del aquenio menos el peso del pericarpo separado en el tamizado, obteniendo una media de 64.02% de rendimiento. (Anexo 8)

3.10.6.2. Extracción de Silimarina a partir de semillas

Se siguió la técnica utilizada por Fallah Huseini et al., (2008), consistente en dos pasos:

El primero consistió en desengrasar las semillas pulverizadas, para lo cual se realizó el siguiente procedimiento: Los aquenios de *Silybum marianum* L. fueron triturados y tamizados en malla 20, para separar el pericarpo de la semilla. Luego a 0.1±0.01g de la semilla pulverizada de aspecto cremoso, se le añadió 1 mL de hexano,

luego sonificado por 30 segundos, centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos y decantado, nuevamente se añadió 1 mL de hexano, sonificado, centrifugado y decantado, luego se evaporó a 50°C por 1 hora por purga trampa.

El segundo paso consistió en la extracción de silimarina para lo cual, se añadió 2 mL de metanol al paso anterior, se aplicó vortex, sonicación y centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos, luego se filtró en filtros millipore de 0.45µm la silimarina pura, para el tamizaje por UV-VIS, IR-FT y determinación de contenido de silimarina por HPLC DAD. Las silimarina extraída presento una apariencia de polvo de color amarillo suave.

Figura 24

Flujograma de extracción, tamizaje y determinación de contenido de silimarina



3.10.6.3. Prueba de solubilidad de silimarina estándar SIGMA (30% de SBN)

La prueba de solubilidad de silimarina se realizó con el estándar de silimarina SIGMA (30% de silibina), en diferentes solventes que se presenta en la siguiente tabla

25, resultado solubilidad completa en metanol, acetona y acetonitrilo: agua 75:25, solubilidad parcial en aceto nitrilo puro, insoluble en agua, hexano y acetato de etilo.

Tabla 11

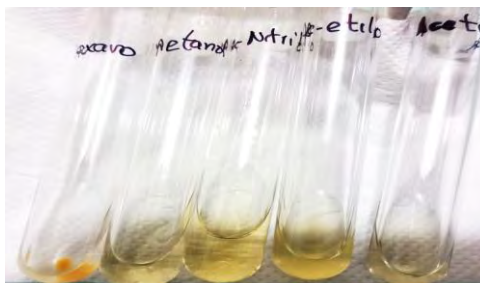
Prueba de solubilidad del estándar de silimarina

Solvente	Lectura	Solubilidad
Agua	-	Insoluble
Hexano	-	Insoluble
Metanol	+++	Completa
Aceto nitrilo (ACN)	++	Parcial
Acetato de etilo	-	Insoluble
Acetona	+++	Completa
Acetonitrilo:H ₂ O 75:25	+++	Completa

Nota: - Insoluble, ++ parcial, +++ completa

Figura 25

Prueba de solubilidad del estándar de silimarina



3.10.6.4. Preparación de soluciones de referencia de silimarina

Se preparó una solución madre de silimarina SIGMA (30% SBN) a una concentración de 1755 ppm y un volumen final de 10 mL, para lo cual se pesaron 17.55 mg de silimarina SIGMA (30% SBN) y se completó el volumen hasta 10 mL. A partir de esta solución madre se prepararon mediante dilución con metanol, 1.5 mL de cada una de las soluciones estándar de trabajo, a concentraciones de 3, 6, 12, 24 y 30 ppm.

3.10.6.5. Tamizaje por espectroscopia UV-VIS

Fundamento: La espectroscopia UV-Visible, se basa en la absorción de radiación electromagnética en la región (200-400 nm) y visible (400-800 nm) por compuestos con estructuras electrónicas conjugadas, como los flavonolignanos que componen la silimarina. Cuando un fotón de energía adecuada incide sobre una molécula, puede excitar electrones desde orbitales de menor energía (normalmente π o n) hacia orbitales de mayor energía (π^* o σ^*). Esta transición electrónica genera un espectro de absorción característico. Los compuestos de silimarina incluyendo silibina, isosilibina, silicristina,

silidianina y taxifolina, presentan bandas de absorción típicas entre 280 y 330 nm asociadas a sus sistemas aromáticos conjuntados (anillos de flavonoides y enlaces C=C).

La obtención de los espectros de absorción de silimarina, se obtuvo usando un espectrofotómetro de doble haz UV/VIS UNICO, ubicado en el laboratorio Fractal Químicos EIRL, siguiendo la metodología de (Moin et al., 2010; Rahman et al., 2004), para el análisis se prepararon tres soluciones estándar de silimarina SIGMA con concentraciones de 3, 6 y 12 ppm, cuyos espectros de absorción fueron registrados y utilizados como referencia para su comparación con los espectros obtenidos de las muestras analizadas.

Figura 26

Espectrofotómetro de doble haz UV-VIS



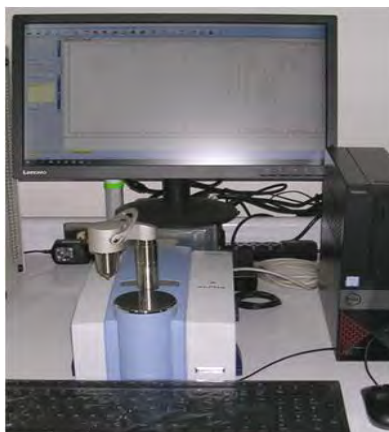
3.10.6.6. Tamizaje por FTIR-ATR.

Fundamento: La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), se basa en la absorción de radiación infrarroja por los enlaces químicos de la muestra. Cada tipo de enlace (-OH, C=O, aromáticos, etc.) vibra a frecuencias características. En el FTIR, un interferómetro barre simultáneamente todas las longitudes de onda y, mediante la transformada de Fourier, se convierte la señal interferencial en un espectro de absorbancia versus número de onda. Así se obtiene un “perfil espectral” (huella digital) donde picos en la región 1 400 – 1 000 cm⁻¹ (huella de anillos aromáticos y ésteres) y alrededor de 650 cm⁻¹ (C=O de los flavonolignanos) permiten identificar y, mediante calibración, cuantificar la silimarina en extractos de *Silybum marianum* L. (Sumatri et al., 2024)

La obtención de los espectros de absorción de silimarina, se obtuvo usando un Espectrofotómetro FTIR-ATR-BRUKER-ALPHA-2019, ubicado en el laboratorio Fractal Químicos EIRL, según metodología de Saiyyad et al., (2017).

Figura 27

Espectrómetro FTIR-ATR-BRUKER-ALPHA-2019



3.10.6.7. Análisis y cuantificación de Silimarina por cromatografía líquida de alta eficacia HPLC-DAD-18.

Fundamento: La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) separa los componentes de la muestra al pasarla bajo presión por una columna empaquetada con fase estacionaria (habitualmente C18, reverso-fase). Un gradiente de disolventes (agua ácida y acetonitrilo o metanol) eluye selectivamente los distintos flavonolignanos (silibinas A/B, isosilibinas, silicristina, etc.) en distintos tiempos. El detector de arreglo de diodos (DAD) registra el espectro UV-Vis completo de cada pico en tiempo real, lo que permite confirmar la identidad de cada compuesto por su longitud de onda máxima (330-290nm) y cuantificarlo comparando el área del pico con estándares. El HPLC-DAD ofrece alta sensibilidad, resolución y selectividad, siendo el método de elección para perfiles cualitativos y cuantitativos de silimarina en productos naturales (Cheilari et al., 2016).

El análisis de silimarina extraída a partir de las semillas de *Silybum marianum* L. se realizó empleando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector UV y de arreglo de diodos (DAD) marca HPLC-DAD modelo KONIC 560, se usó un desgasificador en línea y un horno de columna C18 Thermo Scientific a 30°C. El Software usado fue Konikrom Plus – Chromatography Station for Windows-2013, ubicado en Fractal Químicos EIRL., siguiendo las metodologías de Fallah Huseini et al. (2008); Ha et al. (2019 y Nyiredy et al. (2008), descrito a continuación:

Primero: Se realizó el análisis de las condiciones del cromatograma, que consistió en:

- Selección del tipo de detector para la mejor definición. Se utilizaron estándares preparado a 3, 6, 12, 24 y 30 ppm de silimarina SIGMA (30% SBN). Así mismo se realizaron prueba de solubilidad con acetonitrilo (ACN) y metanol.
- Se realizó la prueba para selección de tiempo de retención.
- La elección de la longitud de onda adecuada para el detector de acuerdo con los siguientes pasos: Evaluación de la calidad de las curvas analizando el tipo y pureza de curva y se eligió una curva sin ruido y bien definida.
- Se analizó la integración, filtros, evaluación de curvas, análisis tipo de curva, pureza de pico (cercano a la línea de base), ruido, selección de tipo de detector (la de mejor definición).
- La cuantificación se realizó por integración de picos al estándar analítico.

Segundo: En base a los análisis de las condiciones del cromatograma, se estableció las siguientes condiciones de análisis:

Tabla 12

Condiciones de análisis de silimarina a partir de semillas por HPLC-DAD

Características	Condiciones
Sistema de análisis cromatográfico	HPLC DAD, UHPLC-DAD OPTIMO KONIK 560-KONIKRON PLUS
Bomba de gradiente	Modo isocrítico (0-40 MPa)
Columna	Nucleosil 100-5 C18 (25x40mm) – Konik Thermo Fisher Scientific
Fase móvil - FM	Acetonitrilo (ACN): H2O 75:25 v/v
Horno de columna	30°C
Inyección (manual)	20µl
Detector DAD	287nm
Caudal	1 mL min ⁻¹
Tiempo de análisis	20min
Concentración del analito	3,6,12, 24 y 30 ppm
Tratamiento de muestras	Desgrasadas en hexano, extracción en metanol, agitación, sonicación, centrifugación y filtración en 0.45µ.
Estándar analítico	Silimarina SLMR (30% SBN) Sigma

Nota: Como fase móvil se usó una mezcla de acetonitrilo (ACN) y agua (grado HPLC)

Figura 28

Sistema de análisis cromatográfico HPLC-DAD OPTIMO Modelo KONIC 560 KONIKRON PLUS



3.10.7. Análisis multivariado y correlacional de los patrones fenotípicos, citogenéticos y el contenido de silimarina en función a los gradientes altitudinales

Se realizó mediante Análisis de Varianza (ANOVA), Tukey y análisis multivariado, para determinar la correlación (Rho de Spearman) de los gradientes altitudinales frente a los patrones fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

En esta sección se expone los hallazgos obtenidos en la evaluación de los patrones fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina en *Silybum marianum* L. en tres gradientes altitudinales de Cusco. Los análisis se enfocaron en las cuatro hipótesis principales: Diferencias morfológicas según gradiente altitudinal, variaciones citogenéticas, contenidos de silimarina y la relación de estos patrones. Se aplicaron técnicas estadísticas multivariadas, incluyendo ANOVA y comparaciones múltiples (Tukey HSD), para determinar significancia de las diferencias observadas entre altitudes. Además, se realizaron análisis de correlación (Rho de Spearman) para evaluar las relaciones organizada por hipótesis, permitiendo una interpretación clara de la influencia de la altitud y las condiciones ambientales locales sobre los rasgos estudiados.

4.1. Resultados descriptivos

4.1.1. Caracterización de las condiciones abióticas de los gradientes altitudinales

4.1.1.1. Temperatura, humedad y precipitación.

De acuerdo con los reportes de SENAMHI se obtuvo las siguientes condiciones abióticas para el año 2021.

Tabla 13

Descripción de las condiciones abióticas de los tres gradientes altitudinales (Año 2021)

Lugar	Altitud (m.s.n.m.)	Temperatura promedio (°C)		Humedad relativa (%)		Precipitación (mm/día)	
		mínima	máxima	mínima	máxima	mínima	máxima
Huaccoto K'ayra	3207	10.56 (jul)	14.87 (nov)	65.81 (jul)	79.98 (feb)	0 (set)	4.85 (ene)
Terminal Huancaro	3402	8.4 (jul)	13.55 (dic)	81.31 (set)	87.19 (ene)	0.02 (ago)	5.28 (ene)
Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman	3625	7.30 (jul)	11.30 (nov)	74.41 (ene)	86.47 (ene)	0.00 (jul)	3.95 (dic)

Nota: Tomado de (SENAMHI, 2021)

De la Tabla 13, se observa un patrón consistente en control altitudinal sobre la temperatura en los tres gradientes altitudinales. En Huaccoto K'ayra (3207 m.s.n.m.) se registra mayores temperaturas promedio (T mínima 10.56°C, T máxima 14.87°C) que en Sacsayhuaman (3265 m.s.n.m.) con una (T mínima de 7.30°C, T máxima 11.30°C) evidenciando un enfriamiento conforme aumenta la altitud. Este comportamiento coincide con la climatología andina descrita para la cordillera de los Andes, donde la altura y la compleja topografía modulan fuertemente el campo térmico regional y local,

generando descensos de temperatura con la elevación (Espinoza et al., 2015). Así mismo la estacionalidad térmica es clara, las temperaturas mínimas ocurren en julio en los tres gradientes (10.56, 8.4 y 7.30°C), lo cual es coherente con el invierno austral y con la estación seca altoandina en la que la menor nubosidad favorece noches más frías. Este patrón es consistente con registros y síntesis climáticas andinas que muestran mayor amplitud térmica diaria en meses secos y fríos, especialmente en zonas de sierra (Garreaud & Aceituno, 2001).

La humedad relativa arroja valores elevados en los tres gradientes altitudinales (65.81-87.19%), con máximos ubicados en meses típicos de la temporada lluviosa (ene-feb) en Huaccoto K'ayra y Terminal Huancaro. Este comportamiento es esperable en el sur andino, donde la humedad disponible y la convección aumenta durante el verano austral para el transporte de humedad desde la cuenca amazónica y por la configuración estacional de la circulación regional. Estudios sobre procesos de precipitación en los Andes tropicales del sur y su transición Andes-Amazónica enfatizan la importancia del aporte amazónico y los cambios estacionales en el comportamiento de lluvias de la región (Espinoza et al., 2015) .

Respecto a la precipitación, el régimen es marcadamente estacional con máximos en verano (enero-marzo) y mínimos nulos en invierno (julio-setiembre). Destaca que el máximo puntual del año ocurre en Terminal Huancaro (5.28 mm/día en enero), mientras que en los tres gradientes se observan valores mínimos de 0.0 mm/día durante el periodo seco. Esta señal confirma una estacionalidad de lluvias bien definida y un déficit hídrico invernal transversal al transecto altitudinal. Este patrón es similar a la climatología del Altiplano y Andes centrales, donde la mayor parte de la precipitación ocurre en la estación húmeda austral y presenta variabilidad interanual significativa (Garreaud & Aceituno, 2001)

Además, el hecho de que el máximo de precipitación no aumente de forma estrictamente monotónica con la altitud, es consistente con lo reportado para montaña, la precipitación está fuertemente influenciada por efectos orográficos, barreras topográficas, exposición y microclimas, lo que puede producir gradientes no lineales incluso en distancias relativamente cortas. (Bookhagen & Strecker, 2008)

4.1.1.2. Análisis Físico químico de Suelos

Los análisis fisicoquímico-realizados a las muestras de suelos de los tres gradientes altitudinales realizados en el Laboratorio Fractal Químicos fueron:

Tabla 14

Análisis Fisicoquímico de suelos de los tres gradientes altitudinales

Parámetros	M1 (Huaccoto Káyra)	M2 (Terminal Huancaro)	M3 (Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman)	Valor referencial
Textura	Franco	Franco	Franco	-
pH	7.8	8.2	7.5	5.5-7.6 óptimo tolera hasta 8.0-8.2
Ceniza %	89.2 ± 2.0	87.4 ± 2.0	89.2 ± 2.0	
Materia orgánica %	9.63 ± 0.45	10.2 ± 0.45	8.78 ± 0.45	> 5 - alta
Humedad %	1.17	2.42	2.02	
Nitrógeno total %	0.3300 ± 0.0160	0.3520 ± 0.0160	0.301 ± 0.0160	0.10-0.3% en suelos agrícolas
Fosforo total (P ₂ O ₅) %	0.0813 ± 0.0038	0.0925 ± 0.0038	0.0778 ± 0.0036	≥0.02% suficiente
Potasio total (K ₂ O) %	0.0331 ± 0.0015	0.0381 ± 0.0015	0.0350 ± 0.015	≥0.02% suficiente

La textura de los suelos en todos los gradientes altitudinales es Franco, lo que facilitaría buen equilibrio de aire y agua con drenaje moderado, favorable para la germinación directa y desarrollo radicular. El pH en las muestras M1 (Huaccoto K'ayra) y M2 (Terminal Huancaro) se encuentra en el límite superior tolerado, puede disminuir la solubilidad de Fe, Zn y Mn, esenciales para la síntesis de flavonolignanos, sobre todo el pH 8,2 de M2 (Terminal Huancaro). *Silybum marianum* L., tolera una amplia gama de pH, pero crece bien en suelos con un pH de 5,5-7,6 (Karkanis et al., 2011)

Los valores de 9-10% de materia orgánica en las muestras es alta favorecería la retención de agua y aporte progresivo de nitrógeno, favoreciendo el rendimiento, pudiendo moderarse al estrés hídrico. Los valores de N, P y K superan ampliamente los umbrales críticos de suficiencia para la mayoría de los cultivos, sin embargo, su disponibilidad dependerá del pH y la fracción soluble de cada nutriente. El P se encuentra elevado pero la fracción disponible se reduce con el pH >7.5, el K adecuado alto, el K mantiene la calidad de semilla y contenido de aceite. El N elevado desfavorece la producción de silimarina. (Liava et al., 2021) demostró que 125 kg N ha⁻¹ aumentó el rendimiento de fruto ≈ 30%, pero no modificó significativamente el % de silimarina; subrayan la necesidad de ajustar P y K para evitar desequilibrios nutricionales.

Silybum marianum L., es muy adaptable a muchas condiciones de cultivo, desarrolla un fuerte sistema radicular y pueden cultivarse en suelos ligeros con deficiencias hídricas periódicas, se cultiva con éxito en diversos tipos de suelo, desde los

arenosos de hasta los arcillosos, mucho más pesados, por lo tanto, el cultivo del cardo mariano en suelos menos fértiles y en condiciones de salinidad moderada podría ser importante no sólo para su uso como cultivo de cobertura contra la erosión del suelo, sino también para producir semillas de mejor valor medicinal (Karkanis et al., 2011).

4.1.2. Determinación de los patrones fenotípicos de *Silybum marianum* L. Gaertner

4.1.2.1. Identificación botánica

Las muestras colectadas en los tres gradientes altitudinales corresponden a *Silybum marianum* L. Gaertner, identificación realizada en el Herbario Vargas (CUZ). (Anexo 4)

4.1.2.2. Análisis fenotípico

Para este análisis, se consideró características fenotípicas de altura de planta (m), número de ramas, largo de hojas y número de capítulos por planta (Anexo 5).

Tabla 15

Media y desviación estándar de las características fenotípicas en tres gradientes altitudinales de Cusco

Lugar	Altitud (m.s.n.m.)	N° de plantas	Media de altura (m)	Media N° de ramas	Media Largo de hojas (cm)	Media de N° de capítulos/planta
Huaccoto K'ayra	3207	50	1.66±0.329	5.48±1.081	25.66±2.320	4.56±1.098
Terminal Huancaro	3402	50	1.79±0.228	6.02±0.883	27.54±1.824	5.60±0.600
Comunidad Fortaleza Sacsayhuamán	3625	50	1.90±0.267	5.90±0.670	30.00±1.720	5.70±0.574

En la tabla 15, se aprecia que de 50 plantas de *Silybum marianum* L., por gradiente altitudinal, evaluadas mostró diferencias fenotípicas a lo largo de los gradientes altitudinales, la altura de la planta y el largo de hojas exhibieron una tendencia creciente con la altitud, pasando de 1.66±0.329 m y 25.66±2.320 cm en Huaccoto-K'ayra (3207 m.s.n.m.) y Terminal Huancaro (3402 m.s.n.m.) a 1.79±0.228 m y 27.54±1.824 cm y en la Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (3625 m.s.n.m.) de 1.90±0.267 m y 30.00±1.720 cm, con un incremento relativo de 10-14%. En contraste, el número de ramas se mantuvo estable entre los tres gradientes altitudinales de 5.48±1.081 a 6.02±0.883, indicando un rasgo poco sensible al gradiente.

El número de capítulos por planta varió entre altitudes de 4.56±1.098 a 5.70±0.574, sugiriendo una respuesta reproductiva moderada probablemente influida por las condiciones hídricas locales. En conjunto estos patrones apoyan la plasticidad

morfológica principalmente en rasgos de tamaño (altura/hoja), mientras la arquitectura (ramificación permanece conservada).

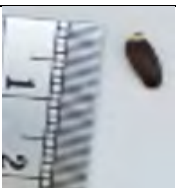
Las referencias bibliográficas describen a *Silybum marianum* L. como una especie con gran variación morfológica en función al ambiente (fertilidad, agua, condiciones locales), con alturas que pueden variar ampliamente. Esto encaja con que, en las poblaciones silvestres, los rasgos vegetativos y reproductivos cambian entre sitios sin necesidad de manejo agrícola. (Marceddu et al., 2022), además en poblaciones silvestres se ha documentado variación química dentro de la especie (a nivel de accesiones), lo que respalda que existe base biológica para diferencias entre localidades. (Martinelli et al., 2023).

Por su parte Khan et al., (2022) en su estudio diseñado específicamente para *S. marianum* a lo largo de un gradiente altitudinal, reportó una disminución significativa con la elevación de rasgos como altura, largo de hoja y capítulos por planta.

Existe evidencia experimental de que la aumentar la severidad de sequía, disminuyen altura de planta y capítulos por planta (y otros componentes de rendimiento), como lo reportado por (Zangani et al., 2023)

Tabla 16

Características fenotípicas del capítulo y semillas de Silybum marianum (L.) Gaertner en tres gradientes altitudinales de Cusco.

Características	Huaccoto K'ayra 3 207 m	Terminal Huancaro 3 402 m	Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman 3 625 m
Color de flor	 Purpura	 Purpura	 Púrpura
Tamaño de capítulo	 7-8.5cm de diámetro	 7-8.5 cm de diámetro	 8-10cm de diámetro
Color de semilla	 Semillas fértiles Color negro brillante	 Semillas fértiles Color: negro brillante	 Semillas fértiles Color: Marrón y líneas negras
	 Semillas infértiles Color: marrón	 Semillas infértiles Color: marrón claro	 Semillas infértiles Color marrón
Tamaño de vilano	 0.7-1cm	 1-1.2	 1-1.5cm
Tamaño de semilla	 6.5-7.2mm	 6.5-7.3mm	 7.5-8.7mm

Las características fenotípicas del capítulo y las semillas mostradas en la tabla 16 muestran que el color de la flor en los tres pisos altitudinales es el **púrpura**, el tamaño de los capítulos en Huaccoto K'ayra (3202 m) y Terminal Huancaro (3407 m) alcanzan un promedio de 7-8.5 y en la comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (3625m) de 8-10cm.

El fenotipo de las semillas o achenios observadas en cuanto a color, tamaño y fertilidad, mostro diferencias en los tres gradientes altitudinales (semilla fértil, semilla grande e íntegra; semilla infértil, semilla de menor tamaño y con arrugas). El color de las semillas en Huaccoto K'ayra y Terminal Huancaro las fértiles mostraron un color **negro brillante**, mientras que las infértiles de color marrón y marrón claro, en el caso del Comunidad Fortaleza de Sacsayhuaman las semillas fértiles se mostraron de color **marrón con líneas negras** y las infértiles de color marrón. La longitud del tamaño de las semillas en Huaccoto K'ayra miden 6.5-7.2mm, en Terminal Huancaro de 6.5-7.3 mm y en el Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman de 7.5-8.7 mm.

El tamaño del vilano alcanza entre 0.7-1 cm en Huaccoto K'ayra, de 1-1.2 cm en Terminal Huancaro y de 1-1.5 cm en la Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman.

Tabla 17

Media de Peso (g) de 1000 semillas de Silybum marianum L. en tres gradientes altitudinales del Cusco

Lugar	Gradiente altitudinal (m.s.n.m.)	Media Peso (g) de 1000 semillas fértiles	Media Peso (g) de 1000 semillas infértiles
Huaccoto K'ayra	3207	19.01±0.078	14.30±0.176
Terminal Huancaro	3402	18.49±0.264	9.80±0.131
Comunidad Fortaleza Sacsayhuamán	3625	22.17±0.034	19.84±0.129

El peso de 1000 semillas de *Silybum marianum* L. varió significativamente a lo largo del gradiente altitudinal, con un incremento consistente hacia la mayor altitud. En **semillas fértiles**, los promedios fueron de 18.49 g (3402 m), 19.01 (3207 m) y 22.17 g (3625 m), mientras que en **semillas infértiles** se observó 9.80 g, 14.30 g y 19.84 g, respectivamente. (Tabla 17).

Por su parte, en el trabajo de Hevia et al., (2007) sobre calidad de cardo mariano cosechados en diferentes estados fenológicos reporto una media de 20,2 y 24,0 g de 1000 semillas para el genotipo chileno y alemán respectivamente. Así mismo, Arampatzis et al., (2019), sobre evaluación de 30 poblaciones silvestres de *Silybum marianum* en

diferentes condiciones ambientales de Grecia, basados en el contenido de silimarina en semillas determinó el peso de 1000 semillas con un rango de 15.91 y 25.90 g, resultados que se asemejan a los estudiados en la investigación.

4.1.2.3. Fenología

De acuerdo con las observaciones fenológicas de las plantas, utilizando la escala de BBCH durante los meses del año, en los tres gradientes altitudinales se demostró los 10 estadios que a continuación se describen:

Tabla 18

Descripción del desarrollo fenológico de Silybum marianum L. según la escala BBCH ampliada en tres gradientes altitudinales de Cusco

Escala BBCH		HUACCOTO K'AYRA (3 207 m)	PUEBLO HUANCARO (3 402 m)	COMUNIDAD FORTALEZA DE SACSAYHUAMAN (3 625 m)
2 dígitos	3 dígitos	Descripción	Descripción	Descripción
Estado principal de desarrollo 0: Germinación				
00	000	Semillas secas	Semillas secas	Semillas secas
01	001	Inicio de la imbibición de las semillas	Inicio de la imbibición de las semillas	Inicio de la imbibición de las semillas
03	003	Imbibición de semillas completas	Imbibición de semillas completas	Imbibición de semillas completas
05	005	Emergencia de la radícula de la semilla	Emergencia de la radícula de la semilla	Emergencia de la radícula de la semilla
08	008	Emergencia del hipocótilo	Emergencia del hipocótilo	Emergencia del hipocótilo
09	009	Emergencia de los cotiledones sobre el suelo	Emergencia de los cotiledones sobre el suelo	Emergencia de los cotiledones sobre el suelo
Fase de crecimiento principal 1: Desarrollo foliar				
10	100	Cotiledones completamente expandidos	Cotiledones completamente expandidos	Cotiledones completamente expandidos
12	102	Primer par de hojas verdaderas elípticas visibles (más de 1cm de longitud cada una)	Primer par de hojas verdaderas elípticas visibles (más de 1cm de longitud cada una)	Primer par de hojas verdaderas elípticas visibles (más de 1cm de longitud cada una)
13	103	Tres hojas visibles (más de 2cm cada una)	Tres hojas visibles (más de 2cm cada una)	Tres hojas visibles (más de 2cm cada una)
1.	10.	El sistema de codificación continua con el mismo esquema hasta la etapa 119	El sistema de codificación continua con el mismo esquema hasta la etapa 119	El sistema de codificación continua con el mismo esquema hasta la etapa 119
19	109	Nueve hojas visibles	Nueve hojas visibles	Nueve hojas visibles
	110	10 hojas visibles	10 hojas visibles	10 hojas visibles
	11.	El sistema de codificación continúa con el mismo esquema hasta la etapa 119	El sistema de codificación continúa con el mismo esquema hasta la etapa 119	El sistema de codificación continúa con el mismo esquema hasta la etapa 119
	119	Diecinueve hojas visibles	Diecinueve hojas visibles	Diecinueve hojas visibles
Fase de crecimiento principal 2ª: Formación de brotes laterales				
21	201	Primer brote lateral visible	Primer brote lateral visible	Primer brote lateral visible
22	202	Dos brotes laterales visibles	Dos brotes laterales visibles	Dos brotes laterales visibles
2	20	La codificación continua con el mismo esquema hasta la etapa 29 (209)	La codificación continua con el mismo esquema hasta la etapa 29 (209)	La codificación continua con el mismo esquema hasta la etapa 29 (209)

29	209	Nueve brotes laterales del segundo orden visible	Nueve brotes laterales del segundo orden visible	Nueve brotes laterales del segundo orden visible
Fase de crecimiento principal 3: Crecimiento en roseta				
31	301	10% del suelo cubiertas por hojas	10% del suelo cubiertas por hojas	10% del suelo cubiertas por hojas
33	303	30% del suelo cubiertas por hojas	30% del suelo cubiertas por hojas	30% del suelo cubiertas por hojas
35	305	50% del suelo cubiertas por hojas	50% del suelo cubiertas por hojas	50% del suelo cubiertas por hojas
37	307	70% del suelo cubiertas por hojas	70% del suelo cubiertas por hojas	70% del suelo cubiertas por hojas
39	309	90% o total del suelo cubiertas por hojas	90% o total del suelo cubiertas por hojas	90% o total del suelo cubiertas por hojas
Etapas de crecimiento principal 4: Desarrollo de biomasa vegetal cosechable				
41	401	10% de la biomasa alcanzada	10% de la biomasa alcanzada	10% de la biomasa alcanzada
42	402	20% de la biomasa alcanzada	20% de la biomasa alcanzada	20% de la biomasa alcanzada
46	406	60% de la biomasa alcanzada	60% de la biomasa alcanzada	60% de la biomasa alcanzada
49	409	90% de la biomasa alcanzada	90% de la biomasa alcanzada	90% de la biomasa alcanzada
Fase de crecimiento principal 5: Aparición de la inflorescencia				
50	500	Cabeza central de la flor presente (3-5mm de diámetro) pero completamente encerrada entre hojas en desarrollo.	Cabeza central de la flor presente (3-5mm de diámetro) pero completamente encerrada entre hojas en desarrollo.	Cabeza central de la flor presente (3-5mm de diámetro) pero completamente encerrada entre hojas en desarrollo.
51	501	Cabeza central de la flor claramente visible entre las hojas, puntos de la bráctea verticales, entrenudos del tallo principal claramente alargado.	Cabeza central de la flor claramente visible entre las hojas, puntos de la bráctea verticales, entrenudos del tallo principal claramente alargado.	Cabeza central de la flor claramente visible entre las hojas, puntos de la bráctea verticales, entrenudos del tallo principal claramente alargado.
53	503	Tres puntas de la bráctea abierta	Tres puntas de la bráctea abierta	Tres puntas de la bráctea abierta
54	504	Cuatro puntas de la bráctea abierta	Cuatro puntas de la bráctea abierta	Cuatro puntas de la bráctea abierta
Fase de crecimiento principal 6: Floración				
60	600	Primera flor en la cabeza central	Primera flor en la cabeza central	Primera flor en la cabeza central
63	603	30% de las flores se abren en la cabeza central	30% de las flores se abren en la cabeza central	30% de las flores se abren en la cabeza central
67	607	70% de las flores se abren en la cabeza central	70% de las flores se abren en la cabeza central	70% de las flores se abren en la cabeza central
69	609	Todas las flores se abren en la cabeza central	Todas las flores se abren en la cabeza central	Todas las flores se abren en la cabeza central
Etapas de crecimiento principal 7: Desarrollo del fruto				
71	701	Los frutos son de color blanco/marfil, todas las flores de la cabeza central están secas.	Los frutos son de color blanco/marfil, todas las flores de la cabeza central están secas.	Los frutos son de color blanco/marfil, todas las flores de la cabeza central están secas.
75	705	Los frutos de la cabeza central son de color violeta/marrón (rayados), los ramilletes empiezan a perder su color violeta.	Los frutos de la cabeza central son de color violeta/marrón (rayados), los ramilletes empiezan a perder su color violeta.	Los frutos de la cabeza central son de color violeta/marrón (rayados), los ramilletes empiezan a perder su color violeta.
79	709	Frutos en el centro completamente desarrollados, son de color negro (brillantes) con puntos de inserción en el capítulo que parecen amarillos, los flósculos han perdido la mayor parte del color.	Frutos en el centro completamente desarrollados, son de color negro (brillantes) con puntos de inserción en el capítulo que parecen amarillos, los flósculos han perdido la mayor parte del color.	Frutos en el centro completamente desarrollados, son de color marrón con líneas y punto negros con puntos de inserción en el capítulo que parecen amarillos, los flósculos han perdido la mayor parte del color.

Principal fase de crecimiento 8: maduración				
86	806	Frutos en la cabeza central al 65% de MS	Frutos en la cabeza central al 65% de MS	Frutos en la cabeza central al 65% de MS
88	808	Frutos en la cabeza central al 80% de MS	Frutos en la cabeza central al 80% de MS	Frutos en la cabeza central al 80% de MS
89	809	Los frutos de la cabeza central están secos (>80% MS)	Los frutos de la cabeza central están secos (>80% MS)	Los frutos de la cabeza central están secos (>80% MS)
Estado de desarrollo principal 9: senescencia				
91	901	Sólo hojas basales senescentes	Sólo hojas basales senescentes	Sólo hojas basales senescentes
93	903	Las hojas de la primera mitad de la planta, a partir del nivel del suelo, están muertas.	Las hojas de la primera mitad de la planta, a partir del nivel del suelo, están muertas.	Las hojas de la primera mitad de la planta, a partir del nivel del suelo, están muertas.
95	905	Todas las hojas de la planta están muertas, el color del tallo pasa de amarillo a marrón	Todas las hojas de la planta están muertas, el color del tallo pasa de amarillo a marrón	Todas las hojas de la planta están muertas, el color del tallo pasa de amarillo a marrón
99	905	El tallo principal, las ramificaciones y también las cabezas de último orden están muertas, el contenido de MS de la biomasa alcanza el 90%.	El tallo principal, las ramificaciones y también las cabezas de último orden están muertas, el contenido de MS de la biomasa alcanza el 90%.	El tallo principal, las ramificaciones y también las cabezas de último orden están muertas, el contenido de MS de la biomasa alcanza el 90%.
^a En <i>Silybum marianum</i> L. la formación de brotes laterales suele tener lugar de forma concomitante a la emergencia de la inflorescencia en el tallo principal (fase de crecimiento principal 5). Por lo tanto, la fase 2 puede omitirse normalmente. Si la formación de brotes laterales se considera un rasgo de especial interés, el estadio de crecimiento principal 2 puede incluirse junto con el estadio de crecimiento principal 5 utilizando un corte diagonal.				

En la tabla 18, se muestra la descripción de los diez estadios de crecimiento BBCH de *Silybum marianum* L. utilizando el sistema de codificación de 2 y 3 dígitos, en los tres gradientes altitudinales, lo que nos permitió determinar que en las tres altitudes, presentan fenologías similares según las escalas de BBCH de las 10 etapas principales (0-9), encontrándose una variabilidad únicamente en la fenología del color del fruto en Huaccoto - K'ayra y Terminal Huancaro presentaron un fenotipo negro brillante, mientras que en la Comunidad de Fortaleza Sacsayhuaman presentaron un fruto de color marrón con líneas y puntos pardos. En la investigación de Martinelli et al., (2015), se muestra el desarrollo detallado de la descripción fenológica detallada de *Silybum marianum* L. en las 10 etapas fenológicas de crecimiento, según escala BBCH en 2 y 3 dígitos, en plantas para producción en Europa central y Asia, obtuvo resultados similares, describiéndolos como rasgos típicos de especies silvestres

El uso de herramientas como las escalas BBCH en las plantas son de gran importancia, para evaluar el impacto del clima en la fenología, especialmente en los parámetros que determinan el rendimiento, además para evaluar el potencial de adaptación de los genotipos en diferentes condiciones agroclimáticas (Kishore, 2017)

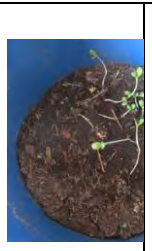
Figura 29

Estados fenológicos de *Silybum marianum* en los tres gradientes altitudinales de Cusco

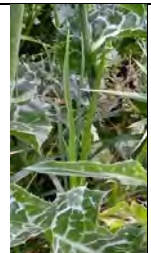
HUACCOTO K'AYRA (3 207 m)

						
Emergencia	Crecimiento Vegetativo	Elongación del tallo	Cabezuela floral	Floración	Fructificación	Aquenios
Brotación, desarrollo de las yemas	Desarrollo de las primeras hojas sobre la superficie	Desarrollo de tallo y hojas	Aparición de cabezuela principal	El capítulo se abre y exhibe las flores	Liberación de los frutos en forma de aquenios	Semillas

TERMINAL HUANCARO (3 402 m)

						
Emergencia	Crecimiento Vegetativo	Elongación del tallo	Cabezuela floral	Floración	Fructificación	Aquenios
Brotación, desarrollo de las yemas	Desarrollo de las primeras hojas sobre la superficie	Desarrollo de tallo y hojas	Aparición de cabezuela principal	El capítulo se abre y exhibe las flores	Liberación de los frutos en forma de aquenios	Semillas

COMUNIDAD FORTALEZA SACSAYHUAMAN (3 625 m)

						
Emergencia	Crecimiento Vegetativo	Elongación del tallo	Cabezuela floral	Floración	Fructificación	Aquenios
Brotación, desarrollo de las yemas	Desarrollo de las primeras hojas sobre la superficie	Desarrollo de tallo y hojas	Aparición de cabezuela principal	El capítulo se abre y exhibe las flores	Liberación de los frutos en forma de aquenios	Semillas

En la figura 29, se aprecian los diez estadios de crecimiento según escala de BBCH de *Silybum marianum* L. utilizando el sistema de codificación de 2 y 3 dígitos, en los tres gradientes altitudinales, lo que nos permitió determinar que en las tres altitudes, presentan fenologías similares según las escalas de BBCH de las 10 etapas principales (0-9), encontrándose una variabilidad únicamente en la fenología del color del fruto en Huaccoto - K'ayra y Terminal Huancaro presentaron un fenotipo negro brillante, mientras que en la Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman presentaron un fruto de color marrón con líneas y puntos negros. Martinelli et al. (2015) muestra el desarrollo detallado de la descripción fenológica detallada de *Silybum marianum* L. en las 10 etapas fenológicas de crecimiento de *Silybum marianum* según escala BBCH en 2 y 3 dígitos, en plantas para producción en Europa central y Asia, obtuvo resultados similares, describiéndolos como rasgos típicos de especies silvestres.

Tabla 19

Observación fenológica según escala BBCH durante los meses del año 2021

Escala BBCH	Descripción	Huaccoto K'ayra (3 207 m)	Terminal Huancaro (3 402 m)	Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (3 647 m)
0	Germinación, brotación, desarrollo de yema	Noviembre-diciembre	Noviembre-diciembre-enero	Octubre-noviembre-diciembre
1	Desarrollo de hojas (brote o tallo principal)	Diciembre-enero-febrero	Diciembre-enero-febrero	Diciembre-enero-febrero-marzo
2	Formación de brotes laterales/macollamiento (ahijamiento)	Marzo-abril	Febrero-marzo-abril	Marzo-abril
3	Crecimiento longitudinal del tallo o crecimiento en roseta, desarrollo de brotes (retoños) y encañado (tallo principal)	Abril-mayo	Marzo-abril-mayo	Marzo-abril-mayo
4	Desarrollo de las partes vegetativas cosechables de la planta o de órganos vegetativos de propagación/embuchamiento	Mayo-junio	Abril-mayo-junio	Abril-mayo-junio
5	Emergencia de inflorescencia	Mayo-junio-julio	Abril-mayo-junio-julio	Mayo-junio-julio
6	Floración (tallo principal)	Junio-julio	Mayo-junio-julio-agosto	Junio-julio-agosto
7	Desarrollo de Capítulo	Junio-julio	Junio-julio-agosto	Junio-julio-agosto-setiembre
8	Coloración y maduración de frutos y semillas	Junio-julio-agosto	Junio-julio-agosto-setiembre	Junio-julio-agosto-setiembre
9	Senescencia, comienzo de dormancia	Setiembre-octubre	Agosto-setiembre-octubre	Agosto-setiembre-octubre

De las observaciones fenológicas según la escala de BBCH, durante los meses del año en los tres gradientes altitudinales se confirmó los 10 estadios fenológicos (anexo 5).

4.1.3. Análisis de los patrones citogenéticos de *Silybum marianum* L. Gaertner

4.1.3.1. Determinación del índice mitótico de *Silybum marianum* L.

Según el índice mitótico para *Silybum marianum* L., se encontró una mayor división celular entre las 10 a 14 horas, indicándonos que es el tiempo en el cual se recolecte las células metafásicas para establecer el cariotipo de la especie. (anexo 6)

Figura 30

índice mitótico de Silybum marianum L.

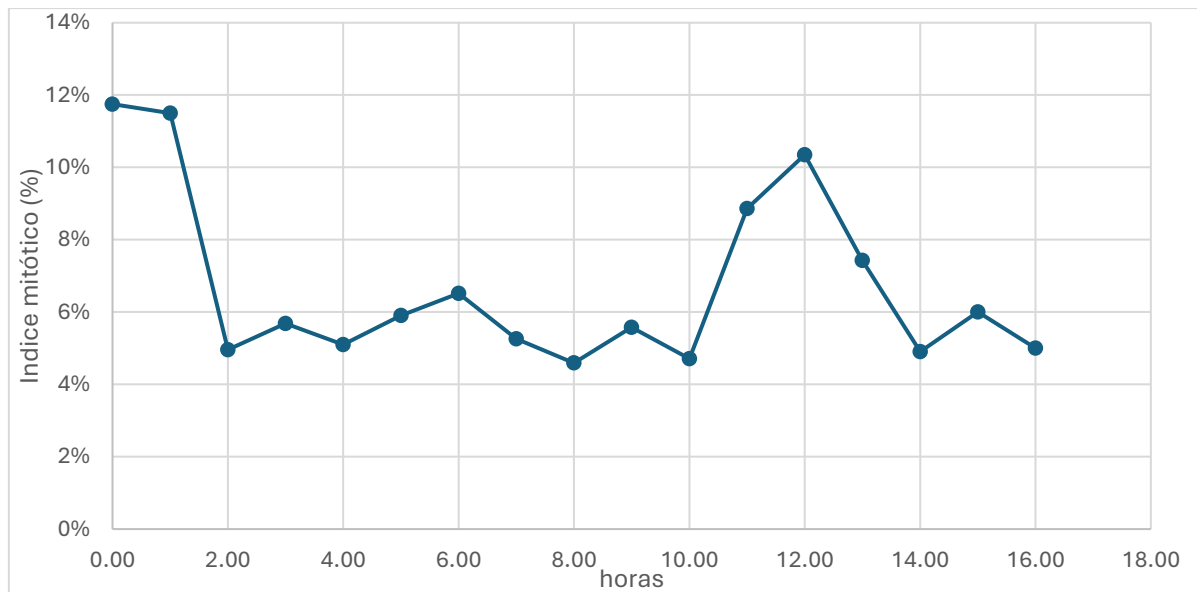
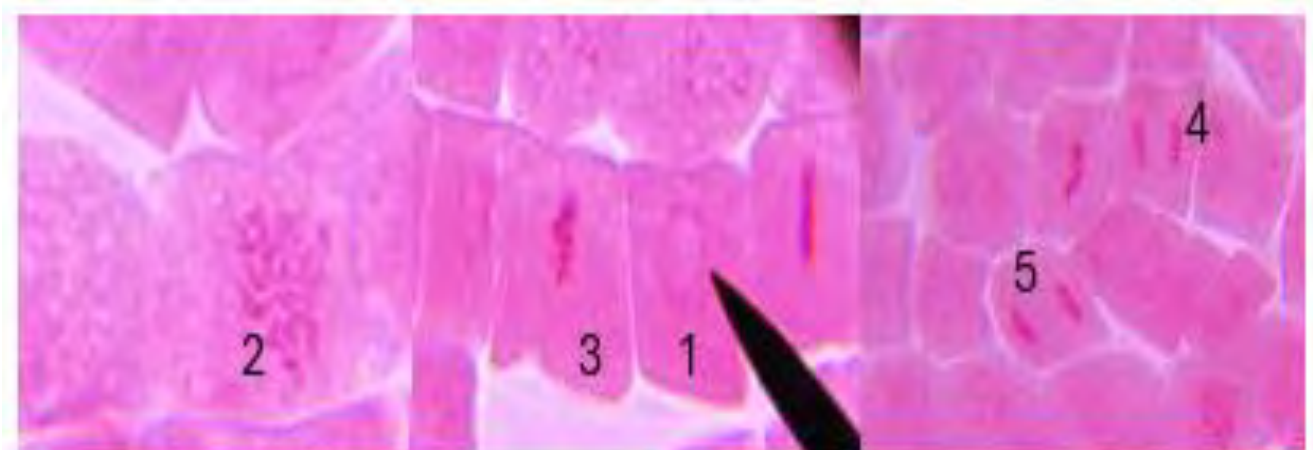


Figura 31

Observación microscópica - Determinación de índice de metafases en Silybum marianum L.



Nota: Observación microscópica a 1000x, coloración OAC al 2%

1) Intefase 2) Profase 3) Metafase 4) Anafase 5) Telofase

4.1.3.2. Determinación de la técnica citogenética para *Silybum marianum* L.

En esta etapa de la investigación, previamente se estandarizó la técnica citogenética, en el pretratamiento, hidrólisis y coloración y se muestra a continuación:

Tabla 20

Determinación de Pretratamiento para la determinación de cariotipo

N°	Pretratamiento	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Resultados observados a 400x
1	Colchicina 0.01%	2	18-20	+++++
2	Colchicina 0.05%	2	18-20	++
3	Colchicina 0.1%	2	18-20	+++
4	Colchicina 0.01%	3	18-20	+++++
5	Colchicina 0.05%	3	18-20	++
6	Colchicina 0.1%	3	18-20	++
7	8-Hidroxiquinoleina 0.02M	2	18-20	++
8	8-Hidroxiquinoleina 0.02M	3	18-20	++
9	8-Hidroxiquinoleina 0.02M	4	18-20	+++++

Nota: Elaboración propia

El pretratamiento se estableció con colchicina al 0.01% por 2-3 horas o con 8-Hidroxiquinoleina por 4 horas, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 21

Determinación de hidrólisis para determinación de cariotipo

N°	Hidrólisis	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Resultados observados a 400x
1	HCl 1N	10	60	+++
2	HCl 1N	20	60	+
3	HCl 1N	30	60	+
4	HCl 1N	10	18-20	+
5	HCl 1N	20	18-20	+
6	HCl 1N	30	18-20	+
7	HCl 2N	10	18-20	++
8	HCl 2N	20	18-20	++
9	HCl 2N	30	18-20	++

Nota: Elaboración propia

La mejor hidrólisis para *Silybum marianum* L., se determinó con HCL 1N por 10 minutos, a más tiempo se observó deterioro del material, tal como se muestra en la tabla.

Tabla 22*Determinación de técnica de coloración*

N°	Coloración	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Resultados observados a 400x
1	Solo OAC 2%	10	18-20	++
2	Solo OAC 2%	20	18-20	+ (células deterioradas)
3	Solo OAC 2%	30	18-20	+ (células deterioradas)
4	Reactivo de Shiff	15	18-20	-
5	Reactivo de Shiff	30	18-20	-
6	Reactivo de Shiff	45	18-20	++
7	Doble tinción OAC 2%+ R.Shiff	5+30	18-20	+
8	Doble tinción OAC 2%+ R.Shiff	10+30	18-20	++
9	Doble tinción OAC 2%+ R.Shiff	10+45	18-20	+++

Nota: OAC (Orceína acética clorhidra al 2%). Elaboración propia

En los ensayos sobre coloración valorada por observación microscópica se determinó doble tinción con OAC 2% 10 minutos y Reactivo de Shiff 45 minutos en condiciones de oscuridad, tal como se observa en la tabla.

De los ensayos preliminares se estableció la siguiente técnica para la determinación de Cariotipo de *Silybum marianum* L.

- Pretratamiento: Con Colchicina al 0.01% entre 2 a 3 horas o 8-Hidroxiquinoleina a 0.02M por 4 horas a temperaturas de 18-20°C.
- Hidrólisis: Con HCl 1N a 60°C por 10 minutos.
- Coloración: Por Doble tinción primero con OAC 2% por 10 minutos seguida reactivo de Shiff por 45 minutos en oscuridad.
- De los ensayos obtenidos anteriormente se estableció la siguiente técnica citogenética.

Técnica citogenética para *Silybum marianum* L.

Luego de obtener los ápices radiculares de *Silybum marianum* L., se inició el pretratamiento con Colchicina al 0.01% de 2-3 horas o con 8-Hidroxiquinoleina a 0.02M hasta 4 horas a temperatura de 18-20°C, luego se lavó por 2 veces en agua destilada pH 7.00 en 10 minutos. Se procedió a la fijación de los ápices radiculares en solución de Farmer a 4°C por 24 horas, se lavó en agua destilada por 2 veces en 30 minutos. Se procedió a la hidrólisis con HCl 1N a 60°C x 10 minutos, luego se lavó en agua destilada por dos veces en 30 minutos. Seguidamente se coloreo con OAC 2% por 10 minutos en oscuridad, se secó el exceso de colorante y se añadió 1-2 gotas de Reactivo de Shiff por 45 minutos, en oscuridad. Se extrajo el exceso de reactivo, y con mucho cuidado el ápice se transfiere en un portaobjetos limpio, se corta el ápice a unos 1-2mm y se añade una

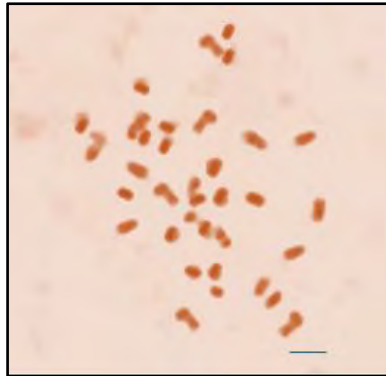
gota de ácido acético al 45% y se realiza el golpeteo y aplastamiento. La observación microscópica se realizó a 400 y 1000x.

4.1.3.3. Análisis cromosómico de *Silybum marianum* L. por gradiente altitudinal

Huaccoto K'ayra (3207 m.s.n.m.)

Figura 32

Cromosomas metafásicos de Silybum marianum L. Huaccoto K'ayra



Nota: Fotografía ampliada de observación microscópica a 1000x

Figura 33

Cariotipo de Silybum marianum L. Huaccoto K'ayra

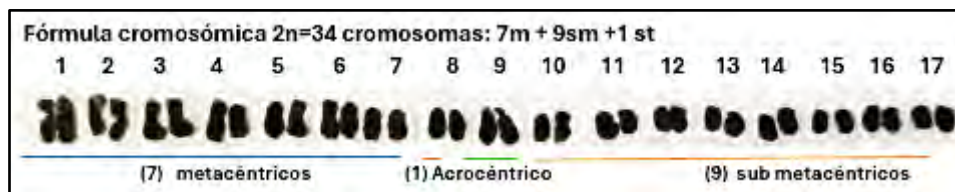


Tabla 23

*Características e índices de los pares cromosómicos del cariotipo de *Silybum marianum* L., procedente de Huaccoto K'ayra, basado en Levan, 1964*

Par Cromosómico	Brazo largo (q) μm	Brazo corto (p) μm	p+q (μm)	RB(q/p)	LR%	AR (p/q)	IC (%)	Tipo
1	1.85	1.35	3.20	1.37	8.98	0.73	42.18	Metacéntrico (m)
2	1.57	1.35	2.92	1.17	8.20	0.86	46.13	Metacéntrico (m)
3	1.70	1.07	2.77	1.59	7.79	0.63	38.67	Metacéntrico (m)
4	1.40	1.00	2.40	1.39	6.74	0.72	41.78	Metacéntrico (m)
5	1.49	1.00	2.49	1.48	6.99	0.67	40.27	Metacéntrico (m)
6	1.44	0.99	2.43	1.45	6.83	0.69	40.74	Metacéntrico (m)
7	1.32	0.80	2.12	1.66	5.97	0.60	37.61	Metacéntrico (m)
8	1.29	0.74	2.03	1.73	5.72	0.58	36.56	Sub metacéntrico (sm)
9	1.59	0.42	2.01	3.76	5.65	0.27	21.02	Acrocéntrico(st)
10	1.16	0.65	1.81	1.78	5.09	0.56	35.91	Sub metacéntrico (sm)
11	1.19	0.68	1.88	1.74	5.27	0.57	36.46	Sub metacéntrico (sm)
12	1.23	0.60	1.83	2.04	5.13	0.49	32.86	Sub metacéntrico (sm)
13	1.18	0.50	1.67	2.37	4.70	0.42	29.67	Sub metacéntrico (sm)
14	1.08	0.52	1.59	2.08	4.48	0.48	32.50	Sub metacéntrico (sm)
15	1.05	0.47	1.52	2.24	4.28	0.45	30.88	Sub metacéntrico (sm)
16	0.97	0.47	1.44	2.06	4.05	0.49	32.73	Sub metacéntrico (sm)
17	0.95	0.54	1.49	1.78	4.18	0.56	36.02	Sub metacéntrico (sm)

Nota: RB (Proporción entre brazos), LR % (Longitud relativa), IC (índice centromérico) (m) metacéntrico (st) satelitado o acrocéntrico

De acuerdo con la tabla 23 se presentan 17 pares de cromosomas ($2n=34$), según Levan se muestra 7 cromosomas metacéntricos, 9 sub metacéntricos y un acrocéntrico (st), el tamaño de las longitudes totales (p+q) oscilan entre 3.20μ (par 1) y 1.44μ (par 16), indicando cariotipo con cromosoma de tamaño pequeño a mediano, típico de las asteráceas. El índice centromérico (IC%) muestra valores entre 37.61-46.13% metacéntricos, 29.67-36-56% submetacéntricos y 21.02% acrocéntrico o satelitado, confirmando la clasificación de Levan e indicando una heterogeneidad moderada en la posición del centrómero. La mayoría de los pares metacéntricos (par 1-7) con IC cercano al 50% lo que indica centrómeros medianos y brazos de longitud similar. A medida que disminuye el tamaño, aparecen submetacéntricos y un acrocéntrico, que presentan IC más bajos, mostrando asimetría moderada, sugiriendo un ligero avance evolutivo según criterio de Stebbins.

La longitud relativa (LR%) va desde 8.98% (par 1) hasta 4.05% (par 16) mostrando un gradiente descendente continuó y sin presencia de cromosomas muy marcadamente grandes o pequeños. Los pares 1-3 son los más largos, lo que fueron útiles para su fácil reconocimiento.

Terminal Huancaro (3402 m.s.n.m.)

Figura 34

Cromosomas metafásicos y cariotipo de Silybum marianum L. Terminal Huancaro



Nota: Fotografía ampliada de observación microscópica a 1000x

Figura 35

Cariotipo de Silybum marianum L. Terminal Huancaro

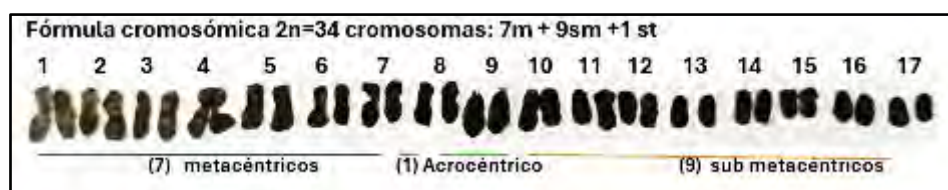


Tabla 24

Características e índices de los pares cromosómicos del cariotipo de Silybum marianum L., procedente de Terminal Huancaro, basado en Levan, 1964

Par Cromosómico	Brazo largo (q) μm	Brazo corto (p) μm	p+q (μm)	RB(q/p)	LR%	AR (p/q)	IC (%)	Tipo
1	1.82	1.366	3.18	1.33	8.81	0.75	42.90	Metacéntrico (m)
2	1.68	1.398	3.08	1.20	8.51	0.83	45.45	Metacéntrico (m)
3	1.72	1.072	2.79	1.61	7.73	0.62	38.37	Metacéntrico (m)
4	1.45	1.002	2.46	1.45	6.79	0.69	40.80	Metacéntrico (m)
5	1.51	1.07	2.58	1.41	7.13	0.71	41.51	Metacéntrico (m)
6	1.46	1.014	2.47	1.44	6.84	0.70	41.02	Metacéntrico (m)
7	1.33	0.836	2.17	1.60	6.00	0.63	38.53	Metacéntrico (m)
8	1.36	0.764	2.12	1.77	5.86	0.56	36.04	Sub metacéntrico (sm)
9	1.54	0.402	1.94	3.83	5.37	0.26	20.70	Acrocéntrico(st)
10	1.19	0.632	1.82	1.89	5.05	0.53	34.65	Sub metacéntrico (sm)
11	1.17	0.658	1.83	1.78	5.05	0.56	36.04	Sub metacéntrico (sm)
12	1.20	0.59	1.79	2.03	4.95	0.49	33.00	Sub metacéntrico (sm)
13	1.17	0.47	1.64	2.49	4.54	0.40	28.62	Sub metacéntrico (sm)
14	1.15	0.538	1.69	2.14	4.68	0.47	31.80	Sub metacéntrico (sm)
15	1.10	0.486	1.58	2.26	4.38	0.44	30.72	Sub metacéntrico (sm)
16	1.02	0.478	1.50	2.14	4.15	0.47	31.87	Sub metacéntrico (sm)
17	1.01	0.496	1.51	2.04	4.17	0.49	32.89	Sub metacéntrico (sm)

Nota: RB (Proporción entre brazos), LR % (Longitud relativa), IC (índice centromérico) (m) metacéntrico (st) satelitado o acrocéntrico

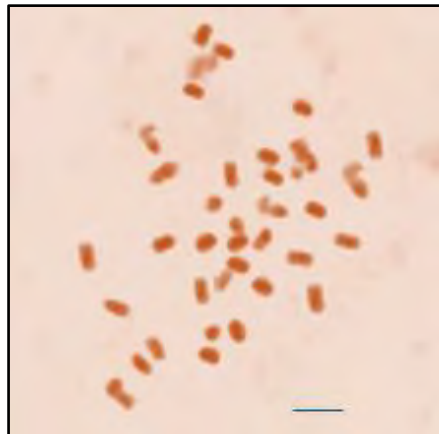
De acuerdo con la tabla 24 se presentan 17 pares de cromosomas ($2n=34$), según Levan se muestra 7 cromosomas metacéntricos, 9 sub metacéntricos y un acrocéntrico (st), el tamaño de las longitudes totales ($p+q$) oscilan entre 3.18μ (par 1) y 1.50μ (par 16), indicando cariotipo con cromosoma de tamaño pequeño a mediano, típico de las asteráceas. El índice centromérico (IC%) muestra valores entre 38.37-45.45% metacéntricos, 28.62-36.04% submetacéntricos y 20.70% acrocéntrico o satelitado, confirmando la clasificación de Levan e indicando una heterogeneidad moderada en la posición del centrómero. La mayoría de los pares metacéntricos (par 1-7) con IC cercano al 50% lo que indica centrómeros medianos y brazos de longitud similar. A medida que disminuye el tamaño, aparecen submetacéntricos y un acrocéntrico, que presentan IC más bajos, mostrando asimetría moderada, sugiriendo un ligero avance evolutivo según criterio de Stebbins.

La longitud relativa (LR%) va desde 8.81% (par 1) hasta 4.15% (par 16) mostrando un gradiente descendente continuo y sin presencia de cromosomas muy marcadamente grandes o pequeños. Los pares 1-3 son los más largos, lo que fueron útiles para su fácil reconocimiento.

Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (3625 m.s.n.m.)

Figura 36

Cromosomas metafásicos y cariotipo de Silybum marianum L. Fortaleza Sacsayhuaman



Nota: Fotografía ampliada de observación microscópica a 1000x

Figura 37

Cariotipo de Silybum marianum L. Fortaleza Sacsayhuaman

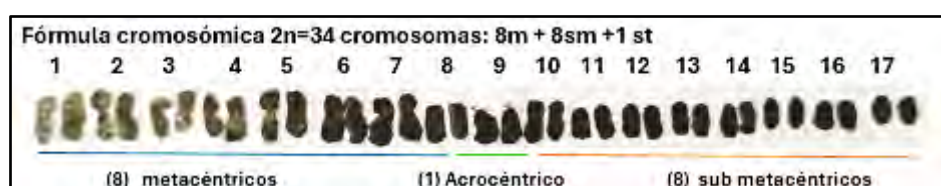


Tabla 25

*Características e índices de los pares cromosómicos del cariotipo de *Silybum marianum* L., procedente de la Comunidad Fortaleza de Sacsayhuaman, basado en Levan, 1964*

Par Cromosómico	Brazo largo (q) μm	Brazo corto (p) μm	p+q (μm)	RB(q/p)	LR%	AR (p/q)	IC (%)	Tipo
1	1.76	1.31	3.07	1.34	8.59	0.74	42.68	Metacéntrico (m)
2	1.60	1.31	2.91	1.23	8.14	0.81	44.88	Metacéntrico (m)
3	1.70	1.00	2.70	1.69	7.56	0.59	37.12	Metacéntrico (m)
4	1.49	1.09	2.58	1.36	7.21	0.74	42.37	Metacéntrico (m)
5	1.48	1.00	2.48	1.48	6.93	0.68	40.37	Metacéntrico (m)
6	1.45	1.00	2.45	1.44	6.86	0.69	40.99	Metacéntrico (m)
7	1.28	0.79	2.07	1.62	5.80	0.62	38.19	Metacéntrico (m)
8	1.32	0.80	2.13	1.65	5.95	0.61	37.78	Metacéntrico (m)
9	1.63	0.44	2.07	3.68	5.78	0.27	21.35	Acrocéntrico(st)
10	1.15	0.63	1.78	1.84	4.98	0.54	35.15	Sub metacéntrico (sm)
11	1.20	0.68	1.88	1.78	5.25	0.56	35.98	Sub metacéntrico (sm)
12	1.22	0.63	1.85	1.94	5.18	0.52	34.06	Sub metacéntrico (sm)
13	1.17	0.51	1.68	2.32	4.70	0.43	30.16	Sub metacéntrico (sm)
14	1.08	0.50	1.58	2.15	4.41	0.47	31.77	Sub metacéntrico (sm)
15	1.02	0.48	1.50	2.10	4.19	0.48	32.21	Sub metacéntrico (sm)
16	1.04	0.51	1.56	2.03	4.36	0.49	33.01	Sub metacéntrico (sm)
17	1.00	0.47	1.46	2.13	4.09	0.47	31.91	Sub metacéntrico (sm)

Nota: RB (Proporción entre brazos), LR % (Longitud relativa), IC (índice centromérico) (m) metacéntrico (st) satelitado o acrocéntrico

De acuerdo con la tabla 25 se presentan 17 pares de cromosomas ($2n=34$), según Levan se muestra 8 cromosomas metacéntricos, 8 sub metacéntricos y un acrocéntrico (st), el tamaño de las longitudes totales (p+q) oscilan entre 3.07μ (par 1) y 1.46μ (par 17), indicando cariotipo con cromosoma de tamaño pequeño a mediano, típico de las asteráceas.

El índice centromérico (IC%) muestra valores entre 37.12-44.88% metacéntricos, 30.16-35.98% submetacéntricos y 21.35% acrocéntrico o satelitado, confirmando la clasificación de Levan e indicando una heterogeneidad moderada en la posición del centrómero.

La mayoría de los pares metacéntricos (par 1-8) con IC cercano al 50% lo que indica centrómeros medianos y brazos de longitud similar. A medida que disminuye el tamaño, aparecen submetacéntricos y un acrocéntrico, que presentan IC más bajos, mostrando asimetría moderada, sugiriendo un ligero avance evolutivo según criterio de Stebbins.

La longitud relativa (LR%) va desde 8.59% (par 1) hasta 4.09% (par 17) mostrando un gradiente descendente continuo y sin presencia de cromosomas muy

marcadamente grandes o pequeños. Los pares 1-4 son los más largos, lo que fueron útiles para su fácil reconocimiento.

Los resultados de los cariotipos de *Silybum marianum* L., demostraron a la especie como diploide con $2n = 2x = 34$ cromosomas. De acuerdo con la clasificación de Levan, 1964, los genotipos de K'ayra Huaccoto y Terminal Huancaro presenta una fórmula cariotípica con 7 cromosomas metacéntricos (m), 9 submetacéntricos (sm) y 1 satelitado o acrocéntrico (st) y para el genotipo de la Fortaleza de Sacsayhuaman presenta 8 cromosomas metacéntricos, 8 submetacéntricos y un satelitado, estos resultados son similares a los reportados por Abrahimpour et al. (2011) & Asghari-Zakaria et al. (2008)

Tabla 26

Índices globales en los cariotipos de los tres genotipos de Silybum marianum L.

Genotipo	Formula de Cariotipo	TF (%)	DRL (%)	S (%)	R (L/S)	A1	A2	Stebbins
Huaccoto K'ayra	7m + 9sm + 1st	36.741	26.22	48.65	2.22	0.43	0.26	2B
Terminal Huancaro	7m + 9sm + 1st	36.813	25.84	44.51	2.13	0.43	0.26	2B
Fortaleza Sacsayhuaman	8m + 8sm + 1st	36.613	24.17	43.18	2.09	0.43	0.24	2B

Nota: TF%: Índice de proporción de brazos cortos en relación al genoma total, DRL%: Índice de la diferencia relativa de longitud, S%: índice de asimetría, R(L/S): Relación de cromosoma mayor sobre cromosoma menor, A1(asimetría intra-pareja), A2(asimetría inter-pareja), 2B (Simetría cromosómica de Stebbins)

Las características de los pares cromosómicos para los tres gradientes altitudinales, presentadas en las tablas 23, 24 y 25 demuestran características cariológicas similares entre sí, aunque se observaron algunas variaciones en las proporciones de los brazos cromosómicos y en las longitudes relativas entre los distintos genotipos. La morfología del par satelitado varió levemente entre sitios AR e IC, atribuible a diferencias en la extensión de la constricción secundaria, sin evidencia de reordenamientos mayores, la presencia fija del satélite en todas las poblaciones respalda la conservación de la región NOR, del locus ribosomal mayor (45S rDNA) como rasgo estable de la especie.

En conjunto con la dominancia de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y la gradación continua de tamaños los cariotipos se clasifican como simétricos (2B) de acuerdo con las categorías de Stebbins. Estos resultados son similares a los reportados por Sarrami et al. (2012) en su investigación sobre diversidad citogenética en diez poblaciones diferentes de *Silybum marianum* quienes demostraron diploidía de cromosomas de $2n=2x=34$, y de acuerdo con la clasificación de Stebbin de la simetría todas las poblaciones se ubicaron como 2B.

Según Levan et al. (1964) los cariotipos presentan predominio de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos, considerados más simétricos y primitivos. El índice de proporción de brazos cortos con relación al genoma total (TF%) fue de 36.6-36.8% lo que indica que los cariotipos son relativamente balanceados en términos de brazos cromosómicos. De acuerdo con Huzirawa (1962) valores cercanos al 50% corresponden a simetría alta, los observados en los cariotipos indican asimetría moderada. La diferencia relativa de longitud (DRL%) presentan diferencias moderadas en tamaño de cromosomas, según Peruzii & Eroglu (2013) valores altos de DRL reflejan mayor heterogeneidad en la longitud cromosómica, asociada con procesos evolutivos de reorganización cromosómica. Sacsayhuaman presente valor más bajo (24.17%) implicando un cariotipo más homogéneo en longitudes.

El % de simetría (S%) van de 43.18% a 48.65%, el más alto se encuentra en K'ayra Huaccoto con 48.65%, indicando mayor proporción de cromosomas simétricos. Según Zarco (1986), valores mayores de simetría se asocia a cariotipos más estables y menos derivados.

La relación de cromosoma mayor y menor R(L/S) con valores de 2.09 y 2.22 muestran una variación moderada, según Paszko (2006) valores bajos cercanos a 2, indican cariotipos más homogéneos y por tanto menos especializados.

Según la clasificación de Stebbins (1971) los tres genotipos presentan cariotipos moderadamente simétricos (2B) con predominio de cromosomas metacéntricos, submetacéntricos, lo que indica estabilidad estructural y un grado evolutivo intermedio.

El genotipo Fortaleza Sacsayhuaman tiende a mayor simetría, mientras que los genotipos de K'ayra Huaccoto y Terminal Huancaro poseen mayor diversidad en tamaños, lo que podría reflejar adaptaciones diferenciales en sus ambientes altitudinales.

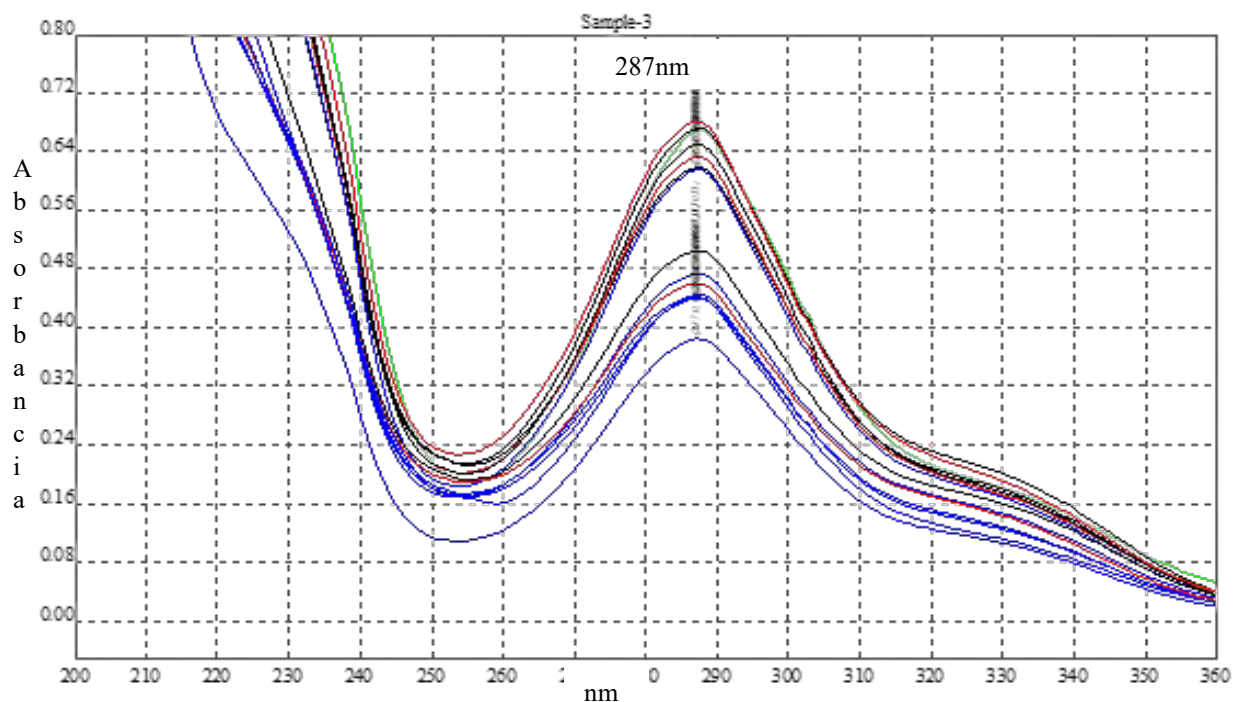
4.1.4. Análisis del contenido de silimarina en semillas de *Silybum marianum* L.

4.1.4.1. Tamizaje de silimarina por espectrofotometría UV-VIS

La obtención de los espectros de absorción de silimarina a partir de las semillas de *Silybum marianum* L. se obtuvo con un espectrofotómetro de doble haz UV/VIS UNICO, la curva de regresión lineal se obtuvo con patrones de referencia de silimarina SIGMA a 3, 6, y 12 ppm.

Figura 38

Espectro de superposición estándar de silimarina y silimarina obtenida a partir de semillas de S. marianum - UV-Visible 287nm

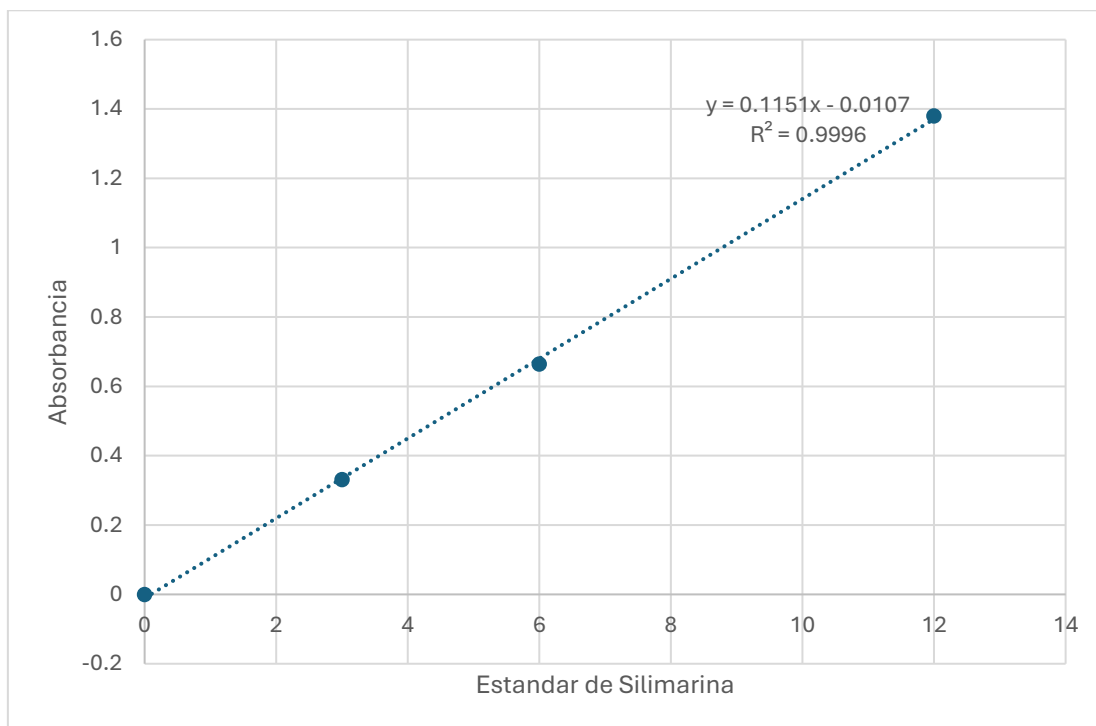


Nota: líneas en verde estándares de silimarina de 3,6 y 12ppm, en azul Huaccoto K'ayra, en Rojo Terminal Huancaro y, en negro de Fortaleza Sacsayhuaman.

En la figura 38, se aprecia, los espectros de superposición de las muestras frente a los estándares: Espectros en color Azul proceden de Huaccoto K'ayra, en Rojo proceden de Terminal Huancaro y en Negro proceden del Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman, encontrando características de identidad molecular frente a los estándares de 3, 6 y 12 ppm de silimarina (30% de silibina) espectros en color verde.

Figura 39

Curva de calibración con estándar de silimarina 3,6 y 12 ppm UV-Vis a 287nm



Estándar de Silimarina ppm	Absorbancia 287nm
0	0
3	0.3311
6	0.6642
12	1.3797

Ecuación de la recta: $Y = 0.115 x - 0.0085$

Donde: y = representa la absorbancia
x = concentración en ppm.

El coeficiente de determinación R^2 fue de 0.9996, significando un ajuste perfecto, rango lineal validado de 0-12 ppm de silimarina. La curva de calibración presentó excelente linealidad, sensibilidad y un intercepto virtualmente nulo, lo que la hace idónea para cuantificar silimarina en extractos de semillas dentro del intervalo 0–12 ppm.

Tabla 27

Porcentaje (p/p) de silimarina por UV-Vis (289nm) en semillas de Silybum marianum L., en tres gradientes altitudinales

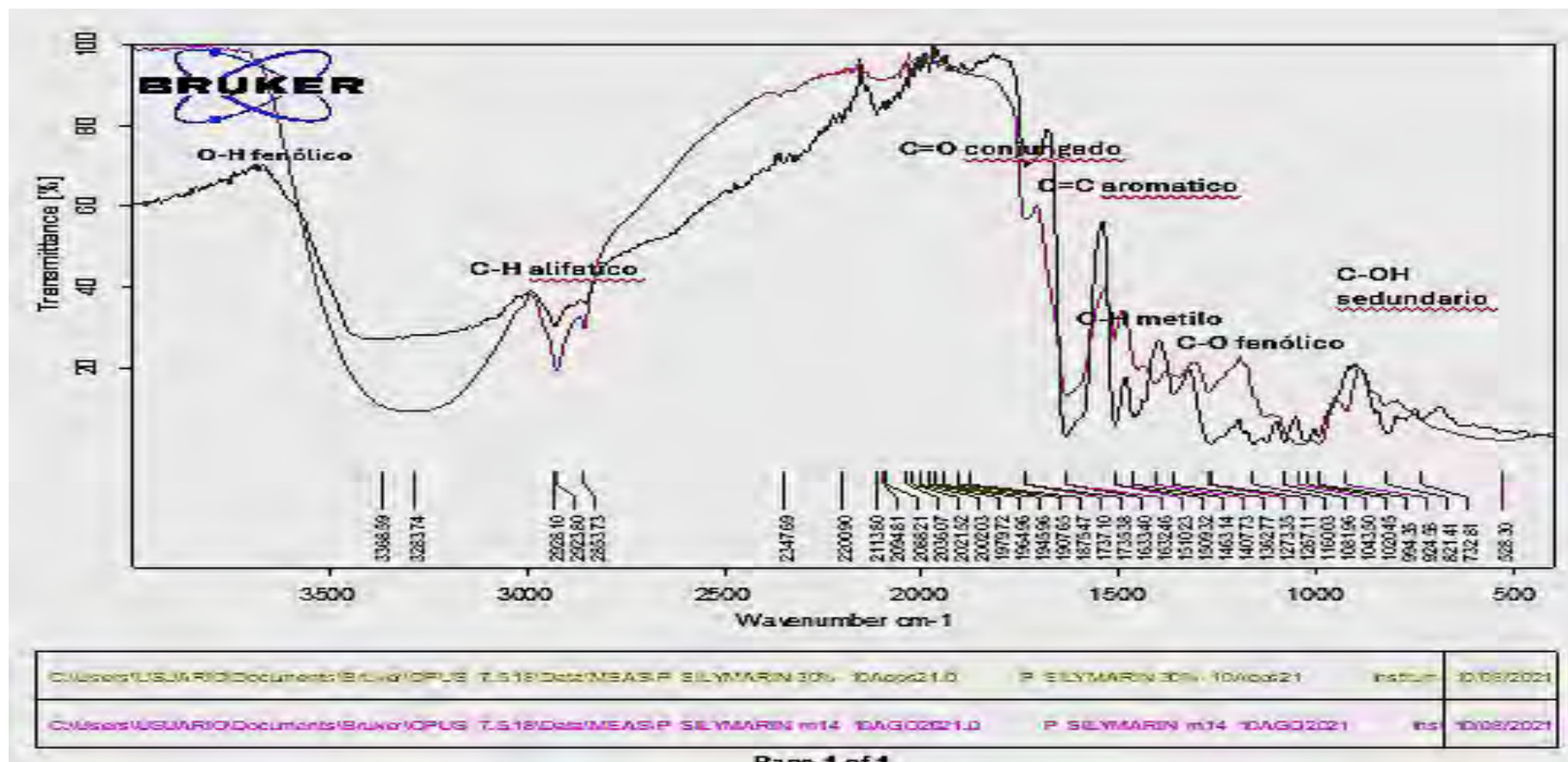
N° muestra	Semilla	Gradiente altitudinal	Absorbancia UV-Vis 287nm	%(p/p)
M9	Fértil	Huaccoto K'ayra (3207m)	0.4737	0.175
M10	Infértil	Huaccoto K'ayra (3207m)	0.6155	0.220
M11	Fértil	Terminal Huancaro (3402m)	0.6337	0.233
M12	Infértil	Terminal Huancaro (3402m)	0.2555	0.095
M13	Fértil	Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (3625m)	0.6187	0.227
M14	Infértil	Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (3625m)	0.6718	0.246

Los % (p/p) de silimarina determinados por UV-Vis, se encontraron entre 0.095-0.246% (2.3-5.9ppm), cabe aclarar que las absorbancias registradas al UV-Vis no es exclusiva de los flavonolignanos de silimarina, sino que incluye otros compuestos fenólicos con cromóforos aromáticos. Desde el punto de vista metodológico el UV-Vis, es un método de tamizaje preliminar o de rutina.

4.1.4.2. Tamizaje de espectro de silimarina por FTIR-ATR

Figura 40

Espectro IR-FTHR de estándar de silimarina (30% de silibina) y silimarina extraída en muestra representativa procedente de la Comunidad Fortaleza Sacsayhuamán



Nota: Estándar de silimarina (30% silibina), color marrón, Muestra 14 representativa procedente de Comunidad Fortaleza Sacsayhuamán, color fucsia.

Tabla 28

Análisis comparativo de la señal de IR-FTHR, de silimarina estándar y la muestra 14 de extracto de silimarina en semilla de Silybum marianum L.

N°	Banda cm^{-1}	Asignación	Presente en estándar de silimarina (30% sibilina)	Presente en Muestra 14	Comentario
1	~3400	O-H fenólico amplio	Muy marcado	Similar	Característico
2	~2930 y 2850	C-H alifático (asimétrico y simétrico)	Muy marcado	Similar	Intensidad semejante
3	~1680-1650	C=O conjugado (carbonilo)	Muy marcado	Similar	Ligera diferencia de intensidad
4	~1600 y 1510	C=C aromático (estiramiento)	Muy marcado	Similar	Muy representativos de flavonoides
5	~1450	C-H de grupos metilo	Muy marcado	Similar	Similar
6	~1270-1050	C-O fenólico y éter aromático	Muy marcado	Similar	Patrón complejo pero consistente
7	~1030-1000	C-OH (alcohol secundario)	Muy marcado	Similar	Similar
8	~800-600	Deformaciones fuera del plano aromáticas	Muy marcado	Similar	Coincidentes

De la figura 40 y la tabla 28 se observa y encontró alta coincidencia espectral, en el espectro del estándar de silimarina (30% silibina) y la muestra de silimarina extraída de la muestra representativa, procedente del Comunidad Fortaleza de Sacsayhuaman, tanto en número de bandas como en su posición relativa. Se observa ligeras diferencias de intensidad relativa, especialmente en la región $\sim 1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, esto podría deberse a diferencias de concentración, posibles interferencias de otras sustancias vegetales residuales como azúcares, lípidos e impurezas, humedad o preparación de la muestra (presencia de agua puede ensanchar la banda OH), No se observan picos nuevos en la muestra 14 que indiquen contaminación o compuestos distintos de los esperados en silimarina.

Kvasnicka et al, 2003 en análisis de los componentes activos de silimarina, reportó bandas OH (~ 3400), C=O (~ 1650) y aromáticos ($\sim 1600\text{cm}^{-1}$), Jelic et al 2020 por FTIR y Raman caracterizaron extractos de silimarina, asignando bandas similares a las encontradas, lo que valida la presencia de los flavonolignanos. Perez et al 2018, por métodos espectroscópicos aplicados a la identificación de silimarina en matrices complejas confirman que los espectros IR de silimarina poseen firmas distintas aromáticas y carbonilos. Los tamizajes de silimarina seguidas por UV-Vis e IR-FT mediante el uso de estándares de silimarina, sirvieron para determinar la identidad de la

silimarina en las muestras y para su posterior determinación del contenido de silimarina en semillas.

4.1.4.3. Análisis del contenido silimarina por HPLC DAD en semillas de *Silybum marianum* L. de los tres gradientes altitudinales en Cusco.

Análisis de los cromatogramas de estándar de Silimarina

Los cromatogramas de los estándares 3, 6, 12,24 y 30 ppm se encuentran en el Anexo 10. Para el análisis de los picos, tiempos de retención, Áreas y altura se utilizó el estándar de 24 ppm representativo de los estándares que se muestra a continuación:

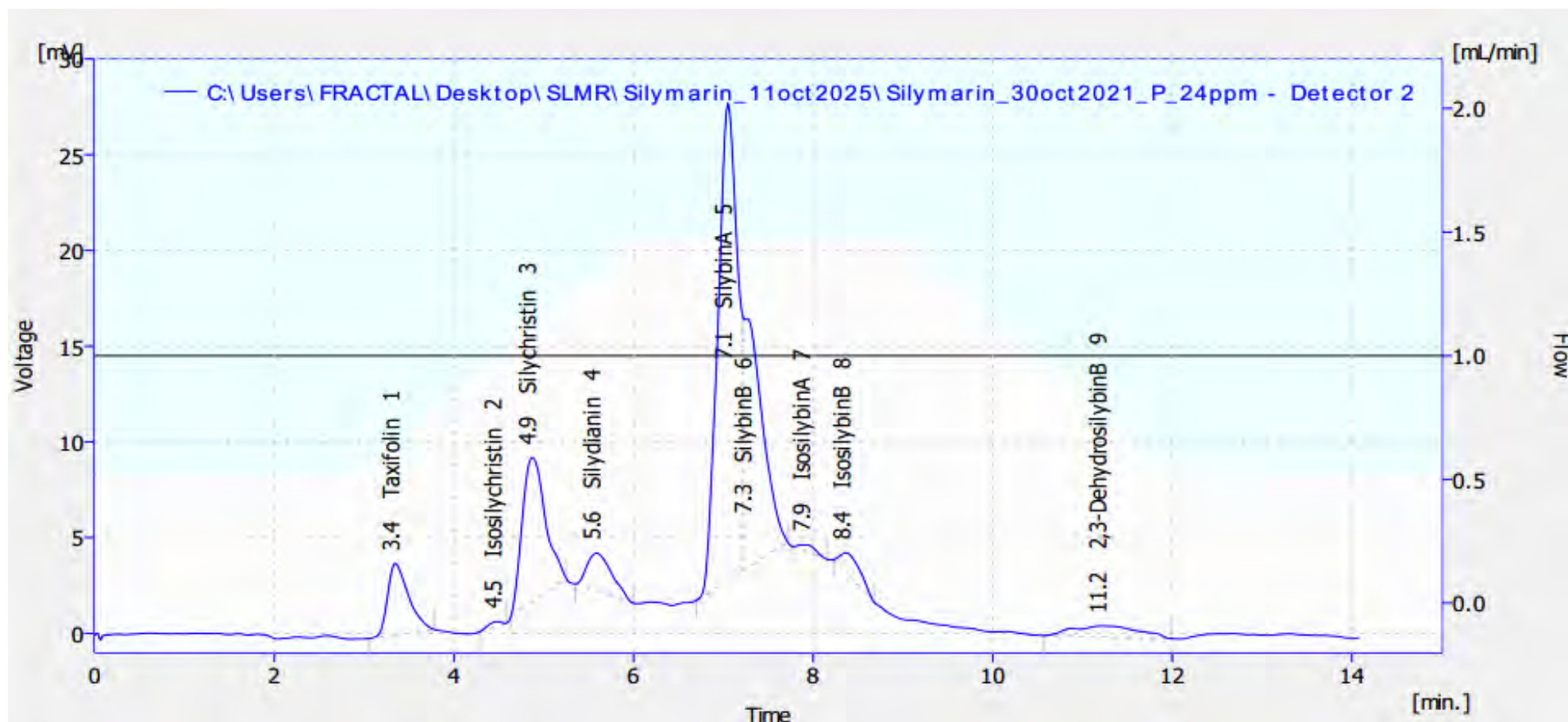
Tabla 29
Tiempo de retención y % de Área y altura de flavonolignanos identificados estándar 24ppm

Pico	Tiempo retención (min)	Área (mV s)	Área (%)	Altura (%)	Compuesto identificado	Observaciones
1	3.350	60.140	7.0	7.0	Taxifolina	Flavonoide precursor
2	4.438	2.402	0.3	0.4	Isosilicristina	Menor concentración
3	4.867	134.269	15.6	14.2	Silicristina	Pico bien definido
4	5.583	38.740	4.5	3.7	Silidianina	Señal clara
5	7.050	373.249	43.3	46.7	Silibina A	Pico mayor compuesto principal
6	7.267	199.676	23.2	24.4	Silibina B	Segundo más abundante
7	7.917	4.908	0.6	0.6	Isosilibina A	Compuesto menor
8	8.367	18.811	2.2	1.9	Isosilibina B	Señal leve
9	11.217	29.925	3.5	1.1	2,3-Dehidrosilibina B	Derivado oxidado
Total		862.120	100.0	100.0		

En el cromatograma del estándar 24 ppm (Figura 43), se usó para la demostración de los nueve picos principales, correspondientes a los flavonolignanos característicos de la silimarina, con predominancia de la silibina A + B (66.2%), seguidos de la Silicristina, la pureza de los picos ($\geq$ a 720) confirman una adecuada separación en las condiciones empleadas. *Silybum marianum* L., posee más de 20 flavonolignanos y alta plasticidad a ambientes duros, es muy razonable que gradientes altitudinales modulen el nivel total como el perfil de silimarina (Zhang et al., 2024).

Figura 41

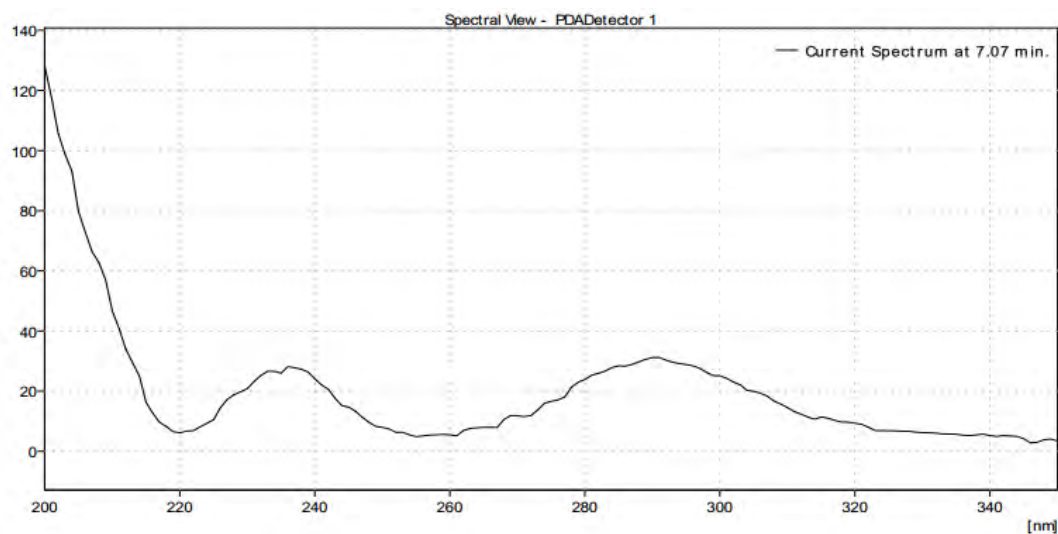
Cromatograma de HPLC-DAD de estándar de 24ppm representativa de silimarina (30% silibina)



Sistema de análisis cromatográfico: HPLC-DAD Optimo Konik 560- Konikon Plus
Columna Nucleosil 100-5 C18 (25x40mm) Konik Thermo Fisher Scientific, Fase móvil: ACN: H2O 75:25 v/v
Estándar de Silimarina (SLMR) 30% SBN Sigma

Figura 42

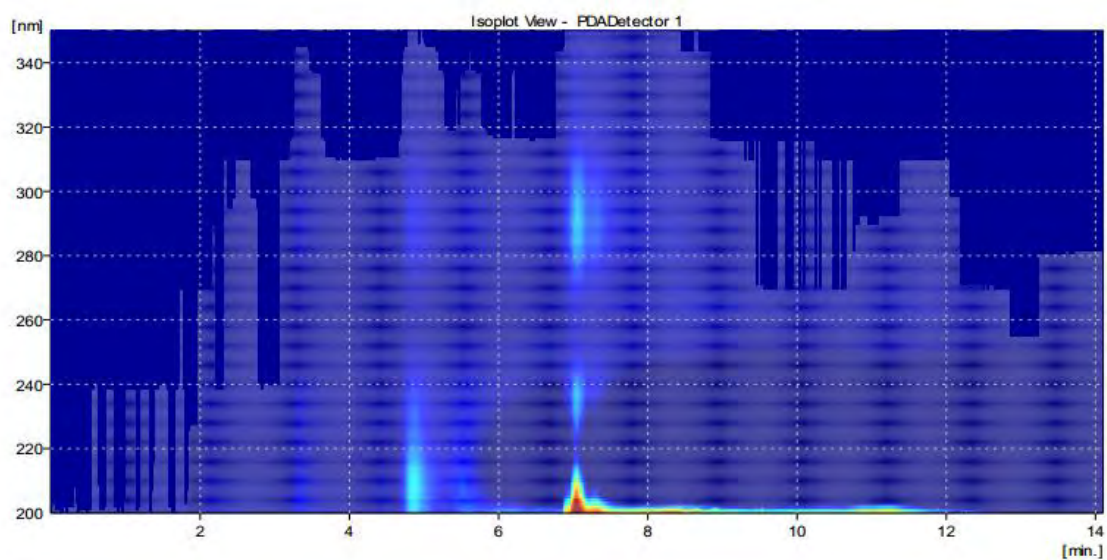
Perfil espectral 2D de pico a 7.07 min con un máximo de absorbancia a 288nm



NOTA: Espectro 2D a 7.07 min, con un máximo de absorbancia cerca de 288nm, coincide con espectros de silibina A y B.

Figura 43

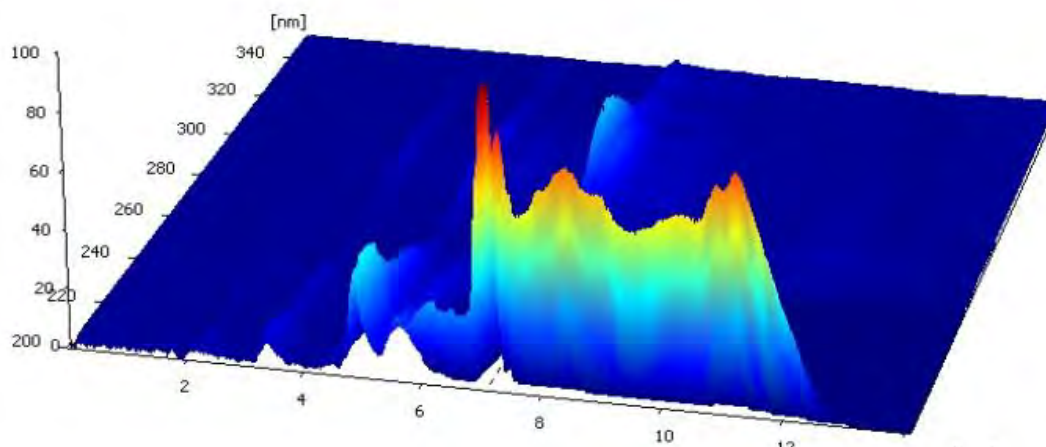
Espectros de identidad y pureza espectral de los picos cromatográficos por HPLC-DAD



NOTA: Se observa zonas de mayor densidad de color alrededor de 7 minutos, correspondientes a los picos más intensos del cromatograma (silibina A y B)

Figura 44

Espectros tridimensionales del detector de arreglo de diodos (DAD) obtenidos durante el análisis de estándar de silimarina



NOTA: Espectro 3D las alturas representan la intensidad de absorbancia, se aprecia predominio de un pico pronunciado en la zona de 7 min y 288-290 nm, confirma que compuestos principales absorben en esta región del espectro

En las figuras 42 a 44, se muestran los espectros de identidad y pureza espectral de los picos cromatográficos observados por HPLC-DAD. La coincidencia de los máximos de absorbancia y tiempos de retención con los valores esperados para las sibilinas indican una adecuada separación y detección del estándar de silimarina.

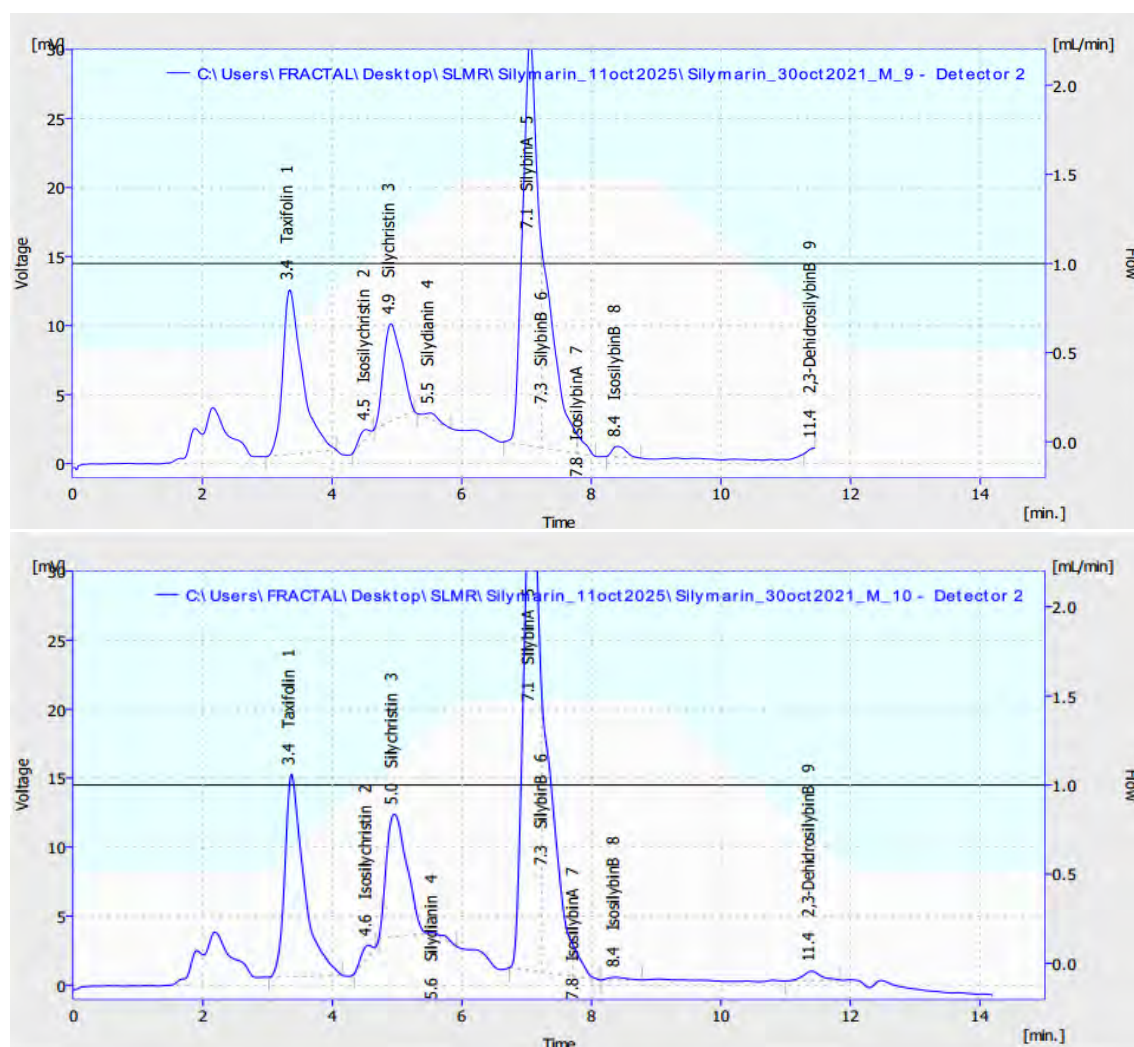
En el cromatograma de la figura 37, se muestra nueve picos bien definidos, correspondientes a los flavonolignanos principales de la silimarina, con una buena separación entre ellos en el rango de 3 a 11 minutos. La intensidad eje Y, indica la respuesta del detector DAD, mientras que el eje X representa el tiempo de retención (min), presenta una línea de base estable, evidenciando una correcta condición del sistema cromatográfico y ausencia de interferencias.

Análisis de los cromatogramas de las muestras

HUACCOTO K'AYRA (3207 m.s.n.m.)

Figura 45

Cromatogramas HPLC-DAD de flavonolignanos de silimarina en semillas fértiles (M9) e infértiles (M10) procedente de Huaccoto - K'ayra



Nota: M9 Semillas fértiles y M10 Semillas infértiles



Tabla 30

Tiempo de retención y % de Área de flavonolignanos mayoritarios en semillas – Huaccoto K'ayra

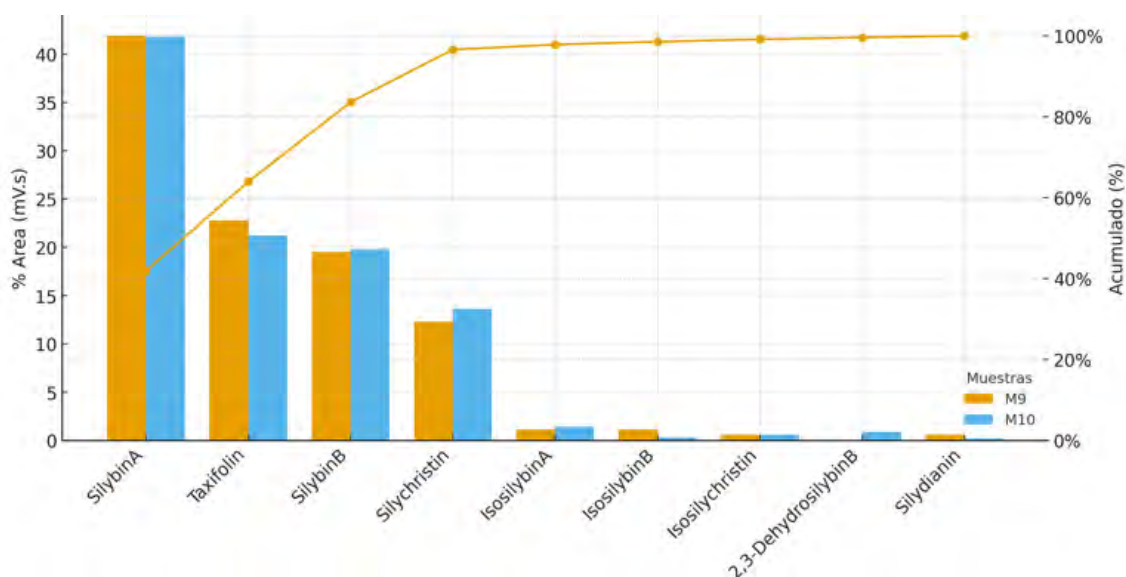
Nº pico	Compuesto	Semillas fértiles (M9)				Semillas infértiles (M10)			
		TR (min)	Área	Área (%)	Altura (%)	TR (min)	Área	Área (%)	Altura (%)
1	Taxifolina	3.4	249.7	22.8	18.3	3.4	302.0	21.2	17.4
2	Isosilicristina	4.5	6.9	0.6	0.9	4.6	8.8	0.6	1.0
3	Silicristina	4.9	134.4	12.3	10.9	5.0	194.0	13.6	10.6
4	Silidianina	5.5	7.0	0.6	0.7	5.6	3.6	0.2	0.1
5	Silibina A	7.1	458.2	41.9	45.5	7.1	593.9	41.8	46.4
6	Silibina B	7.3	213.4	19.5	20.6	7.3	282.1	19.8	21.2
7	Isosilibina A	7.8	11.9	1.1	1.8	7.8	20.4	1.4	2.3
8	Isosilibina B	8.4	11.5	1.1	1.2	8.4	3.8	0.3	0.2
9	2,3-DehydrosilibinaB	11.4	0.3	0.0	0.1	11.4	13.0	0.9	0.8

Nota: Semillas fértiles (M9) y Semillas infértiles (M10)

Los cromatogramas presentan picos bien resueltos en el dominio 7.0-7.3 min (Silibina A y B), seguidos de Silicristina 4.9 min y Taxifolina 3.4 min.

Figura 46

Pareto de flavonolignanos HPLC-DAD (% Área) Huaccoto Káya (3207m) semillas fértiles (M9) Semillas infértiles (M10)

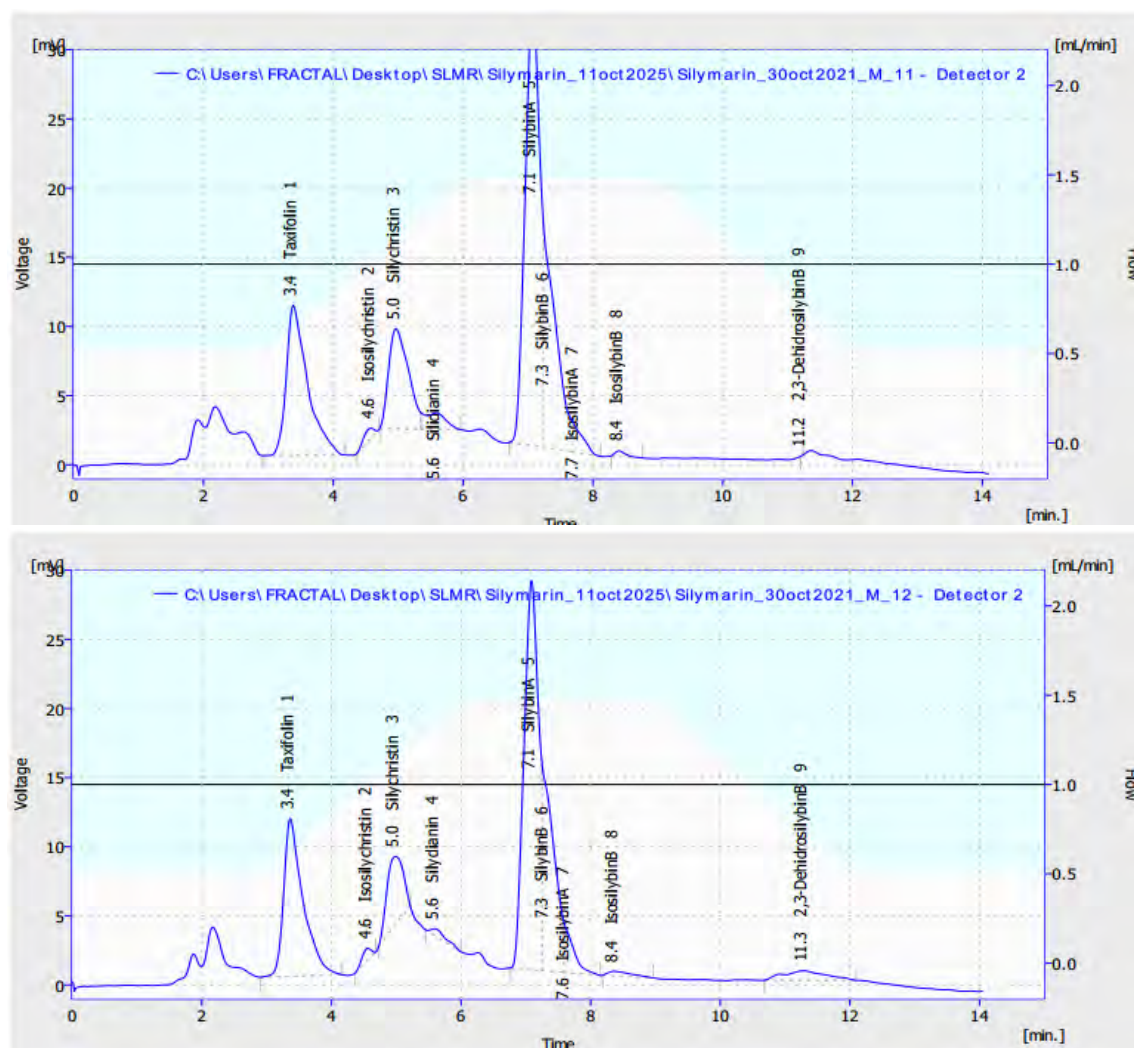


En el Pareto la composición de silibina A + B alcanza 61-62%, Silicristina 12-14%, Taxifolina 21-23%, 2,3-Dehidroisolibina B casi ausente, el perfil de las semillas fértiles e infértiles, presentan un patrón cualitativo similar.

TERMINAL HUANCARO (3402 m.s.n.m.)

Figura 47

Cromatogramas HPLC-DAD de flavonolignanos de silimarina en semillas fértiles(M11) e infértiles(M12) procedente de Terminal Huancaro



Nota: M11 Semillas fértiles y M12 Semillas infértiles



Tabla 31

Tiempo de retención y % de Área de flavonolignanos mayoritarios en semillas - Terminal Huancaro

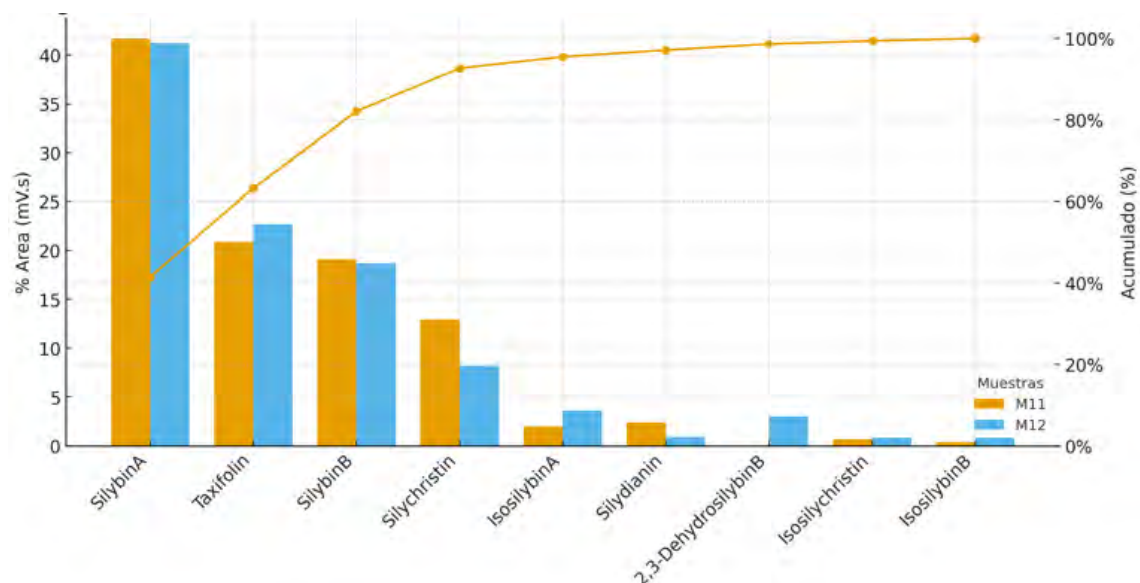
N° pico	Compuesto	Semillas fértiles (M11)				Semillas infértiles (M12)			
		TR (min)	Área	Área (%)	Altura (%)	TR (min)	Área	Área (%)	Altura (%)
1	Taxifolina	3.383	246.195	20.9	15.6	3.367	235.652	22.7	17.8
2	Isosilicristina	4.583	8.255	0.7	1	4.567	7.959	0.8	1.3
3	Silicristina	4.967	152.429	12.9	10.4	4.983	85.38	8.2	7.8
4	Silidianina	5.583	28.291	2.4	1.7	5.6	9.525	0.9	0.8
5	Silibina A	7.067	491.767	41.7	46.7	7.083	427.892	41.2	44
6	Silibina B	7.267	225.247	19.1	21.1	7.283	193.803	18.7	21.8
7	Isosilibina A	7.717	23.94	2	2.8	7.617	37.82	3.6	5
8	Isosilibina B	8.4	4.288	0.4	0.6	8.367	8.352	0.8	0.5
9	DehydrosilibinaB	11.217	0.048	0	0	11.283	31.2	3	1.1

Nota: Semillas fértiles (M11) y Semillas infértiles (M12)

Los cromatogramas presentan picos bien resueltos en el dominio 7.0-7.3 min (Silibina A y B), seguidos de Silicristina 4.9 min y Taxifolina 3.4 min.

Figura 48

Pareto de flavonolignanos HPLC-DAD (% Área) Terminal Huancaro (3 402 m) semillas fértiles (M11) Semillas infértiles (M12)

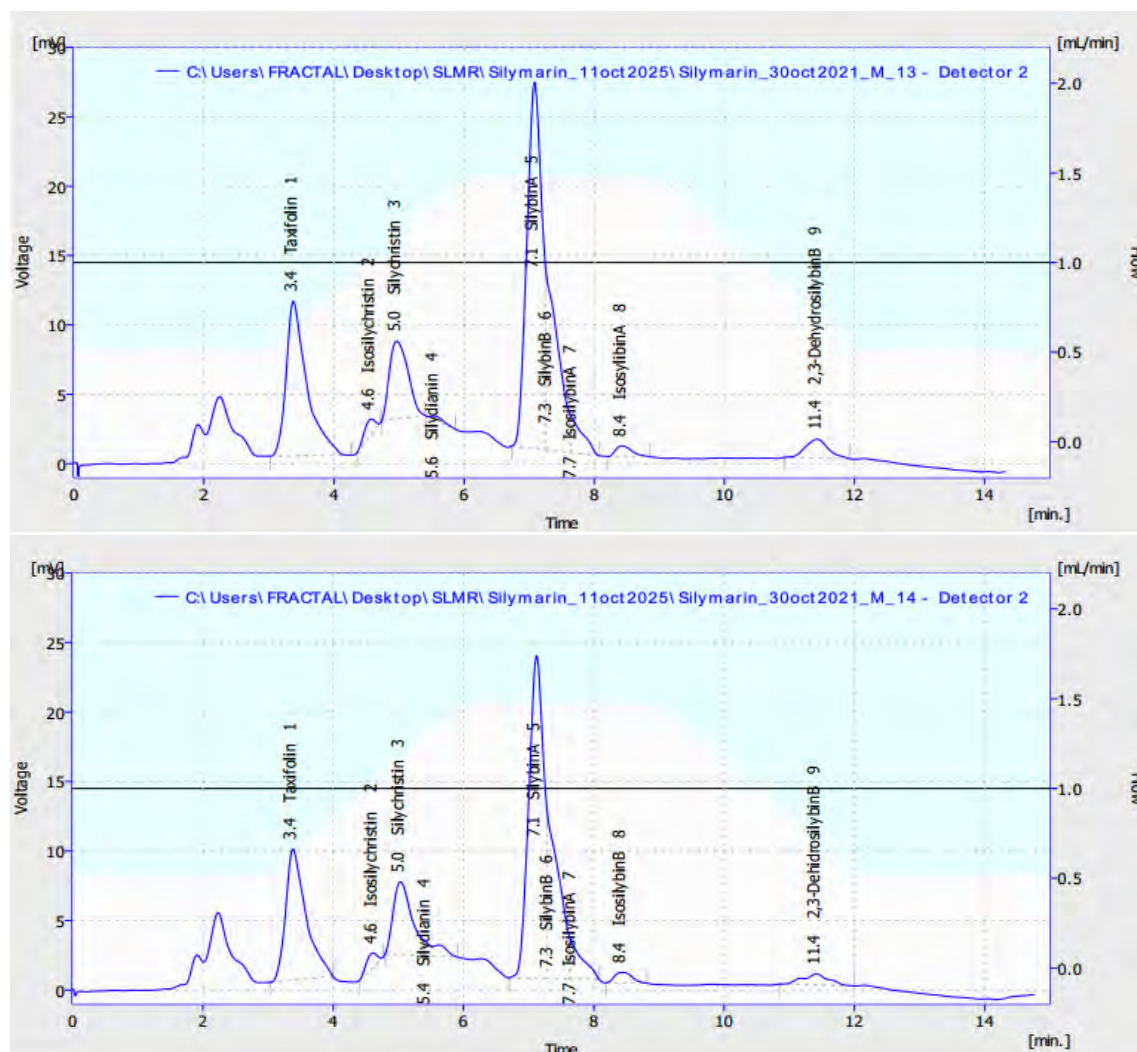


En el Pareto la composición de silibina A + B alcanza 60%, Silicristina baja en M12 (8.2%), Taxifolina 21-23%, aumento de minoritarios Isosilibina A (3.6% y 2.3-DehydrosilibinaB (3.0%)

COMUNIDAD FORTALEZA SACSAYHUAMAN (3625 m.s.n.m.)

Figura 49

Cromatogramas HPLC-DAD de flavonolignanos de silimarina en semillas fértiles e infértiles procedente de la Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman



Nota: M13 Semillas fértiles y M14 Semillas infértiles



Tabla 32

Tiempo de retención y % de Área de flavonolignanos mayoritarios en semillas – Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman

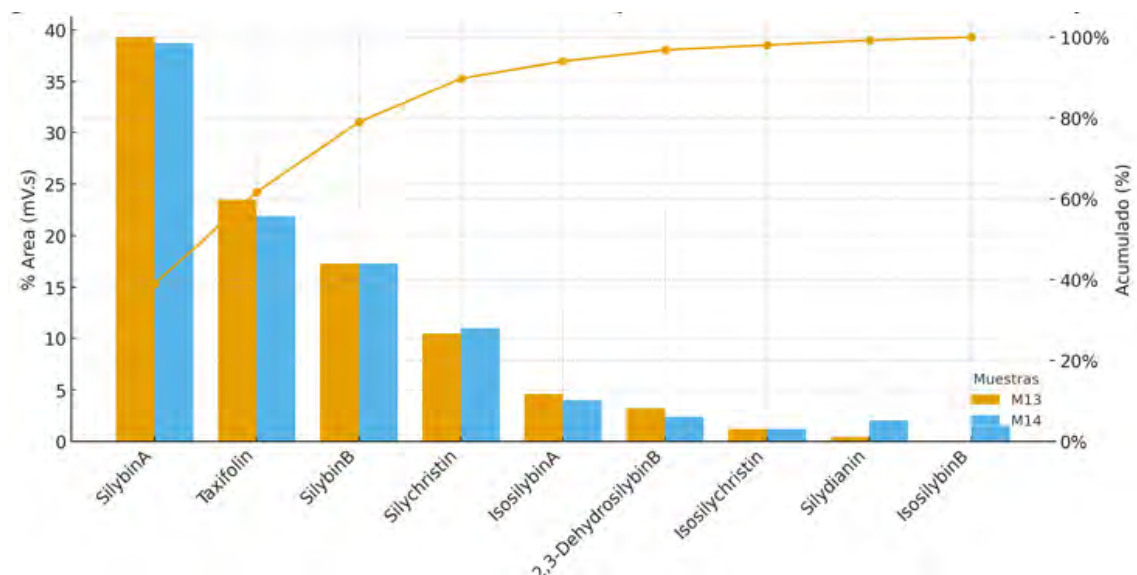
Nº pico	Compuesto	Semillas fértiles (M13)				Semillas infértiles (M14)			
		TR (min)	Área	Área (%)	Altura (%)	TR (min)	Área	Área (%)	Altura (%)
1	Taxifolina	3.383	245.307	23.5	18.2	3.383	203.306	21.9	17.2
2	Isosilicristina	4.567	12.63	1.2	1.9	4.617	11.437	1.2	1.8
3	Silicristina	4.967	109.885	10.5	9.1	5.033	101.968	11	9.5
4	Silidianina	5.55	4.436	0.4	0.5	5.433	18.463	2	1.8
5	SilibinaA	7.083	410.892	39.3	43.2	7.117	358.917	38.7	42.3
6	SilibinaB	7.283	180.244	17.3	19.6	7.317	160.374	17.3	19.9
7	IsosilibinaA	7.667	34.826	3.3	4	7.667	37.535	4	4.6
8	IsosilibinaB	8.433	13.279	1.3	1.3	8.433	14.022	1.5	1.4
9	DehydrosilibinaB	11.433	33.268	3.2	2.2	11.417	21.975	2.4	1.5

Nota: Semillas fértiles (M13) y Semillas infértiles (M14)

Los cromatogramas presentan picos bien resueltos en el dominio 7.0-7.3 min (Silibina A y B), seguidos de Silicristina 4.9 min y Taxifolina 3.4 min.

Figura 50

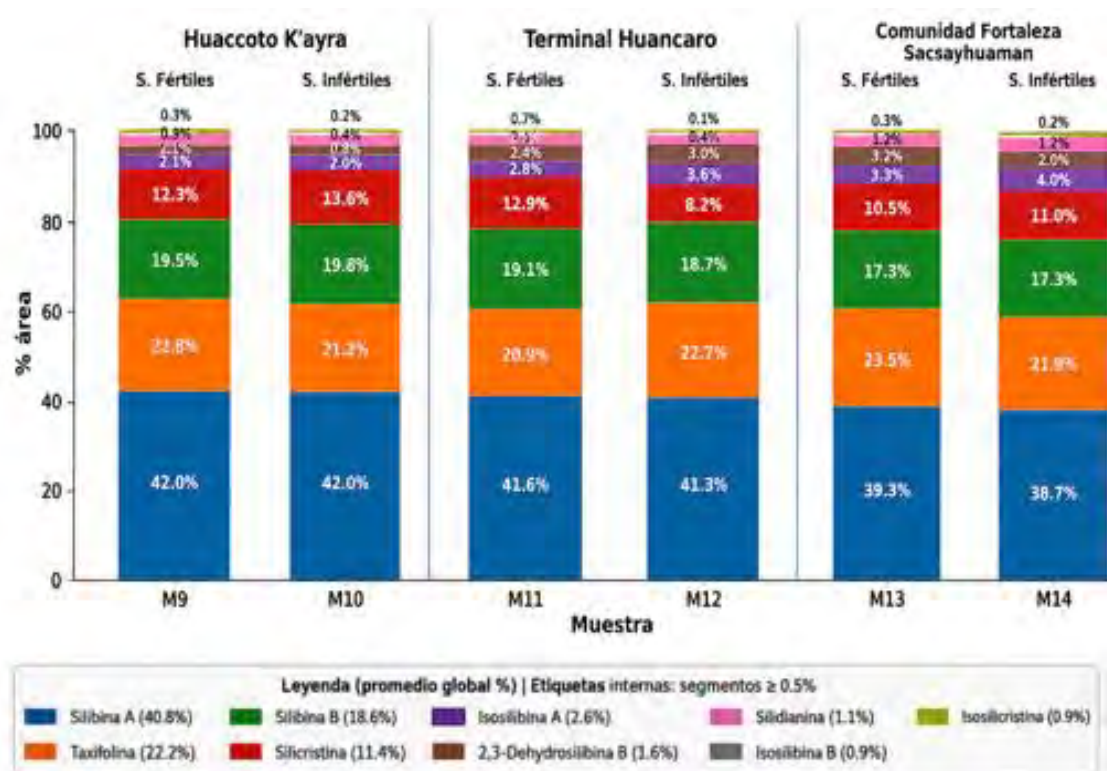
Pareto de flavonolignanos HPLC-DAD (% Área) Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman (3625 m) Semillas fértiles (M13) Semillas infértiles (M14)



En el Pareto la composición de silibina A + B alcanza 56-57%, Taxifolina 22-24%, isosilibiana A y B 3-4% 2,3-Dehidrosilibina B 3.2%, más altos que K'ayra, las semillas fértiles e infértiles son muy consistentes.

Figura 51

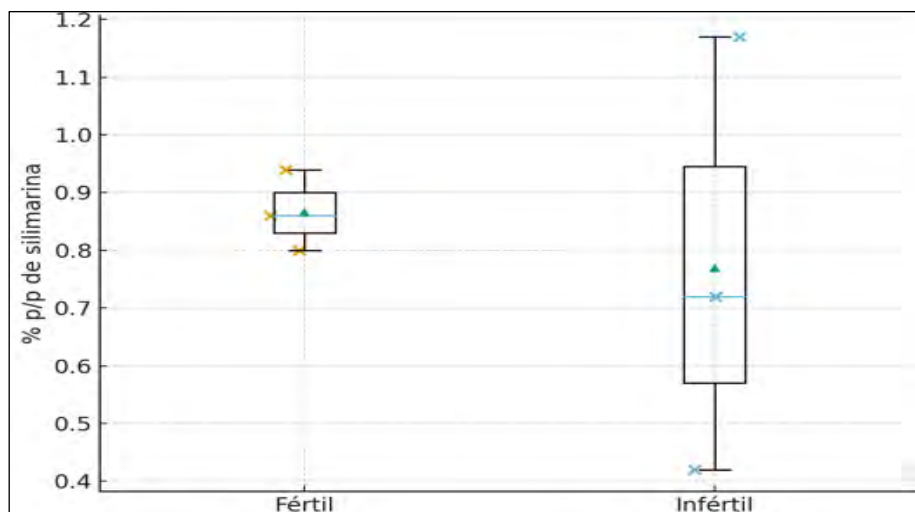
Composición relativa (% Área) de flavonolignanos en tres gradientes altitudinales



En todos los gradientes altitudinales el dominio de los flavonolignanos: silibinas A y B tienen un tiempo de retención de 7.0 – 7.3 min, como acompañantes la Silicristina y taxifolina, acompañantes minoritarios son la Silidianina, Isosilibinas, 2,3-Dehidrosilibina B, varían por gradientes.

En contraste la cromatografía líquida acoplada a detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) permitió identificar individualmente los principales componentes de la silimarina garantizando mayor sensibilidad y exactitud en la cuantificación, coincidiendo con Ha et al. (2019).

En silimarina comercial se muestra perfiles muy distintos y 2,3-dehidrosilibina pueden estar en forma auténticas en muestras de semillas frescas, de ahí que han una diferencia ente Terminal Huancaro y Fortaleza Sacsayhuaman, y no se trata de artefactos. (Petrásková et al., 2020).

Figura 52*% p/p de silimarina por condición de semilla*

Las semillas fértiles alcanzan una mediana de 0.86% (0.80-0.94), las semillas infértiles alcanzan una mediana de 0.72% (0.42-1.17) lo que indica que no hay un aumento significativo.

La dispersión de semillas fértiles es más consistente respecto a las infértiles, con un valor alto en M10 (Huaccoto K'ayra) respecto a M12 (Terminal Huancaro), mostrando heterogeneidad marcada, que podría ser influenciada por las condiciones ambientales y fisiológicas. Por tanto, existe mayor estabilidad y predictibilidad de contenido en semillas fértiles.

Tabla 33*Ratios de Control R1/R2 de flavonolignanos de silimarina en semillas***R1 = SBNB/SBNA, R2 = (SBNB+ISBB)/SBA+ISBA)**

Muestra	Gradiente altitudinal	Semillas	R1	R2
M9	Huaccoto K'ayra (3 207 m)	Fértil	0.465	0.479
M10	Huaccoto K'ayra (3 207 m)	Infértil	0.474	0.465
M11	Terminal Huancaro (3 402 m)	Fértil	0.458	0.446
M12	Terminal Huancaro (3 402 m)	Infértil	0.454	0.435
M13	Fortaleza Sacsayhuaman (3 625 m)	Fértil	0.440	0.437
M14	Fortaleza Sacsayhuaman (3 625 m)	Infértil	0.447	0.440

Nota: Ratios calculados con % de Área

En los extractos de semillas comerciales como los reportados por Chen et al., (2024) se observa ratios estables $R1 = SBNB/SBNA$ de 1.58, $R2 = (SBNB + ISBB) / (SBNA + IBNA)$ de 1.28 en comparación a los resultados obtenidos $R1/R2$ más bajos (sesgo a SBNA), lo que indica una huella químicamente particular en el material Cusqueño.

Tabla 34

Ecuaciones de regresión lineal, R², LOD y LOQ de flavonolignanos en semillas de tres gradientes altitudinales

Muestra*	Compuesto identificado	Ecuación	R ²	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Concentración (ppm)
M9	Silychristin	Y = 6.4048X	0.9881	3	30	20.98
M9	SilybinA	Y = 16.356X	0.9983	3	30	28.02
M9	SilybinB	Y = 9.6858X	0.9783	3	30	22.03
M9	IsosilybinA	Y = 3.1495X -12.419	0.8786	3	12	7.73
M9	IsosilybinB	Y = 3.4404X -11.653	0.9353	3	12	6.72
M10	SilybinB	Y = 9.6858X	0.9783	3	30	29.13
M10	IsosilybinA	Y = 3.1495X -12.419	0.8786	3	12	10.42
M10	IsosilybinB	Y = 3.4404X -11.653	0.9353	3	12	4.48
M10	2,3-DehydrosilybinB	Y = 2.5943X -27.756	0.9719	12	30	15.71
M11	Silychristin	Y = 6.4048X	0.9881	3	30	23.8
M11	Silydianin	Y = 2.5394X	0.9797	3	12	11.14
M11	SilybinB	Y = 9.6858X	0.9783	3	30	23.26
M11	IsosilybinA	Y = 3.1495X -12.419	0.8786	3	12	11.54
M11	IsosilybinB	Y = 3.4404X -11.653	0.9353	3	12	4.63
M12	Silychristin	Y = 6.4048X	0.9881	3	30	13.33
M12	Silydianin	Y = 2.5394X	0.9797	3	12	3.75
M12	SilybinA	Y = 16.356X	0.9983	3	30	26.16
M12	SilybinB	Y = 9.6858X	0.9783	3	30	20.01
M12	IsosilybinB	Y = 3.4404X -11.653	0.9353	3	12	5.81
M12	2,3-DehydrosilybinB	Y = 2.5943X -27.756	0.9719	12	30	22.73
M13	Silychristin	Y = 6.4048X	0.9881	3	30	17.16
M13	SilybinA	Y = 16.356X	0.9983	3	30	25.12
M13	SilybinB	Y = 9.6858X	0.9783	3	30	18.61
M13	IsosilybinA	Y = 3.1495X -12.419	0.8786	3	12	8.16
M13	2,3-DehydrosilybinB	Y = 2.5943X -27.756	0.9719	12	30	23.52
M14	Silychristin	Y = 6.4048X	0.9881	3	30	15.92
M14	Silydianin	Y = 2.5394X	0.9797	3	12	7.27
M14	SilybinA	Y = 16.356X	0.9983	3	30	21.94
M14	SilybinB	Y = 9.6858X	0.9783	3	30	16.56
M14	IsosilybinB	Y = 3.4404X -11.653	0.9353	3	12	7.46
M14	2,3-DehydrosilybinB	Y = 2.5943X -27.756	0.9719	12	30	19.17

Nota: LOD = Límite de detección (menor concentración que el método puede detectar), LOQ = Límite de cuantificación (menor concentración que puede cuantificarse con precisión y exactitud aceptables)

En la tabla 34, se muestra la validación y cuantificación de los flavonolignanos de la silimarina, usando regresión lineal con áreas, reporte de ecuación, valor R², LOD, LOQ y la concentración en ppm estimados para cada muestra M9 al M14.

La calidad de ajuste R², el desempeño es bueno para la mayoría de los flavonolignanos: Silibina A que representa el mejor ajuste (R² de 0.9983), silicristina

(0.9881), silibina B (0.9783), silidianina (0.9797) y 2,3-Dehidrosilibina B (0.9719). En cambio, para isosilibina A, tiene un R^2 más bajo (0.8786), por lo que es el compuesto con mayor incertidumbre en cuantificación (por posible efecto de baja señal o interferencias).

El LOD y LOQ muestra un patrón claro, varios compuestos tienen LOQ alto (30 ppm), por lo que el método resulta ser más exigente para cuantificar con precisión.

Para Isosilibina A y B, Silidianina B con LOQ de 12 ppm, más accesible y para 2,3-Dehidrosilibina B, con LOD de 12 ppm y LOQ de 30ppm muestra una limitación para su cuantificación a niveles relativamente altos.

Fitoquímicamente la dominancia de las silibinas, silicristina, silidianina e isosilibinas, es consistente con la composición típica reportada para extractos de semillas de *Silybum marianum* L., siendo la silibina el componente más representativo dentro de la silimarina, pudiendo variar la proporción entre flavonolignanos por la genética, el ambiente, y el procesamiento (Bijak, 2017). El hecho de que la Isosilibina A tenga un R^2 notablemente menor que los demás puede discutirse con los reportes de los métodos HPLC-DAD y LC-MS de silimarina, varios de los flavonolignanos son estructural y cromatográficamente muy cercanos (isómeros y diastereómeros) y si no hay una clara separación basal, el área integrada puede presentar mayor dispersión y afectar la linealidad aparente (Petrásková et al., 2020). Respecto a 2,3-Dehidrosilibina (y otros 2,3-dehidroflavonolignanos), la literatura reciente resalta que su cuantificación puede ser más desafiante y que lograr su determinación junto con los componentes clásicos de silimarina requiere de métodos con buena selectividad (Petrásková et al., 2020).

4.1.4.4. Contenido de silimarina en semillas de *Silybum marianum* L. por HPLC-DAD-C18

El contenido de silimarina en las semillas de *Silybum marianum* L., se determinó estableciendo la curva de regresión de la suma de Área ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) de los picos 5 y 6 (Silibina A + silibina B) de los estándares de silimarina de 3, 6, 12, 24 y 30 ppm.

Tabla 35

Tiempos de retención y área de picos de Silibina A y Silibina B de los estándares de silimarina

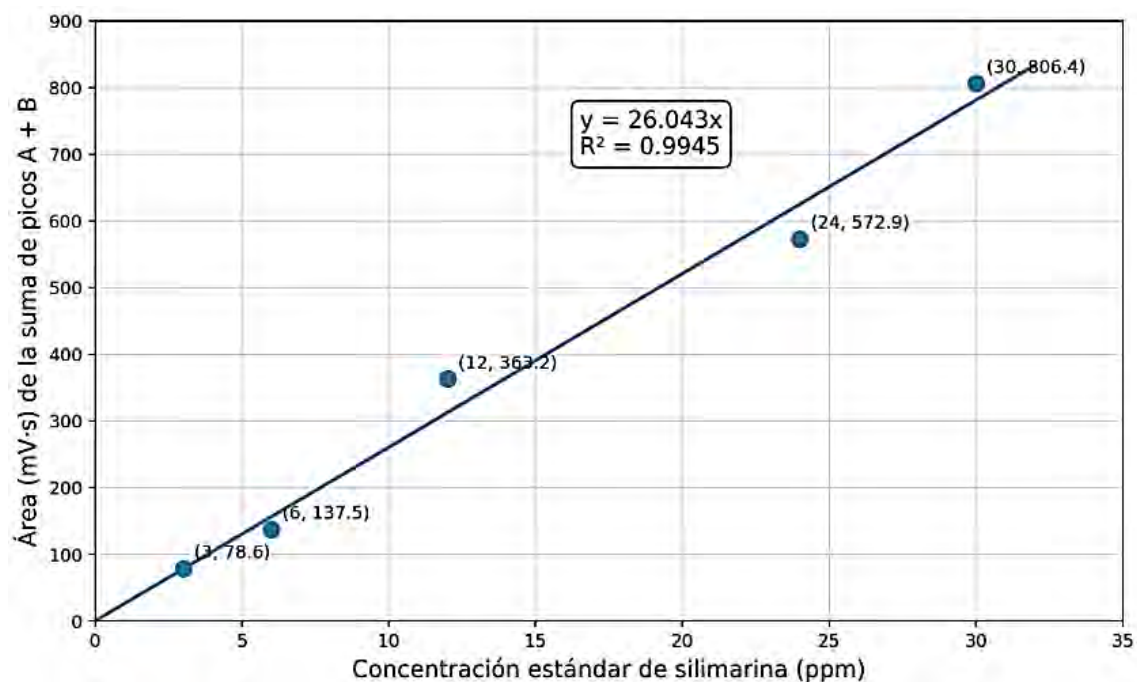
Estándar de silimarina (ppm)	Tiempo de retención (min)	Área ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) Pico 5 Silibina A	Tiempo de retención (min)	Área ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) Pico 6 Silibina B	Área ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) A+B	Área total ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$)
3	7.100	50.445	7.267	28.169	78.6	136.1
6	7.083	88.139	7.267	49.320	137.5	205.6
12	7.083	199.786	7.267	163.397	363.2	567.2
24	7.050	373.249	7.267	199.676	572.9	862.1
30	7.100	506.597	7.283	299.780	806.4	1195.4

En la tabla 35 de estándar de silimarina, se muestra los tiempos de retención: para la Silibina A se establece a 7.083 ± 0.020 min, para la silibina B se establece en 7.270 ± 0.007 s, la separación A-B de 0.187 min (11.2s), es consistente, sugiriendo robustez en la fase móvil/condiciones de gradiente. No se observan corrimientos sistemáticos con la concentración, con buen indicio de ausencia de sobrecarga.

La linealidad en las concentraciones de 3-30ppm en el caso de silibina A (pendiente 16.356 mV s^{-1}) tiene un R^2 de 0.9950, con excelente linealidad, en el caso de Silibina B (pendiente 9.686 mV s^{-1}) tiene un R^2 de 0.9308, la suma A+B, pasando por el origen tiene un R^2 de 0.9933, encontrándose linealmente en el rango.

Figura 53

Curva de Calibración HPLC-DAD con estándares Silimarina (30% Silibina) de 3, 6, 12, 24 y 30 ppm a (287nm)



Estándar de silimarina (30% silibina) ppm	Area mV.s ⁻¹ (A+B)
3	78.6
6	137.5
12	363.2
24	572.9
30	806.4

Ecuación de calibración, para el cálculo de % (p/p) de silimarina en semillas de *Silybum marianum* L. en tres gradientes altitudinales del Cusco.

$$y = 26.034 x$$

Donde: y = representa la absorbancia
x = concentración en ppm.

El coeficiente de determinación R^2 de 0.995, determina buena linealidad (≥ 0.995 , recomendado) la regresión engloba dos décadas de la concentración. La curva de calibración ofrece una sensibilidad adecuada y una linealidad satisfactoria para cuantificar silimarina a un intervalo de 0 a 30 ppm.

Tabla 36

Porcentaje (p/p) de silimarina por HPLC – DAD, en semillas de Silybum marianum L. en tres gradientes altitudinales del Cusco

Muestra	Gradiente Altitudinal (m.s.n.m.)	Tipo de semilla	Señal (mV·s ⁻¹)	% (p/p) en semilla	ppm (w/w)
M9	Huaccoto K'ayra (3 207 m)	Fértil	672	0.862	8616.9
M10	Huaccoto K'ayra (3 207 m)	Infértil	876	1.120	11201.8
M11	Terminal Huancaro (3 402 m)	Fértil	716	0.917	9172.5
M12	Terminal Huancaro (3 402 m)	Infértil	622	0.794	7941.2
M13	Fortaleza Sacsayhuaman (3 625 m)	Fértil	591	0.757	7571.9
M14	Fortaleza Sacsayhuaman (3 625 m)	Infértil	519	0.662	6621.2

Tabla 37

Media del % p/p de silimarina por gradiente altitudinal

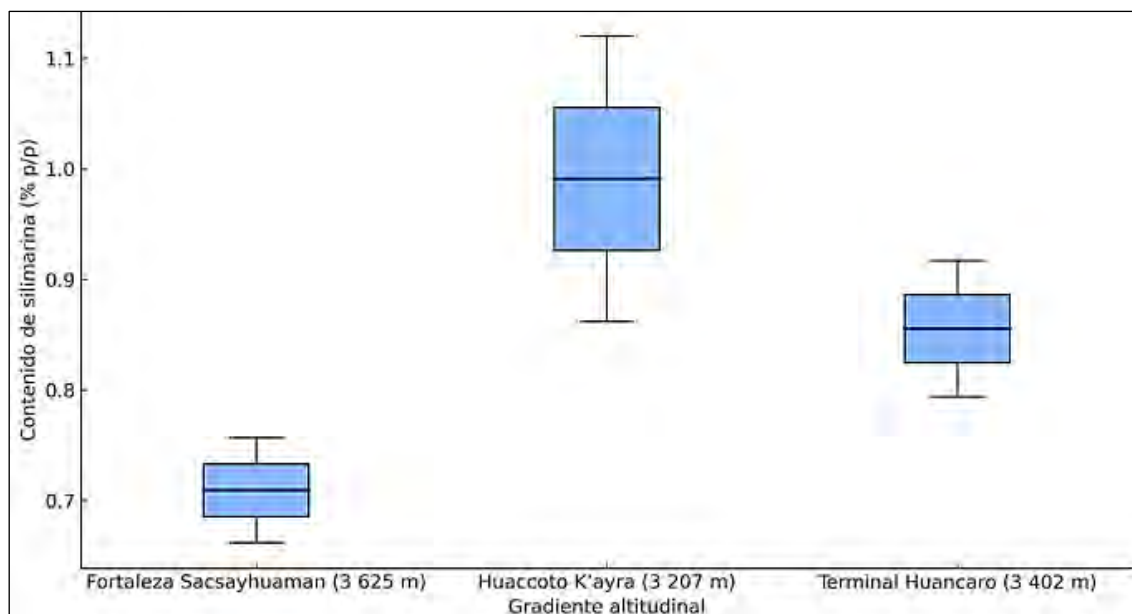
Gradiente altitudinal	Media (% p/p)
Huaccoto K'ayra (3207 m)	0.991
Terminal Huancaro (3402 m)	0.856
Fortaleza Sacsayhuamán (3625 m)	0.710

El porcentaje de silimarina determinada en las semillas varía entre 0.662 – 1.120% (p/p) en los tres gradientes altitudinales, En Huaccoto K'ayra la media alcanzó a 0.991, en Terminal Huancaro a 0.856 y en la comunidad Fortaleza de Sacsayhuaman a 0.710% (p/p). Existe un descenso monotónico del contenido de silimarina al aumentar la altitud de 3207 a 3625 m.

Respecto al contenido de silimarina en semillas fértiles e infértiles analizadas, en Huaccoto se muestra mayor porcentaje en las semillas infértiles (1.120%) que en las fértiles (0.862%), en Huancaro mayor porcentaje en fértiles (0.917%) que infértiles (0.794%) al igual que en la Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman las fértiles presentan mayor porcentaje (0.757%) que las infértiles (0.662%). En Huaccoto K'ayra existe mayor dispersión (rango de 0.258%), en Huancaro (rango de 0.123%) y en Fortaleza Sacsayhuaman (rango de 0.095%) es más homogéneo.

Figura 54

*Variación del contenido promedio de silimarina (%p/p) en semillas de *Silybum marianum* L. colectadas en tres gradientes altitudinales del Cusco*



El diagrama de cajas muestra que el contenido promedio de silimarina disminuye con la altitud, siendo mayor en Huaccoto K'ayra (3207 m) y menor en Fortaleza Sacsayhuaman (3625 m). Los valores intermedios de Terminal Huancaro indican una tendencia negativa altitud contenido, coherente con el efecto de condiciones más frías y radiación elevada a mayor altitud sobre la biosíntesis de flavonolignanos. La dispersión es mayor en Huaccoto, sugiriendo mayor variabilidad intrapoblacional en este sitio. Podría ser que el gradiente de 3207 m ofrece un balance óptimo entre radiación y tempera, para la biosíntesis, a 3625 m, la caída sugiere que el estrés supera los beneficios de la radiación. Las diferencias entre los tres gradientes y entre semillas fértiles e infértiles son esperables por el ecotipo, ambiente y postcosecha, este hecho fue describió Fallah Huseini et al., (2008).

Los resultados de la cuantificación de silimarina en % p/p en semilla de silimarina fue de 0.662 – 1.120 (6621.2 -11201.8 ppm), se encuentra dentro del rango descrito para poblaciones silvestres / semi silvestres de (0.2-1.6%). (Bijak, 2017). El contenido de silimarina entre las poblaciones silvestres en Grecia oscilan entre 2.31 y 7.71% (Arampatzis et al., 2019).

El mayor contenido se concentra en semillas negras y marrones de Huaccoto – K'ayra (3207 m) indicando mayor grado de madurez y lignificación, favoreciendo la acumulación de flavonolignanos que coincide con AbouZid et al. (2016).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Liava et al. (2021; y Karkanis et al. (2011) quienes observaron que factores ambientales tales como la radiación UV, la baja disponibilidad hídrica, la calidad del suelo y el estrés oxidativo asociados a mayores altitudes estimulan la síntesis de flavonoides y flavonolignanos en *Silybum marianum* L. La biosíntesis de silimarina está fuertemente regulada por condiciones de estrés ambiental, dado su rol antioxidante y protector frente al daño oxidativo, (Pan et al., 2023) además de la altitud, factores climáticos anuales (precipitaciones, temperatura, radiación, solar), influyen en la acumulación de metabolitos, esto es consistente con Elateeq et al. (2020), quienes destacan que la síntesis de silimarina depende tanto de factores genéticos como de condiciones edafoclimáticas.

AbouZid et al. (2016) encontraron en poblaciones del norte-centro-sur de Egipto un rango promedio de 0.58-1.53% p/p de silimarina, dicha variación ligada a región climática sin correlación con el color de fruto. Elateeq et al. (2020) describe que el contenido de silimarina en la materia seca del fruto es mayoritariamente del 2 al 4% y puede superar el 6% en algunos ecotipos. En cultivos de *Silybum* a 1 m en Polonia reporta un promedio de 2.18% p/p con un rango que varía de 1.8-2.6% según fecha de siembra, a condiciones templadas, suelo ligero, % más alto que en Cusco, quizá por menor estrés térmico y radiación. (Andrzejewska, 2008). Habán et al. (2009), en semillas silvestres de Europa Central encontró 0.20-0.60% p/p, valores bajos semejantes a los encontrados en Terminal Huancaro y fortaleza de Sacsayhuaman, atribuidos a estrés edáfico y térmico en altura. (Khan et al., 2022).

4.2. Prueba de hipótesis

4.2.1. Hipótesis específica H₁

Existe diferencias fenotípicas significativas entre las poblaciones de *Silybum marianum* L. en los tres gradientes altitudinales.

Tabla 38
ANOVA de diferencias fenotípicas Vs Gradiente altitudinal

ANOVA		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática F		Sig.
Altura de planta	Entre grupos	9701,453	2	4850,727	0,866	0,423
	Dentro de grupos	822978,920	147	5598,496		
	Total	832680,373	149			
Nº De Ramas	Entre grupos	,480	2	0,240	0,420	0,658
	Dentro de grupos	83,980	147	0,571		
	Total	84,460	149			
Largo de hoja	Entre grupos	37,453	2	18,727	5,953	0,003
	Dentro de grupos	462,420	147	3,146		
	Total	499,873	149			
Nº de capítulos	Entre grupos	,333	2	0,167	0,480	0,620
	Dentro de grupos	51,000	147	0,347		
	Total	51,333	149			

P<0.05

Tabla 39*Comparaciones múltiples de patrones fenotípicos Vs Gradiente Altitudinal*

Comparaciones múltiples							
HSD Tukey							
Variable dependiente	(I) Sitio	(J) Sitio	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Altura de la planta	K'ayra Huaccoto	Terminal Huancaro	17,06000	14,96462	0,491	-18,3716	52,4916
		Fortaleza Sacsayhuaman	0,00000	14,96462	1,000	-35,4316	35,4316
	Terminal Huancaro	K'ayra Huaccoto	-17,06000	14,96462	0,491	-52,4916	18,3716
		Fortaleza Sacsayhuaman	-17,06000	14,96462	0,491	-52,4916	18,3716
	Fortaleza Sacsayhuaman	K'ayra Huaccoto	0,00000	14,96462	1,000	-35,4316	35,4316
		Terminal Huancaro	17,06000	14,96462	0,491	-18,3716	52,4916
N° de Ramas	K'ayra Huaccoto	Terminal Huancaro	-0,12000	0,15117	0,707	-0,4779	0,2379
		Fortaleza Sacsayhuaman	0,00000	0,15117	1,000	-0,3579	0,3579
	Terminal Huancaro	HUACCOTO	0,12000	0,15117	0,707	-0,2379	0,4779
		Fortaleza Sacsayhuaman	0,12000	0,15117	0,707	-0,2379	0,4779
	Fortaleza Sacsayhuaman	H K'ayra Huaccoto	0,00000	0,15117	1,000	-0,3579	0,3579
		Terminal Huancaro	-0,12000	0,15117	0,707	-0,4779	0,2379
Largo de Hoja	Huaccoto	Terminal Huancaro	1,06000*	0,35472	0,009	0,2201	1,8999
		Fortaleza Sacsayhuaman	0,00000	0,35472	1,000	-0,8399	0,8399
	Terminal Huancaro	K'ayra Huaccoto	-1,06000*	0,35472	0,009	-1,8999	-0,2201
		Fortaleza Sacsayhuaman	-1,06000*	0,35472	0,009	-1,8999	-0,2201
	Fortaleza Sacsayhuaman	K'ayra Huaccoto	0,00000	0,35472	1,000	-0,8399	0,8399
		Terminal Huancaro	1,06000*	0,35472	0,009	0,2201	1,8999
N° de capítulos	K'ayra Huaccoto	Terminal Huancaro	0,10000	0,11780	0,673	-0,1789	0,3789
		Fortaleza Sacsayhuaman	0,00000	0,11780	1,000	-0,2789	0,2789
	Terminal Huancaro	K'ayra Huaccoto	-0,10000	0,11780	0,673	-0,3789	0,1789
		Fortaleza Sacsayhuaman	-0,10000	0,11780	0,673	-0,3789	0,1789
	Fortaleza Sacsayhuaman	K'ayra Huaccoto	0,00000	0,11780	1,000	-0,2789	0,2789
		Terminal Huancaro	0,10000	0,11780	0,673	-0,1789	0,3789

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

El Análisis de varianza (ANOVA) evaluó el efecto del gradiente altitudinal sobre los patrones fenotípicos de *Silybum marianum* L. mostrando que la altura de la planta, el número de ramas y el número de capítulos no presentaron diferencias significativas entre los sitios (Altura de la planta: $F = 0,866$, $p = 0,423$; N° de ramas: $F = 0,420$, $p = 0,658$; N° de capítulos: $F = 0,480$, $p = 0,620$), indicando que estos caracteres no se ven significativamente afectados por el gradiente altitudinal. Sin embargo, el largo de hoja

presenta diferencias significativas ($F = 5,953$, $p = 0,003$), sugiriendo que este carácter morfológico sí es influenciado por la ubicación de las plantas. Para identificar específicamente sobre el gradiente altitudinal se aplicó la prueba de Tukey HSD, los resultados indicaron que las hojas en Huaccoto K'ayra difirieron significativamente de Terminal Huancaro ($p = 0,009$) y Terminal Huancaro difirió significativamente de Fortaleza Sacsayhuamán ($p = 0,009$), mientras que no hubo diferencias significativas entre Huaccoto K'ayra y Fortaleza Sacsayhuamán ($p = 1,000$). Estos datos sugieren que el gradiente altitudinal de muestreo tiene efecto significativo únicamente sobre el largo de hoja, mientras que la altura de planta, número de ramas y número de capítulos se mantienen relativamente constantes. Estos resultados sugieren que ciertos caracteres morfológicos son más sensibles a las condiciones ambientales locales, como la disponibilidad de nutrientes o el mismo gradiente altitudinal, mientras que otros caracteres presentan mayor estabilidad genética o adaptativa.

4.2.2. Hipótesis específica H₂

El cariotipo de *Silybum marianum* L., presenta variaciones citogenéticas asociadas a la altitud.

Tabla 40*ANOVA de Cariotipo Vs variaciones citogenéticas asociadas a la altitud*

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Brazo largo (q) μm	Entre grupos	383,737	2	191,869	1,005	0,374
	Dentro de grupos	9162,414	48	190,884		
	Total	9546,151	50			
Brazo corto (p) μm	Entre grupos	3457,756	2	1728,878	3,408	0,041
	Dentro de grupos	24353,234	48	507,359		
	Total	27810,990	50			
p+q (μm)	Entre grupos	0,010	2	0,005	0,017	0,983
	Dentro de grupos	13,392	48	0,279		
	Total	13,402	50			
RB(q/p)	Entre grupos	0,018	2	0,009	0,026	0,974
	Dentro de grupos	16,718	48	0,348		
	Total	16,736	50			
LR%	Entre grupos	0,000	2	0,000	0,000	1,000
	Dentro de grupos	104,215	48	2,171		
	Total	104,215	50			
AR (p/q)	Entre grupos	0,001	2	0,000	0,022	0,978
	Dentro de grupos	0,936	48	0,019		
	Total	0,937	50			
IC (%)	Entre grupos	1,566	2	0,783	0,022	0,978
	Dentro de grupos	1673,030	48	34,855		
	Total	1674,596	50			

P<0.05

Tabla 41*Comparaciones múltiples de cariotipo vs variaciones citogenéticas asociadas a la altitud*

Comparaciones múltiples							
HSD Tukey							
Variable dependiente	(I) Altitud	(J) Altitud	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Brazo largo (q) μm	3207	3402	-0,02471	4,73887	1,000	-11,4856	11,4362
		3625	-5,83118	4,73887	0,441	-17,2921	5,6297
	3402	3207	0,02471	4,73887	1,000	-11,4362	11,4856
		3625	-5,80647	4,73887	0,444	-17,2674	5,6544
	3625	3207	5,83118	4,73887	0,441	-5,6297	17,2921
		3402	5,80647	4,73887	0,444	-5,6544	17,2674
Brazo corto (p) μm	3207	3402	-0,00718	7,72589	1,000	-18,6921	18,6778
		3625	-17,47059	7,72589	0,071	-36,1555	1,2144
	3402	3207	0,00718	7,72589	1,000	-18,6778	18,6921
		3625	-17,46341	7,72589	0,071	-36,1484	1,2215
	3625	3207	17,47059	7,72589	0,071	-1,2144	36,1555
		3402	17,46341	7,72589	0,071	-1,2215	36,1484
p+q (μm)	3207	3402	-0,03235	0,18117	0,983	-0,4705	0,4058
		3625	-0,00882	0,18117	0,999	-0,4470	0,4293
	3402	3207	0,03235	0,18117	0,983	-0,4058	0,4705
		3625	0,02353	0,18117	0,991	-0,4146	0,4617
	3625	3207	0,00882	0,18117	0,999	-0,4293	0,4470
		3402	-0,02353	0,18117	0,991	-0,4617	0,4146
RB(q/p)	3207	3402	-0,04235	0,20242	0,976	-0,5319	0,4472
		3625	-0,00529	0,20242	1,000	-0,4948	0,4843
	3402	3207	0,04235	0,20242	0,976	-0,4472	0,5319
		3625	0,03706	0,20242	0,982	-0,4525	0,5266
	3625	3207	0,00529	0,20242	1,000	-0,4843	0,4948
		3402	-0,03706	0,20242	0,982	-0,5266	0,4525
LR%	3207	3402	0,00235	0,50540	1,000	-1,2200	1,2247
		3625	0,00412	0,50540	1,000	-1,2182	1,2264
	3402	3207	-0,00235	0,50540	1,000	-1,2247	1,2200
		3625	0,00176	0,50540	1,000	-1,2205	1,2241
	3625	3207	-0,00412	0,50540	1,000	-1,2264	1,2182
		3402	-0,00176	0,50540	1,000	-1,2241	1,2205
AR (p/q)	3207	3402	0,01000	0,04789	0,976	-0,1058	0,1258
		3625	0,00353	0,04789	0,997	-0,1123	0,1194
	3402	3207	-0,01000	0,04789	0,976	-0,1258	0,1058
		3625	-0,00647	0,04789	0,990	-0,1223	0,1094
	3625	3207	-0,00353	0,04789	0,997	-0,1194	0,1123

		3402	0,00647	0,04789	0,990	-0,1094	0,1223
IC (%)	3207	3402	0,41647	2,02498	0,977	-4,4809	5,3139
		3625	0,11824	2,02498	0,998	-4,7792	5,0156
	3402	3207	-0,41647	2,02498	0,977	-5,3139	4,4809
		3625	-0,29824	2,02498	0,988	-5,1956	4,5992
	3625	3207	-0,11824	2,02498	0,998	-5,0156	4,7792
		3402	0,29824	2,02498	0,988	-4,5992	5,1956

P<0.05

El efecto de la altitud sobre diferentes caracteres citogenéticos mediante comparaciones múltiples con el método HDS de Tukey, indicaron que ninguno de los caracteres citogenéticos medidos (brazo largo q, brazo corto p, p+q, índice de relación RB q/p, porcentaje de longitud relativa LR%, índice AR p/q e índice centromérico IC%) mostró diferencias significativas entre las altitudes analizadas. Para el brazo largo (q) y brazo corto (p), las diferencias de medias entre las altitudes de 3207 m, 3402 m y 3625 m fueron no significativas ($p = 0,441-1,000$ para q; $p = 0,071-1,000$ para p), lo que indica estabilidad en la longitud de los brazos cromosómicos frente a cambios altitudinales.

El tamaño total del cromosoma (p+q) también mostró diferencias no significativas entre altitudes ($p = 0,983-0,999$). Los índices RB (q/p) y AR (p/q), así como LR% e IC (%), presentaron valores de $p > 0,95$ en todas las comparaciones, confirmando que la proporción y la posición del centrómero son consistentes entre las distintas altitudes.

En conjunto, estos resultados sugieren que los caracteres citogenéticos evaluados son estables y no se ven afectados significativamente por los gradientes altitudinales, indicando que la variabilidad cromosómica de *Silybum marianum* L. es independiente del gradiente altitudinal estudiado. Esta estabilidad podría reflejar un control genético fuerte sobre la morfología cromosómica, con poca influencia de factores ambientales asociados a la altura.

4.2.3. Hipótesis específica H₃

El contenido de silimarina en las semillas de *Silybum marianum* L., varía significativamente en función de la altitud.

Tabla 42

Comparaciones múltiples del contenido de silimarina en las semillas de Silybum marianum L. Vs. altitud

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: CONCENTRACIÓN (ppm)						
HSD Tukey						
(I) ALTITUD	(J) ALTITUD	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
3207	3402	2,22200	5,20221	0,905	-11,6568	16,1008
	3625	-1,41800	5,20221	0,960	-15,2968	12,4608
3402	3207	-2,22200	5,20221	0,905	-16,1008	11,6568
	3625	-3,64000	5,20221	0,768	-17,5188	10,2388
3625	3207	1,41800	5,20221	0,960	-12,4608	15,2968
	3402	3,64000	5,20221	0,768	-10,2388	17,5188

Los resultados muestran que la concentración de silimarina no es significativamente diferente entre altitudes (3207, 3402 y 3625 m). Según Tendencias observadas, la altitud de 3207 m tiende a presentar ligeramente mayor concentración de silimarina que 3402 y 3625 m. Esta tendencia podría relacionarse con condiciones ambientales (temperatura, radiación UV, oxígeno) que afectan la biosíntesis de compuestos secundarios en plantas.

La ausencia de diferencias significativas sugiere que, dentro del rango de altitudes estudiadas, la biosíntesis de silimarina es relativamente estable, lo que puede indicar adaptaciones fisiológicas de la planta a distintas altitudes. Sin embargo, la tendencia de 3207 m podría ser relevante en estudios de ecología química, especialmente si se correlaciona con otros factores ambientales (suelo, humedad, exposición solar).

Tabla 43

Comparaciones múltiples del contenido de silimarina en semillas de Silybum marianum L. Vs. muestra

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: CONCENTRACIÓN (ppm)						
HSD Tukey						
(I) MUESTRA	(J) MUESTRA	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
M9	M11	2,22200	5,20221	0,905	-11,6568	16,1008
	M13	-1,41800	5,20221	0,960	-15,2968	12,4608
M11	M9	-2,22200	5,20221	0,905	-16,1008	11,6568
	M13	-3,64000	5,20221	0,768	-17,5188	10,2388
M13	M9	1,41800	5,20221	0,960	-12,4608	15,2968
	M11	3,64000	5,20221	0,768	-10,2388	17,5188

Las comparaciones múltiples de las concentraciones de silimarina en Huaccoto K'ayra (M9), Terminal Terrestre (M11) y Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman M13 no son significativas, pero reflejan ligeras diferencias. Esto puede deberse a la edad de la planta, tamaño de los órganos vegetativos muestreados o diferencias genéticas menores.

Para un análisis más profundo se podría incluir el peso fresco o seco de la planta, así como la relación entre biomasa y concentración de silimarina.

Tabla 44

Comparaciones múltiples del contenido de silimarina en las semillas de Silybum marianum L. Vs. Compuesto identificado

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: CONCENTRACIÓN (ppm)						
HSD Tukey						
(I) COMPUESTO O IDENTIFICADO	(J) COMPUESTO IDENTIFICADO	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Silychristin	SilybinA	-0,78000	5,29112	1,000	-18,1935	16,6335
	SilybinB	-0,65333	5,29112	1,000	-18,0668	16,7602
	IsosilybinA	11,50333	5,29112	0,264	-5,9102	28,9168
	IsosilybinB	9,02333	5,29112	0,472	-8,3902	26,4368
SilybinA	Silychristin	0,78000	5,29112	1,000	-16,6335	18,1935
	SilybinB	0,12667	5,29112	1,000	-17,2868	17,5402
	IsosilybinA	12,28333	5,29112	0,215	-5,1302	29,6968
	IsosilybinB	9,80333	5,29112	0,398	-7,6102	27,2168
SilybinB	Silychristin	0,65333	5,29112	1,000	-16,7602	18,0668
	SilybinA	-0,12667	5,29112	1,000	-17,5402	17,2868
	IsosilybinA	12,15667	5,29112	0,222	-5,2568	29,5702
	IsosilybinB	9,67667	5,29112	0,410	-7,7368	27,0902
IsosilybinA	Silychristin	-11,50333	5,29112	0,264	-28,9168	5,9102
	SilybinA	-12,28333	5,29112	0,215	-29,6968	5,1302
	SilybinB	-12,15667	5,29112	0,222	-29,5702	5,2568
	IsosilybinB	-2,48000	5,29112	0,989	-19,8935	14,9335
IsosilybinB	Silychristin	-9,02333	5,29112	0,472	-26,4368	8,3902
	SilybinA	-9,80333	5,29112	0,398	-27,2168	7,6102
	SilybinB	-9,67667	5,29112	0,410	-27,0902	7,7368
	IsosilybinA	2,48000	5,29112	0,989	-14,9335	19,8935

Según los resultados de la tabla 42, se observa que ninguna de las comparaciones de los flavonolignanos de silimarina: Silicristina, Silibina A, Silibina B e Isosilibina A y B es significativa.

Entre las tendencias observadas se observa que Isosilybina A y B, presentan concentraciones ligeramente más altas que Silicristina y Silibina A y B.

Esto sugiere que, aunque los flavonolignanos de silimarina varían en concentración absoluta, la proporción relativa de cada flavonolignano se mantiene estable entre muestras.

4.2.4. Hipótesis específica H4

Se observa una correlación significativa entre los patrones fenotípicos, citogenéticos y el contenido de silimarina en función del gradiente altitudinal.

HUACCOTO K'AYRA (3207 m.s.n.m.)

Tabla 45

Correlaciones de patrones fenotípicos Vs Huaccoto K'ayra (3207 m)

			correlaciones ^a				
			alt. de planta	N° de ramas	Largo de hoja	N° de capítulos	Altitud
Rho de Spearman	Altura de la planta	C.de correlación	1,000	0,457**	0,450**	0,251	.
		Sig. (bilateral)	.	0,001	0,001	0,079	.
		N	50	50	50	50	50
	N° De Ramas	C.de correlación	0,457**	1,000	0,726**	0,772**	.
		Sig. (bilateral)	0,001	.	0,000	0,000	.
		N	50	50	50	50	50
	Largo de Hoja	C.de correlación	0,450**	0,726**	1,000	0,600**	.
		Sig. (bilateral)	0,001	0,000	.	0,000	.
		N	50	50	50	50	50
	N° de capítulos	C.de correlación	0,251	0,772**	0,600**	1,000	.
		Sig. (bilateral)	0,079	0,000	0,000	.	.
		N	50	50	50	50	50
Altitud	C.de correlación	Sig. (bilateral)	.	.	.	.	.
		N	50	50	50	50	50
		Sig. (bilateral)	.	.	.	.	.
	Sitio	C.de correlación	.	.	.	.	.
		Sig. (bilateral)	.	.	.	.	.
		N	50	50	50	50	50

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

a. Sitio = HUACCOTO, ALTITUD = 3207

El análisis de Spearman muestra que la altura de planta se correlaciona positivamente y de forma significativa con N° de ramas (Rho = 0,457; p = 0,001) y largo de hoja (Rho = 0,450; p = 0,001), indicando que plantas más altas tienden a tener más ramas y hojas más largas. La correlación con N° de capítulos no es significativa (Rho = 0,251; p = 0,079). El N° de ramas se correlaciona fuertemente con Largo de Hoja (Rho = 0,726; p < 0,001) y con N° de capítulos (Rho = 0,772; p < 0,001), mientras que Largo de Hoja también se asocia significativamente con N° de capítulos (Rho = 0,600; p < 0,001). No se presentan correlaciones con altitud, ya que estas variables son constantes dentro de este subconjunto.

En Huaccoto K'ayra, las características morfológicas están estrechamente relacionadas entre sí, mostrando que un mayor tamaño de planta coincide con más ramas, hojas más largas y más capítulos, aunque la relación con el número de capítulos es menos fuerte.

TERMINAL HUANCARO (3402 m.s.n.m.)

Tabla 46

Correlaciones de patrones fenotípicos Vs Terminal Huancaro (3402 m)

			Correlaciones ^a					
			Alt. De planta	Nº De Ramas	Largo de Hoja	Nº de capítulos	ALTITUD	Sitio
Rho de Spearman	ALT. De Planta	C. de correlación	1,000	-0,013	0,226	0,267	.	.
		Sig. (bilateral)	.	0,926	0,115	0,061	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
	Nº De Ramas	C. de correlación	-0,013	1,000	0,799**	0,668**	.	.
		Sig. (bilateral)	0,926	.	0,000	0,000	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
	Largo de Hoja	C. de correlación	0,226	0,799**	1,000	0,891**	.	.
		Sig. (bilateral)	0,115	0,000	.	0,000	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
	Nº de capítulos	C. de correlación	0,267	0,668**	0,891**	1,000	.	.
		Sig. (bilateral)	0,061	0,000	0,000	.	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
	ALTITUD	C. de correlación	.	.	.	.	.	.
		Sig. (bilateral)	.	.	.	.	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
	Sitio	C. de correlación	.	.	.	.	.	.
		Sig. (bilateral)	.	.	.	.	.	.
		N	50	50	50	50	50	50

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

a. Sitio = Terminal Huancaro, ALTITUD = 3402

El análisis de Spearman muestra que la altura de la planta no muestra correlación significativa con Nº de ramas ($Rho = -0,013$; $p = 0,926$), largo de hoja ($Rho = 0,226$; $p = 0,115$) ni con Nº de capítulos ($Rho = 0,267$; $p = 0,061$). En cambio, Nº de ramas se correlaciona fuertemente con largo de hoja ($Rho = 0,799$; $p < 0,001$) y con Nº de capítulos ($Rho = 0,668$; $p < 0,001$), largo de hoja también se relaciona fuertemente con Nº de capítulos ($Rho = 0,891$; $p < 0,001$).

En Terminal Huancaro, las características morfológicas están interrelacionadas entre sí (ramas, hojas y capítulos), pero el tamaño total de la planta (Altura de la planta) no muestra asociaciones significativas con las demás variables. Esto podría indicar mayor uniformidad en altura de las plantas o variabilidad independiente de otras características

COMUNIDAD FORTALEZA SACSAYHUAMAN (3625 m.s.n.m.)

Tabla 47

Correlaciones de patrones fenotípicos Vs. Fortaleza Sacsayhuaman (3625 m)

Correlaciones ^a								
			Alt. De planta	Nº DE RAMA S	Largo de Hoja	Nº de capítulo s	ALT ITU D	Siti o
Rho de Spearm an	Alt. De planta	C. de correlación	1,000	0,457**	0,450**	0,251	.	.
		Sig. (bilateral)	.	0,001	0,001	0,079	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
	Nº De Ramas	C. de correlación	0,457**	1,000	0,726**	0,772**	.	.
		Sig. (bilateral)	0,001	.	0,000	0,000	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
	Largo de Hoja	C. de correlación	0,450**	0,726**	1,000	0,600**	.	.
		Sig. (bilateral)	0,001	0,000	.	0,000	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
	Nº de capítulos	C. de correlación	0,251	0,772**	0,600**	1,000	.	.
		Sig. (bilateral)	0,079	0,000	0,000	.	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
	ALTITUD	C. de correlación	.	.	.	.	.	.
		Sig. (bilateral)	.	.	.	.	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
	Sitio	C. de correlación	.	.	.	.	.	.
		Sig. (bilateral)	.	.	.	.	.	.
		N	50	50	50	50	50	50
**. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).								
a. Sitio = Fortaleza Sacsayhuaman, ALTITUD = 3625								

El análisis de Spearman, la altura de la planta se correlaciona positiva y significativamente con N° de ramas (Rho = 0,457; p = 0,001) y Largo de hoja (Rho = 0,450; p = 0,001), mientras que la correlación con N° de capítulos no es significativa (Rho = 0,251; p = 0,079). El N° de ramas se correlaciona fuertemente con largo de hoja (Rho = 0,726; p < 0,001) y con N° de capítulos (Rho = 0,772; p < 0,001), y largo de hoja con N° de capítulos (Rho = 0,600; p < 0,001), al igual que en los otros gradientes la altitud no presenta variación dentro del subconjunto, por lo que no se calculan correlaciones.

En Fortaleza Sacsayhuaman, se mantiene el patrón de Huaccoto: plantas más altas presentan más ramas y hojas más largas, pero la relación con el número de capítulos es débil.

Dentro de los tres gradientes altitudinales se muestran relaciones fuertes y consistentes entre el número de ramas y largo de hojas, número de ramas y número de capítulos, largo de hojas y número de capítulos. En la altura de la planta se muestra significativo en Huaccoto K'ayra y Fortaleza Sacsayhuaman con ramas y hojas, y no significativo en Terminal Huancaro. Respecto al número de capítulos, existe una correlación más débil con altura de la planta, pero fuerte con el número de hojas y largo de hojas.

Las características morfológicas de las plantas están altamente relacionadas dentro de cada gradiente altitudinal, mientras que la altura total de la planta puede variar según el gradiente, mostrando diferencias locales en su asociación con ramas y hojas.

Tabla 48
Correlaciones citogenéticas

		Correlaciones									
			Sitio	Altitud	Brazo largo (q) μm	Brazo corto (p) μm	p+q (μm)	RB(q/p)	LR%	AR (p/q)	IC (%)
Rho de Spearman	Sitio	C. correlación	1,000	1,000**	0,092	0,072	0,017	0,011	0,010	-0,018	-0,007
		Sig. (bilateral)	.	.	0,520	0,616	0,905	0,941	0,946	0,900	0,964
		N	51	51	51	51	51	51	51	51	51
	Altitud	C. correlación	1,000**	1,000	0,092	0,072	0,017	0,011	0,010	-0,018	-0,007
		Sig. (bilateral)	.	.	0,520	0,616	0,905	0,941	0,946	0,900	0,964
		N	51	51	51	51	51	51	51	51	51
	Brazo largo (q) μm	C. correlación	0,092	0,092	1,000	0,605**	0,838**	-0,563**	0,837**	0,550**	0,0560**
		Sig. (bilateral)	0,520	0,520	.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		N	51	51	51	51	51	51	51	51	51
	Brazo corto (p) μm	C. correlación	0,072	0,072	0,605**	1,000	0,870**	-0,936**	0,873**	0,932**	0,934**
		Sig. (bilateral)	0,616	0,616	0,000	.	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		N	51	51	51	51	51	51	51	51	51
	p+q (μm)	C. correlación	0,017	0,017	0,838**	0,870**	1,000	-0,822**	0,998**	0,818**	0,820**
		Sig. (bilateral)	0,905	0,905	0,000	0,000	.	0,000	0,000	0,000	0,000
		N	51	51	51	51	51	51	51	51	51
	RB(q/p)	C. correlación	0,011	0,011	-0,563**	-0,936**	-0,822**	1,000	-	-0,999**	-1,000**
									0,825**		
		Sig. (bilateral)	0,941	0,941	0,000	0,000	0,000	.	0,000	0,000	0,000
		N	51	51	51	51	51	51	51	51	51
	LR%	C. correlación	0,010	0,010	0,837**	0,873**	0,998**	-0,825**	1,000	0,821**	0,822**
		Sig. (bilateral)	0,946	0,946	0,000	0,000	0,000	0,000	.	0,000	0,000
		N	51	51	51	51	51	51	51	51	51
	AR (p/q)	C. correlación	-0,018	-0,018	0,550**	0,932**	0,818**	-0,999**	0,821**	1,000	0,999**
		Sig. (bilateral)	0,900	0,900	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	.	0,000
		N	51	51	51	51	51	51	51	51	51
	IC (%)	C. correlación	-0,007	-0,007	0,560**	0,934**	0,820**	-1,000**	0,822**	0,999**	1,000
		Sig. (bilateral)	0,964	0,964	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	.
		N	51	51	51	51	51	51	51	51	51

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

El análisis de correlaciones de Spearman muestra que las variables sitio y altitud no presentan correlaciones significativas con ninguna de las características citogenéticas medidas, incluyendo brazo largo (q), brazo corto (p), p+q, RB(q/p), LR%, AR(p/q) e IC% (Rho entre 0,010 y 0,113; $p > 0,5$). Esto indica que la ubicación geográfica y la altitud no influyen de manera detectable en la morfología cromosómica de las plantas estudiadas.

Por otro lado, se observan correlaciones muy fuertes y altamente significativas entre las variables citogenéticas entre sí. El brazo largo (q) y el brazo corto (p) presentan una correlación positiva significativa (Rho = 0,605; $p < 0,01$), lo que sugiere que los cromosomas con brazos largos más extensos tienden a tener también brazos cortos relativamente más largos. La suma de los brazos (p+q) está fuertemente correlacionada con ambos brazos individualmente (q: Rho = 0,838; p: Rho = 0,870; $p < 0,01$), indicando que el tamaño total del cromosoma depende directamente de la longitud de sus brazos.

Las relaciones de brazos y porcentajes relativos muestran patrones esperables: RB(q/p) está fuertemente correlacionada de manera negativa con p, q y p+q (Rho = -0,563 a -0,936; $p < 0,01$), reflejando que a medida que el brazo corto aumenta en proporción al largo, la relación q/p disminuye. De manera similar, AR(p/q) e IC% muestran correlaciones casi perfectas con RB(q/p) y con los tamaños de los brazos, lo que confirma la consistencia interna de las mediciones citogenéticas. Los porcentajes relativos LR% también están altamente correlacionados con la longitud de los brazos y con p+q (Rho = 0,837 a 0,998; $p < 0,01$), indicando que el porcentaje de cada brazo dentro del cromosoma refleja directamente su tamaño absoluto. Mientras que sitio y altitud no afectan las características citogenéticas, existe una fuerte interdependencia entre las mediciones morfológicas de los cromosomas, donde el tamaño de los brazos, la relación entre ellos y los porcentajes relativos están estrechamente conectados. Esto refleja la coherencia morfológica del cariotipo de las plantas, independiente del origen geográfico o altitudinal.

Tabla 49*Correlaciones del contenido de silimarina y gradiente altitudinal*

Correlaciones			Sitio	Altitud	Muestra	Compuesto identificado	Concentración (ppm)
Rho de Spearman	SITIO	Coefficiente de correlación	1,000	1,000**	1,000**	0,000	0,113
		Sig. (bilateral)	.	.	.	1,000	0,687
		N	15	15	15	15	15
	ALTITUD	Coefficiente de correlación	1,000**	1,000	1,000**	0,000	0,113
		Sig. (bilateral)	.	.	.	1,000	0,687
		N	15	15	15	15	15
	MUESTRA	Coefficiente de correlación	1,000**	1,000**	1,000	0,000	0,113
		Sig. (bilateral)	.	.	.	1,000	0,687
		N	15	15	15	15	15
	COMPUESTO IDENTIFICADO	Coefficiente de correlación	0,000	0,000	0,000	1,000	-0,535*
		Sig. (bilateral)	1,000	1,000	1,000	.	0,040
		N	15	15	15	15	15
	CONCENTRACIÓN (ppm)	Coefficiente de correlación	0,113	0,113	0,113	-0,535*	1,000
		Sig. (bilateral)	0,687	0,687	0,687	0,040	.
		N	15	15	15	15	15

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

El análisis de correlaciones muestra que las variables sitio, altitud y muestra están perfectamente correlacionadas entre sí ($Rho = 1,000$; $p < 0,01$), lo que indica que cada sitio corresponde a una altitud y muestra específica; en otras palabras, estos factores geográficos y de muestreo no varían de manera independiente. Por lo tanto, cualquier efecto geográfico sobre la concentración de silimarina no puede separarse entre estos factores.

La concentración de silimarina no presenta correlación significativa con el sitio, la altitud ni la muestra ($Rho = 0,113$; $p = 0,687$), confirmando que estas variables no influyen de manera significativa sobre la cantidad de silimarina en las plantas. Esto concuerda con los resultados previos de comparaciones múltiples y del modelo de estimación de parámetros, que mostraban un promedio general de ~ 17 ppm y una alta variabilidad entre plantas.

En cambio, se observa una correlación negativa significativa entre el compuesto identificado y la concentración de silimarina ($Rho = -0,535$; $p = 0,040$). Esto indica que la variación en los compuestos que componen la silimarina está asociada con cambios en la concentración total: algunos compuestos tienden a presentar concentraciones menores y otros mayores. Aunque la correlación no es extremadamente fuerte, sugiere que la

composición química de la silimarina tiene un efecto parcial sobre la cantidad total de este metabolito secundario en las plantas.

La concentración de silimarina en las plantas estudiadas es relativamente estable frente a factores geográficos y de muestreo, con un promedio aproximado de 17 ppm y alta variabilidad natural. La única influencia estadísticamente significativa sobre la concentración total se relaciona con el tipo de compuesto identificado, lo que resalta la importancia de considerar la composición química en estudios de silimarina.

4.2.5. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio permiten analizar la variabilidad morfológica, citogenética y fitoquímica de *Silybum marianum* L. a lo largo de tres gradientes altitudinales en el Cusco, proporcionando evidencia sobre la estabilidad y plasticidad de diferentes caracteres de la especie.

Variabilidad fenotípica según altitud

La hipótesis H1 planteaba que los rasgos morfológicos de *Silybum marianum* L. variarían entre los sitios y altitudes muestreadas. Los análisis ANOVA indicaron que solo el largo de hoja mostró diferencias significativas entre algunas altitudes, mientras que altura de planta, número de ramas y número de capítulos no presentaron variaciones significativas. Las comparaciones múltiples confirmaron diferencias relevantes entre Huaccoto y Terminal Huancaro, así como entre Terminal Huancaro y Fortaleza Sacsayhuamán. Estos resultados sugieren que ciertos caracteres morfológicos, como el largo de hoja, son sensibles a factores ambientales locales, probablemente relacionados con microclima, disponibilidad de luz y condiciones del suelo, mientras que otros caracteres presentan mayor estabilidad genética.

Este hallazgo es consistente con estudios previos que documentan plasticidad fenotípica en *Silybum marianum* L., frente a gradientes altitudinales y ambientales. Khan et al. (2022) reportaron que el tamaño de la planta y el número de capítulos pueden variar con la altitud, mientras que Martinelli et al. (2015, 2016) y Ram et al. (2005) destacaron la estabilidad de ciertos rasgos morfológicos, con variaciones dependientes principalmente del genotipo y no exclusivamente del entorno. La coincidencia parcial entre nuestros resultados y los de estudios internacionales indica que la respuesta fenotípica a la altitud puede ser específica del sitio y del material genético evaluado.

Variabilidad citogenética según altitud

En relación con la hipótesis H2, los índices cromosómicos evaluados mostraron una marcada estabilidad frente al gradiente altitudinal. Solo el brazo corto (p) presentó un valor cercano a significancia, pero las comparaciones múltiples no detectaron diferencias relevantes. Esto coincide con los estudios de Asghari-Zakaria et al. (2008) y Sarrami et al. (2012), quienes describieron un cariotipo altamente conservado en *S. marianum*, sin poliploidía ni reordenamientos cromosómicos importantes, aunque con ligera variabilidad en la longitud y simetría de los cromosomas. La estabilidad citogenética encontrada en nuestro estudio refuerza la idea de que los caracteres cromosómicos están fuertemente determinados genéticamente y no se modifican significativamente ante cambios altitudinales moderados.

Contenido de silimarina y gradiente altitudinal

Respecto a la hipótesis H3, el análisis de la concentración de silimarina mostró estabilidad entre altitudes, sitios y muestras, aunque se observó una ligera tendencia a mayores contenidos en la altitud más baja y en Huaccoto. Los compuestos Isosilibina A/B mostraron valores marginalmente superiores a Silicristina y Silibina A/B. Estos resultados son coherentes con hallazgos previos que sugieren que, aunque factores ambientales como luz, temperatura y estrés hídrico pueden modular la síntesis de metabolitos secundarios (Pant et al., 2021; Guevara-Terán et al., 2024), la producción de silimarina en *Silybum marianum* L. tiende a mantenerse estable, probablemente debido a mecanismos fisiológicos de homeostasis. Estudios de Abenavoli et al. (2018) y Marceddu et al. (2022) reportan porcentajes de silimarina similares entre ecotipos, lo que coincide con la baja variación observada en nuestros análisis.

Correlaciones entre rasgos fenotípicos, citogenéticos y silimarina

El análisis de correlaciones, hipótesis H4, evidenció que los caracteres morfológicos, especialmente el número de ramas, largo de hoja y número de capítulos, están fuertemente interrelacionados dentro de cada sitio. Sin embargo, no se detectó correlación significativa entre rasgos fenotípicos y citogenéticos ni entre éstos y la concentración de silimarina. Esto sugiere que, aunque la morfología vegetativa puede estar influenciada por factores ambientales locales, la estructura cromosómica y la biosíntesis de metabolitos secundarios son relativamente independientes de estas variaciones morfológicas. Estos patrones concuerdan con los estudios de Giuliani et al.

(2018) y Ram et al. (2005), quienes describen independencia parcial entre la variabilidad genética/cariotípica y la expresión fenotípica o fitoquímica en la especie.

En conjunto, los resultados de este estudio indican que *Silybum marianum* L. presenta una combinación de estabilidad genética y plasticidad ambiental. La longitud de hoja es el rasgo morfológico más sensible a la altitud y al sitio, mientras que otros caracteres fenotípicos y la morfología cromosómica permanecen estables. El contenido de silimarina muestra baja variabilidad frente a cambios altitudinales y de sitio, lo que refleja adaptaciones fisiológicas que aseguran la producción de compuestos bioactivos. Este patrón de respuesta es consistente con antecedentes internacionales y locales, y aporta evidencia adicional sobre la resiliencia y adaptabilidad de *Silybum marianum* L. frente a los gradientes altitudinales.

CONCLUSIONES

- Los patrones fenotípicos de *Silybum marianum* L. Gaertner estudiados en tres gradientes altitudinales (3207, 3402 y 3625 m.s.n.m.), demostró que el largo de hoja y el color de semillas presentan diferencias significativas entre los gradientes altitudinales, la altura de planta, número de ramas y número de capítulos permanecieron estables. Los rasgos morfológicos presentan distinta sensibilidad al ambiente: algunos caracteres muestran plasticidad frente a condiciones locales, mientras que otros están fuertemente controlados genéticamente. Existe interrelación entre los caracteres morfológicos (número de ramas, largo de hoja y número de capítulos), evidenciando patrones consistentes de crecimiento dentro de cada gradiente altitudinal.
- El patrón citogenético encontrado para *Silybum marianum* L. Gaertner en los tres gradientes altitudinales mantuvieron estabilidad como especie diploide con $2n = 2x = 34$ cromosomas. La fórmula cariotípica para Huaccoto K'ayra, y Terminal Huancaro fue de $7m + 9sm + 1st$ y para Fortaleza Sacsayhuaman de $8m + 8sm + 1st$. Se encontró que los índices cromosómicos evaluados son altamente estables y no presentan diferencias significativas ($p > 0.005$) entre altitudes, indicando un fuerte control genético sobre la morfología cromosómica. Se encontró que el brazo corto (p) mostró un valor cercano a significancia, pero las comparaciones múltiples no evidenciaron diferencias reales entre sitios. Por lo tanto, existe consistencia interna entre las variables citogenéticas, lo que sugiere un cariotipo conservado en las poblaciones analizadas.
- El contenido de silimarina a partir de semillas de *Silybum marianum* L. Gaertner determinada por HPLC DAD se encuentra entre 0,662%-1.120% p/p entre 4 a 11 minutos de tiempo de retención, demostrando ser relativamente estable frente a los gradientes altitudinales, sitio y muestra, aunque se observan ligeras tendencias hacia mayores concentraciones en altitudes más bajas (Huaccoto K'ayra 3207 m.s.n.m.). Los flavonolignanos Silibina A y B, presentan valores ligeramente superiores a otros flavonolignanos, reflejando un perfil fitoquímico consistente entre sitios. La estabilidad del contenido de silimarina sugiere adaptaciones fisiológicas de la planta que garantizan la producción de metabolitos secundarios en diferentes condiciones ambientales.

- La correlación entre rasgos fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina, evidenciaron que los caracteres morfológicos están fuertemente interrelacionados dentro de cada sitio, mientras que la altura de planta, los índices cromosómicos y el contenido de silimarina muestran independencia relativa. No se observa correlación directa entre la variabilidad fenotípica, citogenética y fitoquímica, lo que sugiere que cada conjunto de caracteres responde a factores distintos (genéticos o ambientales).

RECOMENDACIONES

- En futuros estudios sobre variabilidad fenotípica, considerar el largo de hoja como un indicador sensible de adaptación ambiental. Asimismo, se debe evaluar el efecto de otros factores ambientales (luz y humedad) sobre la morfología de la planta para comprender mejor la plasticidad de ciertos caracteres y se debe mantener registros detallados de cada sitio para seleccionar genotipos con rasgos morfológicos deseables en programas de cultivo o conservación.
- Se recomienda realizar estudios citogenéticos complementarios con técnicas moleculares (RAPD, SSR, DArT) para confirmar la estabilidad genética y detectar posibles variaciones sutiles. Asimismo, considerar estas poblaciones como material genético estable para programas de mejoramiento y conservación. Evaluar otras especies cercanas o poblaciones de *Silybum marianum* L. en gradientes más amplios de altitud para identificar posibles límites de plasticidad citogenética.
- Se recomienda incorporar estas poblaciones en programas de extracción de silimarina debido a su estabilidad fitoquímica. Explorar la influencia de factores ambientales específicos (luz, temperatura, estrés hídrico) sobre la biosíntesis de flavonolignanos para optimizar su producción. Considerar estudios de madurez de semilla y fenología para determinar el momento óptimo de cosecha y maximizar el contenido de silimarina.
- Fomentar análisis multivariados que integren morfología, genética y metabolitos secundarios para una comprensión más completa de la plasticidad y estabilidad de la especie, pero en muestras más grandes. Priorizar el estudio de correlaciones morfológicas locales para la selección de genotipos con características deseables de crecimiento y rendimiento.
- Considerar la independencia entre citogenética y contenido de silimarina al diseñar estrategias de conservación o mejora de la especie, evitando asumir relación directa entre estos conjuntos de caracteres.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Gil, L., Gismera, M. J., Sevilla, M. T., & Procopio, J. R. (2025). Determination of the Major Bioactive Component of *Silybum marianum* in Nutricosmetics by a HPLC Method With Amperometric Detection and UAE Pretreatment. *Phytochemical Analysis*, 36(4), 934–942. <https://doi.org/10.1002/pca.3478>
- Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A., & Capasso, R. (2018a). Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. In *Phytotherapy Research* (Vol. 32, Issue 11, pp. 2202–2213). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.6171>
- Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A., & Capasso, R. (2018b). Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. In *Phytotherapy Research* (Vol. 32, Issue 11, pp. 2202–2213). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.6171>
- AbouZid, S. (2014). Authentication of *Silybum marianum* Varieties Using RAPD Analysis. In *Plant Tissue Cult. & Biotech* (Vol. 24, Issue 1).
- AbouZid, S., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2016). Silymarin content in *Silybum marianum* populations growing in Egypt. *Industrial Crops and Products*, 83, 729–737. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.012>
- Abrahimpour, F., Khaniki, G. R. B., Ghanavati, M., & Zade, K. E. (2011). Investigation of genetic variation on different populations of *Silybum marianum* L. (Fabaceae) by using cytogenetic parameters. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(19), 4759–4763. <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- Aghemo, A., Alekseeva, O. P., Angelico, F., Bakulin, I. G., Bakulina, N. V., Bordin, D., Bueverov, A. O., Drapkina, O. M., Gillessen, A., Kagarmanova, E. M., Korochanskaya, N. V., Kucheryavii, U. A., Lazebnik, L. B., Livzan, M. A., Maev, I. V., Martynov, A. I., Osipenko, M. F., Sas, E. I., Starodubova, A., ... Yakovlev, A. A. (2022). Role of silymarin as antioxidant in clinical management of chronic liver diseases: a narrative review. In *Annals of Medicine* (Vol. 54, Issue 1, pp. 1548–1560). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2069854>
- Andrzejewska, J. (2008). *Effect of cultivation conditions on the variability and interrelation of yield and raw material quality in milk thistle (Silybum marianum (L.) Gaertn.)*. <https://www.researchgate.net/publication/41560458>
- Aragón & Chusme. (2018). *Ecología Geográfica del Cusco*. <https://www.researchgate.net/publication/327172888>
- Arampatzis, D. A., Karkanis, A. C., & Tsiropoulos, N. G. (2019). Silymarin content and antioxidant activity of seeds of wild *Silybum marianum* populations growing in Greece. *Annals of Applied Biology*, 174(1), 61–73. <https://doi.org/10.1111/aab.12470>
- Ascue Cuba, J. C. (2018). *La vulnerabilidad de ecosistemas frágiles en ciudades altoandinas. Caso: Microcuenca Huancaro, Distrito de Santiago – Cusco y el Desarrollo sostenido urbano marginal*. Universidad Federico Villareal.
- Asghari-Zakaria, R., Panahi, A. R., & Sadeghizadeh, M. (2008). *Comparative Study of Chromosome Morphology in Silybum marianum*. <http://www.colostate>.

- Aziz, M., Saeed, F., Ahmad, N., Ahmad, A., Afzaal, M., Hussain, S., Mohamed, A. A., Alamri, M. S., & Anjum, F. M. (2021). Biochemical profile of milk thistle (*Silybum Marianum* L.) with special reference to silymarin content. In *Food Science and Nutrition* (Vol. 9, Issue 1, pp. 244–250). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1990>
- Biedermann, D., Vavříková, E., Cvak, L., & Křen, V. (2014). Chemistry of silybin. In *Natural Product Reports* (Vol. 31, Issue 9, pp. 1138–1157). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3np70122k>
- Bijak, M. (2017). Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules22111942>
- Bookhagen, B., & Strecker, M. R. (2008). Orographic barriers, high-resolution TRMM rainfall, and relief variations along the eastern Andes. *Geophysical Research Letters*, 35(6). <https://doi.org/10.1029/2007GL032011>
- Brinda, B. J., Zhu, H. J., & Markowitz, J. S. (2012). A sensitive LC-MS/MS assay for the simultaneous analysis of the major active components of silymarin in human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 902, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.06.003>
- Burbano, L., Fernández, E., & Cortés, E. (2011). Determinación de la hora mitótica de *Guadua angustifolia* var. *Grandicaula* (Familia:Gramineae) a partir de meristemas radiculares. *Armenia*, 22, 129–135.
- Cheilari, A., Sturm, S., Intelmann, D., Seger, C., & Stuppner, H. (2016). Head-to-Head Comparison of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection versus Quantitative Nuclear Magnetic Resonance for the Quantitative Analysis of the Silymarin Complex in *Silybum marianum* Fruit Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(7), 1618–1626. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05494>
- Chen, W., Zhao, X., Huang, Z., Luo, S., Zhang, X., Sun, W., Lan, T., & He, R. (2024). Determination of Flavonolignan Compositional Ratios in *Silybum marianum* (Milk Thistle) Extracts Using High-Performance Liquid Chromatography. *Molecules*, 29(13). <https://doi.org/10.3390/molecules29132949>
- Crocenzi, F. A., & Roma, M. G. (2006). Silymarin as a New Hepatoprotective Agent in Experimental Cholestasis: New Possibilities for an Ancient Medication. In *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 13).
- Dhande, D., Dhok, A., Anjankar, A., & Nagpure, S. (2024). Silymarin as an Antioxidant Therapy in Chronic Liver Diseases: A Comprehensive Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.67083>
- Dorđević, S., Janković, T., & Mihailović, M. (2018). The influence of the extraction method on the content of silymarin in *Silybi mariani fructus*. *Research Article Lekovite Sirovine*, 38, 5. <https://doi.org/10.5937/leksir1838005D>
- Dušková, E., Dušek, K., & Smékalová, K. (2016). P 5: A descriptor list of *Silybum marianum* (L.) Gaertner-morphological and biological characters. *Julius-Kühn-Archiv*, 6, 19–23. <https://doi.org/10.5073/jka.2016.453.038>
- Elateeq, A. A., Sun, Y., Nxumalo, W., & Gabr, A. M. M. (2020). Biotechnological production of silymarin in *Silybum marianum* L.: A review. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 29). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101775>

- Elsayed, A. I., El-Hamahmy, M. A. M., Rafudeen, M. S., Mohamed, A. H., & Omar, A. A. (2019). The impact of drought stress on antioxidant responses and accumulation of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). *Plants*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/plants8120611>
- Eskandari Nasrabadi, S., Ghorbani, R., Rezvani Moghaddam, P., & Nassiri Mahallati, M. (2014). Phenological response of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) to different nutrition systems. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1(4), 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2014.10.002>
- Espinoza, J. C., Chavez, S., Ronchail, J., Junquas, C., Takahashi, K., & Lavado, W. (2015). Rainfall hotspots over the southern tropical Andes: Spatial distribution, rainfall intensity, and relations with large-scale atmospheric circulation. *Water Resources Research*, 51(5), 3459–3475. <https://doi.org/10.1002/2014WR016273>
- Fallah Huseini, H., Radjabian, T., Rezazadeh, S. H., & Fallah Huseini, H. (2008). Analysis of silymarin components in the seed extracts of some milk thistle ecotypes from Iran by HPLC “. In *Article in Iranian Journal of Science and Technology. Transaction A* (Vol. 32, Issue A2). <https://www.researchgate.net/publication/260980235>
- Falsini. (2023). *Caryologia*, 2023 (Vol. 76). Firenze University Press.
- Ganj Khanloo. (2021). *Karyotypic analysis of Silybum marianum using multivariate statistical methods*.
- García-Muñoz, A. M., Victoria-Montesinos, D., Ballester, P., Cerdá, B., & Zafrilla, P. (2024). A Descriptive Review of the Antioxidant Effects and Mechanisms of Action of Berberine and Silymarin. In *Molecules* (Vol. 29, Issue 19). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/molecules29194576>
- Garreaud, R. D., & Aceituno, P. (2001). *Interannual Rainfall Variability over the South American Altiplano*.
- Ghassemi-Golezani, K., Raey, Y., Ghassemi Golezani, K., Yaghoobian, I., Raei, Y., & Author, C. (2016). The impact of hydro-priming duration on seed invigoration and field emergence of milk thistle. *Online*, 9(2), 229–234. <http://www.innspub.net>
- Gillessen, A., Angelico, F., Chen, J., Lu, L., Lucena, M. I., Fu, Q., Xie, Q., Andrade, R. J., Xie, W., Xu, X., Yu, Y., Mao, Y. min, & Nan, Y. (2022). Silymarin for Treating Toxic Liver Disease: International Consensus Recommendations. In *Gastro Hep Advances* (Vol. 1, Issue 5, pp. 882–893). American Gastroenterological Association. <https://doi.org/10.1016/j.gastha.2022.05.006>
- Giuliani, C., Tani, C., Maleci Bini, L., Fico, G., Colombo, R., & Martinelli, T. (2018). Localization of phenolic compounds in the fruits of *Silybum marianum* characterized by different silymarin chemotype and altered colour. *Fitoterapia*, 130, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.09.002>
- Guevara-Terán, M., Tejera, E., Vásquez-Castillo, W., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., & Alvarez-Suarez, J. M. (2024). Influence of altitudes and development stages on the chemical composition and antioxidant capacity of Andean blackberries (*Rubus glaucus* Benth). *Frontiers in Nutrition*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1501889>
- Ha, E. S., Han, D. G., Seo, S. W., Kim, J. M., Lee, S. K., Sim, W. Y., Yoon, I. S., & Kim, M. S. (2019). A simple HPLC method for the quantitative determination of silybin in rat plasma:

- Application to a comparative pharmacokinetic study on commercial silymarin products. *Molecules*, 24(11). <https://doi.org/10.3390/molecules24112180>
- Habán, M., Otepka, P., Kobida, L., & Habánová, M. (2009). Production and quality of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic 138ilybum138ion. *Horticultural Science*, 36(2), 69–74. <https://doi.org/10.17221/38/2008-HORTSCI>
- Hassanen, S. A., Diab, M. I., Abd, G., Hegazi, E.-M., Rayan, G., & El-Dis, A. (2021). Silymarin Accumulation in *Silybum marianum* Suspension Culture via Precursor Feeding. In *CATRINA* (Vol. 24, Issue 1).
- Hevia, F., wilckens, R., Berti, M., & Fischer, S. (2007). Calidad de Cardo Mariano (*Silybum marianum* (L.) Gaertn. Cosechado en diferentes estados fenológicos. In *Información Tecnológica* (Vol. 18, Issue 5).
- Hurtado, J., Castañeda, R., & Alban, J. (2021). Asteráceas medicinales en dos comunidades andinas del sur del Perú: Quinoa (Ayacucho) y Lircay (Huancavelica). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 20(4), 351–366. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.4.26>
- INEI. (2021). *Compendio Estadístico, Cusco 2021*.
- Karkanis, A., Bilalis, D., & Efthimiadou, A. (2011). Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. In *Industrial Crops and Products* (Vol. 34, Issue 1, pp. 825–830). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.027>
- Keshavarz Afshar, R., Chaichi, M. R., Ansari Jovini, M., Jahanzad, E., & Hashemi, M. (2015). Accumulation of silymarin in milk thistle seeds under drought stress. *Planta*, 242(3), 539–543. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2265-9>
- Khan, N., Ullah, R., Ali, K., Jones, D. A., & Khan, M. E. H. (2022). Invasive Milk Thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) Causes Habitat Homogenization and Affects the Spatial Distribution of Vegetation in the Semi-Arid Regions of Northern Pakistan. *Agriculture (Switzerland)*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/agriculture12050687>
- Kim, N. C., Graf, T. N., Sparacino, C. M., Wani, M. C., & Wall, M. E. (2003). Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Organic and Biomolecular Chemistry*, 1(10), 1684–1689. <https://doi.org/10.1039/b300099k>
- Kishore, K. (2017). Phenological growth stages of Indian gooseberry (*Phyllanthus emblica* L.) according to the extended BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 225, 607–614. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.004>
- Körner, C. (2007). The use of “altitude” in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(11), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.006>
- Kvasnička, F., Bíba, B., Ševčík, R., Voldřich, M., & Krátká, J. (2003). Analysis of the active components of silymarin. *Journal of Chromatography A*, 990(1–2), 239–245. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01971-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01971-4)
- Liang, L. (2019). Phenology. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11739-7>
- Liava, V., Karkanis, A., & Tsiropoulos, N. (2021). Yield and silymarin content in milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) fruits affected by the nitrogen fertilizers. *Industrial Crops and Products*, 171. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113955>

- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., & Yin, H. (2021). The flavonoid biosynthesis network in plants. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>
- Loayza, L. (2022). *Evaluación del proyecto de gestión ambiental e infraestructura -PROGAISH en la microcuenca Huancaro Santiago, Subcuenca del Río Huatanya-Cusco*.
- Lv, Y., Gao, S., Xu, S., Du, G., Zhou, J., & Chen, J. (2017). Spatial organization of silybin biosynthesis in milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn]. *Plant Journal*, 92(6), 995–1004. <https://doi.org/10.1111/tpj.13736>
- Makouie, S., Bryś, J., Małajowicz, J., Koczoń, P., Siol, M., Palani, B. K., Bryś, A., Obranović, M., Mikolčević, S., & Gruczyńska-Sękowska, E. (2024). A Comprehensive Review of Silymarin Extraction and Liposomal Encapsulation Techniques for Potential Applications in Food. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 14, Issue 18). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/app14188477>
- Marceddu, R., Dinolfo, L., Carrubba, A., Sarno, M., & Di Miceli, G. (2022). Milk Thistle (*Silybum Marianum* L.) as a Novel Multipurpose Crop for Agriculture in Marginal Environments: A Review. In *Agronomy* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030729>
- Marcela. L, Uribe, M., & Marulanda M. (2010). Estandarización de la técnica citogenética “Squash” para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. In *Scientia et Technica Año XVII* (Vol. 46).
- Mardani-Nafchi, H., Heidari-Soureshjani, S., & Rostamian, S. (2025). A systematic review of silymarin and silibinin mechanisms for attenuating cerebral ischemia-reperfusion injuries. *Avicenna J Phytomed*, 14(4), 1279–1297. <https://doi.org/10.22038/ajp>
- Marmouzi, I., Bouyahya, A., Ezzat, S. M., El Jemli, M., & Kharbach, M. (2021). The food plant *Silybum marianum* (L.) Gaertn.: Phytochemistry, Ethnopharmacology and clinical evidence. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 265). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113303>
- Martinelli, T., Andrzejewska, J., Salis, M., & Sulas, L. (2015). Phenological growth stages of *Silybum marianum* according to the extended BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 166(1), 53–66. <https://doi.org/10.1111/aab.12163>
- Martinelli, T., Fulvio, F., Pietrella, M., Bassolino, L., & Paris, R. (2023). *Silybum marianum* chemotype differentiation is genetically determined by factors involved in silydianin biosynthesis. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 32, 100442. <https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2022.100442>
- Martinelli, T., Potenza, E., Moschella, A., Zaccheria, F., Benedettelli, S., & Andrzejewska, J. (2016). Phenotypic evaluation of a milk thistle germplasm collection: Fruit morphology and chemical composition. *Crop Science*, 56(6), 3160–3172. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.03.0162>
- Martinelli, T., Whittaker, A., Benedettelli, S., Carboni, A., & Andrzejewska, J. (2017). The study of flavonolignan association patterns in fruits of diverging *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Chemotypes provides new insights into the silymarin biosynthetic pathway. *Phytochemistry*, 144, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.08.013>

- Meier. (2001). *B BCH Monografía*.
- MINAM. (2014). *Guía para Muestreo de Suelos*.
- Moin, M. A., N, P. C., B, D. J., & A, P. J. (2010). Validated method for Silymarin by Spectrophotometry in Bulk drug and Pharmaceutical formulations. *J. Chem. Pharm. Res*, 2(1), 396–400.
- Moscoso, C. (2023). *Un 140ilybu botánico para Cusco “Estructuras geodésicas en zonas andinas.”*
- MPC. (2013). *Plan de Desarrollo Urbano Cusco al 2023*.
- Pan, L., Yang, N., Sui, Y., Li, Y., Zhao, W., Zhang, L., Mu, L., & Tang, Z. (2023). Altitudinal Variation on Metabolites, Elements, and Antioxidant Activities of Medicinal Plant Asarum. *Metabolites*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/metabo13121193>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. In *Journal of Nutritional Science* (Vol. 5). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pant, P., Pandey, S., & Dall’Acqua, S. (2021). The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants: A Literature Review. In *Chemistry and Biodiversity* (Vol. 18, Issue 11). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100345>
- Petrásková, L., Káňová, K., Biedermann, D., Kren, V., & Valentová, K. (2020). Simple and rapid HPLC separation and quantification of flavonoid, flavonolignans, and 2,3-dehydroflavonolignans in silymarin. *Foods*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/foods9020116>
- Porwal, O., Mohammed Ameen, M. S., Anwer, E. T., Uthirapathy, S., Ahamad, J., & Tahsin, A. (2019). Silybum marianum (Milk Thistle): Review on Its chemistry, morphology, ethno medical uses, phytochemistry and pharmacological activities. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(5), 199–206. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i5.3666>
- Puglisi, D., Pasquariello, M., Martinelli, T., Paris, R., De Vita, P., Pecchioni, N., Esposito, S., & Bassolino, L. (2024). Genetic diversity of a Silybum marianum (L.) Gaertn. Germplasm collection revealed by DNA Diversity Array Technology (Dartseq). *PloS ONE*, 19(8 August). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0308368>
- Rahman, N., Najmul, S., Azmi, H., Sur Rahman, N., & Ahmad, Y. (2004). *Kinetic spectrophotometric method for the determination of silymarin in pharmaceutical formulations using potassium permanganate as oxidant Optimized and Validated Kinetic Spectrophotometric Method for the Determination of Silymarin in Drug formulations*. <https://www.researchgate.net/publication/8676309>
- Ram, G., Bhan, M. K., Gupta, K. K., Thaker, B., Jamwal, U., & Pal, S. (2005). Variability pattern and correlation studies in Silybum marianum Gaertn. *Fitoterapia*, 76(2), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.10.006>
- Rondón, H. B., Rache, L. C., & Pacheco, J. M. (2013). Cariotipo de Espeletiopsis muiska Karyotype of Espeletiopsis muiska. *Revista MVZ Córdoba*, 18, 3868–3876.
- Saiyyad, I. M., Bhambere, D. S., & Kshirsagar, S. (2017). Formulation and Optimization of Silymarin Loaded PLGA Nanoparticle for liver targeting. *Asian J. Pharm. Tech*, 7(4). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35383.16809>

- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., & Villanueva-Cañongo, C. (2019). Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. In *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83815>
- Sarrami, M., Zeinali, H., & Bakhshi Khaniki, G. (2012). Population diversity and analysis of cytogenetic affinities between different *Silybum marianum* L. populations from Iran. *Nucleus (India)*, 55(3), 155–161. <https://doi.org/10.1007/s13237-012-0071-3>
- Sayyad, M., Sutar, A. D., Shivhare, K., Shukla, R., & Flora, S. J. S. (2025). Silymarin as a phytopharmaceutical agent: advances in mechanistic insights, formulation strategies, and pre-clinical applications. *Frontiers in Pharmacology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1711653>
- SENAMHI. (2019). *Zonas de vida de Holdridge 2017*.
- SENAMHI. (2025). *SENAMHI – Datos Meteorológicos*. <https://www.senamhi.gob.pe/site/descarga-datos/>
- Severin, N. (2013). *Fast Analysis of Silymarins in Milk Thistle Using the Agilent 1290 Infinity LC System and an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 1.8 µm Column Author*.
- Sharma, R. (2023). *Silybum Marianum (Asteraceae): An Addition To The Weed Flora of Delhi, India*. *Journal of Economic and Taxonomic Botany*, 47(1), 38–41. <https://doi.org/10.61080/jetb/v47/i1/2023/38-41>
- Shim, J., Hong, S. Y., Han, J. H., Yu, Y., Yoo, E., Sung, J., Chin, J. H., & Lee, O. N. (2023). A Genomic Evaluation of Six Selected Inbred Lines of the Naturalized Plants of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) in Korea. *Plants*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/plants12142702>
- Shokrpour, M., Mohammadi, S. A., Moghaddam, M., Ziai, S. A., & Javanshir, A. (2008). Variation in flavonolignan concentration of milk thistle (*Silybum marianum*) fruits grown in Iran. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 13(4), 55–69. <https://doi.org/10.1080/10496470801946034>
- Sumatri, M., Kosalai, D., Rajendiran, P., & Muthiah, C. (2024). Phytochemical Profiling of the Methanol Extracts of *Silybum marianum* (Milk Thistle) by FTIR and GCMS Analysis. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 15(4), 121–129. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v15i4.4730>
- Teleszko, M., Haraf, G., Zając, A., & Krzos, G. (2023). Milk Thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertner) Endosperm as an Alternative Protein Source for a Sustainable Food System (SFS)—Pilot Studies. *Sustainability (Switzerland)*, 15(19). <https://doi.org/10.3390/su151914411>
- Tolangi, P., Shim, J., Sumabat, R. M., Kim, S., Park, H. S., Do Kim, K., Kim, H. U., Lee, S., & Chin, J. H. (2024). The genetics and genomics of milk thistle: unlocking its therapeutic potential through modern breeding and biotechnological innovations. In *Applied Biological Chemistry* (Vol. 67, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1186/s13765-024-00967-7>
- Waizel-Bucay, J., De, M., & Cruz-Juárez, L. (2014). *Arnica montana* L., planta medicinal europea con relevancia *Arnica montana* L., relevant European medicinal plant.
- Zahir, A., Abbasi, B. H., Adil, M., Anjum, S., Zia, M., & Ihsan-Ul-Haq. (2014). Synergistic effects of drought stress and photoperiods on phenology and secondary metabolism of *Silybum*

- marianum. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(2), 693–707.
<https://doi.org/10.1007/s12010-014-1098-5>
- Zangani, E., Angourani, H. R., Andalibi, B., Rad, S. V., & Mastinu, A. (2023). Sodium Nitroprusside Improves the Growth and Behavior of the Stomata of *Silybum marianum* L. Subjected to Different Degrees of Drought. *Life*, 13(4).
<https://doi.org/10.3390/life13040875>
- Zhang, X., Liu, M., Wang, Z., Wang, P., Kong, L., Wu, J., Wu, W., Ma, L., Jiang, S., Ren, W., Du, L., Ma, W., & Liu, X. (2024). A review of the botany, phytochemistry, pharmacology, synthetic biology and comprehensive utilization of *Silybum marianum*. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1417655>
- Zhao, Y., Zhou, Y., Gong, T., Liu, Z., Yang, W., Xiong, Y., Xiao, D., Cifuentes, A., Ibáñez, E., & Lu, W. (2024). The clinical anti-inflammatory effects and underlying mechanisms of silymarin. In *iScience* (Vol. 27, Issue 11). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.111109>
- Zhou, S., Yan, X., Yang, J., Qian, C., Yin, X., Fan, X., Fang, T., Gao, Y., Chang, Y., Liu, W., & Ma, X. F. (2021). Variations in Flavonoid Metabolites Along Altitudinal Gradient in a Desert Medicinal Plant *Agriophyllum squarrosum*. *Frontiers in Plant Science*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.683265>

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 50

Matriz de consistencia

Patrones fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina en *Silybum marianum* L. Gaertner en tres gradientes altitudinales de cusco

Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis específicas	Variables	Indicadores	Técnicas e instrumentos	Técnicas de análisis
Problema: ¿Cómo influye la altitud (3 200, 3 400 y 3 600 m) en los patrones fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina en <i>S. marianum</i> en Cusco?	Objetivo: Evaluar patrones fenotípicos, citogenéticos y contenido de silimarina de <i>Silybum marianum</i> L. Gaertner en tres gradientes altitudinales.	Hipótesis: La altitud induce diferencias significativas en los tres conjuntos de variables.	Independiente: Altitud (3 niveles). Dependientes: Fenotipo, Cariotipo, Silimarina.	Ver filas específicas	GPS; cinta y calibrador; registros fenológicos; microscopio; HPLC-DAD	ANOVA/MANOVA; modelos mixtos; PCA; correlaciones
¿Qué diferencias fenotípicas (morfología y fenología) presenta <i>S. marianum</i> L. entre los tres gradientes altitudinales?	Objetivo: Caracterizar rasgos fenotípicos (morfología y fenología) de <i>Silybum marianum</i> L. a 3200, 3400 y 3600 m de altitud.	Hipótesis: Existen diferencias fenotípicas significativas entre las poblaciones de <i>Silybum marianum</i> L. en los tres gradientes altitudinales	Fenotipo (morfología + fenología)	Altura, largo de hoja, N° de capítulos, N° de ramas	Cinta, calibrador, escáner + ImageJ; observación semanal	Shapiro-Wilk; ANOVA 1-vía / MANOVA; Kruskal-Wallis; Tukey; η^2
¿Existen diferencias citogenéticas de <i>S. marianum</i> asociadas a la altitud?	Objetivo: Determinar el cariotipo de <i>Silybum marianum</i> L., a partir de semillas procedentes de cada altitud.	Hipótesis: El cariotipo de <i>Silybum marianum</i> L. presenta variaciones citogenéticas asociadas a la altitud.	Cariotipo	2n, fórmula cromosómica, longitud haploide total, índice de asimetría (A2)	Pre-tratamiento 8-hidroxiquinolina; tinción Feulgen/Giemsa; microscopio; software KaryoType	ANOVA / Kruskal-Wallis; χ^2 ; Tukey; η^2
¿Cómo varía el contenido de silimarina en las semillas de <i>S. marianum</i> L., en función a la diferencia altitudinal?	Objetivo: Cuantificar el contenido de silimarina en las semillas de <i>Silybum marianum</i> L. mediante HPLC-DAD.	Hipótesis: El contenido de silimarina en las semillas de <i>Silybum marianum</i> L., varía significativamente en función a la altitud.	Contenido de silimarina	Silimarina total (% p/p) y perfil de flavonolignanos	Extracción MeOH 80 % ultrasónica; HPLC-DAD (C18, $\lambda=287$ nm)	ANOVA 1-vía / Kruskal-Wallis; Tukey; η^2
¿Qué relación existe entre fenotipo, cariotipo y contenido silimarina en función de la altitud?	Objetivo: Evaluar correlaciones multivariantes.	Hipótesis: Se observa una correlación significativa entre los rasgos fenotípicos, citogenéticos y el contenido de silimarina en función del gradiente altitudinal.	Matriz conjunta de variables anteriores	Valores estandarizados de todos los indicadores	SPSS	Pearson/Spearman; PCA; PLS-R; modelos lineales múltiples; IC 95 %

Anexo 2

Tabla 51

Registro de los componentes bióticos acompañantes de *Silybum marianum* L.

K'ayra Huaccoto (KH) 3207 m

Flora	
Nombre científico	Nombre común
<i>Baccharis latifolia</i>	Mayu chillca
<i>Daucus montanus</i> Humb. & Bomp. expreg.	Monte zanahoria
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cipres
<i>Pennisetum clandestinum</i>	Kikuyo
<i>Poa annua</i> L.	Pasto
<i>Rumex cuneifolius</i> Campd.	LLaque
<i>Senecio rudbeckiaefolius</i>	Maycha
Fauna	
Nombre científico	Nombre común
<i>Colibri coruscans</i> (Gould)	K'ente azul
<i>Colaptes rupicola</i> (d'Orbigny)	J'acachu
<i>Turdus chiguanco</i> (Lafresnaye & d'Obrigny)	Chiguaco
<i>Zonotrichia capensis</i> Lesson	Pichinco
Polinizadores	
<i>Danaus plexippus</i>	Mariposa
<i>Apis mellifera</i>	Abeja
<i>Coccinella</i> sp.	Mariquita

Terminal Huancaro (TH) 3402 m

Flora	
Nombre científico	Nombre común
<i>Baccharis incarum</i> Wedd.	Tayanca
<i>Cytisus scoparius</i> L. (Link)	Cetico
<i>Eucaliptus globulus</i> Labill.	Eucalipto
<i>Hipochaeris taraxacoides</i> (Meyen & Walp) Benth & Hook	Pilli pilli
<i>Pennisetum clandestinum</i>	Kikuyo
<i>Polylepis incana</i> Kunth.	Q'euña
<i>Poa annua</i> L.	Pasto
<i>Rumex cuneifolius</i> Campd.	LLaque
<i>Salix</i> sp.	Sauce llorón
<i>Senna</i> sp. L.	Mutuy
<i>Senecio rudbeckiaefolius</i>	Maycha
<i>Schinus molle</i> L.	Molle
Fauna	
Nombre científico	Nombre común
<i>Columbia livia</i> (Gmelin)	Paloma
<i>Turdus chiguanco</i> (Lafresnaye & d'Obrigny)	Chiguaco
<i>Zonotrichia capensis</i> Lesson	Pichinco
<i>Zenaida auriculata</i> (Bonaparte)	Urpi
Polinizadores	
Nombre científico	Nombre común
<i>Danaus plexippus</i>	Mariposa
<i>Apis mellifera</i>	Abeja

Fortaleza Sacsayhuaman (FS) 3625 m

Flora		
Nombre científico		Nombre común
<i>Barnadesia horrida</i> (R&P) Pers		Chillca
<i>Bidens andicola</i> Kunth		Pirka
<i>Berberis boliviana</i> Lechl		Cheqche
<i>Calamagrostis heterophylla</i> (Wedd.) Plig.		Pasto
<i>Calceolaria engleriana</i> Kraenzl.		Ayac zapatilla
<i>Eucaliptus globulus</i> Labill.		Eucalipto
<i>Hipochaeris taraxacoides</i> (Meyen & Walp) Benth & Hook		Pilli pilli
<i>Mintostachis spicata</i> (Benth) Epling		Muña
<i>Opuntia tunicata</i> (Lehm) Pfeiff.		Pataquisca
<i>Pennisetum clandestinum</i>		Kikuyo
<i>Polylepis microphylla</i> (Wedd.) Bitter.		Ch'afra q'euña
<i>Polylepis incana</i> Kunth.		Q'euña
<i>Poa annua</i> L.		Pasto
<i>Rumex cuneifolius</i> Campd.		LLaque
<i>Schinus molle</i> L.		Molle
Fauna		
Nombre científico		Nombre común
<i>Colibri coruscans</i> (Gould)		K'ente azul
<i>Colaptes rupicola</i> (d'Orbigny)		J'acachu
<i>Turdus chiguanco</i> (Lafresnaye & d'Obrigny)		Chiguaco
<i>Zonotrichia capensis</i> Lesson		Pichinco
Polinizadores		
Nombre científico		Nombre común
<i>Apis mellifera</i>		Abeja
<i>Coccinella sp.</i>		Mariquita
<i>Danaus plexippus</i>		Mariposa

Figura 55

Fauna y flora acompañante de *Silybum marianum* L.



Anexo 3

Registro de Condiciones Meteorológicas del SENAMHI Año 2021

Huaccoto-K'ayra (HK) 3207m

Tabla 52

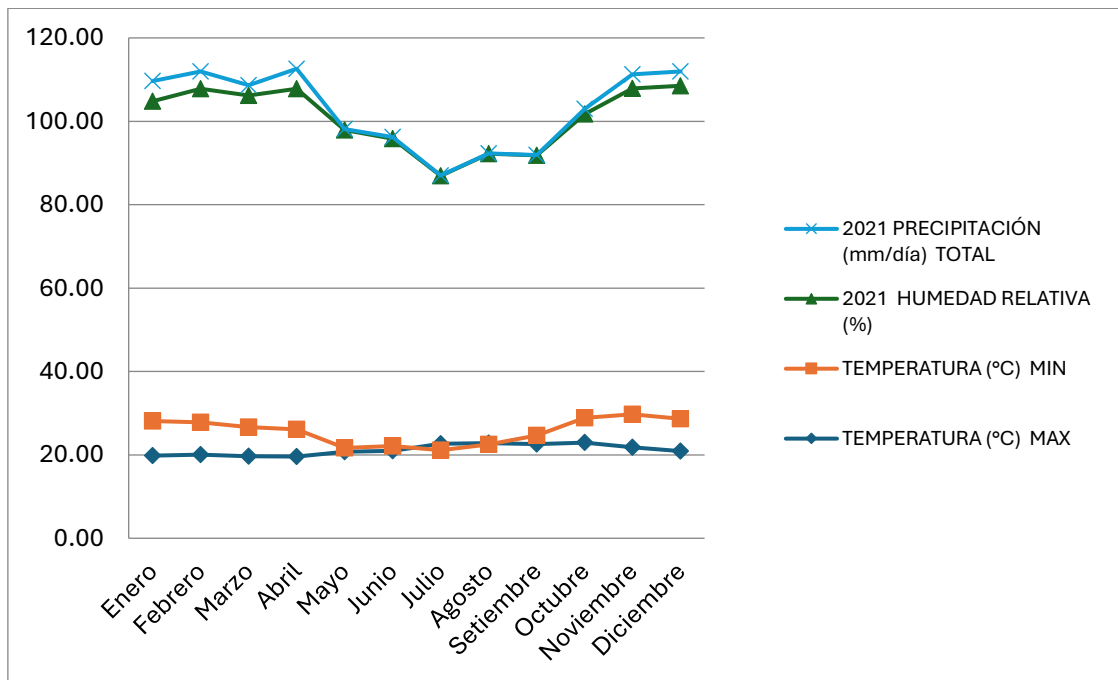
Temperatura promedio, humedad relativa y precipitación pluvial 2021 en Huaccoto-K'ayra

	Temperatura promedio (°C)		Humedad relativa (%)		Precipitación (mm/día)	
	mínima	máxima	mínima	máxima	mínima	máxima
2021	10.56 (jul)	14.87 (nov)	65.81 (jul)	79.98 (feb)	0 (set)	4.85 (ene)

Nota: Obtenida de Datos meteorológicos SENAHMI, (2025)

Figura 56

Temperatura, Humedad y Precipitación pluvial en Haccoto K'ayra 2021



Nota: Obtenida de Datos meteorológicos SENAHMI, (2025)

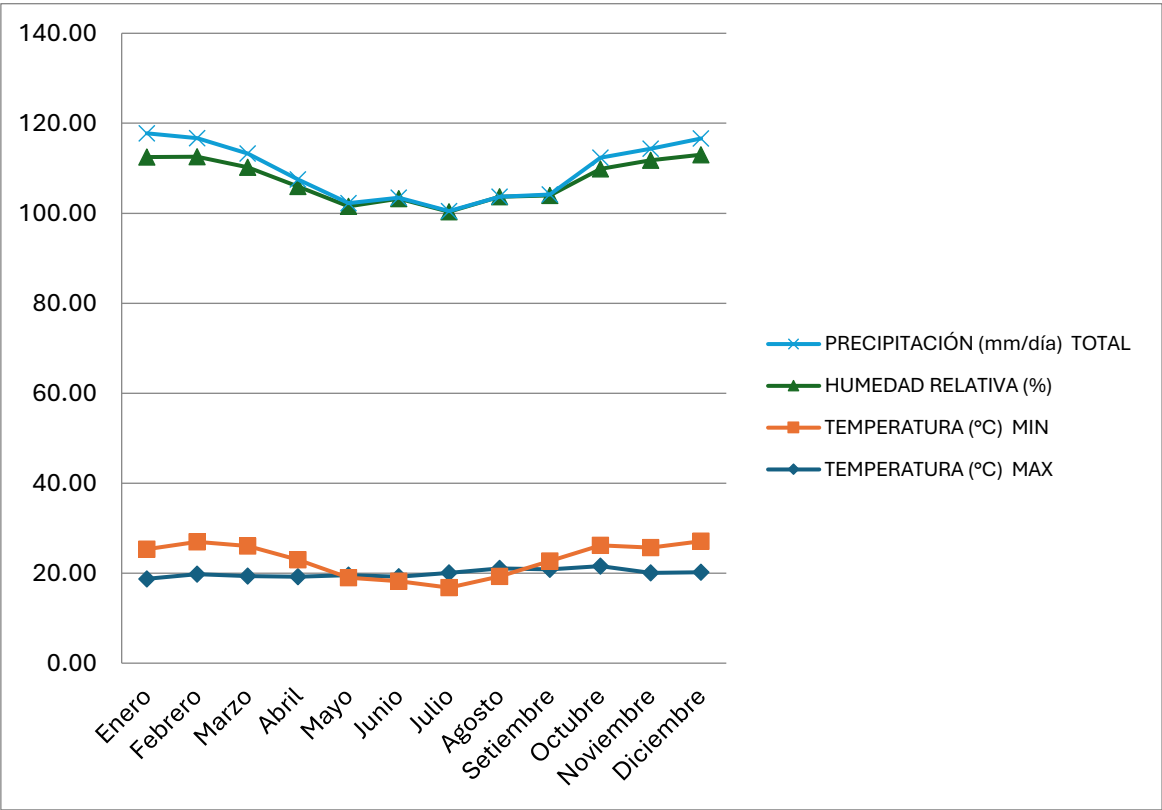
Terminal Huancaro (TH) 3402 m

Tabla 53
Temperatura promedio, humedad relativa y precipitación pluvial 2021 en Terminal Huancaro

	Temperatura promedio (°C)		Humedad relativa (%)		Precipitación (mm/día)	
	mínima	máxima	mínima	máxima	mínima	máxima
2021	8.4 (jul)	13.55 (dic)	81.31 (set)	87.19 (ene)	0.02 (ago)	5.28 (ene)

Nota: Obtenida de Datos meteorológicos SENAEMI, (2025)

Figura 57
Temperatura, Humedad y Precipitación pluvial en Terminal Huancaro 2021



Nota: Obtenida de Datos meteorológicos SENAEMI, (2025)

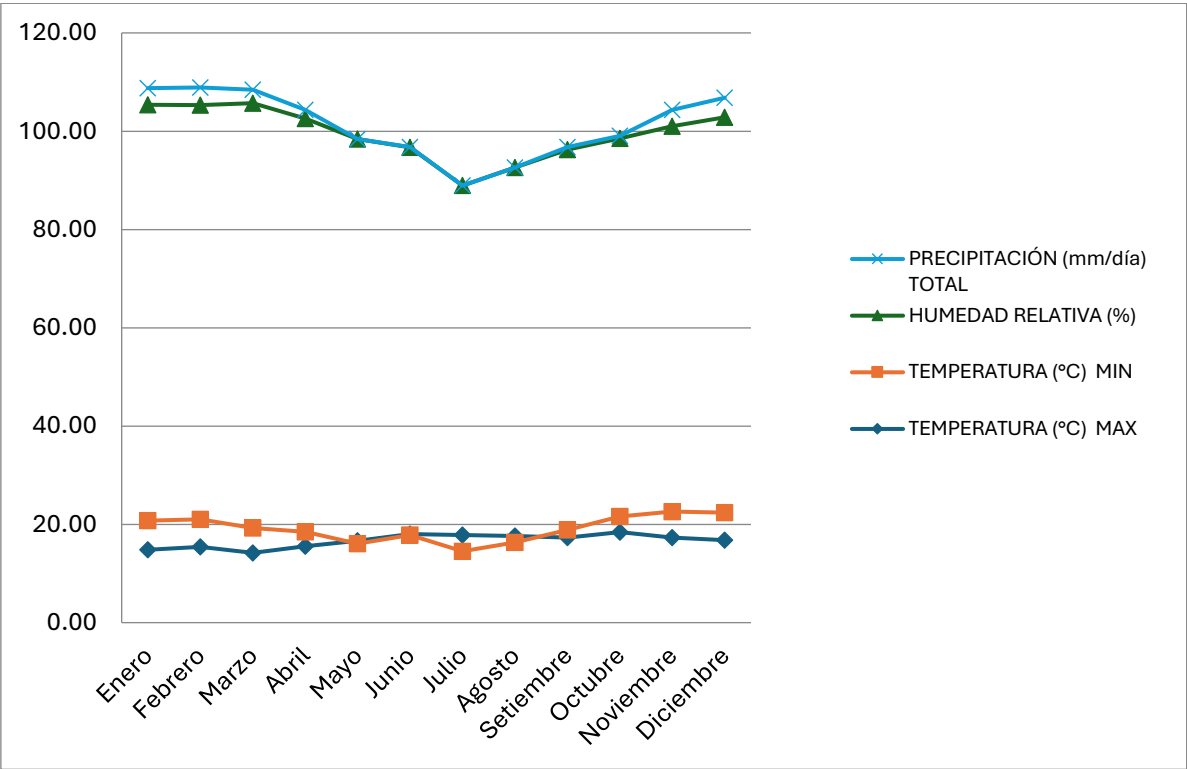
Comunidad Fortaleza de Sacsayhuaman (FS) 2625m

Tabla 54
Temperatura promedio, humedad relativa y precipitación pluvial 2021 en Fortaleza Sacsayhuaman

	Temperatura promedio (°C)		Humedad relativa (%)		Precipitación (mm/día)	
	mínima	máxima	mínima	máxima	mínima	máxima
2021	7.30 (jul)	11.30 (nov)	74.41 (ene)	86.47 (ene)	0.00 (jul)	3.95 (dic)

Nota: Obtenida de Datos meteorológicos SENAHMI, (2025)

Figura 58
Temperatura, Humedad y Precipitación pluvial en Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman 2021



Nota: Obtenida de Datos meteorológicos SENAHMI, (2025)

Figura 59

Muestras de suelos para análisis físico-químico



Anexo 4

Identificación botánica de *Silybum marianum* L. Gaertner

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

* APARTADO POSTAL
N° 971 - Cusco - Perú

* FAX: 226136 - 226173 - 222572

* RECTORADO
Calle Tigris N° 827
Teléfonos: 222271 - 224091 - 224181

* CIUDAD UNIVERSITARIA

Av. de la Cultura N° 733

Teléfonos: 226541 - 222512 - 222578
222573 - 222226

* LOCAL CENTRAL

Plaza de Armas s/n

Teléfono: 221313 - 225721 - 224018

* MUSEO E INSTITUTO DE ARQUEOLOGÍA

Calle del Almirante N° 103 - Teléfono: 221180

* CENTRO AGROPECUARIO ICATRA

San Francisco s/n Cusco - Teléfono: 221409 - 211423

* COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"

Av. de la Cultura N° 731

"Escuela Universitaria" - Teléfono: 221192

HERBARIO VARGAS (CUZ)

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 027-2019-HVC-FCB-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas (CUZ) -Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: la Blg. Olga Lilia Cjuno Huancá egresada de la Maestría en Ciencias con mención en Química, Productos Naturales de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ha presentado a la Dirección del Herbario Vargas (CUZ) tres muestras vegetales herborizadas para su determinación taxonómica (expediente N°003594), para el proyecto de tesis titulado "PATRONES DE VARIABILIDAD GENOTÍPICA, CITOGÉNÉTICA Y QUÍMICA DE *Silybum marianum* (L.) Gaertn. EN TRES PISOS ECOLÓGICOS DE CUSCO". La que al ser diagnosticado por el M. Sc. Abel Monteagudo Mendoza, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del Herbario, concuerdan con la clasificación del grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016):

N°	FAMILIA	ESPECIES
1	Asteraceae	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.
2	Asteraceae	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.
3	Asteraceae	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.

Se le expide la presente certificación a petición formal de la interesada para los fines que viere por conveniente:

Cusco, 14 de diciembre del 2019

Blg. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas (CUZ)



Anexo 5

Descripción de patrones fenotípicos y fenológicos de *Silybum marianum* L.

Figura 60

Descripción de los patrones fenotípicos de *Silybum marianum* y registro de campo



Nota: Medida de altura, número de ramas, número de capítulos por planta

Tabla 55

Registro de características fenotípicas en los tres gradientes altitudinales

Registro de características fenotípicas de <i>Silybum marianum</i> L. en tres gradientes altitudinales del Lusco										
Puente Huaccoto-K (Tres poblaciones de plantas de 10, 30 y 20 individuos)										
Fecha	Hora	N°	Altura de planta (m)	N° Ramas	Tamaño de haja	Color de haja	N° de capítulos/planta	Color de flor	Color de semilla	
16.07.2020	###	1	2.2	6	30	Verde brillante	5	Purpura	Negro	
		2	1.58	5	20	Verde brillante	3	Purpura	Negro	
		3	1.45	3	25	Verde brillante	4	Purpura	Negro	
		4	1.2	4	18	Verde brillante	2	Purpura	Negro	
		5	1.55	4	25	Verde brillante	3	Purpura	Negro	
		6	1.35	4	20	Verde brillante	3	Purpura	Negro	
		7	2.35	6	32	Verde brillante	5	Purpura	Negro	
		8	1.6	5	25	Verde brillante	4	Purpura	Negro	
		9	2.35	7	25	Verde brillante	6	Purpura	Negro	
		10	1.67	5	25	Verde brillante	4	Purpura	Negro	
		11	1.45	5	20	Verde brillante	3	Purpura	Negro	
		12	1.25	4	22	Verde brillante	2	Purpura	Negro	
		13	0.9	3	20	Verde brillante	2	Purpura	Negro	
		14	2.45	6	35	Verde brillante	6	Purpura	Negro	
		15	1.58	4	24	Verde brillante	3	Purpura	Negro	
		16	1.45	4	22	Verde brillante	3	Purpura	Negro	
		17	1.7	5	28	Verde brillante	5	Purpura	Negro	
		18	1.35	6	28	Verde brillante	5	Purpura	Negro	
		19	1.5	5	22	Verde brillante	4	Purpura	Negro	
		20	1.72	6	27	Verde brillante	5	Purpura	Negro	
		21	1.2	4	23	Verde brillante	3	Purpura	Negro	
		22	2.35	6	27	Verde brillante	6	Purpura	Negro	
		23	1.72	6	26	Verde brillante	6	Purpura	Negro	

Puente Huancaro (dos poblaciones de plantas de 28 y 35 individuos)									
Fecha	Hora	N°	Altura de plantar (m)	N° Ramar	Tamaño de hajar	Color	N° de capitular/planta	Color de florar	Color de remillar
16.07.2020	12:00	1	1.6	6	25	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		2	1.5	4	25	Verde brillante	4	Purpura	Negro
		3	1.35	4	23	Verde brillante	3	Purpura	Negro
		4	1.4	4	23	Verde brillante	3	Purpura	Negro
		5	1.2	3	22	Verde brillante	3	Purpura	Negro
		6	1.75	6	28	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		7	1.7	6	28	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		8	1.6	5	26	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		9	1.5	5	24	Verde brillante	4	Purpura	Negro
		10	1.2	3	23	Verde brillante	3	Purpura	Negro
		11	1.45	4	24	Verde brillante	4	Purpura	Negro
		12	1.75	6	27	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		13	1.4	4	23	Verde brillante	3	Purpura	Negro
		14	1.7	6	28	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		15	1.65	6	26	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		16	1.6	5	25	Verde brillante	4	Purpura	Negro
		17	1.2	3	23	Verde brillante	3	Purpura	Negro
		18	1.65	6	26	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		19	1.55	6	26	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		20	1.45	5	24	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		21	1.7	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Negro
		22	1.6	5	26	Verde brillante	5	Purpura	Negro
		23	1.4	4	23	Verde brillante	4	Purpura	Negro
Comunidad Fortaleza Sacsayhuaman, sector Mollocco (3 poblaciones de plantas de 50, 40 y 45 individuos)									
Fecha	Hora	N°	Altura de plantar (m)	N° Ramar	Tamaño de hajar	Color	N° de capitular/planta	Color de florar	Color de remillar
16.07.2020	16:00	1	1.6	5	25	Verde brillante	5	Purpura	Marrón
		2	1.9	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		3	1.8	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		4	1.75	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		5	2	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		6	1.6	5	26	Verde brillante	5	Purpura	Marrón
		7	1.5	5	25	Verde brillante	5	Purpura	Marrón
		8	1.9	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		9	1.7	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		10	2.1	6	30	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		11	1.5	5	25	Verde brillante	5	Purpura	Marrón
		12	1.9	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		13	1.7	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		14	1.6	5	26	Verde brillante	5	Purpura	Marrón
		15	1.75	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		16	1.8	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		17	1.6	5	26	Verde brillante	5	Purpura	Marrón
		18	2.2	7	30	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		19	1.4	4	25	Verde brillante	5	Purpura	Marrón
		20	1.7	6	28	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		21	1.55	5	26	Verde brillante	4	Purpura	Marrón
		22	1.6	5	26	Verde brillante	5	Purpura	Marrón
		23	2	6	30	Verde brillante	6	Purpura	Marrón
		24	2.1	6	30	Verde brillante	6	Purpura	Marrón

Figura 61

Observaciones fenológicas de *Silybum marianum* L. según escala de BBCH durante los meses del año en los tres gradientes altitudinales



Nota: (0) Germinación (1) Desarrollo de hojas (brote de tallo) (2) Formación de brotes laterales (3) Crecimiento longitudinal del tallo (4) crecimiento en roseta (5) Emergencia de inflorescencia (6) Floración principal (7) Desarrollo de capítulo (8) coloración y maduración de frutos (9) Senescencia.

Anexo 6

Determinación de los Patrones citogenéticos de *Silybum marianum* L.

Figura 62

Flujograma para la determinación de índice mitótico de Silybum marianum L.

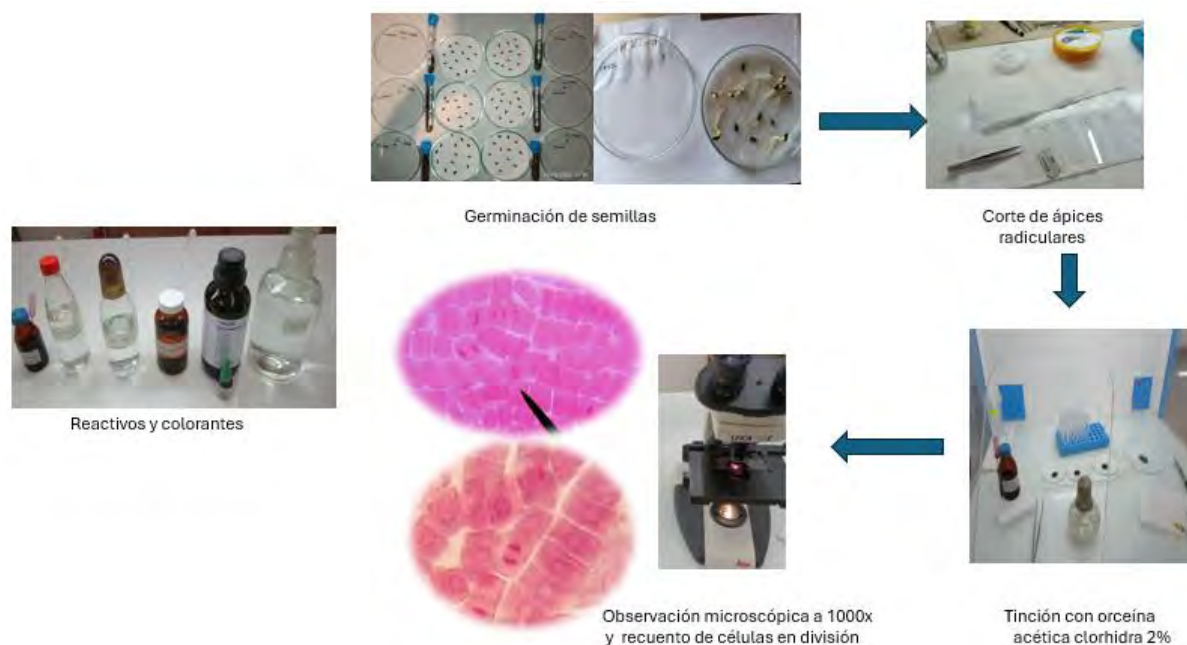


Tabla 56

Recuento de células en mitosis para la determinación del índice mitótico

	Hora	N	%	IM	%	P	%	M	%	A	%	T	%	I	%
0	06:00	1149	100%	135	12%	101	9%	24	2%	8	1%	2	0%	1014	88%
1	07:00	1221	100%	96	8%	58	5%	19	2%	8	1%	11	1%	1125	92%
2	08:00	1290	100%	64	5%	32	2%	25	2%	5	0%	2	0%	1226	95%
3	09:00	879	100%	50	6%	19	2%	20	2%	8	1%	3	0%	829	94%
4	10:00	960	100%	49	5%	21	2%	16	2%	10	1%	2	0%	911	95%
5	11:00	1220	100%	72	6%	38	3%	16	1%	15	1%	3	0%	1148	94%
6	12:00	1365	100%	89	7%	57	4%	18	1%	11	1%	3	0%	1276	93%
7	13:00	1520	100%	80	5%	31	2%	32	2%	15	1%	2	0%	1440	95%
8	14:00	980	100%	45	5%	24	2%	14	1%	7	1%	0	0%	935	95%
9	15:00	1290	100%	72	6%	34	3%	24	2%	13	1%	1	0%	1218	94%
10	16:00	913	100%	43	5%	31	3%	8	1%	3	0%	1	0%	870	95%
11	17:00	1298	100%	115	9%	76	6%	24	2%	10	1%	5	0%	1183	91%
12	18:00	1450	100%	150	10%	76	5%	50	3%	18	1%	6	0%	1300	90%
13	19:00	1090	100%	81	7%	46	4%	26	2%	9	1%	0	0%	1009	93%
14	20:00	1040	100%	51	5%	29	3%	15	1%	7	1%	0	0%	989	95%
15	21:00	1041	100%	60	6%	30	3%	16	2%	8	1%	1	0%	990	95%
16	22:00	1042	100%	53	5%	31	3%	17	2%	9	1%	2	0%	991	95%

Figura 63

Indice mitótico de Silybum marinum L.

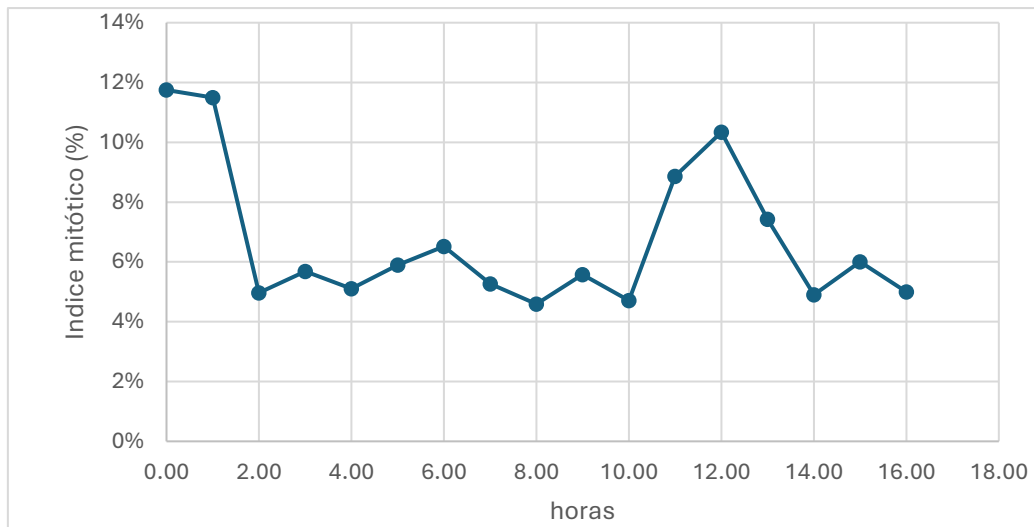


Figura 65

Flujograma de análisis cariotípico de Silybum marianum L.

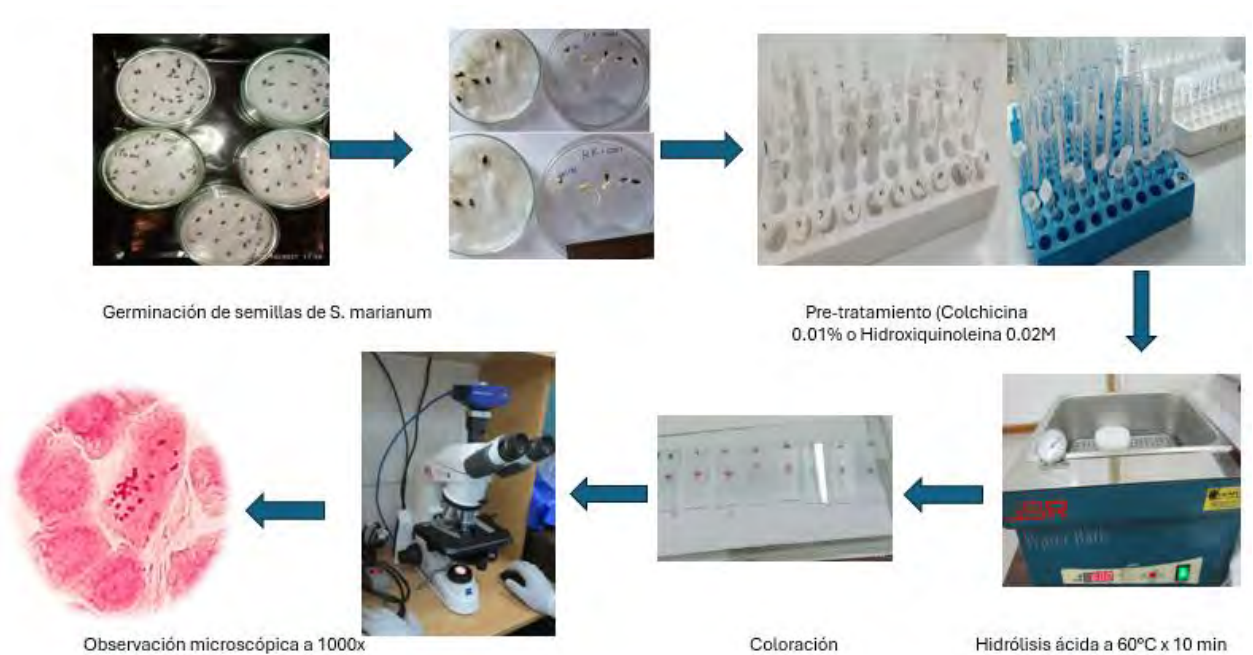
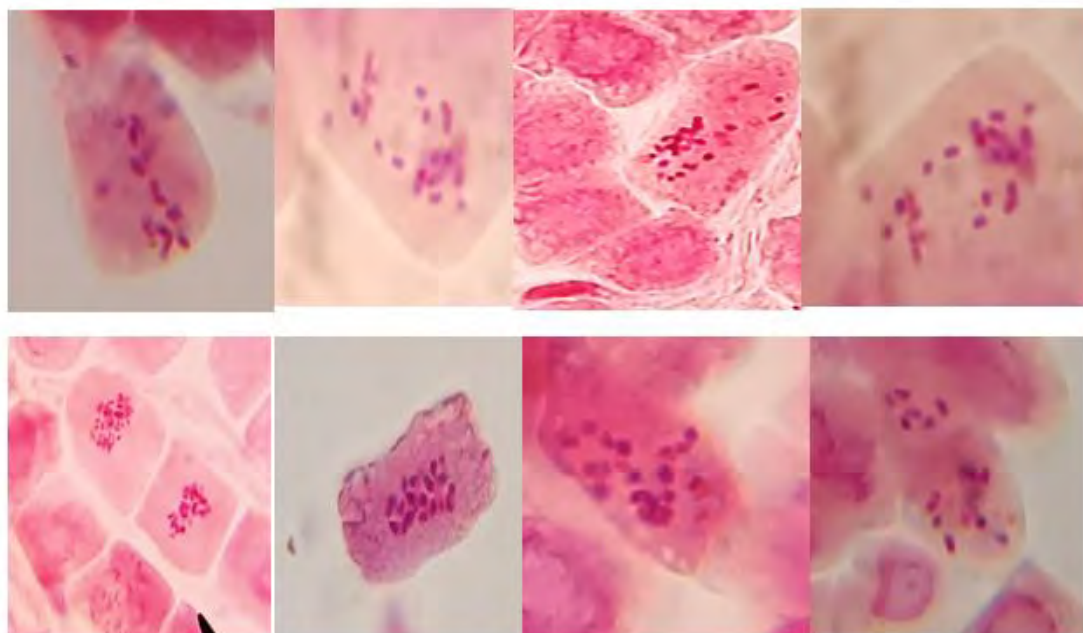
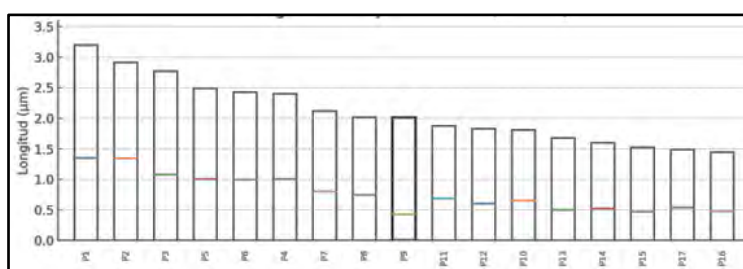


Figura 66

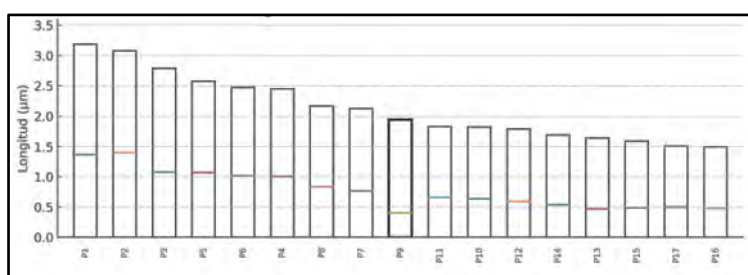
Análisis de imágenes fotográficas observadas a 1000x, para organización de cariotipo



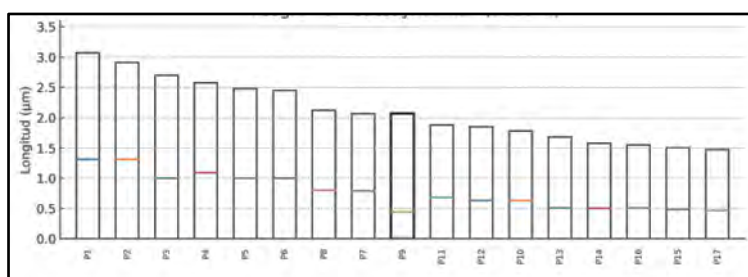
Ideograma con reordenamiento consensuado K'ayra Huaccoto



Ideograma con reordenamiento consensuado Terminal Huancaro



Ideograma con reordenamiento consensuado Fortaleza de Sacsayhuaman



Anexo 7

Análisis del contenido de silimarina en semillas de *Silybum marianum* L.

Tabla 57

Códigos de colección de semillas de Silybum marianum en tres gradientes altitudinales de Cusco-2021

N°	Código	Ubicación	Características de semillas
M9	HK-1a-2021	Puente Huaccoto-K'ayra	Semillas fértiles negras
M10	HK-1b-2021	Puente Huaccoto-K'ayra	Semillas infértiles marrones pequeñas
M11	TH-1a-2021	Terminar Huancaro	Semillas fértiles negras
M12	TH-1b-2021	Terminar Huancaro	Semillas infértiles marrones pequeñas
M13	FS-1a-2021	Fortaleza Saccsayhuaman	Semillas fértiles Marrones grandes
M14	FS-1b-2021	Fortaleza Saccsayhuaman	Semillas infértiles marrones pequeñas

Tabla 58

Semillas de Silybum marianum procedentes de los tres gradientes altitudinales



Anexo 8

Rendimiento de semila para el análisis de silimarina

Tabla 59

Rendimiento en la obtención del producto de la semilla de Silybum marianum L. para el análisis de silimarina

Nº	Peso total de semillas	Peso de cáscara	Peso tamizado molido	% de rendimiento
M9	2.20	0.69	1.51	68.64
M10	2.07	0.58	1.49	71.98
M11	2.16	0.77	1.39	64.35
M12	2.06	0.99	1.07	51.94
M13	2.12	0.98	1.14	53.77
M14	2.18	0.96	1.22	55.96
Media	2.04	0.74	1.31	64.02

Anexo 9

Análisis de silimarina

Figura 67

*Flujograma de extracción de silimarina a partir de semillas de *Silybum marianum* L.*

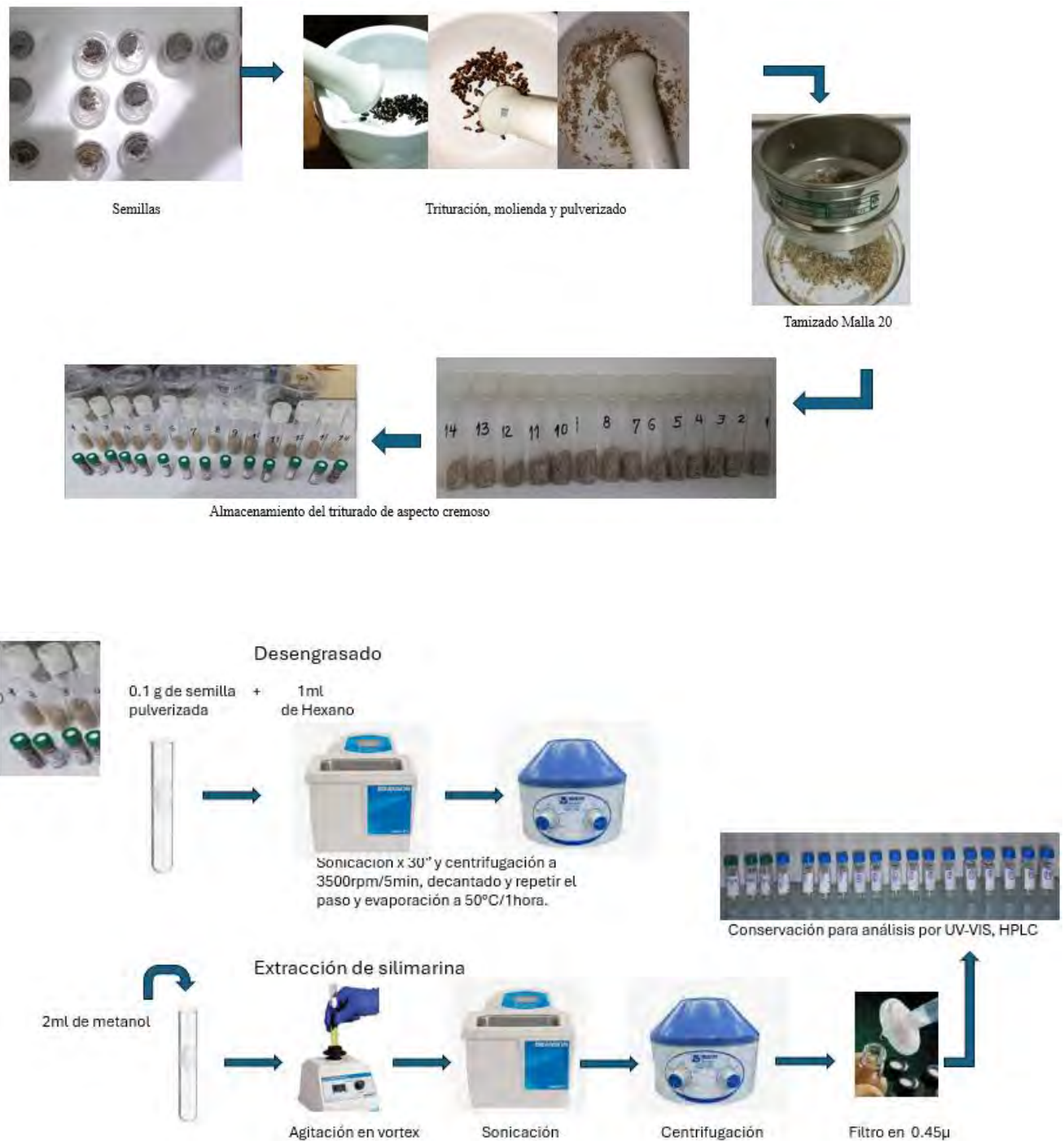


Figura 68
FTIR-ATR de estándar de silimarina (30% de silibina)

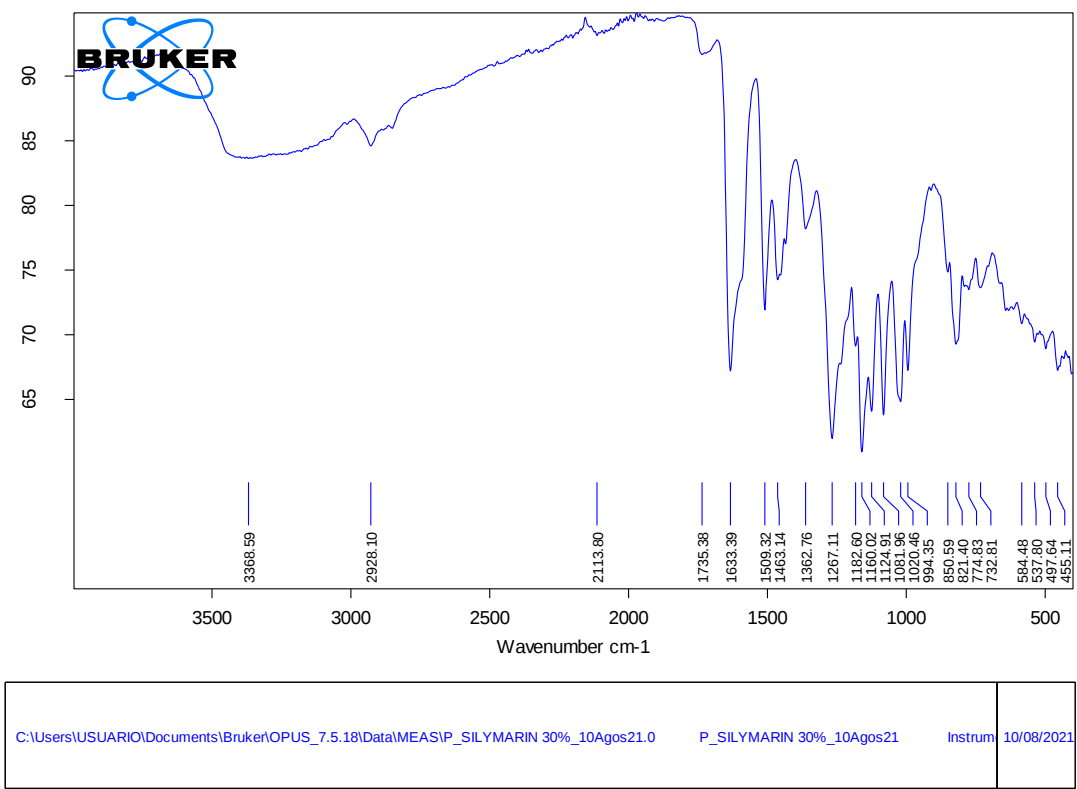
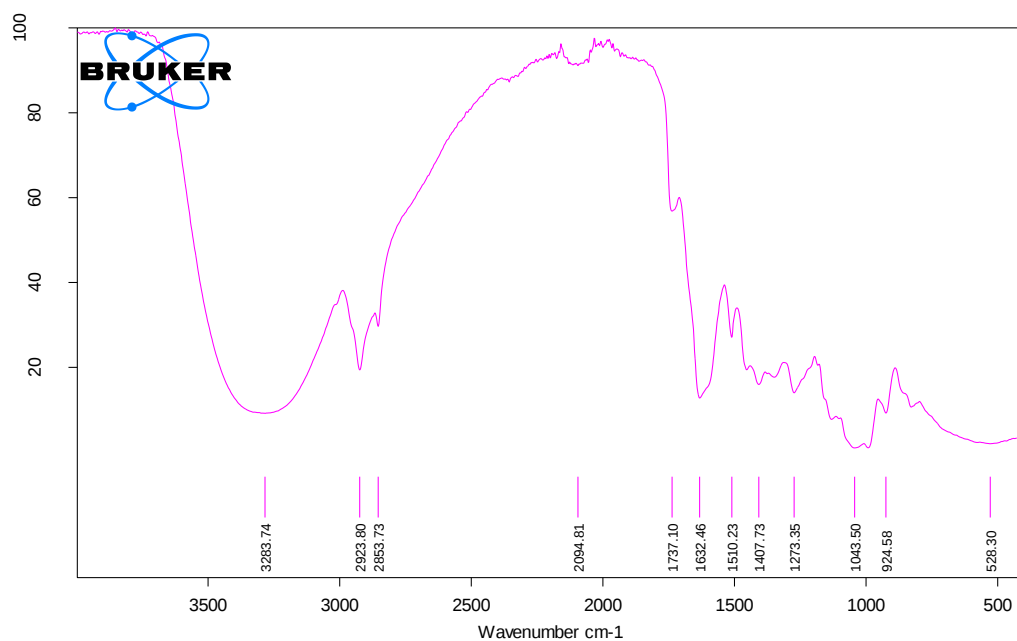


Figura 69
FTIR-ATR de silimarina extraída M14



C:\Users\USUARIO\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\Data\MEAS\P_SILYMARIN_m14_10AGO2021.0

P_SILYMARIN_m14_10AGO2021

Ins 10/08/2021

Anexo 10

Cromatogramas del HPLC-DAD de estándares de silimarina y muestras de semillas de *Silybum marianum* L.

Konikrom Plus - Chromatography station

www.konik-group.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_1oct2025\Silymarin_30oct2021_P_3ppm.FH File Created : 18/10/2025 08:07:30 p.m.
 Origin : Acquired, Acquisition started 02/11/2021 02:00:18 p.m. Acquired Date : 02/11/2021 02:17:34 p.m.
 Project : C:\Konikrom Plus\Projects\Iron-LPR3 By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : Modified Printed Date : 18/10/2025 08:15:55 p.m.
 Report Style : C:\Konikrom Plus\Common\Chromatogram.rpt By : Administrator
 Calibration File : None

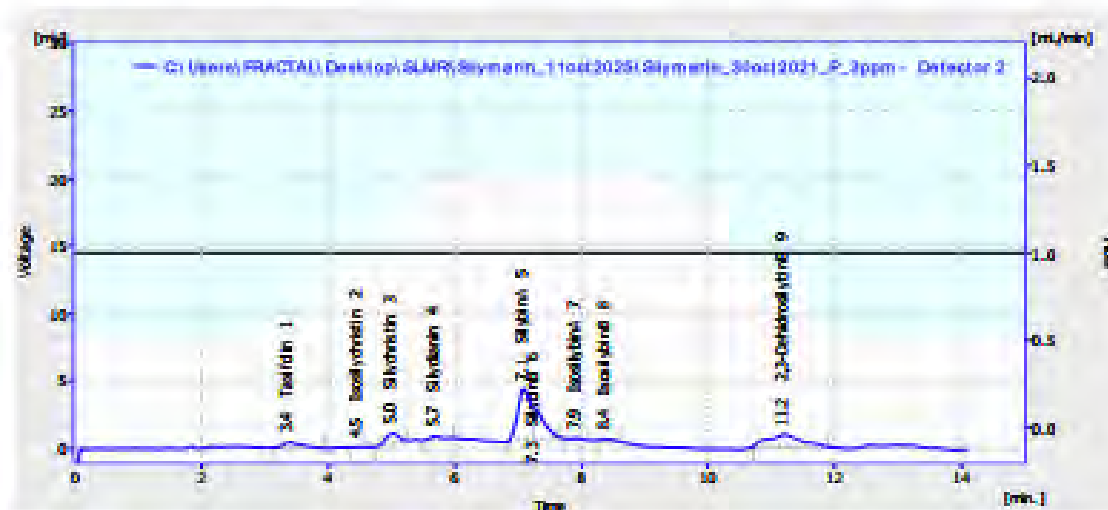
Sample Info:

Sample ID : Silymarin_30oct2021 Amount : 1
 Sample : Silybum marianum_1-Anisotropin_01_4 LSTD Amount : 1
 Inj. Volume [mL] : 0.02 Dilution : 1

Method : Silymarin_30oct2021 By : Administrator
 Description : Silymarin_30oct2021
 Created : 12/08/2021 12:05 p.m. Modified : 18/10/2025 08:15 p.m.
 Column : Nucleosil 100 C18 5 (4,06 x 250)mm Detection : 254, 267, 300, 320nm
 Mobile Phase : Gradient: H₂O-HCOOH(70-30)CH₃OH(30-70) Temperature : 30°C
 Flow Rate : 1.000ml/min Pressure : 0 - 40 MPa
 Note : Patrons: Silymarin-SLMR y Patrones y muestras degradado-Hex, purga tramo, Extrac.H₂O/H, agt. iónico, control, 0-40mic. Soluciones finales de 3, 5 y 10ppm en PH. Muestras aprox. 5 ppm en PH.

Autoskip : None External Start : Start - Retain, Down
 Detector 2 : Detector 2 Range 2 : Bipolar, 3000 mV, 1 Samp. per Sec.
 Subtraction Chromatogram : (None) Hatching : No Change

Base : Not Used Calibration File : None Calculation : Uncal
 Scale Factor : Not Used Units After Scaling : Not Used Uncal. Response : 8
 Unretained Time : 0.00 min Column Length : 250.00 mm Column Calc. : From Width at 50% of Height
 Result Table Reports : All Peaks Hide LSTD Peak : Enabled



Result Table (Uncal - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_1oct2025\Silymarin_30oct2021_P_3ppm - Detector 2)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Run Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [%]	Compound Name												
3.283	0.002	0.404	6.7	5.1	0.33	976	Taurolin												
4.483	0.175	0.623	0.1	0.3	0.15	985	Isochrysin												
5.017	18.544	0.750	7.7	8.8	0.27	964	Silychristin												
5.760	2.766	0.232	2.8	2.7	0.23	813	Silydianin												
7.160	50.445	3.773	32.1	44.3	0.35	995	Silybin A												
7.267	28.169	2.159	20.7	25.4	0.30	999	Silybin B												
7.923	1.085	0.080	0.8	1.0	0.27	1000	Isochrysin A												
8.480	1.790	0.144	1.3	1.7	0.20	1000	Isochrysin B												
11.217	27.687	0.766	14.6	22.6	0.65	984	2,3-Dihydroisoblan												
Total	136.086	8.510	100.0	100.0															

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_13oct2025\Silymarin_30oct2021_P_6ppm.F
 Origin : Acquired, Acquisition started 02/11/2021 06:18:41 p.m.
 Project : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR.LPRJ

File Created : 18/10/2025 06:07:30 p.m.
 Acquired Date : 02/11/2021 06:18:41 p.m.
 By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : Modified
 Report Style : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Chromatogram.rpt
 Calibration File : None

Printed Date : 18/10/2025 06:14:08 p.m.
 By : Administrator

Sample Info:

Sample ID : Silymarin_30oct2021
 Sample : Syllbum_mariannum_1-muestra_01_14
 Inj. Volume [mL] : 0.00

Amount : 1
 ISTD Amount : 1
 Dilution : 1

Method : Silymarin_30oct2021 By : Administrator

Description : Silymarin_30oct2021
 Created : 13/08/2021 12:06 a.m. Modified : 18/10/2025 06:13 p.m.

Column : Nucleosil 100 C18 S (4.00 x 250)mm Detection : 254, 307, 300, 350nm

Mobile Phase : Grad: H₂O-HCOOH (70-30)-MeOH (30-70) Temperature : 30°C

Flow Rate : 1mL/min Pressure : 0 - 40 MPa

Note : Patrón: Silymarin-SLMR y Patrones y muestras degradado-Hex, purga tramp, Extrac: MeOH, agit. sonic, control, 0,45mL. Soluciones
 Brakes de 3, 6 y 12 ppm en FM. Muestras aprox. 6 ppm en FM.

Autosetup : None

External Start : Start - Restart, Down

Detector 2 : Detector 2

Range 2 : Bipolar, 3000 mV, 1 Samp. per Sec.

Subtraction Chromatogram : (None)

Hatching : No Change

Base : Not Used

Calibration File : None

Calculation : Uncal

Scale Factor : Not Used

Units After Scaling : Not Used

Uncal. Response : 0

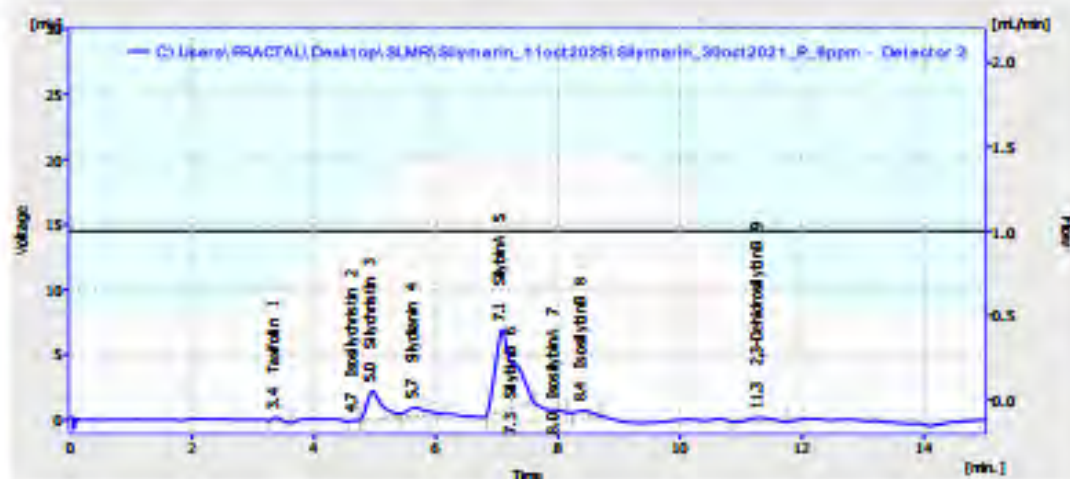
Unretained Time : 0.00 min

Column Length : 50.00 mm

Column Calc. : From Width at 50% of Height

Result Table Reports : All Peaks

Hide ISTD Peak : Enabled



18/10/2025 06:14 p.m. Chromatogram C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_13oct2025\Silymarin_30oct2021_P_6ppm.FRM

Page 2 of 2

Result Table (Uncal - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_13oct2025\Silymarin_30oct2021_P_6ppm - Detector 2)

	Reten. Time [min.]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	WIS [min.]	Peak Purity [%]	Compound Name
1	3.383	3.076	0.306	1.5	2.3	0.17	999	Taxifolin
2	4.667	0.740	0.049	0.1	0.4	0.19	998	Isosilychristin
3	4.967	26.322	2.118	12.7	15.8	0.27	996	Silychristin
4	5.693	15.102	0.661	7.3	4.9	0.43	991	Silydianin
5	7.083	86.129	6.234	42.9	46.5	0.28	981	Silybin
6	7.267	49.330	3.406	24.8	25.4	0.27	999	Silybin
7	7.967	0.346	0.027	0.2	0.2	0.27	1000	Isosilybin A
8	8.417	4.293	0.264	2.1	2.0	0.28	1000	Isosilybin B
9	11.300	0.748	0.237	4.3	2.5	0.47	998	2,3-Dihydroxybin
Total		205.629	12.402	100.0	100.0			

Konikrom Plus - Chromatography station

www.konikgroup.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2021_P_12ppm.FRM File Created : 18/10/2025 08:07:10 p.m.
 Origin : Acquired, Acquisition started 03/11/2021 05:38:20 p.m. Acquired Date : 03/11/2021 05:38:20 p.m.
 Project : C:\Konikrom Plus\Projects\work.LPRD By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : Modified Printed Date : 18/10/2025 08:12:01 p.m.
 Report Style : C:\Konikrom Plus\Common\Chromatogram.rpt By : Administrator
 Calibration File : None

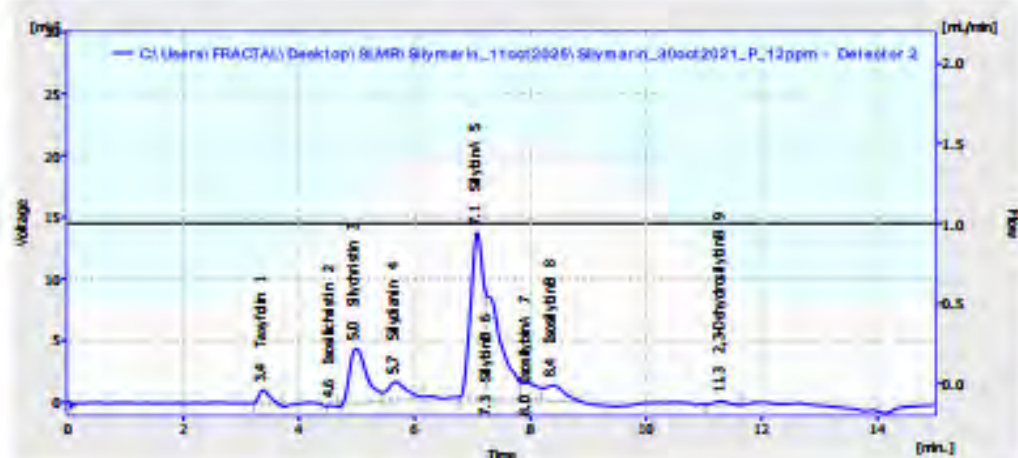
Sample Info:

Sample ID : Silymarin_30oct2021 Amount : 1
 Sample : Silymarin_marianum_14muestras_01_14 ISTD Amount : 1
 Inj. Volume (µL) : 0.00 Dilution : 1

Method : Silymarin_30oct2021 By : Administrator
 Description : Silymarin_30oct2021
 Created : 13/08/2021 12:06 a.m. Modified : 18/10/2025 08:11 p.m.
 Column : Nucleosil 100 C18 S (4.00 x 250)mm Detection : 254, 267, 300, 350nm
 Mobile Phase : Grad: H₂O-HCOOH (70-30)-MeOH (30-70) Temperature : 30°C
 Flow Rate : 0.1ml/min Pressure : 0 - 40 MPa
 Note : Patrons: Silymarin-SLMR y Patrones y muestras degradados-Hex, purga tramp, Extrac: MeOH, agit. sonic, centrif, 0,45mic. Soluciones finales de 2, 6 y 12 ppm en RM. Muestras aprox. 6 ppm en RM.

Autosetup : None External Start : Start - Restart, Down
 Detector 2 : Detector 2 Range 2 : Bipolar, 1000 mV, 1 Samp. per Sec.
 Subtraction Chromatogram : (None) Hatching : No Change

Base : Not Used Calibration File : None Calculation : Unscal
 Scale Factor : Not Used Units After Scaling : Not Used Unscal. Response : 0
 Unrelated Time : 0.00 min Column Length : 50.00 mm Column Calc. : From Width at 50% of Height
 Result Table Reports : All Peaks Hide ISTD Peak : Enabled



Result Table (Unscal - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2021_P_12ppm - Detector 2)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [%]	Compound Name
1	3.283	15.666	1.155	2.8	2.7	0.32	871	Taxifolin
2	4.598	0.367	0.067	0.1	0.2	0.12	965	Isosilychristin
3	4.983	92.719	4.475	16.3	14.2	0.33	954	Silychristin
4	5.667	31.753	1.442	5.6	4.6	0.38	982	Silydianin
5	7.083	196.786	13.370	25.2	42.4	0.38	817	Silybin A
6	7.267	162.367	8.169	28.8	25.9	0.38	674	Silybin B
7	7.995	27.423	1.355	4.8	4.3	0.37	1000	Isosilybin A
8	8.383	31.197	1.339	5.5	3.8	0.42	1000	Isosilybin B
9	11.300	4.983	0.289	0.9	0.9	0.38	988	2,3-Dihydroxyisoflavone
Total		567.169	31.552	100.0	100.0			

Konikrom Plus - Chromatography station

www.konik-group.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_13oct2025\Silymarin_30oct2021_P_24ppm.PRM File Created : 18/10/2025 08:07:32 p.m.
 Origin : Acquired, Acquisition started 02/11/2021 08:31:17 p.m. Acquired Date : 02/11/2025 08:45:36 p.m.
 Project : C:\Konikrom Plus\Project\Horti-LPRJ By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : Modified Printed Date : 18/10/2025 08:31:09 p.m.
 Report Style : C:\Konikrom Plus\Common\Chromatogram.rpt By : Administrator
 Calibration File : None

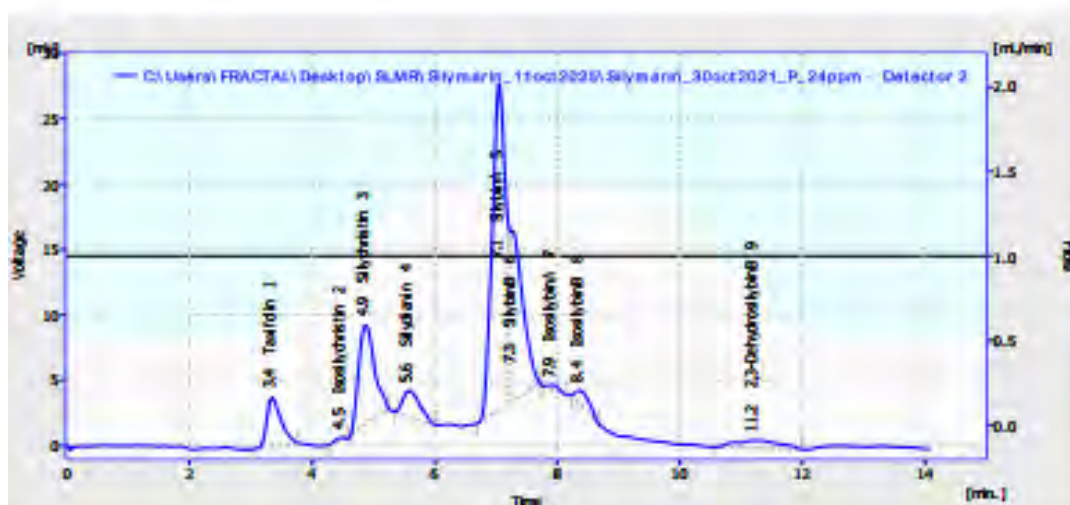
Sample Info:

Sample ID : Silymarin_30oct2021 Amount : 1
 Sample : Silybum_marianum_1-Muestra_36_14 ISTD Amount : 1
 Inj. Volume (µl) : 0.02 Dilution : 1

Method : Silymarin_30oct2021 By : Administrator
 Description : Silymarin_30oct2021
 Created : 13/08/2021 12:06 p.m. Modified : 18/10/2025 08:30 p.m.
 Column : Nucleosil 100 C18 S (4.0µm x 250mm) Detection : 254, 267, 300, 350nm
 Mobile Phase : Grad:100-HCOOH(70-30)-MeOH(30-70) Temperature : 30°C
 Flow Rate : 1ml/min Pressure : 0 - 40 MPa
 Note : Patrón: Silymarin-SLMR/ Patrónes y muestras degradado-Hex, purga trap, Extrac:MeOH, agt. sonic, centrif, 0,45mic. Soluciones finales de 3, 6 y 12ppm en FM. Muestras aprox. 6 ppm en FM.

Autosetup : None External Start : Start - Restart, Down
 Detector 2 : Detector 2 Range 2 : Bipolar, 3000 mV, 1 Samp. per Sec.
 Subtraction Chromatogram : (None) Matching : No Change

Base : Not Used Calibration File : None Calculation : Uncal
 Scale Factor : Not Used Units After Scaling : Not Used Uncal. Response : 0
 Unretained Time : 0.00 min Column Length : 50.00 mm Column Calc. : From Width at 50% of Height
 Result Table Reports : All Peaks Hide ISTD Peak : Enabled



Result Table (Uncal - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_13oct2025\Silymarin_30oct2021_P_24ppm - Detector 2)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	WPS [mV]	Peak Purity [-]	Compound Name
1	3.360	68.140	3.743	7.0	7.0	0.77	791	Tauridin
2	4.480	2.402	0.730	0.3	0.4	0.18	963	Isosilychristin
3	4.867	134.260	7.552	15.6	14.2	0.30	987	Silychristin
4	5.583	38.740	1.905	4.5	3.7	0.30	720	Silydianin
5	7.050	273.249	24.825	43.3	46.7	0.30	604	Silybinin
6	7.267	196.626	13.669	33.2	34.4	0.25	845	Silybinin
7	7.917	4.928	0.236	0.9	0.6	0.25	1090	Isosilybinin A
8	8.367	18.861	1.630	2.3	1.9	0.25	949	Isosilybinin B
9	11.217	26.605	0.579	3.5	1.1	0.62	934	2,3-Dihydroisobavicol
Total		962.120	52.269	100.0	100.0			

Konikrom Plus - Chromatography station

www.konikrom.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_1oct2025\Silymarin_30oct2021_P_30ppm.PRM File Created : 18/10/2025 06:07:32 p.m.
 Origin : Acquired, Acquisition started 03/11/2021 07:22:59 p.m. Acquired Date : 03/11/2021 07:28:13 p.m.
 Project : C:\Konikrom Plus\Project\Work.LPRD By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : Modified Printed Date : 18/10/2025 06:06:50 p.m.
 Report Style : C:\Konikrom Plus\Common\Chromatogram.rpt By : Administrator
 Calibration File : None

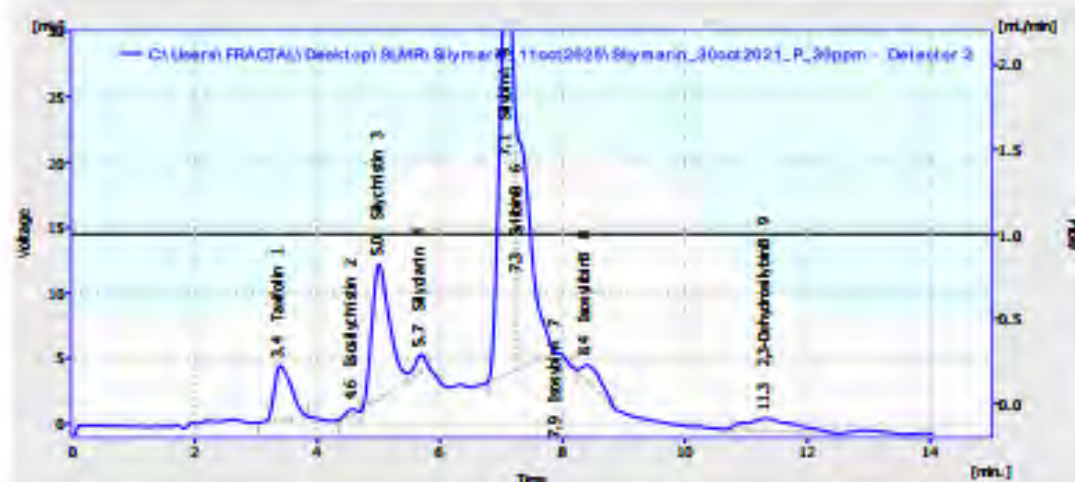
Sample Info:

Sample ID : Silymarin_30oct2021 Amount : 1
 Sample : Silybum marianum_1-Insuetra_01_1-4 ISTD Amount : 1
 Inj. Volume [ml] : 0.00 Dilution : 1

Method : Silymarin_30oct2021 By : Administrator
 Description : Silymarin_30oct2021
 Created : 12/08/2021 12:06 a.m. Modified : 18/10/2025 06:06 p.m.
 Column : Nucleosil 100 C18 S (4.0 x 250mm) Detection : 254, 267, 300, 360nm
 Mobile Phase : Grad:H2O+HCOOH(70-30):H2OH(20-70) Temperature : 30°C
 Flow Rate : 0.7ml/min Pressure : 0 - 40 MPa
 Note : Patrones: Silymarin-SLMR/ Patrones y muestras degradado-Hex, purga tramp, Extrac.MeOH, agit. sonic, centrif, 0,40mic. Soluciones
 Brinde de 2, 6 y 12 ppm en PH. Muestras aprox. 6 ppm en FPL

Autosetup : None External Start : Start - Restart, Down
 Detector 2 : Detector 2 Range 2 : Bipolar, 1000 mV, 1 Samp. per Sec.
 Subtraction Chromatogram : (None) Matching : No Change

Base : Not Used Calibration File : None Calculation : Uncal
 Scale Factor : Not Used Units After Scaling : Not Used Uncal. Response : 0
 Unintegrated Time : 0.00 min Column Length : 50.00 mm Column Calc. : From Width at 50% of Height
 Result Table Reports : All Peaks Hide ISTD Peak : Enabled



Result Table (Uncal - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_1oct2025\Silymarin_30oct2021_P_30ppm.PRM)

	Reten. Time [min]	Area [mV]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [%]	Compound Name
1	3.400	76.869	4.140	6.4	5.9	0.33	807	Taxifolin
2	4.583	4.401	0.383	0.4	0.5	0.32	805	Isosilychristin
3	5.017	202.644	10.347	17.0	34.6	0.35	809	Silychristin
4	5.700	16.765	1.288	1.4	1.9	0.30	877	Silydianin
5	7.100	906.937	34.277	42.4	48.9	0.28	716	Silybin
6	7.263	266.380	17.528	25.1	25.0	0.32	663	Sy Bin A
7	7.917	1.067	0.089	0.3	0.1	0.33	949	Isosilybin A
8	8.400	30.121	1.135	2.5	1.6	0.32	948	Isosilybin B
9	11.313	53.128	0.853	4.4	1.4	1.00	980	2,3-Dihydroisochlorogenic acid
Total		1195.401	70.658	100.0	100.0			

Konikrom Plus - Chromatography station

www.konikgroup.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2025_M_9PRH File Created : 18/10/2025 08:05:28 p.m.
 Origin : Acquired, Acquisition started 03/11/2021 08:16:05 p.m. Acquired Date : 03/11/2021 08:27:55 p.m.
 Project : C:\Konikrom Plus\Project\Isoni.LPR By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : Modified Printed Date : 18/10/2025 08:25:28 p.m.
 Report Style : C:\Konikrom Plus\Common\Chromatogram.rpt By : Administrator
 Calibration File : None

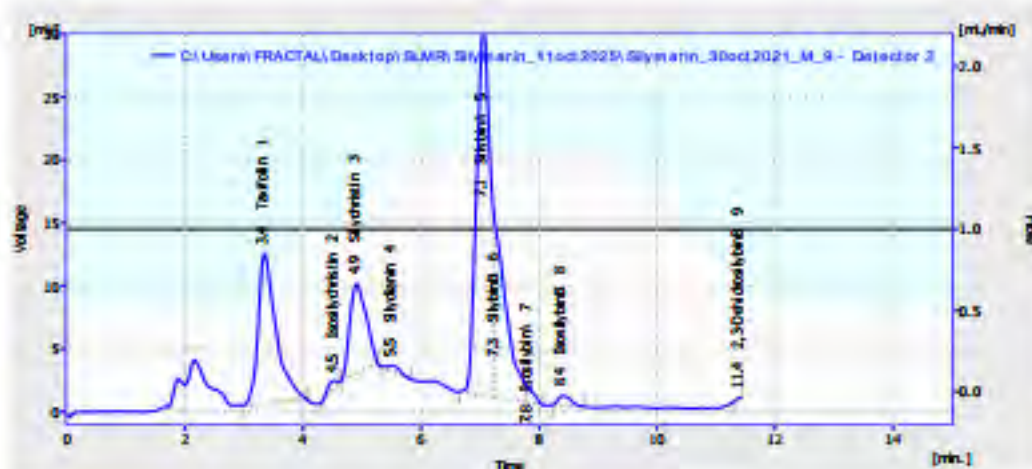
Sample Info:

Sample ID : Silymarin_30oct2025 Amount : 1
 Sample : Silybum marianum_1-muestra_01_14 ISTD Amount : 1
 Inj. Volume [mL] : 0.02 Dilution : 1

Method : Silymarin_30oct2025 By : Administrator
 Description : Silymarin_30oct2025
 Created : 13/08/2021 12:06 a.m. Modified : 18/10/2025 08:25 p.m.
 Column : Nucleod 100 C18 S (4.00 x 250)mm Direction : 254, 200, 200, 250mm
 Mobile Phase : Grad:H2O-HCOOH(70-30)/H2OH(30-70) Temperature : 30°C
 Flow Rate : 0.1mL/min Pressure : 0 - 40 MPa
 Note : Patron: Silymarin-SLMR/ Patrones y muestras degradado-Hsu, purga tramp, Extrac-H2OH, agit. sonic, centrif, 0,45mic. Soluciones finales de 3, 6 y 12ppm en FM. Muestras aprox. 6 ppm en FM.

Autosap : None External Start : Start - Restart, Down
 Detector 2 : Detector 2 Range 2 : Bipolar, 1000 mV, 1 Samp. per Sec.
 Subtraction Chromatogram : (None) Matching : No Change

Base : Not Used Calibration File : None Calculation : Uncal
 Scale Factor : Not Used Units After Scaling : Not Used Uncal. Response : 0
 Unretained Time : 0.00 min Column Length : 50.00 mm Column Calc. : From Width at 50% of Height
 Result Table Reports : All Peaks Hide ISTD Peak : Enabled



Result Table (Uncal - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2025_M_9 - Detector 2)

1	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [%]	Compound Name
1	3.269	246.686	11.140	22.8	18.3	0.10	622	Tauridin
2	4.023	6.851	0.588	0.6	0.9	0.18	981	Isoalychristin
3	4.917	134.258	7.045	12.3	18.9	0.17	989	Silychristin
4	6.517	7.005	0.463	0.6	0.7	0.18	857	Silydianin
5	7.050	458.242	24.524	41.9	45.5	0.10	594	SilybinA
6	7.567	213.404	13.360	19.5	20.6	0.10	857	SilybinB
7	7.567	11.018	1.191	1.1	1.8	0.15	1000	IsoalychristinA
8	8.400	11.482	0.764	1.1	1.2	0.25	1000	IsoalychristinB
9	11.417	6.389	0.672	0.9	0.1	0.07	690	3,3'-Dihydroisochristin
	Total	1001.313	64.600	100.0	100.0			

Konikrom Plus - Chromatography station

www.konik-group.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2021_M_10.PRN File Created : 18/10/2025 06:05:20 p.m.
 Origin : Acquired, Acquisition started 03/11/2021 08:32:36 p.m. Acquired Date : 03/11/2021 08:46:53 p.m.
 Project : C:\Konikrom Plus\Projects\Istec LPR3 By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : Modified Printed Date : 18/10/2025 06:18:27 p.m.
 Report Style : C:\Konikrom Plus\Common\Chromatograms.rpt By : Administrator
 Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Silymarin_30oct2021 Amount : 1
 Sample : Silybum marianum_H-muestras_01_14 ISTD Amount : 1
 Inj. Volume (ml) : 0.02 Dilution : 1

Method:

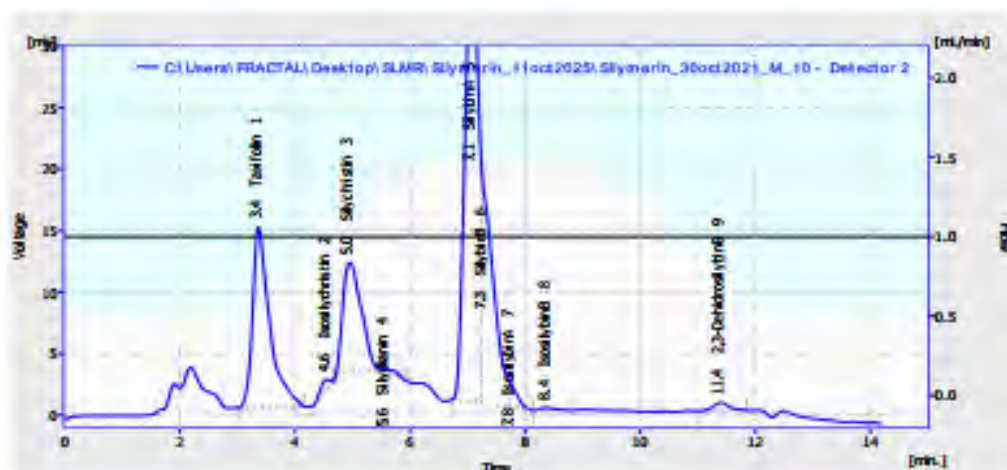
Method : Silymarin_30oct2021 By : Administrator
 Description : Silymarin_30oct2021
 Created : 12/08/2021 12:06 a.m. Modified : 18/10/2025 06:18 p.m.
 Column : Nucleosil 100 C18 5 (4.26 x 250mm) Detection : 254, 267, 300, 320nm
 Mobile Phase : Gradient-H₂O/MeOH(70-30):MeOH(30-70) Temperature : 30°C
 Flow Rate : 0.8ml/min Pressure : 0 - 40 MPa
 Note : Patron: Silymarin-SLMR Patrones y muestras degradado-Hav, purga tramp, Extrac.MeOH, agit. sonik, centrif. 0,45mic. Soluciones
 Bules de 3, 6 y 10ppm en FM. Muestras aprox. 6 ppm en FM.

Autosap:

Autosap : None External Start : Start - Restart, Down
 Detector 2 : Detector 2 Range 2 : Bipolar, 5000 mv, 1 Samp. per Sec.
 Subtraction Chromatogram : (None) Hatching : No Change

Base:

Base : Not Used Calibration File : None Calculation : Uncal
 Scale Factor : Not Used Units After Scaling : Not Used Uncal. Response : 0
 Unintegrated Time : 0.00 min Column Length : 50.00 mm Column Calc. : From Width at 90% of Height
 Result Table Reports : All Peaks Hide ISTD Peak : Enabled



Result Table (Uncal - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2021_M_10 - Detector 2)

	Reten. Time [min.]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min.]	Peak Purity [-]	Compound Name
1	3.367	202.036	14.663	21.2	17.4	0.30	602	Taxifolin
2	4.593	8.889	0.811	0.6	1.0	0.39	980	Isosilybin
3	4.950	194.034	8.889	13.6	10.6	0.40	995	Silybin
4	5.967	3.923	0.364	0.2	0.1	0.56	768	Silybin
5	7.067	593.872	26.095	41.8	46.4	0.30	719	Silybin
6	7.267	282.144	17.845	19.8	21.2	0.35	790	Silybin
7	7.793	25.412	1.946	1.4	2.3	0.15	1000	Isosilybin A
8	8.363	1.262	0.202	0.3	0.3	0.33	1000	Isosilybin B
9	11.400	12.008	0.607	0.3	0.8	0.38	999	2,3-Dihydroisobav
Total		1421.620	84.203	100.0	100.0			

Konikrom Plus - Chromatography station

www.konikgroup.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLHR\Silymarin_11oct2005\Silymarin_30oct2001_M_11.PRM File Created : 18/10/2005 06:05:20 p.m.
 Origin : Acquired, Acquisition started 03/11/2001 06:40:49 p.m. Acquired Date : 03/11/2001 06:03:09 p.m.
 Project : C:\Konikrom Plus\Project\Work LP02 By : Administrator

Printed version Info:

Printed version : Modified Printed Date : 18/10/2005 06:27:36 p.m.
 Report Style : C:\Konikrom Plus\Common\Chromatogram.rpt By : Administrator
 Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Silymarin_30oct2001 Amount : 1
 Sample : Silybum marianum_1 muestra tras 01_14 ISTD Amount : 1
 Inj. volume [mL] : 0.02 Dilution : 1

Method:

Method : Silymarin_30oct2001 By : Administrator
 Description : Silymarin_30oct2001
 Created : 12/08/2001 12:06 a.m. Modified : 18/10/2005 06:27 p.m.

Column:

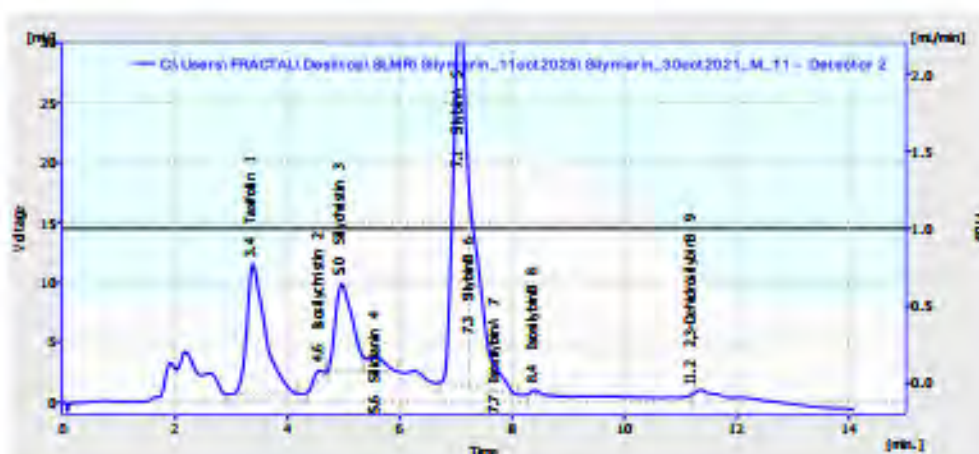
Column : Hacholol 100 C18 S (4.00 x 250)mm Detection : 254, 267, 305, 350nm
 Mobile Phase : Gradient H₂O-CH₃COOH(70-30)-MeOH(20-70) Temperature : 30°C
 Flow Rate : 0.1mL/min Pressure : 0 - 40 MPa
 Note : Patrones Silymarin-SLHR// Patrones y muestras desgrasados-Hen, purga tramp, Extrac-MeOH, agit. sonic, control, 6/45min. Soluciones finales de 2, 6 y 12ppm en FPL. Muestras aprrox. 6 ppm en FPL.

Autosap:

Autosap : None External Start : Start - Restart, Down
 Detector 2 : Detector 2 Range 2 : Bipolar, 1000 mV, 1 Samp. per Sec.
 Subtraction Chromatogram : (None) Hatching : No Change

Base:

Base : Not Used Calibration File : None Calculation : Uncal
 Scale Factor : Not Used Units After Scaling : Not Used Uncal. Response : 0
 Unresolved Time : 0.00 min Column Length : 50.00 mm Column Calc. : From Width at 50% of Height
 Result Table Reports : All Peaks Hide ISTD Peak : Enabled



Result Table (Uncal - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLHR\Silymarin_11oct2005\Silymarin_30oct2001_M_11 - Detector 2)

	Reten. Time [min]	Area [mV.A]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [%]	Compound Name
1	3.360	246.195	10.940	20.8	15.6	6.23	995	Taurolin
2	4.580	6.255	0.718	0.7	1.0	6.23	990	Isochrysin
3	4.967	152.429	7.232	12.8	10.4	6.27	986	Silychrisin
4	5.593	28.291	1.182	2.4	1.7	6.40	723	Silicinin
5	7.067	491.767	32.403	41.7	46.7	6.30	653	Silybin
6	7.267	225.247	14.623	19.3	21.1	6.23	874	Silybin
7	7.717	22.640	1.075	2.8	2.8	6.18	1000	Isochrysin
8	8.400	4.280	0.390	0.4	0.6	6.18	1000	Isochrysin
9	11.217	0.848	0.023	0.0	0.0	6.03	1000	2,3-Dihydroisobutyl
Total		1156.499	69.372	100.0	100.0			

Konikrom Plus - Chromatography station

www.konik-group.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2021_M_12.PRN File Created : 18/10/2025 08:05:31 p.m.
 Origin : Acquired, Acquisition started 03/11/2021 07:58:57 p.m. Acquired Date : 03/11/2021 08:12:23 p.m.
 Project : C:\Konikrom Plus\Project\Work.LPR3 By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : Modified Printed Date : 18/10/2025 08:28:13 p.m.
 Report Style : C:\Konikrom Plus\Common\Chromatogram.rpt By : Administrator
 Calibration File : None

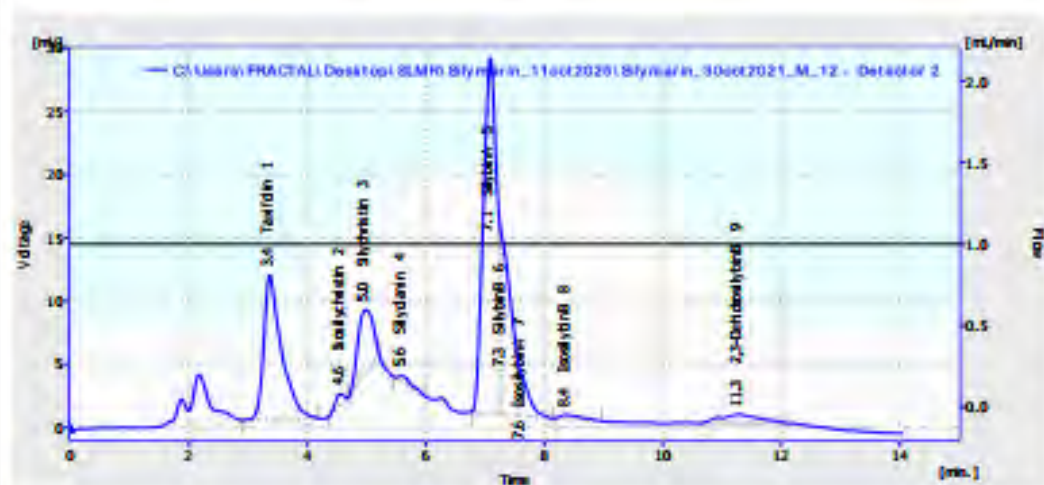
Sample Info:

Sample ID : Silymarin_30oct2021 Amount : 1
 Sample : Silybum marianum_3-muestral_01_M ISTD Amount : 1
 Inj. volume [mL] : 0.02 Dilution : 1

Method : Silymarin_30oct2021 By : Administrator
 Description : Silymarin_30oct2021
 Created : 13/08/2021 12:05 a.m. Modified : 18/10/2025 08:28 p.m.
 Column : Nucleosil 100 C18 S (4,60 x 250)mm Detection : 254, 287, 300, 320nm
 Mobile Phase : Gradient H₂O-CH₃COOH(70-30)MeOH(30-70) Temperature : 30°C
 Flow Rate : 0.8mL/min Pressure : 0 - 40 MPa
 Note : Patron: Silymarin-SLMR// Patrones y muestras de grado-His, purga Inmp, Extrac.H₂O/H, agt. acic, cmtf, Silybinc. Soluciones: Iniales de 3, 6 y 12ppm en FHL. Muestras aprox. 6 ppm en FHL.

Autosap : None External Start : Start - Restart, Down
 Detector 2 : Detector 2 Range 2 : Bipolar, 1000 mV, 1 Samp. per Sec.
 Subtraction Chromatogram : (None) Hatching : No Change

Scan : Not Used Calibration File : None Calculation : Uncal
 Scale Factor : Not Used Units After Scaling : Not Used Uncal. Response : 0
 Unrelated Time : 9.00 min Column Length : 50.00 mm Column Calc. : From Width at 50% of Height
 Result Table Reports : All Peaks Hide ISTD Peak : Enabled



Result Table (Detector - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2021_M_12 - Detector 2)

	Retent. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [%]	Compound Name
1	3.367	205.602	11.404	22.7	17.8	0.30	794	Taxifolin
2	4.507	7.609	0.808	0.8	1.3	0.30	646	Isosilybin
3	4.980	65.380	4.962	8.3	7.8	0.30	675	Silybin
4	5.000	6.525	0.510	0.9	0.8	0.30	752	Silybin
5	7.080	407.660	28.122	41.7	44.0	0.30	636	Silybin
6	7.290	100.603	13.811	16.7	21.8	0.30	611	Silybin
7	7.617	37.600	3.267	3.6	5.0	0.17	680	Isosilybin
8	8.367	8.762	0.700	0.9	0.5	0.35	1000	Isosilybin
9	11.200	31.780	0.684	3.8	1.1	0.65	660	2,3-Dihydroisobiflavin
	Total	1037.583	62.958	100.0	100.0			

Konikrom Plus - Chromatography station

www.konik-group.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2025_M_13.PRN File Created : 18/10/2025 08:06:20 p.m.
 Origin : Acquired, Acquisition started 09/11/2025 08:22:04 p.m. Acquired Date : 09/11/2025 08:26:26 p.m.
 Project : C:\Konikrom Plus\Projects\Ivork LPRD By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : Modified Printed Date : 18/10/2025 08:29:15 p.m.
 Report Style : C:\Konikrom Plus\Common\Chromatogram.rpt By : Administrator
 Calibration File : None

Sample Info:

Sample ID : Silymarin_30oct2025 Amount : 1
 Sample : Silybum marianum_14muextrac_05_M4 ISTD Amount : 1
 Inj. Volume [mL] : 0.00 Dilution : 1

Method : Silymarin_30oct2025

By : Administrator

Description : Silymarin_30oct2025

Modified : 18/10/2025 08:28 p.m.

Created : 13/08/2025 12:06 a.m.

Column : Nucleosil 100 C18 5 (4.00 x 250)mm

Detection : 254, 267, 303, 350nm

Mobile Phase : Gradient H₂O-HCOOH(70-30)-MeOH(30-70)

Temperature : 30°C

Flow Rate : 1.0[mL/min]

Pressure : 0 - 40 MPa

Note : Patrons: Silymarin-SLMR y Patrones y muestras degradados-Hex, purga tramp, Extrac.MeOH, agf. sonic, centrif, 0,45mic. Soluciones
 Builes de 3, 5 y 10ppm en FHL. Huestras aprox. 6ppm en FHL.

Autosetup : None

External Start : Start - Restart, Down

Detector 2 : Detector 2

Range 2 : Bipolar, 1000 mV, 1 Samp. per Sec.

Subtraction Chromatogram : (None)

Matching : No Change

Base : Not Used

Calibration File : None

Calculation : Uncal

Scale Factor : Not Used

Units After Scaling : Not Used

Uncal. Response : 0

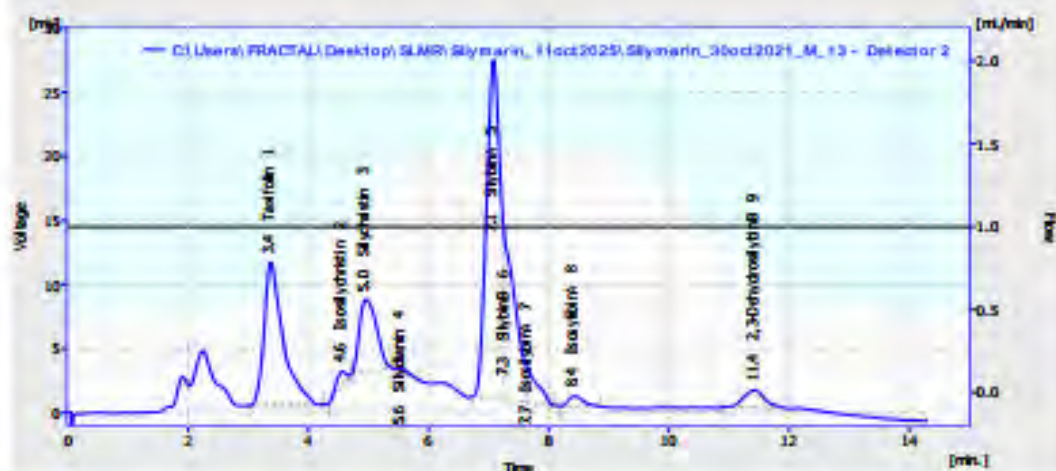
Unretained Time : 0.00 min

Column Length : 50.00 mm

Column Calc. : From Width at 50% of Height

Result Table Reports : All Peaks

Hide ISTD Peak : Enabled



Result Table (Uncal - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2025_M_13 - Detector 2)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	WDS [min]	Peak Purity [%]	Compound Name
1	3.263	245.307	11.110	23.5	18.2	0.33	800	Testolol
2	4.927	12.620	1.185	1.2	1.9	0.33	952	Isosilychristin
3	4.972	109.885	5.579	10.5	9.1	0.33	989	Silychristin
4	5.590	4.406	0.281	0.4	0.5	0.33	800	Silydianin
5	7.032	410.892	26.402	39.3	43.2	0.30	996	Silybinin
6	7.230	186.244	12.002	17.3	19.6	0.25	909	Silybinin
7	7.527	24.926	2.442	2.3	4.0	0.22	999	Isosilybin A
8	8.433	13.279	0.766	1.3	1.3	0.28	1000	Isosilybin A
9	11.433	21.568	1.367	2.3	2.2	0.38	998	2,3-Dihydroxyisobutyl
Total		1044.766	66.394	100.0	100.0			

Konikrom Plus - Chromatography station

www.konik-group.com

Chromatogram Info:

File Name : C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2025_M_14.PRN File Created : 18/10/2025 08:08:28 p.m.
 Origin : Acquired, Acquisition started 03/11/2025 08:38:15 p.m. Acquired Date : 03/11/2025 08:52:11 p.m.
 Project : C:\Konikrom Plus\Project\Ilori.LPRJ By : Administrator

Printed Version Info:

Printed Version : 18/10/2025 08:08:08 p.m. Printed Date : 18/10/2025 08:23:17 p.m.
 Report Style : C:\Konikrom Plus\Common\Chromatogram.rpt By : Administrator
 Calibration File : None

Sample Info:

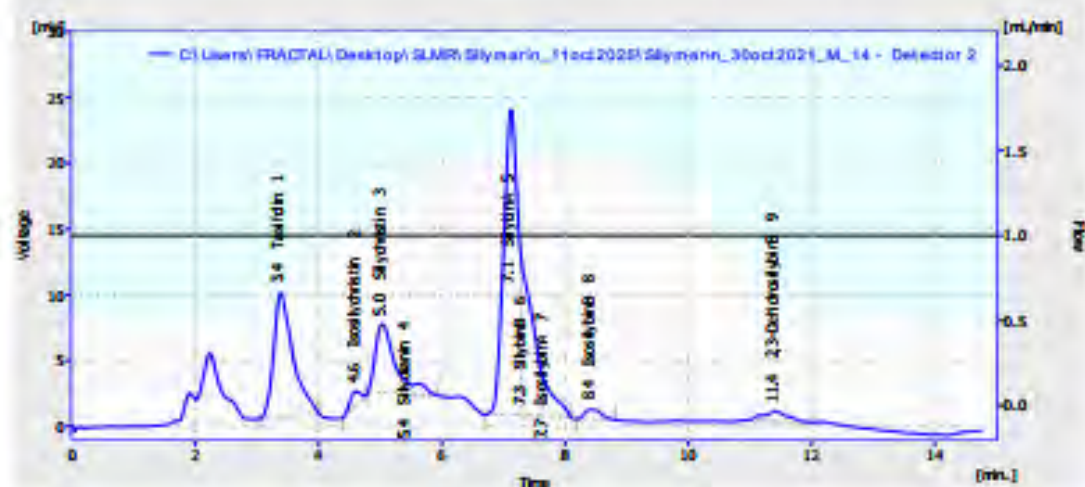
Sample ID : Silymarin_30oct2025 Amount : 1
 Sample : Silybum marianum_14muestras_01_14 ISTD Amount : 1
 Inj. Volume [ml] : 0.00 Dilution : 1

Method : Silymarin_30oct2025 By : Administrator
 Description : Silymarin_30oct2025
 Created : 13/08/2025 12:06 a.m. Modified : 18/10/2025 08:05 p.m.

Column : Nucleosil 100 C18 S (4.00 x 250)mm Direction : 254, 267, 300, 250nm
 Mobile Phase : Gradient 30-100% MeOH (20-70) Temperature : 30°C
 Flow Rate : 0.8 ml/min Pressure : 0 - 40 MPa
 Note : Patronec Silymarin-SLMR y Patronec y muestras degradado-Hex, purga tramp, Extrac.MeOH, agit. sonik, centrif, 0.46mic. Soluciones finales de 3, 6 y 12 ppm en FM. Muestras aprox. 6 ppm en FM.

Autosetup : None External Start : Start - Restart, Down
 Detector 2 : Detector 2 Range 2 : Bipolar, 1000 mV, 1 Samp. per Sec.
 Subtraction Chromatogram : (None) Hatching : No Change

Base : Not Used Calibration File : None Calculation : Uncal
 Scale Factor : Not Used Units After Scaling : Not Used Uncal. Response : 0
 Unretained Time : 0.00 min Column Length : 50.00 mm Column Calc. : From Width at 50% of Height
 Result Table Reports : All Peaks Hide ISTD Peak : Enabled



Result Table (Uncal - C:\Users\FRACTAL\Desktop\SLMR\Silymarin_11oct2025\Silymarin_30oct2025_M_14 - Detector 2)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [%]	Compound Name
1	3.380	202.306	9.436	21.9	17.2	0.33	918	Tachidin
2	4.617	11.407	0.994	1.3	1.8	0.25	980	Isochrysin
3	5.033	101.969	5.239	11.9	9.5	0.30	991	Silybinin
4	5.403	18.463	0.966	2.0	1.8	0.33	711	Silybinin
5	7.117	268.917	23.211	38.7	42.3	0.30	496	Silybinin
6	7.317	168.304	10.916	17.3	19.9	0.25	967	Silybinin
7	7.693	27.526	2.541	4.8	4.6	0.23	999	Isochrysin
8	8.403	14.002	0.752	1.5	1.4	0.30	1000	Isochrysin
9	11.417	21.095	0.693	2.4	1.5	0.48	998	2,3-Dihydroisobutyl
Total		927.997	54.846	100.0	100.0			