



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

Biología experimental

**Uso de *barcodes* para el control de calidad de especies
selectas del complejo árnica**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JONATHAN ÁLVAREZ ÁLVAREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Sol Cristians Niizawa

JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Rosalinda Tapia López

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Mariana Vallejo Ramos

JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

Biología experimental

**Uso de *barcodes* para el control de calidad de especies
selectas del complejo *árnica***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JONATHAN ÁLVAREZ ÁLVAREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Sol Cristians Niizawa
JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Rosalinda Tapia López
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Mariana Vallejo Ramos
JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., FEBRERO, 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
OFICIO: CGEP/CPCB/IB /0941/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de octubre de 2023 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de BIOLOGÍA EXPERIMENTAL del estudiante ÁLVAREZ ÁLVAREZ JONATHAN con número de cuenta 312102209 con la tesis titulada "Uso de barcodes para el control de calidad de especies selectas del complejo árnica", realizada bajo la dirección del DR. SOL CRISTIANS NIIZAWA, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. RICARDO REYES CHILPA
Vocal: DR. LEONARDO ALEJANDRO BELTRÁN RODRÍGUEZ
Vocal: DR. LEONARDO OSVALDO ALVARADO CÁRDENAS
Vocal: DRA. ANDREA MARTÍNEZ BALLESTÉ
Secretaria: DRA. ROSALINDA TAPIA LÓPEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de noviembre de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/RGA/EARR/rga

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de continuar mi formación académica, así como mi desarrollo personal.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por el apoyo económico que me otorgó mediante la beca para estudios de maestría, la cual fue indispensable para mi estancia en el programa de posgrado.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA, UNAM, por el apoyo económico al proyecto IA202920 “Estudio molecular de complejos selectos de plantas medicinales enfocado a su control de calidad”, que financió parte de este proyecto y permitió concluirlo durante el período de obtención de grado.

A mi tutor principal, el Dr. Sol Cristians Niizawa, por su asesoría a lo largo de este proceso, quien guió este proyecto de tesis con compromiso y dedicación, resolviendo mis dudas tanto en términos teóricos como prácticos. Agradezco el tiempo brindado y la paciencia para poder concluir esta tesis en tiempo y forma.

A la Dra. Rosalinda Tapia López, miembro del comité tutorial, por su asesoría y observaciones hacia el desarrollo experimental y los conceptos de Biología molecular utilizados y requeridos para el desarrollo de este estudio.

A la Dra. Mariana Vallejo Ramos, miembro del comité tutorial, por su asesoría y observaciones sobre los conceptos y desarrollo experimental en la parte etnobotánica de este estudio.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Herbario Nacional (MEXU) y a los técnicos, curadores y encargados por el trabajo que realizan manteniendo a esta colección, fuente valiosa de información sobre los taxones vegetales que se recolectan a lo largo de todo el país, asimismo, agradezco el permiso para tomar muestras de ejemplares herborizados, individuos muy importantes para el desarrollo de este estudio.

A la Dra. Lidia Irene Cabrera Martínez, responsable del Laboratorio de Biología Molecular (Laboratorio Nacional de Biodiversidad del Instituto de Biología, UNAM), por su asesoría en el uso del equipo de laboratorio disponible para la extracción de DNA.

A la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdemar y la M. en C. Nelly María López Ortiz del Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud (LaNaBio) del Instituto de Biología, UNAM por el apoyo técnico en la secuenciación de DNA.

A los miembros del jurado, investigadores que revisaron este trabajo y realizaron aportes importantes para la apropiada conclusión de este trabajo.

A mi familia. Mi madre, María Luisa, una persona ejemplar que siempre forma parte de mi desarrollo personal y me motiva a ser la mejor versión de mí mismo. Mis hermanos, Carlos y Gustavo, personas que siempre han visto por mi bienestar, que apoyan mis decisiones y me motivaron a continuar mi formación académica. A mi padre, José Ignacio, quien mostró interés en que he hecho con mi vida y quien a su modo, mostró su apoyo incondicional ante mis decisiones, un abrazo hasta el cielo.

A mis amistades, personas con quienes he pasado buenos y malos momentos, con quienes quiero y espero seguir compartiendo charlas, opiniones, juegos y comidas: Joel, Ayala, Melo, Adri, Josa, Bryan, Gaby y Lalo. Por último, agradezco todo el apoyo de mi piquita chiciosa, Mariana Espinoza, mi siempre presente pilar, razón de mis alegrías y algunas tristezas, pero sobre eso, la llama que no permite que mi brillo se apague; deseo de todo corazón un mayor éxito en tu vida, mi apoyo siempre estará contigo.

Índice general

| | |
|--|----|
| Resumen | 1 |
| Abstract | 2 |
| Introducción | 3 |
| Antecedentes | 4 |
| <i>El complejo árnica</i> | 4 |
| <i>Usos de las especies del complejo árnica</i> | 4 |
| <i>Criterios para la identificación del material vegetal comercializado</i> | 9 |
| <i>DNA Barcoding</i> | 9 |
| <i>Marcadores moleculares</i> | 10 |
| <i>Capacidad discriminativa</i> | 11 |
| <i>Polémicas sobre el uso de barcodes</i> | 12 |
| Justificación | 14 |
| Hipótesis | 14 |
| Objetivo general | 14 |
| Metodología | 15 |
| Colecta de individuos en Jardín Etnobiológico..... | 15 |
| Obtención de individuos de herbario | 15 |
| Obtención de las muestras comerciales | 15 |
| Extracción de DNA..... | 15 |
| Amplificación de los marcadores..... | 16 |
| Secuenciación y elaboración de secuencias consenso | 16 |
| Evaluación de la capacidad discriminativa | 16 |
| Resultados | 18 |
| Obtención de las muestras de estudio del complejo árnica | 18 |
| Extracción de DNA..... | 19 |
| Amplificación de los marcadores moleculares | 21 |
| Generación de las secuencias consenso | 23 |
| Evaluación de la capacidad discriminativa por árboles filogenéticos..... | 23 |
| Evaluación de la capacidad discriminativa por análisis de distancia del código de barras | 27 |
| Discusión | 30 |
| Especies comercializadas bajo el nombre común “árnica”..... | 30 |
| Extracción de DNA..... | 31 |
| Amplificación y secuenciación | 33 |

| | |
|--|----|
| Selección de marcadores moleculares..... | 33 |
| Conclusiones | 35 |
| Referencias Bibliográficas | 36 |
| Anexos | 39 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Plantas del complejo árnica utilizadas en este estudio..... | 18 |
| Figura 2. Amplicones de los marcadores | 22 |
| Figura 3. Árbol inferido mediante el método de Máxima verosimilitud del marcador <i>rbcL</i> | 25 |
| Figura 4. Árbol inferido mediante el método de Máxima verosimilitud del espaciador <i>ITS2</i> | 26 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Las 58 especies conocidas como “árnica” en México... .. | 5 |
| Tabla 2. Los siete problemas al realizar investigaciones basadas en el uso de códigos de barras ... | 13 |
| Tabla 3. Condiciones del termociclador | 16 |
| Tabla 4. Muestras del complejo árnica utilizadas en este estudio | 19 |
| Tabla 5. Resultados de la espectrofotometría de DNA de las muestras obtenidas del Herbario Nacional..... | 19 |
| Tabla 6. Resultados de la espectrofotometría de DNA de las muestras colectadas de Jardín Etnobiológico..... | 20 |
| Tabla 7. Resultados de la espectrofotometría de DNA de las muestras obtenidas por medio del comercio. | 20 |
| Tabla 8. Eficacia de cada uno de los marcadores moleculares..... | 23 |
| Tabla 9. Particiones de los marcadores <i>rbcL</i> e <i>ITS2</i> de acuerdo con los rangos de P utilizados mediante el método ABGD | 27 |

Resumen

Las plantas medicinales son un recurso sumamente importante, pues son la primera opción para el cuidado de la salud de numerosos sectores poblacionales. Muchas especies diferentes usadas de forma terapéutica coinciden en cualidades medicinales, morfológicas y organolépticas, lo que da lugar a la clasificación en grupos artificiales conocidos como “complejos etnobotánicos”.

En México destaca un grupo denominado “complejo árnica”, donde se clasifican plantas reconocidas por sus propiedades astringentes y antiinflamatorias. Dado su vasto registro de especies, es necesaria su regulación dentro de un creciente mercado que requiere herramientas que otorguen una precisa y rápida identificación, por lo que el objetivo de este trabajo es generar códigos de barras como método discriminativo entre distintas especies del complejo “Árnica” y aplicarlos en plantas comercializadas bajo este nombre común, con intención de integrar esta herramienta al control de calidad del grupo.

Se colectó material foliar de diez individuos de las especies *Arnica montana*, *Heterotheca inuloides*, *Galphimia glauca* y *Oenothera rosea* que fueron adquiridos en el Herbario Nacional (MEXU) y la sección etnobiológica del Jardín Botánico de la UNAM. Se extrajo el DNA y se realizó la amplificación mediante PCR de los marcadores *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* e *ITS2* para su secuenciación, alineamiento y evaluación de la capacidad discriminativa mediante análisis filogenéticos por máxima verosimilitud y métodos de distancia del código de barras (*Barcoding gap*). Posteriormente, se adquirieron plantas de “árnica” en el mercado de Sonora y se aplicó el mismo método para identificar las relaciones de estas plantas con las especies previamente identificadas.

Por medio del estudio de mercado se reconoció que *G. glauca* y *A. montana* no son comunes en cuanto a su comercialización, no obstante, se encontraron dos especies que no figuraban como “árnicas” en registros previos: *Cuphea aequipetala* y *Chrysactinia mexicana*. Posteriormente, la extracción de DNA evidenció mayor dificultad en muestras de herbario, especímenes que en su totalidad se componen de material foliar seco y cuya colecta dista de al menos cinco años previos a este estudio, mientras que los especímenes frescos provenientes del Jardín Etnobiológico y de mercado presentaron una mejor eficiencia tanto en extracción como amplificación.

El marcador *matK* presentó problemas durante la amplificación, esto debido a que no es apto como un marcador universal y depende de condiciones específicas para cada especie, en tanto que los espaciadores *psbA-trnH* y *rpl32-trnL* presentaron problemas a lo largo de la secuenciación y por lo tanto, hubo dificultad para establecer secuencias consenso, motivo por el cual, *rbcL* e *ITS2* fueron los marcadores elegidos para resolver problemas de identidad. En estos marcadores, las medidas de apoyo de las filogenias son suficientes para distinguir familias y especies, mientras que el método de distancia de códigos de barras puede distinguir especies, lo cual es un avance significativo en la discriminación de especies por códigos de barras dentro de este complejo etnobotánico.

Abstract

Medicinal plants are an extremely important resource, as they are the first option for health care of numerous population sectors. Many different species used therapeutically coincide in medicinal, morphological and organoleptic qualities, which gives rise to the classification into artificial groups known as “ethnobotanical complexes.”

In Mexico, a group called “arnica complex” stands out, where plants recognized for their astringent and anti-inflammatory properties are classified. Due to its extensive species record, the regulation is necessary within a growing market that requires tools that provide precise and rapid identification, so the objective of this work is to generate barcodes as a discriminative method between different species of the “Arnica” complex. ” and apply them in plants marketed under this common name, with the intention of integrating this tool into the quality control of this group.

Leaf material was collected from ten individuals of the species *Arnica montana*, *Heterotheca inuloides*, *Galphimia glauca* and *Oenothera rosea* that were acquired at the Herbario Nacional (MEXU) and the ethnobiological section at Jardín Botánico de la UNAM. DNA was extracted and PCR amplification of the markers *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *rpl32-trnL* and *ITS2* was carried out for sequencing, alignment and evaluation of the discriminative capacity through phylogenetic analyzes by maximum likelihood and barcode distance methods (Barcoding gap). Subsequently, “arnica” plants were purchased in Mercado de Sonora and the same method was applied to identify the relationships of these plants with the species previously identified with the chosen markers.

Through the market study, it was recognized that *G. glauca* and *A. montana* are not common in terms of their commercialization, however, two species were found that did not appear as “arnica” in previous records: *Cuphea aequipetala* and *Chrysactinia mexicana*. Subsequently, DNA extraction showed greater difficulty in herbarium samples, specimens that are entirely composed of dry leaf material and whose collection was at least five years prior to this study, while fresh specimens from the ethnobiological garden and market presented better efficiency in both extraction and amplification.

The *matK* marker presented problems during amplification, because it is not suitable as a universal marker and depends on specific conditions for each species, while the spacers *psbA-trnH* and *rpl32-trnL* presented problems throughout the sequencing and therefore, there was difficulty in establishing consensus sequences, which is why *rbcL* and *ITS2* were the markers chosen to resolve identity problems. In these markers, supporting measures from phylogenies are sufficient to distinguish families and species, while the barcode distance method can distinguish species, which is a significant advance in barcoding species discrimination within this ethnobotanical complex.

Introducción

Actualmente, las plantas medicinales tienen gran importancia en la procuración de la salud, lo que capta la atención de instancias internacionales como la Organización Mundial de la Salud, que señala que el 80% de la población de países en desarrollo resuelve sus problemas de salud mediante la medicina tradicional (Aslam y Ahmad, 2016). Así mismo, las plantas medicinales representan una parte esencial de las costumbres y tradiciones de los pueblos y en el caso de México existe una gran herencia cultural enfocada hacia su colecta, cultivo y uso (Juárez-Rosete *et al.*, 2013); sin embargo, algunas especies se encuentran restringidas por las autoridades de salud debido a las características de compuestos activos que resultan ser contraproducentes para la salud, o bien, no cuentan con la identificación pertinente del material vegetal comercializado (CPFEUM, 2021), lo que hace notar la importancia del enfoque de control de calidad, dado el creciente mercado de venta de plantas medicinales que requiere de una precisa y rápida identificación (Cristians-Niizawa, 2020).

La identificación morfológica y química es, hoy en día, la forma más ampliamente utilizada para la identificación de especies por parte de diferentes farmacopeas y compendios de plantas medicinales de carácter internacional (FHEUM, 2021; OMS, 2007), además que los estudios fitoquímicos están enfocados en el avance del conocimiento respecto a los diferentes compuestos activos en los individuos de una especie (Heinrich y Anagnostou, 2017). De manera paralela, la aplicación de los fundamentos de biología molecular han logrado ser integrados a estas problemáticas para encontrar soluciones a la identificación y apoyar así al control de calidad y regulación en plantas antes de su llegada al punto de venta, lo cual se puede observar en métodos como los códigos de barra moleculares (DNA *barcodes*) que permiten utilizar secuencias cortas para discriminar rápida y eficientemente a las muestras de plantas que se comercializan en un rango amplio (Scotland *et al.*, 2003; Heinrich y Anagnostou, 2017)

Las especies comúnmente conocidas como árnica gozan de una amplia distribución comercial, lo cual las pone en un punto de mira respecto a su correcta y eficiente identificación, así como su regulación en el mercado, ya que en el caso del *Arnica montana* se derivan una gran cantidad de productos tópicos, sobre todo de las empresas Proquinat y Redsa, sin embargo, esta especie puede poner en riesgo la salud si se ingiere en forma de infusión (Rodríguez- Chávez *et al.*, 2017; Waizel-Bucay, 2014), por lo que el uso de códigos de barras moleculares representa una solución complementaria al control de calidad para la regulación y venta de estas especies, que puede dar un mayor soporte a la identificación morfológica y a las reacciones de identidad utilizadas por la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (Sharma *et al.*, 2012).

Por dichas razones, en este trabajo se pretende utilizar a los códigos de barra moleculares como herramienta para la adecuada discriminación e identificación de individuos de especies selectas de árnica colectadas en la Ciudad de muestras comerciales obtenidas en el mercado de Sonora.

Antecedentes

El complejo árnica

Los complejos etnobotánicos están compuestos por distintas especies que comparten características morfológicas, cualidades organolépticas y propiedades medicinales, las cuales se engloban a través de un mismo nombre común (Linares y Bye, 1987). En la medicina tradicional mexicana se emplean más de 3,000 especies de plantas, dentro de las cuales, al menos 58 de ellas, clasificadas en ocho familias, se conocen bajo el nombre común de “árnica” (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017).

El nombre común de este complejo deriva de varias plantas medicinales utilizadas en Europa, representadas por la especie *Arnica montana* L., ampliamente utilizada por sus propiedades como astringente, antiinflamatorio y estimulante del corazón y cuyo uso medicinal data desde el siglo XVI gracias a los trabajos de Petri Andreae (Waizel-Bucay y Cruz-Juárez, 2014). Posteriormente, el nombre de árnica se extendería a otras especies distribuidas de forma natural en México a lo largo del siglo XVIII lo que coincide con el momento en que las autoridades españolas promovieron el uso de *A. montana*, período en el que se reconoció el parecido morfológico y uso medicinal entre varias especies que se utilizaban con el fin de tratar las inflamaciones (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017). Las plantas reconocidas como árnica dentro del país suelen ser muy diferentes entre sí, ya que se clasifican dentro de diferentes géneros e incluso familias, no obstante, todas se reconocen bajo este nombre común debido a su uso común para el tratamiento de dolores musculares, así como en inflamaciones internas como en los casos de gastritis y úlceras (Waizel-Bucay y Cruz-Juárez, 2014).

En el caso particular de la Ciudad de México, destaca la venta y el uso de especies como el árnica mexicana (*Heterotheca inuloides* Cass.) árnica roja (*Galphimia glauca* Cav.) y árnica de raíz o hierba de golpe (*Oenothera rosea* L'Hér. ex Aiton), que comparten propiedades antiinflamatorias y analgésicas utilizadas como tratamiento en diversas afecciones dérmicas (Esquivel-García *et al.*, 2018), así mismo, destacan las investigaciones para el cultivo de *A. montana* y el uso de esta planta por hasta 39 empresas en México que se encargan de comercializar sus derivados en el país para la elaboración de cosméticos y tratamientos tópicos (Waizel Bucay y Cruz-Juárez, 2014), lo que hace evidente la importancia de poder identificarla de forma eficaz dado su riesgo al ser ingerida en forma de infusión, tal como se usa *H. inuloides*, la especie con mayor parecido morfológico (CPFEUM, 2021; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017).

Usos de las especies del complejo árnica

Las especies de este grupo son bien distinguidas por su empleo en la elaboración de medicamentos tópicos como pomadas, así como en su consumo en forma de infusiones (Waizel-Bucay y Cruz-

Juárez, 2014). La mayoría de estas especies se utilizan para atender inflamaciones externas e internas, aunque algunas especies también suelen ser utilizadas para tratar otros problemas relacionados con dolores internos, como puede ser el dolor de cabeza, los cólicos menstruales, dolores de estómago e incluso para tratar distintos tipos de cáncer (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017), lo que indica que la identidad de este complejo etnobotánico tiene una fuerte base debido a los usos tan similares a lo largo de las 58 especies registradas (Tabla 1).

Tabla 1. Tabla modificada de Rodríguez-Chávez *et al.* (2017) en la que se muestran las 58 especies conocidas como “árnica” en México y las ocho familias en las que se clasifican. Destaca su uso en el tratamiento contra dolores musculares e inflamaciones externas e internas, así como su forma de venta, la cual predomina como plantas frescas dado que la mayoría se colecta en sus respectivas áreas de distribución para su consumo y venta local.

| <i>Familia</i> | <i>Especie</i> | Uso medicinal | Forma de venta | <i>Referencia</i> |
|--------------------|---|--|-----------------------|---|
| Acanthaceae | <i>Carlowrightia cordifolia</i> A. Gray | Inflamación y antiséptico | Planta fresca | Cruz-Vega <i>et al.</i> , 2002 |
| Asteraceae | <i>Adenophyllum aurantium</i> (L.) Strother | Desórdenes intestinales | Planta fresca | Beltrán-Rodríguez <i>et al.</i> , 2014, Herrera-Martínez <i>et al.</i> , 2016 |
| | <i>Adenophyllum porophyllum</i> (Cav.) Hemsl. | Hemorroides, úlceras, problemas de riñón y dolores de estómago | Planta fresca | García, 2015 |
| | <i>Arnica montana</i> L. | Golpes, inflamación y artritis (uso externo) | Remedios tópicos | Secretaría de Salud, 2001; VanderJagt <i>et al.</i> , 2002 |
| | <i>Aster gymnocephalus</i> (DC.) A. Gray | Dolores gastrointestinales, dolores postparto, úlceras y heridas | Planta fresca y seca | Aguilar <i>et al.</i> , 1994; González <i>et al.</i> , 2004, INI, 1994 |
| | <i>Aster moranensis</i> Kunth | Dolor de estómago | Planta fresca | González <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>Aphanostephus ramosissimus</i> DC. | Hernias, inflamaciones musculares, hinchazón y dolor de cabeza. | Planta fresca | García, 2015 |
| | <i>Aster subulatus</i> (Michx.) hort. ex Michx. | Heridas | Planta fresca | Navarro and Avendaño, 2002. |
| | <i>Aster tanacetifolius</i> Kunth | Cólicos, presión arterial alta, colitis, gastritis | Planta fresca y seca | García, 2015; González <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>Astranthium orthopodum</i> (B.L.Rob. & Fernald) Larsen | Hemorragia postparto, cólicos, úlceras y problemas en la piel | Planta fresca | Bello-González <i>et al.</i> , 2015 |
| | <i>Bahia absinthifolia</i> Benth | Diarrea, heridas y granos | Planta fresca | Aguilar <i>et al.</i> , 1994 |
| | <i>Coreopsis mutica</i> DC. | Infecciones, heridas y dolores menstruales | Planta fresca | Sánchez-González <i>et al.</i> , 2008 |

| Familia | Especie | Uso medicinal | Forma de venta | Referencia |
|----------------|--|--|--|---|
| | <i>Dieteria canescens</i> (Pursh) Nutt | Espinillas en la piel | Planta fresca | Aguilar et al., 1994 |
| | <i>Emilia sonchifolia</i> (L.) DC. ex DC. | Parásitos intestinales | Planta fresca | Luna-José and Rendón-Aguilar, 2008 |
| | <i>Ericameria nauseosa</i> var. <i>ammophila</i> L.C. Anderson. | Problemas de piel | Planta fresca y seca | Aguilar et al., 1994; Bello-González et al., 2015 |
| | <i>Erigeron delphinifolius</i> Willd | Úlceras estomacales | Planta fresca | González et al., 2004 |
| | <i>Erigeron divergens</i> Torr. & A.Gray | Úlceras y golpes internos | Planta fresca | González et al., 2004 |
| | <i>Gaillardia pinnatifida</i> Torr. | Inflamaciones | Planta fresca | Royo and Melgoza, 2001 |
| | <i>Grindelia inuloides</i> Willd. | Heridas, hematomas, gastritis, gripe y diabetes | Planta fresca | Aguilar et al., 1994; Estrada-Castillón et al., 2012; Valdés-Cobos, 2013 |
| | <i>Grindelia oxylepis</i> Greene | Presión arterial alta, moretones, heridas, problemas de riñón, diabetes, abortivo, dolores menstruales | Planta fresca | García, 2015; Vega-Carrillo et al., 1997 |
| | <i>Grindelia squarrosa</i> Dunal | Úlceras y cáncer | Planta fresca | Aguilar et al., 1994; Bye and Linares, 1986 |
| | <i>Gutierrezia conoidea</i> (Hemsl) M.A.Lane (syn. <i>Xanthocephalum conoideum</i> Hemsl.) | Diarrea | Planta fresca | González et al., 2004 |
| | <i>Helenium mexicanum</i> Kunth | Antiséptico y acaricida | Planta fresca y seca | Barrera-Figueroa et al., 2011; Hernández-Xolocotzi et al., 1983 |
| | <i>Heterotheca inuloides</i> Cass. | Moretones, reumatismo, enfermedades pulmonares y “bilis” | Planta fresca y seca, té e infusiones. | Aguilar et al., 1994; CONAFOR [Comisión Nacional Forestal], 2010, Winkelman, 1986 |
| | <i>Heterotheca latifolia</i> Buckley | Sarpullido y dolores menstruales | Planta fresca y seca | Latorre and Latorre, 1977 |
| | <i>Heterotheca subaxilaris</i> (Lam.) Britton & Rusby | Desinfección de heridas, úlcera y dolor de estómago | Planta fresca | González et al., 2004; INI, 1994; Macías et al., 2009 |
| | <i>Hieracium abscissum</i> Less. | Heridas | Planta fresca | Navarro and Avendaño, 2002 |

| Familia | Especie | Uso medicinal | Forma de venta | Referencia |
|----------------|---|--|-----------------------|--|
| | <i>Isocoma veneta</i> (Kunth) Greene. | Moretones y granos | Planta fresca | Aguilar et al., 1994 |
| | <i>Jaegeria macrocephala</i> Less. | Inflamación y cáncer | Planta fresca y seca | Callejas, 2006;López-Gutiérrez et al., 2014 |
| | <i>Jefea pringlei</i> (Greenm.) Strother (syn <i>Zexmenia pringlei</i> Greenm.) | Espasmos y dolores de estómago | Planta fresca | Gentry, 1963 |
| | <i>Machaeranthera pinnatifida</i> (Hook.) Shinnars | Acné, asma y sarna | Planta fresca | Bustamante, 2013 |
| | <i>Montanoa</i> sp. | Para introducir contracciones durante el parto, combinado con <i>Tagetes lucida</i> , <i>Solanum cervantesii</i> , <i>Ruta graveolens</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Schinus molle</i> | Planta fresca | Luna-José and Rendón-Aguilar, 2008;Montoya-Cabrera et al., 1998;Villavicencio-Nieto et al., 2010 |
| | <i>Neurolaena lobata</i> (L.) R.Br. ex Cass. | Diabetes, cáncer | Planta fresca | Estrada-Muñiz et al., 2012;Luna-José and Rendón-Aguilar, 2008 |
| | <i>Pseudogynoxys chenopodioides</i> (Kunth) Cabrera | Problemas del sistema tegumentario músculo-esquelético. | Planta fresca | López-Gutiérrez et al., 2014;Villavicencio-Nieto et al., 2010 |
| | <i>Psilactis brevilingulata</i> Sch. Bip. ex Hemsl.) | Úlceras, mordidas de insectos y dolores musculares | Planta fresca | Aguilar et al., 1994 |
| | <i>Salmea scandens</i> (L.) DC. | Distensión abdominal, golpes y moretones | Planta fresca | Guzmán, 2010 |
| | <i>Senecio confusus</i> Britten | Dolores de muelas y choques internos | Planta fresca y seca | Callejas, 2006 |
| | <i>Senecio stoechadiformis</i> DC. | Diarrea, cólicos y mal de orín | Planta fresca y seca | Bello and Salgado, 2007;CONABIO et al., 2007 |
| | <i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip. | Moretones, esguinces y heridas | Planta fresca | INI, 1994;Vázquez et al., 2011 |
| | <i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg. | Alferecía, hepatitis, cirrosis, inflamación de ovarios, promotor de menstruación | Planta fresca y seca | Aguilar et al., 1994;Favari et al., 2013;Estrada-Castillón et al., 2012 |
| | <i>Tithonia diversifolia</i> (Helms.) A. Gray | Malaria, moretones, heridas y reumatismo | Planta fresca | Aguilar et al., 1994;Duarte and Bonissoni, 2012;INI, 1994,Pulido-Salas, 1993 |

| Familia | Especie | Uso medicinal | Forma de venta | Referencia |
|----------------------|---|---|---|--|
| | <i>Tithonia koelzii</i> McVaugh | Moretones | Planta fresca | Luna-José and Rendón-Aguilar, 2008 |
| | <i>Tithonia rotundifolia</i> (Mill.) S.F.Blake | Fiebre y enfermedades culturales como el “aire” | Planta fresca | Rodríguez, 2009 |
| | <i>Trixis angustifolia</i> DC. | Infecciones pulmonares y tratamiento de heridas | Planta fresca | García, 2015. |
| | <i>Trixis californica</i> Kellogg | Heridas internas y externas, cáncer, dolor de estómago, úlceras y dolores de próstata | Planta fresca | Estrada-Castillón et al., 2012 |
| | <i>Trixis silvatica</i> B.L. Rob. & Greenm. | Dolores musculares de pecho y enfermedades estomacales | Planta fresca | Rocha-Gracia et al., 2011 |
| | <i>Verbesina cinerascens</i> B.L.Rob. & Greenm. | Inflamaciones | Planta fresca | Luna-José and Rendón-Aguilar, 2008 |
| | <i>Verbesina crocata</i> (Cav.) Less. | Contracciones en el parto | Planta fresca | Canales et al., 2005 |
| | <i>Verbesina fastigiata</i> B.L. Rob. & Greenm. (syn. <i>Verbesina greenmanii</i> Urb.) | Gastritis, dolores postparto y reumatismo | Planta fresca | Luna-José and Rendón-Aguilar, 2008; White-Olascoaga et al., 2013 |
| | <i>Xanthisma spinulosum</i> (Pursh) D.R.Morgan & R.L.Hartm. (Syn <i>Haplopappus spinulosus</i> Pursh DC.) | Cáncer | Planta fresca | Murillo-Alvarez et al., 2001; Terrones et al, 2014 |
| Fabaceae | <i>Desmodium</i> sp. | Inflamaciones, disentería y mal de orín | Planta fresca y seca, suplementos alimenticios. | Aguilar et al., 1994; Navarro and Avendaño, 2002 |
| Loasaceae | <i>Mentzelia conzatti</i> Greenm. | Desórdenes de la piel y lepra | Planta fresca | Martínez, 1937 |
| Malpighiaceae | <i>Galphimia glauca</i> Cav. | Antidepresivo, úlceras, cicatrices, dolores postparto, heridas, golpes y moretones | Planta fresca y seca | Argueta et al., 1994; García-Alvarado et al., 2001; Tortoriello et al., 2011 |
| Onagraceae | <i>Oenothera rosea</i> L'Hér. ex Aiton | Heridas, golpes, moretones y dolores de estómago | Planta fresca y seca | Aguilar et al., 1994; Márquez-Flores et al., 2009; Meckes et al., 2004 |
| Rhamnaceae | <i>Colubrina greggii</i> S.Watson | Raíces usadas para tratar la disentería | Raíces frescas y secas | Hersch-Martínez, 1995, Popoca et al., 1998 |
| | <i>Colubrina macrocarpa</i> (Cav.) G.Don | Úlceras, disentería y cáncer | Planta fresca | Secretaría de Salud, 2001 |

| <i>Familia</i> | <i>Especie</i> | <i>Uso medicinal</i> | <i>Forma de venta</i> | <i>Referencia</i> |
|----------------------|---|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| | <i>Colubrina triflora</i> Brongn. ex Sweet | Inflamaciones | Planta fresca | Martínez-Pérez et al., 2012 |
| | <i>Karwinskia umbellata</i> (Cav.) Schltl. | Inflamaciones | Planta fresca | Fernández, 1992 |
| Ranunculaceae | <i>Ranunculus petiolaris</i> Humb., Bonpl. & Kunth ex DC. | Dolor e hinchazón de estómago | Planta fresca | Gheno-Heredia et al., 2011 |

Criterios para la identificación del material vegetal comercializado

Uno de los problemas asociados a esta diversidad de especies es la dificultad para identificar el material comercializado bajo el nombre de árnica, debido a que la mayoría de las especies de este complejo etnobotánico se clasifican dentro de la familia Asteraceae, en específico en la tribu Heliantheae, donde las especies se caracterizan por flores liguladas color amarillo; dichos taxones pueden distinguirse por medio del tamaño del cuerpo primario y de los capítulos, sin embargo, especies como *Heterotheca inuloides* y *Arnica montana* son similares en un alto grado, lo que dificulta su identificación mediante la morfología (Šutovská *et al.*, 2014).

En el caso de los documentos regulatorios, solamente se han establecido marcadores químicos y algunos criterios morfológicos (CPFEUM, 2021). Dentro de estos criterios químicos suelen usarse procesos conocidos como “ensayos de identidad”, en específico el método MGA-FH 0050, en el que se emplea cromatografía en gel de sílice para separar los compuestos e identificar especies de acuerdo con el conjunto de cada uno de sus compuestos, fundamento que postula que cada especie contiene compuestos específicos que permiten identificar a los individuos; por ejemplo, en el caso de *H. inuloides*, los grupos químicos que más abundan son los sesquiterpenos con esqueletos de cadinano, polifenoles, flavonoides, triterpenos y fitoesteroles (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017), mismos que en el caso de las reacciones de identidad, le otorgan un color amarillento-anaranjado (CPFEUM, 2021). Esta forma de identificación está sujeta a diferentes problemas, como la presencia común de mismos compuestos en diferentes especies, así como la presencia/ausencia de los compuestos dependiendo de factores como la época del año en que se colecta el material vegetal y la etapa del ciclo de vida, por lo que es necesario establecer análisis de control de calidad que implican la identificación por medio de técnicas mediante análisis del DNA, con el fin de discriminar especies a las especies a nivel genético (Marcial-Quino *et al.*, 2015).

DNA Barcoding

Los métodos para identificar y clasificar a la biodiversidad han sido modificados conforme se consideran diferentes aspectos de los individuos en una población; estos análisis pueden ocurrir

con base en caracteres morfológicos, o bien a partir de atributos moleculares, entre los que se considera la totalidad de elementos genéticos o de sus derivados (*i.e.* proteoma, transcriptoma o genoma), o bien, con el uso de apenas unas pocas regiones específicas del DNA (Scotland *et al.*, 2003). Dentro del estudio de regiones moleculares, los métodos para identificar especies por medio de secuencias cortas ortólogas de DNA (<1000 pb), conocidas como *barcodes*, facilitan los estudios de la biodiversidad al asociar una especie con una referencia específica dentro de una colección (Kress *et al.*, 2005).

El principio del *barcoding* se basa en el uso de secuencias de origen nuclear o plastídico, en el caso de las plantas, las cuales evolucionan rápidamente con el fin de apreciar de forma precisa las diferencias que presentan especies cercanamente emparentadas (Veldman *et al.*, 2014). Adicionalmente, estas secuencias deben estar flanqueadas por regiones universalmente conservadas del DNA que funcionan como *primers*; el Consorcio para Código de Barras de la Vida (CBOL) propuso el uso de los marcadores de cloroplasto *rbcL* y *matK*, pero debido a que no ha resultado ser exitoso en todos los grupos, se ha optado por complementar con *trnH-psbA* y el marcador nuclear *ITS2* (Hollingsworth *et al.*, 2011), los cuales se han utilizado efectivamente en *Arnica montana* y *Galphimia glauca*, aunque en este último, en adición al marcador plastídico *rpoC1* 8 (Sharma *et al.*, 2012, Van Rossum *et al.*, 2018).

Marcadores moleculares

El uso de diferentes marcadores moleculares sirve para afinar las carencias del uso de marcadores por sí solos, lo cual puede ayudar a mejorar la capacidad discriminativa y, por lo tanto, la eficiencia en la identificación de especies (Hollingsworth *et al.*, 2011). De acuerdo con Cristians-Niizawa (2020), los marcadores más adecuados en materia de plantas tras una búsqueda comparativa de su eficiencia son los siguientes:

rbcL (subunidad mayor de la enzima Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa, RuBisCO): *locus* ampliamente caracterizado con facilidad de amplificación (Teuchen *et al.*, 2014).

matK (maturasa K): *locus* plastídico de rápida evolución con hasta el 66% de eficiencia para la identificación de especímenes, sin embargo, requiere de modificaciones en las condiciones de amplificación para obtener la secuencia correspondiente (Hollingsworth, 2011).

ITS2 (segundo espaciador del transcrito interno del cistrón ribosomal nuclear): marcador con alto porcentaje de amplificación que presenta alta divergencia interespecífica.

trnH-psbA (espaciador intergénico de cloroplasto): espaciador con alta tasa de divergencia entre linajes de angiospermas (Kress y Erickson., 2007).

rpl32-trnL (espaciador intergénico de cloroplasto): presenta el grado más alto de variabilidad entre distintos linajes de angiospermas, sin embargo, es difícil de alinear dado su tamaño variable

y largos sitios de inserción-delección (Peterson *et al.*, 2014).

Capacidad discriminativa de los códigos de barras

Dentro del método para generar códigos de barras, los análisis filogenéticos se utilizan para observar las relaciones entre los diferentes individuos. A partir de las filogenias generadas, es posible inferir características evolutivas como tiempos de divergencia, extinción o cladogénesis, sin embargo, en términos del *barcoding* estos árboles se remiten al reconocimiento de grupos de especímenes que nos permiten identificar taxones, idealmente a nivel de especie (Hajibabaei *et al.*, 2007).

Los análisis filogenéticos se establecen a partir de un método fundamental que consiste en el alineamiento de las secuencias generadas a partir de diferentes muestras, una posterior búsqueda de modelo de sustitución y una construcción de la topología de los árboles, lo cual se puede lograr por métodos como parsimonia, máxima verosimilitud o inferencia Bayesiana (Braukmann *et al.*, 2017). Los análisis por parsimonia son un primer acercamiento a los árboles filogenéticos y resultan importantes para tener una primera idea de las relaciones entre los individuos, ya que su mayor ventaja recae en la facilidad y rapidez para obtener resultados por este método, no obstante, su sesgo hacia la construcción de un árbol que busca el menor número de pasos evolutivos puede dar origen a relaciones no resueltas o a múltiples árboles con la misma probabilidad de ocurrir (Goloboff, 2003).

Uno de los métodos estadísticos ampliamente utilizados es la inferencia Bayesiana, cuyo principio se fundamenta en determinar la probabilidad posterior dada una probabilidad previa o *prior* y una función de verosimilitud (Cummings *et al.*, 2003). Debido a que obtener las probabilidades posteriores para este tipo de datos es complicado matemáticamente, se utilizan procedimientos estocásticos para estimar las probabilidades posteriores, como por ejemplo las cadenas de Markov Montecarlo (MCMC por sus siglas en inglés) (Huelsenbeck *et al.*, 2001). Es por esta dificultad implícita en el método Bayesiano que se suele usar el método de Máxima verosimilitud, la cual se define como la probabilidad de observar los datos dada una hipótesis, lo que en biología molecular se traduce como la probabilidad de observar las secuencias de nucleótidos, dado un árbol y un modelo de sustitución (Felsenstein, 1981), a día de hoy es el método más ampliamente utilizado en la discriminación de especies a partir de *barcodes*, ya que otorga resultados más concisos al resultar en sólo un árbol más probable, a diferencia de parsimonia que ofrece varios árboles igualmente probables basados en una cantidad de cambios o de la inferencia Bayesiana que requiere de la especificación de las probabilidades previas o *priors* (Bafeel *et al.*, 2012).

Adicionalmente a la construcción de filogenias, la identificación de especies por medio de DNA

barcodes sólo es segura si existe una diferencia significativa entre la distancia genética interespecífica, al mismo tiempo que existe una consistencia a nivel intraespecífico (Čandek y Kuntner, 2015), por lo que se emplea el fundamento de *barcoding gap*, que utiliza criterios como la regla 10X, que asume que se puede inferir la identidad de las especies por medio de una distancia genética interespecífica al menos 10 veces mayor que entre los individuos de una especie (Herbert *et al.*, 2003), aunque esta regla no ha podido ser aplicada a muchos grupos de organismos, en los cuales la distancia intra e interespecífica incluso puede llegar a sobrelaparse (Meier *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008). Para tratar este problema, se desarrolló un método llamado ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery), que tiene como objetivo identificar taxones a partir de diferentes distribuciones de frecuencias basadas en distancias genéticas. A partir de varios umbrales de distancias genéticas elegidos *a priori*, se calcula primero el límite máximo teórico (P máxima) de la diversidad intraespecífica, luego se identifica la distancia genética superior a P máxima en toda la distribución de distancias genéticas de los individuos, donde se encuentra un límite potencial entre la diversidad intra e interespecífica (Puillandre *et al.* 2012)

Polémicas sobre el uso de barcodes

Esta técnica se ve como una alternativa muy prometedora a largo plazo dentro de las técnicas que permiten identificar especies, no obstante, se discuten algunos puntos que deben mantenerse en consideración ante los resultados que arrojan los protocolos o algoritmos que los emplean. De acuerdo con Meier *et al.* (2008), uno de los problemas es que la identificación a partir de estas secuencias cortas podría estar sobrevalorada ya que, en términos de morfología, es una analogía a la identificación a partir de solo un pequeño fragmento de un individuo. El otro problema que afecta a esta técnica es el fundamento del *barcoding gap*, el cual es un método de distancia que establece diferencias filogenéticas a partir de un cociente de distancia interespecífica entre la distancia intraespecífica, aunque en numerosos estudios se sugiere el uso de la distancia interespecífica más corta para resolver problemas de identidad (Cognato, 2006; Roe y Sperling, 2007).

Collins y Cruickshank (2013) han hecho una recopilación de los errores dentro de estos estudios, entre los que destacan siete por su especial importancia dentro del marco conceptual y de los criterios experimentales para determinar si el método de *barcoding* puede resultar suficiente para resolver problemas de identificación de especímenes (Tabla 2), no obstante, se recomiendan posibles soluciones para que este tipo de investigaciones que se enfocan en el correcto uso de términos, la apropiada delimitación de hipótesis y objetivos, así como de los análisis recomendados.

Tabla 2. Los siete problemas principales al realizar investigaciones basadas en el uso de códigos de barras para la identificación de especímenes, así como las soluciones enfocadas en el correcto uso de conceptos y herramientas computacionales.

| Problema | Consecuencia | Solución |
|---|--|--|
| Error al probar hipótesis claras | Elección de métodos analíticos inapropiados o subóptimos debido a confusión en los objetivos de estudio. | Determinar explícitamente cada hipótesis y presentar diferentes experimentos para cada uno de los aspectos, así como la presentación de resultados por separado. |
| Identificación <i>a priori</i> inadecuada de especies | Identificaciones conflictivas hechas en diferentes laboratorios pueden comprometer la efectividad de las bases de datos usados para investigaciones con objetivos de regulación | Presentar una bibliografía de referencias, así como la descripción de caracteres morfológicos usados en el proceso de identificación. |
| Uso del término “identificación de especies” | Existe una confusión entre identificación de especímenes y delimitación de especies. | Utilizar términos como “identificación de individuos” o “descubrimiento de especies” |
| Uso inapropiado de árboles por <i>neighbour-joining</i> | Depender de monofilia estricta para la identificación puede reducir la efectividad aparente del <i>Barcoding</i> como herramienta de identificación. Esto debido a parafilia originada por el mtDNA o mala identificación de especies. | Usar otros métodos como “best close match” que han demostrado alta eficiencia en la identificación de individuos. Esto se puede lograr al estimar la riqueza de especies utilizando el programa ABGD (Puillandre <i>et al.</i> , 2011) |
| Uso inapropiado de <i>bootstrap</i> | Para la identificación de especímenes, el <i>bootstrap</i> puede reducir aún más la efectividad asociada al uso de <i>Neighbour joining</i> . | Uso de bootstrap solamente en una parte del proceso de delimitación de especies. |
| Uso inapropiado de umbrales de distancia corregida | En un umbral genérico con valores demasiado altos o bajos puede llevar a un sesgo de identificación. | Uso del software ABGD para la optimización de datos. |
| Interpretación incorrecta del <i>barcoding gap</i> | Las distribuciones del solapamiento de distancias intra e interespecíficas no necesariamente significa que los códigos de barras se ejecutaron de manera pobre para la identificación. | Para la identificación de especímenes, las gráficas de puntos de distancias intra e interespecíficas son una mejor manera de ilustrar los resultados por <i>barcoding gap</i> . |

Justificación

Los métodos farmacopéicos reconocidos actualmente para identificar el material vegetal comercializado bajo el nombre de árnica solamente están descritos para las especies *A. montana* y *H. inuloides*; por otro lado, han resultado ser poco precisos y pueden representar problemas a la salud relacionados con la intoxicación derivada de la confusión entre especies (CPFEUM, 2021; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017). En el caso de los *barcodes*, estos no han sido establecidos en todas las especies del complejo, aunado a que no hay marcadores moleculares estandarizados para identificarlas, por lo que hace falta una herramienta de identificación para especies selectas de este complejo que pueda ser aprovechada para desarrollar análisis de control de calidad y complemente la información existente en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

Hipótesis

Las especies del complejo árnica no son capaces de ser identificadas mediante marcadores universales que generen códigos de barra por lo tanto será posible identificar las especies del complejo a través de algún marcador molecular utilizando amplificación por PCR que afinen la capacidad discriminativa de los códigos de barras.

Objetivo general

Identificar taxónomicamente, mediante el uso de *código de barras*, especies selectas del complejo árnica (*Arnica montana*, *Heterotheca inuloides*, *Galphimia glauca* y *Oenothera rosea*) para proponer una herramienta de control de calidad del material vegetal comercializado.

Objetivos particulares

- Obtener DNA genómico a partir de ejemplares representativos de las especies del complejo árnica: *A. montana*, *H. inuloides*, *G. glauca* y *O. rosea*
- Obtener por amplificación mediante PCR, diferentes marcadores moleculares para afinar la capacidad discriminativa de los códigos de barras en individuos previamente identificados provenientes de colecciones.
- Comparar los códigos de barras generados de muestras de jardín etnobiológico y Herbario con muestras comercializadas bajo el nombre común de “árnica”.

Metodología

Colecta de individuos en Jardín Etnobiológico

Se colectó tejido foliar en desarrollo de cinco individuos de las especies *H. inuloides* y *O. rosea*, así como de tres individuos de *G. glauca* presentes en la colección del Jardín Etnobiológico del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. El tejido se almacenó en conos de papel filtro y se secaron a temperatura ambiente durante dos semanas dentro de una bolsa hermética con gel de sílice.

Obtención de individuos de herbario

Simultáneamente, se obtuvieron muestras de tejido foliar de individuos herborizados en el Herbario Nacional (MEXU). Se muestrearon siete individuos de la especie *G. glauca*, dos individuos de *H. inuloides* y dos de *O. rosea* (Anexo 1), esta diferencia en el número de individuos fue determinada para utilizar la menor cantidad de ejemplares de *G. glauca* presentes en el Jardín Etnobiológico.

Obtención de las muestras comerciales

Se adquirió material vegetal comercializado bajo el nombre común de árnica en diferentes puntos de venta de plantas medicinales (tianguis, puestos ambulantes, mercados), con un mayor énfasis en el Mercado Sonora, debido a que es un centro de distribución nacional de plantas medicinales y al gran flujo de personas procedentes de todas las alcaldías de la Ciudad de México que acceden a las especies vegetales para poder comercializarlas en sus propias localidades. Dentro de los puestos se procedió a realizar el siguiente cuestionario para poder adquirir especies dentro de este estudio, así como especies adicionales que la gente del mercado podría conocer como árnica:

- 1) ¿Puede mostrarnos algunas árnicas que venda?
- 2) ¿Tiene otras plantas que ustedes conozcan como árnica?
- 3) ¿De dónde vienen estas plantas?
- 4) ¿Dónde podríamos conseguir árnica europea por aquí?
- 5) ¿Para qué se usan estas plantas?

Posterior a su adquisición, se aplicó el mismo método de muestreo del tejido foliar descrito para las especies provenientes del Jardín Etnobiológico.

Extracción de DNA

Siete días previos a la extracción de DNA, se pesaron aproximadamente 20 mg de material foliar de cada individuo y se almacenaron en microtubos a una temperatura de -70° C. El día de la extracción, el material fue lisado por medio de un equipo TissueLyser II (QIAGEN®) y se realizó la extracción de DNA de acuerdo con modificaciones al protocolo establecido por el kit DNeasy Plant Mini

(QIAGEN®). Posteriormente, se evaluó la cantidad y calidad del DNA mediante mediciones espectrofotométricas de 1 µL de muestra por individuo mediante un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), así como por visualización en gel tras una electroforesis. El cociente 260/280 está relacionado con la pureza del DNA, el cual debe tener un rango óptimo de 1.8 a 2 (Lucena-Aguilar *et al.*, 2016); de forma complementaria se utiliza el cociente 260/230, el cual tiene valores óptimos de 2 a 2.2, lecturas menores a dicho rango pueden indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm (Desjardins y Conklin, 2010).

Amplificación de los marcadores

La amplificación de los marcadores *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *rpl32-trnL* e *ITS2* se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen final de 30 µL por muestra, utilizando una mezcla de reacción Master Mix (Ampliqon) basado en la metodología descrita por Kress y Erickson (2012) y Cristians-Niizawa (2020), con las modificaciones que se describen en la Tabla 3. La evaluación de la presencia de fragmentos amplificados de DNA fue realizada mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) con Midori Green (Nippon Genetics) como agente intercalante, con un voltaje constante de 105 V y amperaje variable durante un período de 35 minutos.

Tabla 3. Condiciones del termociclador y mezcla de reacción para la amplificación de los marcadores: *rbcL*, *matK*, *ITS2*, *trnH-psbA* y *rpl32-trnL*.

| | <i>rbcL/matK</i> | | <i>ITS2</i> | | <i>trnH-psbA</i> | | <i>rpl32-trnL</i> | | | | | |
|---|------------------|--------|-------------|-----------|------------------|--------|-------------------|--------|--------|-----------|----|--------|
| | °C | Tiempo | °C | Tiempo | °C | Tiempo | °C | Tiempo | | | | |
| Desnaturalización inicial | 30 ciclos | 94 | 2 min | 40 ciclos | 95 | 5 min | 40 ciclos | 94 | 2 min | 35 ciclos | 95 | 3 min |
| Desnaturalización | | 94 | 30 seg | | 94 | 30 seg | | 94 | 30 seg | | 94 | 1 min |
| Alineamiento | | 52 | 45 seg | | 56 | 30 seg | | 55 | 40 seg | | 53 | 1 min |
| Extensión | | 72 | 1 min | | 72 | 45 seg | | 72 | 40 seg | | 72 | 2 min |
| Extensión final | | 72 | 5 min | | 72 | 10 min | | 72 | 5 min | | 72 | 10 min |
| Concentración final | <i>rbcL/matK</i> | | <i>ITS2</i> | | <i>trnH-psbA</i> | | <i>rpl32-trnL</i> | | | | | |
| Master Mix (MgCl₂ 1.5 mM) | 1× | | 1× | | 1× | | 1× | | | | | |
| Oligos | 0.1 mM | | 0.6 mM | | 0.25 mM | | 0.25 mM | | | | | |
| DNA | 10 ng/µL | | 10 ng/µL | | 10 ng/µL | | 10 ng/µL | | | | | |

Secuenciación y elaboración de secuencias consenso

Se realizó la secuenciación Sanger en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LANABIO) por medio de un método de purificación en Sephadex con un equipo Applied Biosystems 3730xl. Posteriormente se generaron las secuencias consenso utilizando el programa DNADynamo (BlueTracto Software); aquellas secuencias con muchos errores o diferencias de tamaño que no permitían ser empalmadas para obtener las secuencias consenso fueron descartadas.

Evaluación de la capacidad discriminativa

Para conocer la capacidad discriminativa de cada marcador molecular evaluado, se realizaron dos

tipos de análisis, uno filogenético y otro de distancia del código de barras. Para el análisis filogenético, se realizó el alineamiento de las secuencias consenso por medio del algoritmo MUSCLE y posteriormente se hizo un análisis de Máxima verosimilitud en el programa MEGA11 (Tamura *et al.*, 2022, por medio del modelo de sustitución y distribución más adecuado, seleccionando aquel con la puntuación más baja del criterio de información bayesiano. Como medida de soporte estadístico se realizaron 1,000 iteraciones de Bootstrap.

De igual forma, se realizó un análisis de distancia del código de barras utilizando la herramienta Automatic Barcode Gap Discovery (Puillandre *et al.*, 2012), para ello se emplearon los alineamientos previamente generados para cada uno de los marcadores moleculares evaluado, se seleccionó un valor de divergencia intraespecífica previa de entre 0.001 a 0.1 y se analizaron por medio del método de distancia simple.

Resultados

Obtención de las muestras de estudio del complejo árnica

En el Jardín Etnobiológico se obtuvieron muestras de cinco individuos de *H. inuloides* (Figura 1a), cinco individuos de *O. rosea* (Figura 1b) y cuatro individuos de la especie *G. glauca* (Figura 1c), mientras que en el Herbario Nacional (MEXU) se obtuvieron cinco muestras de *G. glauca*, tres de *H. inuloides* y tres de *O. rosea* (Tabla 4).

Por otra parte, en el mercado de Sonora, ubicado en la alcaldía Cuauhtémoc en la Ciudad de México, en tres diferentes locales, se consiguieron dos muestras de *H. inuloides* y cinco muestras de *O. rosea*; aunado a esto, se consiguieron una muestra denominada “árnica morada” (Figura 1d) y otra nombrada “árnica de monte” (Figura 1e) (Tabla 4).

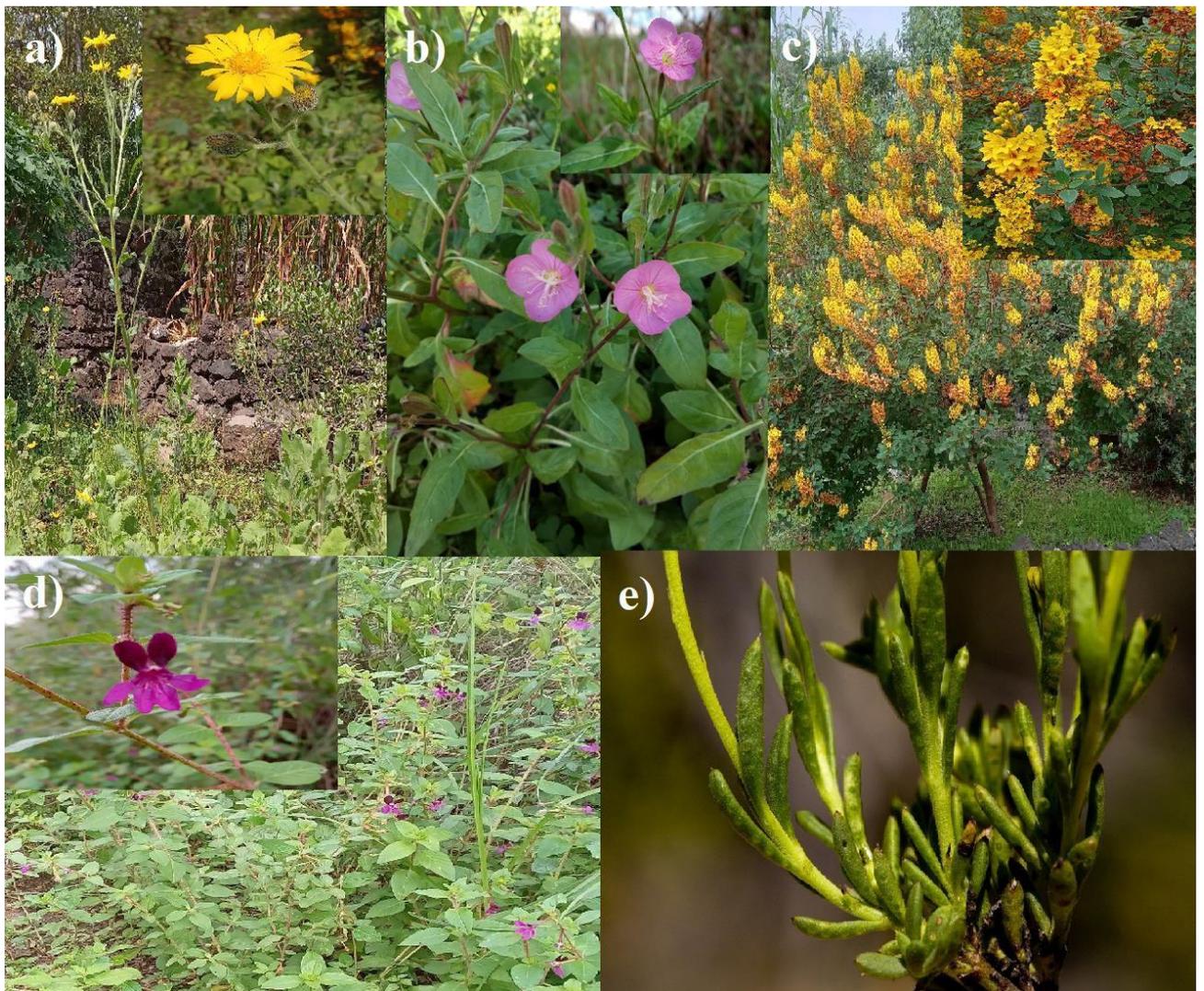


Figura 1. Plantas del complejo árnica utilizadas en este estudio: a) *Heterotheca inuloides*, b) *Oenothera rosea*, c) *Galphimia glauca*, d) *Cuphea aequipetala* y e) *Chrysactinia mexicana*. Fotos: Jonathan Álvarez

Tabla 4. Muestras del complejo árnica utilizadas en este estudio. En rojo se destacan aquellas muestras que se utilizaron en los análisis discriminativos.

| | Nombre | Herbario Nacional (MEXU) | Nombre |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------|
| | Jardín Etnobiológico | | <i>G. glauca 1</i> |
| <i>G. glauca 2</i> | | <i>G. glauca 6</i> | |
| <i>G. glauca 3</i> | | <i>G. glauca</i> | |
| <i>G. glauca 4</i> | | <i>G. glauca</i> | |
| <i>H. inuloides 1</i> | | <i>G. glauca</i> | |
| <i>H. inuloides 2</i> | | <i>H. inuloides</i> | |
| <i>H. inuloides 3</i> | | <i>H. inuloides</i> | |
| <i>H. inuloides 4</i> | | <i>H. inuloides</i> | |
| <i>H. inuloides 5</i> | | <i>O. rosea</i> | |
| <i>O. rosea 1</i> | | <i>O. rosea</i> | |
| <i>O. rosea 2</i> | | <i>O. rosea</i> | |
| <i>O. rosea 3</i> | | | |
| <i>O. rosea 4</i> | | | |
| <i>O. rosea 5</i> | | | |
| | | Procedencia | |
| Muestras de mercado | <i>H. inuloides 7</i> | Mercado de Sonora, local 186 | |
| | <i>H. inuloides 8</i> | Mercado de Sonora, local 203-204 | |
| | <i>O. rosea 7</i> | Mercado de Sonora, local 186 | |
| | <i>O. rosea 8</i> | Mercado de Sonora, local 203-204 | |
| | <i>O. rosea 9</i> | Mercado de Sonora, local 186 | |
| | <i>O. rosea 10</i> | Mercado de Sonora, local 203-204 | |
| | <i>O. rosea 11</i> | Mercado de Sonora, local 203-204 | |
| | Árnica morada | Mercado de Sonora, local 203-204 | |
| | Árnica de monte | Mercado de Sonora, local 203-204 | |

Extracción de DNA

Se cuantificó y evaluó la calidad del DNA extraído, revelando una calidad irregular asociada al origen de las muestras. En los individuos herborizados ninguno de los cocientes evaluados estuvo en el rango óptimo de pureza y contaminantes; sin embargo, se eligieron dos de los individuos de *G. glauca* por su alta concentración de ácidos nucleicos (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la espectrofotometría de DNA de las muestras obtenidas del Herbario Nacional. En rojo se destacan aquellas muestras que se utilizaron en los análisis discriminativos.

| Individuo | DNA (ng/μL) | ABS 260/230 | ABS 260/280 |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>G. glauca.</i> | 10.2 | 0.55 | 1.27 |
| <i>G. glauca.</i> | 6.8 | 0.54 | 0.61 |

| | | | |
|---------------------|-------|------|------|
| <i>G. glauca 5</i> | 103.1 | 1.29 | 1.68 |
| <i>G. glauca 6</i> | 19.8 | 0.45 | 1.12 |
| <i>G. glauca</i> | 16.9 | 0.49 | 1.07 |
| <i>H. inuloides</i> | 0.3 | 0.02 | 0.17 |
| <i>H. inuloides</i> | 13.4 | 0.26 | 0.78 |
| <i>H. inuloides</i> | 16.2 | 1.34 | 1.38 |
| <i>O. rosea</i> | 36.1 | 0.81 | 1.73 |
| <i>O. rosea</i> | 15.1 | 0.47 | 1.03 |
| <i>O. rosea</i> | 19.1 | 0.57 | 1.28 |

Los individuos colectados en el Jardín Etnobiológico presentaron una mejor calidad en el DNA extraído; seis muestras tuvieron un cociente 260/280 óptimo, y solamente una muestra (*G. glauca 2*) tuvo un valor adecuado del cociente 260/230. Todas las muestras provenientes del Jardín Etnobiológico se utilizaron para la amplificación de los marcadores moleculares, debido a la alta concentración de DNA obtenida (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de la espectrofotometría de DNA de las muestras colectadas de Jardín Etnobiológico del Jardín Botánico de la UNAM. Se destacan con rojo las muestras con rango óptimo.

| Individuo | DNA (ng/μL) | ABS 260/230 | ABS 260/280 |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>G. glauca 1</i> | 201.3 | 1.86 | 1.87 |
| <i>G. glauca 2</i> | 106.7 | 2.07 | 1.87 |
| <i>O. rosea 1</i> | 84.1 | 1.22 | 1.86 |
| <i>O. rosea 2</i> | 9.1 | 0.98 | 1.41 |
| <i>O. rosea 3</i> | 10.9 | 0.78 | 1.31 |
| <i>O. rosea 4</i> | 6.9 | 0.87 | 1.42 |
| <i>O. rosea 5</i> | 17.8 | 0.93 | 1.5 |
| <i>H. inuloides 1</i> | 20.5 | 1.64 | 1.92 |
| <i>H. inuloides 2</i> | 41.1 | 1.36 | 1.83 |
| <i>H. inuloides 3</i> | 4.6 | 3.46 | 2.57 |
| <i>H. inuloides 4</i> | 5.8 | 0.79 | 1.81 |
| <i>H. inuloides 5</i> | 12.2 | 0.55 | 1.66 |

Respecto a las muestras comerciales, seis muestras exhibieron un rango óptimo de los cocientes 260/230 y 260/280, indicando niveles de pureza y contaminantes idóneos. Solamente la muestra de árnica de monte presentó cocientes por debajo del rango esperado, coincidente con el estado de conservación del material vegetal vendido. Todas las muestras presentaron alta concentración de DNA, por lo que se usaron para poner a prueba la capacidad discriminativa de los marcadores moleculares. Cabe denotar la buena calidad del DNA proveniente de ejemplares comercializados tanto en fresco como en seco (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de la espectrofotometría de DNA de las muestras obtenidas por medio del comercio. Se indica con rojo la muestra con rango óptimo y con asterisco, las muestras utilizadas

para los análisis discriminativos.

| Individuo | DNA (ng/ μ L) | ABS 260/230 | ABS 260/280 |
|------------------------------|-------------------|-------------|-------------|
| <i>O. rosea comercial 1*</i> | 84.1 | 2.15 | 1.86 |
| <i>O. rosea comercial 2*</i> | 87.5 | 1.98 | 1.81 |
| <i>O. rosea comercial 3*</i> | 90.9 | 2.12 | 1.79 |
| <i>O. rosea comercial 4</i> | 86.9 | 2.07 | 1.82 |
| <i>O. rosea comercial 5</i> | 97.8 | 2.03 | 1.75 |
| <i>H. inuloides 6**</i> | 80.5 | 1.64 | 1.92 |
| <i>H. inuloides 7*</i> | 81.1 | 2.06 | 1.83 |
| <i>Árnica morada*</i> | 95.8 | 2.09 | 1.81 |
| <i>Árnica de monte*</i> | 72.2 | 1.75 | 1.67 |

Amplificación de los marcadores moleculares

La visualización mediante la electroforesis en gel de agarosa permitió elegir los amplicones candidatos a ser secuenciados de acuerdo con la intensidad para cada una de las muestras.

Dada la ausencia de amplicones, se descartó del estudio al marcador *matK* ya que solamente se logró amplificar este marcador en tres individuos de la especie *H. inuloides* (Figura 2b).

El marcador *rbcL* presentó amplicones para todas las muestras provenientes del Jardín Etnobiológico, muestras frescas; mientras que para los ejemplares herborizados se observaron amplicones solamente para cuatro individuos, uno de *H. inuloides* y tres de *G. glauca*, destacando las muestras *G. glauca 5* y *G. glauca 6*, motivo por el cual son las únicas muestras de herbario que se utilizaron en la amplificación del resto de los marcadores moleculares evaluados (Figura 2a).

En el caso del marcador molecular *ITS2* reveló que, salvo una muestra de *G. glauca* de herbario, el resto de los individuos amplificaron, no obstante, los especímenes provenientes del Jardín Etnobiológico tuvieron una mayor concentración de DNA. Todos los amplicones presentaron un peso molecular similar, o sea, no hubo una distinción entre las distintas especies estudiadas (Figura 2c).

El espaciador *trnH-psbA* amplificó solamente en dos de las muestras de herbario, *G. glauca 5* y *H. inuloides*, y para el caso de los especímenes provenientes del Jardín Etnobiológico mostró amplicones en todos los casos, a excepción de *O. rosea 1*. Los amplicones de dicha especie presentaron una menor concentración de DNA. Cabe destacar que el marcador *trnH-psbA* mostró distintos tamaños según la especie amplificada, siendo notoria la diferencia entre *H. inuloides*, el fragmento más ligero, y *G. glauca*, el más pesado (Figura 2d).

Finalmente, el marcador *rpl32-trnL* presentó un sólo amplicón de una muestra de herbario de *H. inuloides*; en los individuos del Jardín Etnobiológico, solamente la especie *O. rosea* amplificó en todas sus muestras, para el caso de *H. inuloides* se recuperaron tres amplicones y en *G. glauca* únicamente un amplicón. Al igual que en el caso de *trnH-psbA*, este espaciador intergénico mostró distintos pesos moleculares para cada una de las especies estudiadas, siendo los amplicones de *O. rosea* los más ligeros, seguidos por los de *H. inuloides* y el de *G. glauca* fue el de mayor peso (Figura 2e).

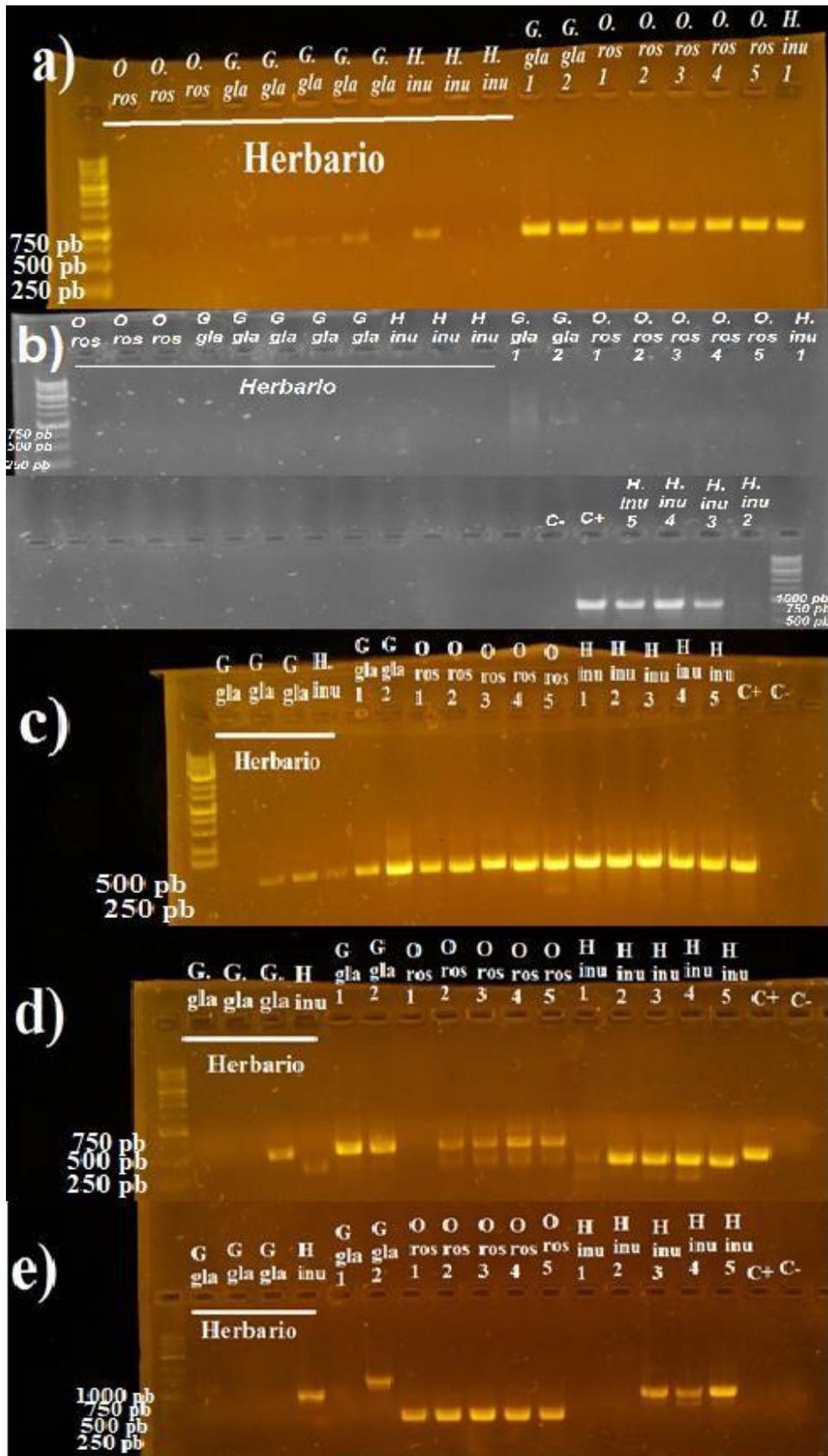


Figura 2. Amplicones de los marcadores: a) *rbcl*; b) *matK*; c) *ITS2*; d) *trnH-psbA*; e) *rpl32-trnL*. En todos los casos se muestra el marcador de peso molecular seccionado cada 250 pares de bases (pb). C+ control positivo DNA de *Portulaca oleracea*, C- control negativo agua grado molecular.

Generación de las secuencias consenso

Dentro de las distintas muestras de los marcadores secuenciados, *rbcL*, *ITS2*, *trnH-psbA* y *rpl32-trnL*, se presentaron obstáculos al momento de generar las secuencias consenso, ya que varias presentaron nucleótidos cuya identidad no se podía asignar o estaban incompletas alguna de las dos secuencias complementarias, lo que redujo considerablemente el número de amplicones a usar en los análisis discriminativos (Tabla 7). Estos problemas fueron mayores en *rpl32-trnL*, marcador del que solamente se pudieron ensamblar dos secuencias consenso para la especie *H. inuloides*, 20% de las muestras totales amplificadas; dicho tamaño de muestra reducido, aunado a que solamente se recuperó información para una especie, impidió su empleo en la identificación del resto de las especies del complejo árnica (Tabla 7). En el caso del marcador *trnH-psbA*, se tuvo un resultado similar, generando sólo tres secuencias consenso, las mismas muestra de *H. inuloides* y una de *G. glauca*, 23% de las muestras totales amplificadas (Tabla 7); como se recuperaron dos especies del complejo y se pudo conseguir una secuencia del *GenBank* de *O. rosea*, si se procedió a los análisis discriminativos. Los dos marcadores restantes presentaron una buena eficacia, siendo *ITS2* aquel con el mayor porcentaje de secuencias consenso generadas, 97%, seguido de *rbcL* con un 93% (Tabla 8).

Tabla 8. Eficacia de cada uno de los marcadores moleculares, representada por el número de amplicones obtenidos (eficacia de amplificación) y de secuencias consenso generadas (eficacia de secuencias consenso). Estos datos representan solamente las muestras de las especies *G. glauca*, *H. inuloides* y *O. rosea*.

| Marcador | Eficacia de amplificación | Eficacia de secuencias consenso |
|-------------------|---------------------------|---------------------------------|
| <i>matK</i> | 13% | 0% |
| <i>rbcL</i> | 94% | 93% |
| <i>trnH-psbA</i> | 81% | 23% |
| <i>rpl32-trnL</i> | 63% | 20% |
| <i>ITS2</i> | 94% | 97% |

Evaluación de la capacidad discriminativa por árboles filogenéticos

Para los análisis discriminativos siguientes se utilizaron tres marcadores moleculares: *rbcL*, *ITS2* y *trnH-psbA*. Para complementar estos análisis se utilizaron secuencias de la base de datos *GenBank* para incluir muestras de *A. montana* en este estudio, así como una secuencia de *O. rosea* para el caso de *trnH-psbA*, con el fin de contar con al menos un individuo de cada especie del complejo árnica. En el caso del árbol generado con el marcador *trnH-psbA* (Anexo 2), solamente se incluyeron las secuencias de dos individuos de *H. inuloides* y un individuo de *G. glauca*, sumadas a dos secuencias

de *A. montana* y una de *O. rosea* obtenidas de *GenBank*. Sumado al problema de la carencia de especímenes evaluados, se ponen en duda las relaciones filogenéticas resultantes, donde el clado de la especie *H. inuloides* muestra como especie hermana a *G. glauca* y en segundo término a *O. rosea*, completamente separado de *A. montana* a pesar de pertenecer a la misma familia. Por lo anterior, se descarta como candidato a *barcode* dentro de este complejo etnobotánico.

Para el marcador *rbcL* los análisis se llevaron a cabo con un total de 14 secuencias pertenecientes a las tres especies estudiadas del complejo árnica, con el fin de incluir a *A. montana*, se consultó *GenBank*, encontrando una sola secuencia para este gen. El árbol generado se encuentra dividido en dos grandes clados, uno de ellos formado por las muestras de las dos árnicas de la familia Asteraceae (*H. inuloides* y *A. montana*); el otro grupo lo conforman las muestras de *G. glauca* y *O. rosea* separadas en dos subgrupos con un soporte del 99%, mostrando que *rbcL* es capaz de distinguir inequívocamente a las cuatro especies selectas del complejo árnica (Anexo 3).

En el caso del espaciador nuclear *ITS2* el análisis filogenético se realizó con un total de 15 secuencias de las especies provenientes del Herbario Nacional y el Jardín Etnobiológico. En este caso, la revisión a la base de datos de *GenBank* arrojó seis secuencias de *A. montana*, las cuales fueron incorporadas al estudio. Al igual que en el caso de *rbcL*, se observa que el árbol generado se encuentra dividido en dos clados principales, uno constituido por las especies de la familia Asteraceae utilizadas en este estudio y el otro clado con las otras tres especies, cuya relación cuenta con un soporte de *bootstrap* del 99% (Anexo 4).

Dada la capacidad discriminativa de los marcadores moleculares *rbcL* e *ITS2*, se eligieron para identificar taxonómicamente a las muestras comerciales árnica de monte y árnica morada. Las secuencias de los marcadores obtenidas a partir del DNA de dichos especímenes se compararon con la base de datos de *GenBank* por medio de la herramienta BLAST. El mayor porcentaje de identidad del árnica morada fue con la especie *Cuphea aequipetala* Cav., mientras que *Chrysactinia mexicana* A. Gray resultó ser la especie con mayor similitud a la muestra de árnica de monte (Anexo 5). Tras la identificación de estas dos especies nuevas de árnica, y con el fin de comprobar con un mayor número de muestras la veracidad de los resultados dados por el BLAST, se obtuvieron muestras foliares de tres individuos de cada especie. En el caso de *C. aequipetala* se muestrearon individuos silvestres que crecían en las inmediaciones del Jardín Botánico de la UNAM; mientras que, para *C. mexicana*, se tomaron hojas de plantas ubicadas en los invernaderos del Jardín Botánico del Instituto de Biología.

Un objetivo particular de este trabajo versó en el uso *barcodes* para la identificación de muestras comerciales, por lo que tanto el marcador *rbcL* como *ITS2* se pusieron a prueba con el resto de las muestras comerciales adquiridas en el mercado Sonora (Tabla 4).

El árbol filogenético a partir del marcador molecular *rbcL* se construyó con un total de 26 secuencias

pertenecientes a las seis especies del complejo árnica incluidas en este estudio. En esta filogenia se destacan dos clados, uno conformado por las especies *A. montana*, *C. mexicana* y *H. inuloides*, todas pertenecientes a la familia Asteraceae, donde se separan con un soporte del 99% seis muestras de *H. inuloides* del resto de las asteráceas; cabe destacar aquí que la muestra *H. inuloides* 5 quedó en el grupo de *A. montana* y *C. mexicana*, aunque presentaron bajos niveles de soporte en dicha relación. En el otro clado se encuentran el resto de las especies del complejo árnica, que pertenecen a las familias Onagraceae, Lythraceae y Malpighiaceae; es importante hacer notar que, con un soporte del 100%, *C. aequipetala* y *O. rosea* conforman un grupo distinto a las muestras de *G. glauca*, siendo las dos primeras especies mencionadas parte del orden de las Myrtales (Figura 3).

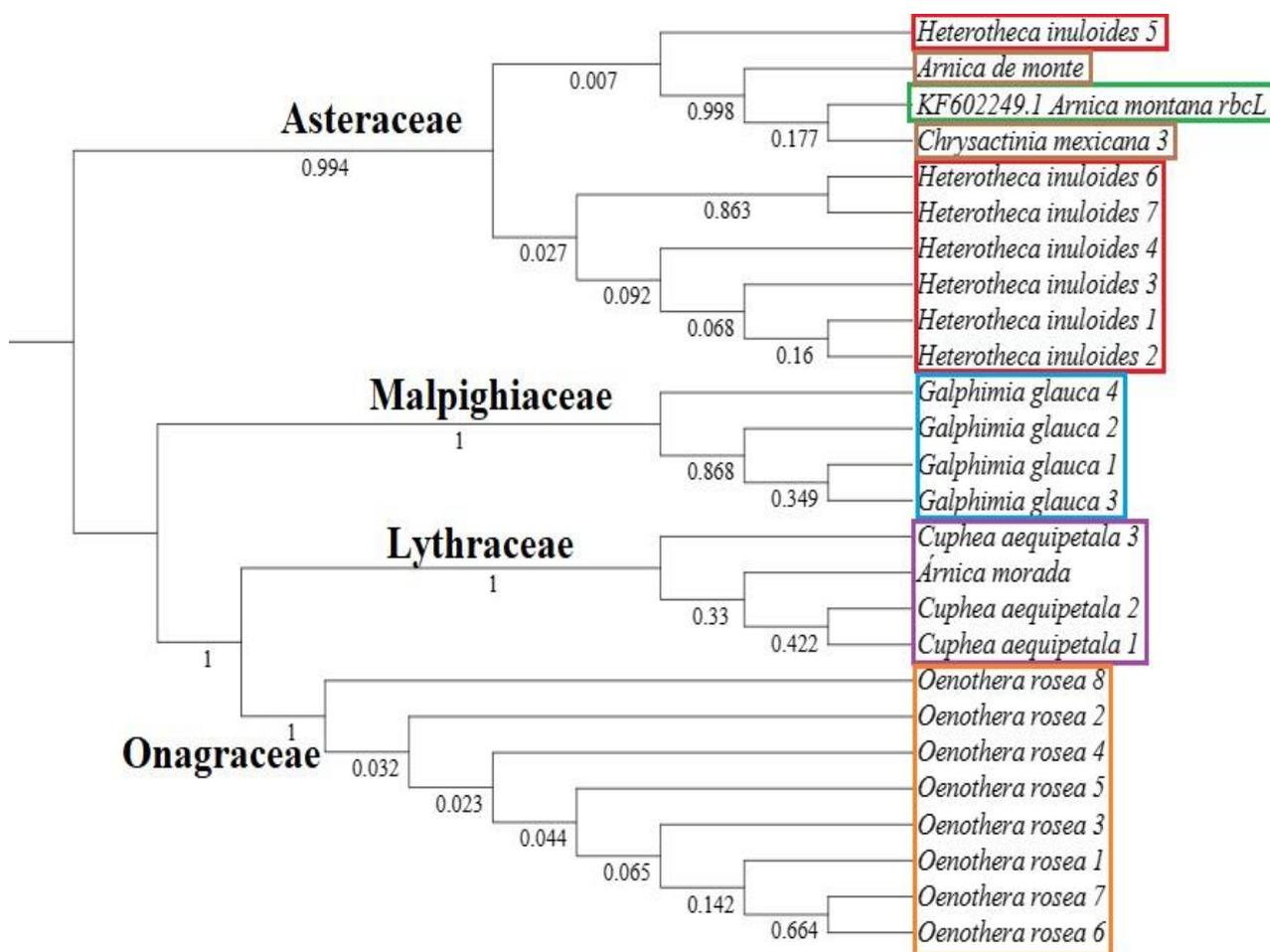


Figura 3. Árbol inferido mediante el método de Máxima verosimilitud y el modelo de sustitución de nucleótidos Kimura de 2 parámetros a partir del marcador rbcL. Los números en las ramas representan el soporte de Bootstrap (1000 réplicas) y se resaltan en diferentes colores cada una de las especies. Los análisis fueron realizados en el software Mega XI (Tamura et al., 2021).

El árbol filogenético a partir del espaciador intergénico *ITS2* se construyó con 34 secuencias pertenecientes a las seis especies selectas del complejo etnobotánico estudiado. De manera similar a los árboles anteriores, un clado principal estuvo constituido por las muestras de la familia Asteraceae,

diferenciando las tres especies con soportes que van del 87 al 91%. Por otro lado, se separaron las especies *C. aequipetala* y *O. rosea* de las muestras de *G. glauca*, con un valor de *bootstrap* del 87%, y las especies pertenecientes al orden de las Myrtales, se diferencian con un soporte del 86% (Figura 4).

A diferencia de *rbcL*, *ITS2* agrupa las muestras de cada especie analizada en clados perfectamente separados, además que se lograron obtener un mayor número de secuencias, lo que permite proponer a este marcador molecular como el candidato idóneo para resolver problemas de identidad entre especies del complejo etnobotánico árnica, mismo que se caracteriza por su diversidad taxonómica.

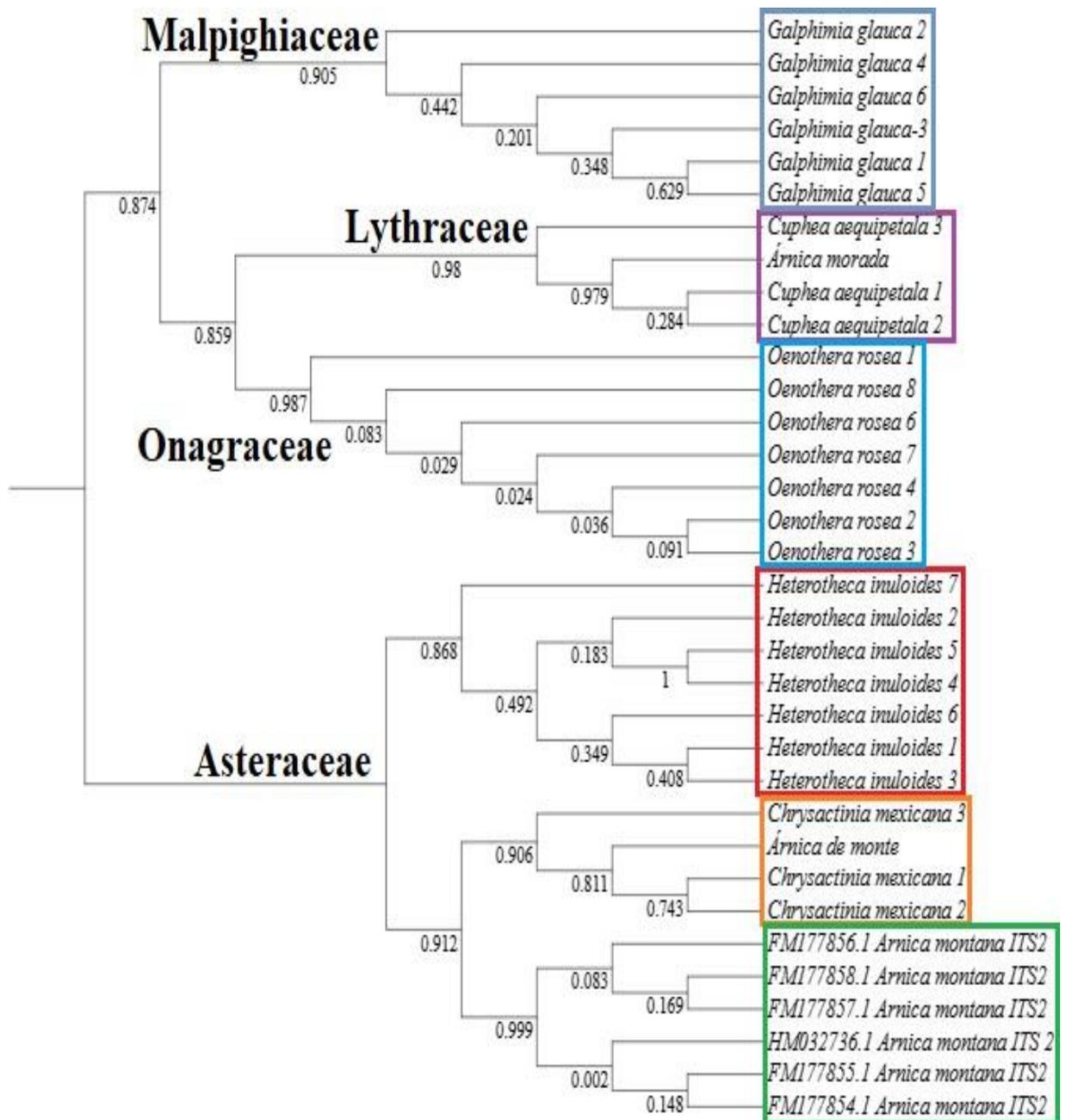


Figura 4. Árbol inferido mediante el método de Máxima verosimilitud y el modelo de sustitución

de nucleótidos Tamura de 3 parámetros a partir del espaciador nuclear *ITS2*. Los números en las ramas representan el soporte de Bootstrap (1000 réplicas) y se resaltan en diferentes colores cada una de las especies. Los análisis fueron realizados en el software Mega XI (Tamura et al., 2021).

Evaluación de la capacidad discriminativa mediante el análisis de distancia del código de barras

Con la finalidad de robustecer los resultados anteriores se evaluó a través de un análisis de distancia del código de barras, la capacidad discriminativa de los marcadores moleculares *rbcL* e *ITS2*, en las muestras comerciales, del Jardín Etnobiológico, del Herbario Nacional y del *GenBank*.

En el caso de *rbcL* cuando la divergencia intraespecífica previa es más estricta ($P= 0.001 - 0.0077$), se muestra una distinción de 6 grupos conformados por: las muestras de las especies de *O. rosea* (grupo 1); los especímenes de *C. aequipetala* (grupo 2); todas las *H. inuloides* (grupo 3); dos individuos de *C. mexicana*, comercial y invernadero, junto con la muestra de *GenBank* de *A. montana* (grupo 4); *G. glauca* 4 (grupo 5); y el resto de las muestras de *G. glauca* (grupo 6) (Tabla 8). Con un valor de P más laxo ($P= 0.0129 - 0.0359$) se hace una división en 4 grupos, uno donde se clasifican todos los especímenes de *O. rosea* (grupo 1), otro con los especímenes de *G. glauca* (grupo 2), uno con las muestras de las tres especies de la familia Asteraceae: *H. inuloides*, *A. montana* y *C. mexicana*, y por último, el grupo donde se encuentran las muestras de *C. aequipetala* (grupo 4).

En el caso de *ITS2* se muestra una división en 8 grupos cuando la P es estricta ($P= 0.001 - 0.059$), en este caso, los grupos están conformados por las muestras de *G. glauca* (grupo 1), *C. aequipetala* (grupo 2), *O. rosea* (grupo 3), *C. mexicana* (grupo 4), *A. montana* (grupo 5) y tres grupos entre los que se clasifican los especímenes de *H. inuloides* (grupo 6-8). Cuando la P es laxa ($P= 0.1$) se forman 7 grupos, los cuales se conforman por las muestras de cada especie de la siguiente manera: *G. glauca* (grupo 1), *C. aequipetala* (grupo 2), *O. rosea* (grupo 3), *C. mexicana* (grupo 4), *A. montana* (grupo 5) y dos grupos donde se distribuyen las muestras de *H. inuloides* (grupo 6-7).

(Tabla 9).

Estos grupos contienen a diferentes individuos y una mejor resolución resulta en cada uno de los grupos correlacionados con cada una de las especies en este estudio.

Tabla 9. Particiones de los marcadores *rbcL* e *ITS2* de acuerdo con los rangos de P utilizados mediante el método ABGD.

| | Valor de P | Número de grupos | Descripción |
|--|--------------|------------------|---|
| | 0.001-0.0077 | 6 | Grupo 1 <i>Oenothera rosea</i> 8, <i>Oenothera rosea</i> 7, <i>Oenothera rosea</i> 6, <i>Oenothera rosea</i> 5, <i>Oenothera rosea</i> 4, <i>Oenothera rosea</i> 3, |

| | | | |
|-------------|---------------|---|--|
| rbcL | | | <p><i>Oenothera rosea</i> 2, <i>Oenothera rosea</i> 1</p> <p>Grupo 2</p> <p>Árnica morada, <i>Cuphea aequipetala</i>, 1, <i>Cuphea aequipetala</i> 3, <i>Cuphea aequipetala</i> 2</p> <p>Grupo 3</p> <p><i>H.inuloides</i> 7, <i>H.inuloides</i> 6, <i>H.inuloides</i> 5, <i>H.inuloides</i> 4, <i>H.inuloides</i> 3, <i>H.inuloides</i> 2, <i>H.inuloides</i> 1</p> <p>Grupo 4</p> <p>Árnica de monte, <i>Chrysactinia mexicana</i> 3 KF602249.1_Arnica_montana_rbcL</p> <p>Grupo 5</p> <p><i>Galphimia glauca</i> 4</p> <p>Grupo 6</p> <p><i>Galphimia glauca</i> 3, <i>Galphimia glauca</i> 2, <i>Galphimia glauca</i> 1</p> |
| | 0.0129-0.0359 | 4 | <p>Grupo 1</p> <p><i>Oenothera rosea</i> 8, <i>Oenothera rosea</i> 7, <i>Oenothera rosea</i> 6, <i>Oenothera rosea</i> 5, <i>Oenothera rosea</i> 4, <i>Oenothera rosea</i> 3, <i>Oenothera rosea</i> 2, <i>Oenothera rosea</i> 1</p> <p>Grupo 2</p> <p><i>Galphimia glauca</i> 4, <i>Galphimia glauca</i> 3, <i>Galphimia glauca</i> 2, <i>Galphimia glauca</i> 1</p> <p>Grupo 3</p> <p>Árnica_de_monte, <i>H.inuloides</i> 7, <i>H.inuloides</i> 6, <i>H.inuloides</i> 5, <i>H.inuloides_4</i> <i>H.inuloides_3</i> <i>H.inuloides_2</i> <i>H.inuloides_1</i> <i>Chrysactinia mexicana_3</i> <i>KF602249.1_Arnica_montana_rbcL</i></p> <p>Grupo 4</p> <p>Árnica morada, <i>Cuphea aequipetala</i> 1, <i>Cuphea aequipetala</i> 3, <i>Cuphea aequipetala</i> 2</p> |
| | 0.001-0.059 | 8 | <p>Grupo 1</p> <p><i>Galphimia glauca</i> 6, <i>Galphimia glauca</i> 5, <i>Galphimia glauca</i> 4, <i>Galphimia glauca</i> 3, <i>Galphimia glauca</i> 2, <i>Galphimia glauca</i> 1</p> <p>Grupo 2</p> <p>Árnica_morada, <i>Cuphea aequipetala</i> 3, <i>Cuphea aequipetala</i> 2, <i>Cuphea aequipetala</i> 1</p> <p>Grupo 3</p> <p><i>Oenothera rosea</i> 8. <i>Oenothera rosea</i> comercial 2, <i>Oenothera rosea</i> 6, <i>Oenothera rosea</i> 4, <i>Oenothera rosea</i> 3, <i>Oenothera rosea</i> 2, <i>Oenothera rosea</i> 1</p> <p>Grupo 4</p> <p>Árnica_de_monte, <i>Chrysactinia mexicana</i> 3, <i>Chrysactinia mexicana</i> 2, <i>Chrysactinia mexicana</i> 1 5</p> <p>Grupo 5 FM177854.1_Arnica_montana_ITS2 FM177855.1_Arnica_montana_ITS2</p> |

| | | | |
|-------------|-----|---|---|
| ITS2 | | | <p>FM177856.1_Arnica_montana_ITS2 FM177857.1_Arnica_montana_ITS2 FM177858.1_Arnica_montana_ITS2 HM032736.1_Arnica_montana_ITS_2</p> <p>Grupo 6 <i>H.inuloides 4, H.inuloides 5</i></p> <p>Grupo 7 <i>H_inuloides 7</i></p> <p>Grupo 8 <i>H. inuloides 6, H.inuloides 3, H.inuloides 2, H.inuloides 1</i></p> |
| | 0.1 | 7 | <p>Grupo 1 <i>Galphimia glauca 6, Galphimia glauca 5, Galphimia glauca 4, Galphimia glauca 3, Galphimia glauca 2, Galphimia glauca 1</i></p> <p>Grupo 2 <i>Árnica_morada, Cuphea aequipetala 3, Cuphea aequipetala 2, Cuphea aequipetala 1</i></p> <p>Grupo 3 <i>Oenothera rosea 8, Oenothera rosea comercial 2, Oenothera rosea 6, Oenothera rosea 4, Oenothera rosea 3, Oenothera rosea 2, Oenothera rosea 1</i></p> <p>Grupo 4 <i>Árnica de monte, Chrysactinia mexicana 3, Chrysactinia mexicana 2, Chrysactinia mexicana 1</i></p> <p>Grupo 5 FM177854.1_Arnica_montana_ITS2 FM177855.1_Arnica_montana_ITS2 FM177856.1_Arnica_montana_ITS2 FM177857.1_Arnica_montana_ITS2 FM177858.1_Arnica_montana_ITS2 HM032736.1_Arnica_montana_ITS_2</p> <p>Grupo 6 <i>H. inuloides 7, H. inuloides 6, H.inuloides 3, H.inuloides 2, H.inuloides 1</i></p> <p>Grupo 7 <i>H.inuloides 4, H.inuloides 5</i></p> |

Discusión

Especies comercializadas bajo el nombre común “árnica”

El estudio en el mercado Sonora mostró una baja diversidad de especies comercializadas bajo el nombre de árnica, ya que de las 58 especies referidas en el estudio de Rodríguez-Chávez y colaboradores (2017; Tabla 1) solamente se pudo adquirir la especie *Heterotheca inuloides*, árnica mexicana.

Si bien la especie que da nombre al complejo etnobotánico es *Arnica montana* (Waizel-Bucay y Cruz-Juárez, 2014), en México ha dejado de ser la especie emblema (Linares y Bye, 1987) y este lugar lo ha tomado *H. inuloides*, ya que no sólo es ampliamente comercializada fuera de su área de distribución geográfica, sino además se trata de la planta con más estudios fitoquímicos y farmacológicos en el país (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017); motivo por el cual cuenta con una monografía en la FHEUM (CPFEUM, 2021).

Al momento de querer adquirir especies propias del complejo árnica como *Galphimia glauca* y *A. montana*, conocidas como “árnica roja” y “árnica europea”, respectivamente, los locatarios comentaron que solamente pueden ser conseguidas mediante pedido, lo cual indica que *G. glauca* podría no ser tan consumida en la actualidad, o bien, se trata de una especie de consumo local y su comercialización se circunscribe a su área de distribución natural.

El caso de *A. montana* es particular, ya que a nivel nacional se comercializa en forma de remedios y medicamentos herbolarios y cuenta con una monografía en la FHEUM (CPFEUM, 2021). Esta especie se distribuye de forma natural en la región occidental y central de Europa, lugar donde también se produce la mayor cantidad de material vegetal para su venta y exportación, sobre todo en España, Italia y Alemania, aunque en el caso de México también hay algunas empresas que la utilizan para elaborar remedios herbolarios e incluso para la venta del material vegetal, aunque esto se ha limitado sólo a algunas empresas que la cultivan de forma particular (Waizel-Bucay y Cruz-Juárez, 2014). La ausencia de material vegetal comercializado en los mercados representa un dato importante para la seguridad de los consumidores, ya que se ha reconocido que *A. montana* puede resultar tóxica al ser ingerida como infusión (Daane, 2001), y en el marco de los complejos etnobotánicos, donde varias especies reciben el mismo nombre común y se utilizan para los mismos fines terapéuticos, la forma más común de consumo del árnica mexicana, tisana e infusión, podría generar eventos de intoxicación si estuviera disponible en libre venta el árnica europea.

El árnica mexicana *H. inuloides* goza de la mayor aceptación por parte de la población, ya que esta es la especie que se ofreció al preguntar por el simple nombre de “árnica”. Este fenómeno puede darse debido a la regulación efectuada por diferentes instituciones como COFEPRIS a través del conocimiento y métodos de control de calidad establecidos por la FHEUM (2021), sin embargo, esta regulación se limita a empresas que manufacturan productos que contienen a estas especies, lo que

significa que el alcance de este documento regulador es acotado, ya que se trata de un registro de especies utilizadas y no de una autoridad sobre la venta de drogas vegetales. Otro factor a considerar son los gastos de importación, dado que las empresas que producen *A. montana* en México la utilizan en la elaboración de pomadas y ungüentos, mientras que el material vegetal fresco y seco se produce mayormente en Europa occidental, sobre todo en Alemania, Francia y España (Waizel-Bucay, 2014), lo cual implica un gasto adicional que influyen en la preferencia de plantas nacionales por encima de las importaciones.

De manera contrastante, en este estudio fue posible conseguir dos plantas que se comercializaban bajo los nombres de “árnica de monte” y “árnica morada”, especies cuyos nombres comunes no se encuentran en la lista recopilada por Rodríguez-Chávez *et al.* (2017), pero cuyas propiedades medicinales descritas por el locatario, fueron como antiinflamatorias y tratantes de heridas, características del complejo etnobotánico árnica.

En el caso del árnica de monte, se demostró por medio del uso de BLAST de las secuencias de *rbcL* e *ITS2* que su identidad más probable es la especie *Chrysactinia mexicana* A. Gray, una especie de la familia Asteraceae que en la filogenia demostró tener la relación más cercana con *A. montana* y *H. inuloides*, dos especies pertenecientes a la misma familia botánica. Por otro lado, el árnica morada fue identificada por BLAST como la especie *Cuphea aequipetala* Kunth, la cual se clasifica dentro de la familia Lythraceae, un grupo estrechamente relacionado con la familia Onagraceae, ambas dentro del orden Myrtales (APG IV, 2016) y cuya relación fue corroborada al demostrar su estrecha relación con la especie *O. rosea* dentro de este estudio.

El árnica de monte, *Chrysactinia mexicana*, se caracteriza por su uso como fungicida para el tratamiento de afecciones de la piel derivadas por hongos, candidiasis o unicomicosis (Medina-de la Cruz *et al.*, 2021) aunque también destaca como antiinflamatorio para el tratamiento de úlceras y gastritis (Reyes-Matamoros *et al.*, 2022), una característica que comparte con la mayoría de especies de este complejo; no obstante, esta planta recibe varios nombres comunes los cuales no concuerdan con el nombre de árnica, algunos de los cuales son “hierba de San Nicolás” o “damianita” (Naturalista, 2022), así como “calanca” (Reyes-Matamoros *et al.*, 2022). Cabe destacar que esta especie cuenta con una amplia distribución a lo largo del país y en el caso de los nombres anteriormente mencionados, provienen de avistamientos en el sur de Estados Unidos, en donde se utiliza el nombre “damianita”, así como el caso del nombre “calanca” que proviene de un estudio hecho en Puebla; esto deja la posibilidad de que el nombre de “árnica de monte” pueda ser considerado como un regionalismo propio de la Ciudad de México y por lo tanto, como un registro nuevo dentro del complejo árnica.

El árnica morada, *Cuphea aequipetala*, es la especie del género *Cuphea* más conocida en México y la más vendida como remedio herbolario, utilizada en el tratamiento de dolores musculares, golpes,

gastritis y úlceras e incluso como tratamiento complementario para cáncer, aunque en menor porcentaje (Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2012). Esta especie es denominada bajo varios nombres, como “trompetilla”, “apanchola”, “pegamosca”, “hierba del cáncer”, “alcáncer”, “mirto”, “petalillo” o “zapotillo” (Márquez *et al.*, 1999), aunque en estudios posteriores se registra bajo el nombre de “árnica falsa” (Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2012), lo que adquiere sentido al contemplar los usos medicinales tan similares que comparte con el resto de las especies de este complejo etnobotánico. Aún así, su registro como “árnica morada” no fue encontrado, lo que podría significar un regionalismo no registrado para esta especie, al igual que en el caso del árnica de monte.

Extracción de DNA

En cuanto a las muestras de Jardín Etnobiológico y mercado, una mayor cantidad de ejemplares mostró una buena calidad de DNA, lo cual se observó por medio de la espectrofotometría y la electroforesis del DNA extraído, sin embargo, el DNA extraído de ejemplares de herbario fue de menor cantidad y calidad, un resultado esperado debido a la degradación del DNA y cambios moleculares en ejemplares herborizados almacenados durante años (Graper *et al.*, 2021). De acuerdo con Särkinen *et al.* (2012) existen dos posibles factores que afectan el éxito en las extracciones de DNA de estos especímenes. El primero corresponde a los caracteres específicos del espécimen, en el que se engloba el proceso de secado, congelación y almacenamiento, por lo que los problemas presentes al tratar un individuo pueden llevar a daño en los tejidos y lisis celular; la segunda razón alude a los caracteres específicos del taxón, que se entiende como el trato que debe tener cada grupo, lo que cobra importancia cuando no se consideran requisitos especiales para cada tipo de hoja, así mismo, en este factor se enuncia que es necesario contemplar que la producción de metabolitos secundarios difiere entre linajes, lo que refuerza la idea de establecer más estudios para un correcto trabajo de herborizado que permita realizar mejores estudios a nivel molecular.

La degradación de DNA también afecta a los procedimientos de amplificación, puesto que puede existir la posibilidad de carecer de DNA que funcione como molde durante el proceso de PCR, una consecuencia que aumenta proporcionalmente con la edad del espécimen de herbario, aún cuando se haya realizado un procedimiento adecuado de almacenamiento (Graper *et al.*, 2021). Esto es relevante con respecto al trato de especímenes de herbario, pero cobra importancia también con los individuos de libre venta que pueden adquirirse, ya que además de no contar con un procedimiento de almacenamiento adecuado, hay irregularidades entre el período que se colectan y su venta.

El trato del material vegetal para el comercio es un aspecto importante que influye en los resultados de la extracción y amplificación de los ácidos nucleicos, pues al igual que en las muestras de herbario, el tiempo transcurrido desde su colecta y su tratamiento posterior influye en la calidad del DNA de los individuos (Särkinen *et al.*, 2012). En este estudio fue posible adquirir individuos frescos de *H.*

inuloides, *O. rosea* y árnica morada, lo cual representa el estado ideal de los especímenes a ser evaluados para evitar los problemas asociados con el paso del tiempo y la consecuente degradación del DNA.

En el caso del árnica de monte, el material vegetal que se adquirió se encontraba en estado seco, un aspecto que podría sugerir bajo éxito de extracción en esta especie, ya que presenta las mismas dificultades que los ejemplares de herbario, no obstante, su éxito fue similar a las especies frescas, lo que puede sugerir que el tiempo de almacenamiento no fue tan prolongado como el de los ejemplares de herbario utilizados o bien, por cualidades de la especie que le permiten una mayor conservación, ya que esta especie desarrolla madera (crecimiento secundario) y tiene propiedades antifúngicas y antibióticas (Medina-de la Cruz *et al*, 2021) que pueden evitar su infección y por lo tanto, evitar la contaminación de su genoma.

Amplificación y secuenciación

Algunos marcadores revelan obstáculos para su empleo, los cuales no pueden ser amplificados bajo condiciones previamente establecidas. El obstáculo más grande se observó en *matK*, un locus que se ha distinguido por su difícil amplificación debido a que en el mercado se ofrecen *primers* universales que no resultan eficientes para todas las especies, por lo que este marcador puede requerir de un refinamiento para cada especie, lo que lo hace de difícil uso en investigaciones que contemplan taxones de diferentes familias (Hollingsworth, 2011). Este marcador tiene un mayor éxito cuando se emplea para identificar especies dentro de una misma familia, sin embargo, esto sólo aplica en algunos casos, como se ha observado en estudios en la familia Apocynaceae, donde destaca como el marcador con la mayor eficiencia (Cabelin y Alejandro, 2016). Esto sugiere que su uso para resolver problemas de identidad dentro de complejos etnobotánicos aún presenta muchos obstáculos.

Otro marcador de interés, pero con problemas durante la secuenciación fue *trnH-psbA*, un espaciador con una alta capacidad de discriminación por sí mismo, pero cuyo empleo ha sido sugerido en compañía de *rbcL* dentro de análisis multiloci, lo que les otorga un gran potencial como posible código de barras global para plantas terrestres (Kress y Erickson., 2007), no obstante, previo a la concatenación con otros marcadores, la amplificación y secuenciación de este espaciador es problemática por la falta de un proceso riguroso, ya que en muchos estudios se han identificado inserciones de *rps19*, un gen presente alrededor de la región del espaciador (Pang *et al.*, 2012).

El caso de *rpl32-trnL* fue el más notable durante la generación de las secuencias consenso, ya que es el marcador que presenta una mayor cantidad de errores, lo cual puede deberse a factores como el tamaño de las secuencias de este espaciador, considerando que es el marcador molecular con un mayor número de pares de bases (Anexo 6). Este marcador tiene un comportamiento similar al de *matK*, en el que resulta sumamente útil para distinguir especies cercanamente emparentadas entre sí, ya que exhibe la mayor divergencia de secuencias a nivel interespecífico e incluso resulta fácil de

amplificar en subfamilias como Pooideae y Chloridoideae (ambas de la familia Poaceae), sin embargo, requiere de *primers* específicos dependiendo de la familia con la que se trabaje (Peterson *et al.*, 2014), lo cual es complicado al trabajar con complejos etnobotánicos en el que se distribuyen especies de diferentes familias.

Selección de marcadores moleculares

Dentro de los marcadores con resultados favorables destaca *rbcL*, un locus bastante confiable y de fácil amplificación que genera secuencias de un tamaño a partir de 500 pares de bases, un tamaño adecuado y que no representa dificultades para su alineamiento, razón por la que es un gen predilecto para su uso en análisis filogenéticos (Omonhinmin y Onuselogu, 2022). Es un gen útil en la identificación de especímenes de helechos y musgos, sin embargo, presenta una eficiencia media cuando es aplicado en angiospermas (Kolter y Gemeinholzer, 2021), razón por la que se recomienda un marcador que funcione como complemento para mejorar su afinidad como identificador (Li *et al.*, 2015).

En este trabajo destaca también *ITS2*, un marcador con un gran potencial, ya que se trata de una secuencia con alta divergencia interespecífica (Cristians-Niizawa, 2020), en adición a que se trata del marcador molecular con menor tamaño en sus secuencias, lo que facilita su amplificación y secuenciación. La facilidad para trabajar con este marcador recae también en el vasto registro en bases de datos, ya que al ser un espaciador intergénico ampliamente adoptado debido a su origen nuclear, permite que exista un gran repositorio de datos que ayudan a complementar análisis discriminativos (Michel *et al.*, 2016). Por sí misma, la secuencia de *ITS2* es poco eficiente, incluso menor a *ITS* (Yao *et al.*, 2010), sin embargo, no conlleva los problemas de esta última, como la presencia de secuencias parálogas (Hollingsworth, 2011).

Los marcadores en los que se generó una mayor cantidad de secuencias fueron *rbcL* e *ITS2*, mismos que, aunque poseen un origen e historia evolutiva diferentes debido a su origen en el cloroplasto y núcleo, respectivamente (Michel *et al.*, 2016), han podido resolver diversos problemas al utilizarse de forma independiente. Para efectos de este trabajo estos dos marcadores moleculares han logrado distinguir cada uno de los linajes y han reagrupado a individuos de la misma especie de forma exitosa. Especialmente, *ITS2* destaca por su facilidad de manejo, lo que se ve reflejado en la mayor eficacia de amplificación y de secuencias consenso generadas por este marcador, lo cual se suma al buen soporte obtenido en los clados conformados en el árbol filogenético y en los siete a ocho grupos formados por medio del análisis de *Barcoding gap*, los cuales aunque exceden la cantidad de especies utilizadas en este trabajo (seis en total), concentran este problema solamente en la clasificación de las muestras de *H. inuloides*, dejando al resto de muestras correctamente agrupadas dentro de su propia especie.

Conclusiones

- El marcador plastídico *rbcL* y el marcador nuclear *ITS2* son los candidatos como código de barras que permite la identificación de las especies selectas que conforman el complejo etnobotánico árnica.
- El resultado favorable del método descrito en este trabajo es relevante para el control de calidad del material vegetal, lo cual es útil como conocimiento que puede ser incorporado en documentos regulatorios como lo es la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.
- Hay especies del complejo árnica cuya venta no es tan frecuente e incluso ya no se las reconoce en los mercados, como en el caso de *Galphimia glauca*. Respecto a *Arnica montana* su venta es sólo por pedido.
- Se encontraron dos especies nuevas de árnica, no contempladas en este estudio contribuyendo al listado de especies de este complejo etnobotánico.
- Las secuencias consenso generadas y los análisis discriminativos de las especies del complejo árnica contribuyen a la escasa información molecular de plantas de la flora medicinal mexicanas.

Referencias Bibliográficas

- Aguilar-Rodríguez, S., Echeveste-Ramírez, N. L., López-Villafranco, M. E., Aguilar-Contreras, A., Elisa, V. Á. y Reyes-Chilpa, R. (2012). Etnobotánica, micrografía analítica de hojas y tallos y fitoquímica de *Cuphea aequipetala* Cav.(Lythraceae): una contribución a la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11: 316-330.
- Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical journal of the Linnean Society*. 181: 1-20.
- Aslam, M. S., y Ahmad, M. S. (2016). Worldwide importance of medicinal plants: Current and historical perspectives. *Recent Advances in Biology and Medicine*, 2: 88-93.
- Bafeel, S. O., Arif, I. A., Bakir, M. A., Al Homaidan, A. A., Al Farhan, A. H., y Khan, H. A. (2012). DNA barcoding of arid wild plants using rbcL gene sequences. *Genetics and Molecular Research*. 11: 1934-1941.
- Braukmann, T. W., Kuzmina, M. L., Sills, J., Zakharov, E. V. y Hebert, P. D. (2017). Testing the efficacy of DNA barcodes for identifying the vascular plants of Canada. *PLoS one*. 12: 1-19.
- Cabelin, V. L. D., & Alejandro, G. J. D. (2016). Efficiency of matK, rbcL, trnH-psbA, and trnL-F (cpDNA) to molecularly authenticate Philippine ethnomedicinal Apocynaceae through DNA barcoding. *Pharmacognosy magazine*. 12: S384.
- Čandek, K. y Kuntner, M. (2015). DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales. *Molecular ecology resources*. 15: 268-277.
- Cognato A. I., Caesar R. M.. 2006. Will DNA barcoding advance efforts to conserve biodiversity more efficiently than traditional taxonomic methods? *Front. Ecol. Environ.* 4:268–273.
- Collins, R. A. y Cruickshank, R. H. (2013). The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular ecology resources*. 13: 969-975.
- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2021). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. 3ª ed. Ciudad de México: Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 371 p.
- Cristians-Niizawa, S. (2020). Los códigos de barra moleculares como una herramienta para la identificación de plantas medicinales. *Mensaje bioquímico*. 44: 31-37.
- Cummings, M. P., S. A. Handley, D. S. Myers, D. L. Reed, A. Rokas y K. Winka. 2003. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case. *Systematic Biology*. 52: 477-487
- Daane, S. P. (2001). Potential for danger with *Arnica montana*. *Annals of Plastic Surgery*. 46: 349-350.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 45: e2565.
- Esquivel-García, R., Pérez-Calix, E., Ochoa-Zarzosa, A. y García-Pérez, M. E. (2018). Flora

etnomedicinal utilizada para el tratamiento de afecciones dermatológicas en la Meseta Purépecha, Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana*. 125: 95-132.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution*. 17: 368-376.

Gen Bank. (2022). Rescatado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. 06/05/2022 12:30 hrs.

Goloboff, P. A. (2003). Parsimony, likelihood, and simplicity. *Cladistics*. 19: 91-103.

Graper, A. L., Noyszewski, A. K., Anderson, N. O., & Smith, A. G. (2021). Variability in *ITS1* and *ITS2* sequences of historic herbaria and extant (fresh) *Phalaris* species (Poaceae). *BMC Plant Biology*. 21: 1-16.

Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D. y Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*. 23: 167-172.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. y DeWaard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 270: 313–321.

Heinrich, M. y Anagnostou, S. (2017). From pharmacognosia to DNA-based medicinal plant authentication—pharmacognosy through the centuries. *Planta medica*. 83: 1110-1116.

Hollingsworth, P. M. (2011). Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108: 19451-19452.

Hollingsworth, P. M., Graham, S. W. y Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PloS one*. 6: 1-13.

Huelsenbeck, J. P., Ronquist, R. Nielsen y J. P. Bollack. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*. 294: 2310-2314.

Juárez-Rosete, C. R., Aguilar-Castillo, J. A., Juárez-Rosete, M. E., Bugarin-Montoya, R., Juárez-López, P. y Cruz-Crespo, E. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista Bio Ciencias*. 2:119-129.

Kolter, A. y Gemeinholzer, B. (2021). Plant DNA barcoding necessitates marker-specific efforts to establish more comprehensive reference databases. *Genome*. 64: 265-298.

Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS one*. 2: e508.

Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. y Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 8369-8374.

Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y. y Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews*. 90: 157-166.

Linares, E. y Bye Jr, R. A. (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent

United States. *Journal of Ethnopharmacology*. 19: 153-183.

Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Avila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and Biobanking*. 14: 264-270.

Marcial-Quino, J., Mendoza-Espinoza, J. A. y Sierra-Palacios, E. (2015). DNA barcoding: An alternative for the identification of the medicinal plants employed in Mexico. *Journal of Plant Sciences*. 10: 116.

Medina-de la Cruz, O., Leal-Morales, C. A., Meza-Menchaca, T., Guillen, L., Juárez-Flores, B. I. y Gallegos-García, V. (2021). Efecto del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* A. Gray sobre aislados clínicos de *Candida glabrata*. *Biotecnia*. 23: 28-35.

Meier, R., Zhang, G. y Ali, F. (2008). The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the “barcoding gap” and leads to misidentification. *Systematic biology*. 57: 809-813.

Michel, C. I., Meyer, R. S., Taveras, Y. y Molina, J. (2016). The nuclear internal transcribed spacer (ITS2) as a practical plant DNA barcode for herbal medicines. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 3: 94-100.

Naturalista. 2022. *Chrysactinia Mexicana*. Rescatado de: <https://www.naturalista.mx/taxa/160538-Chrysactinia-mexicana> 20/11/2022 17:53 hrs.

Omonhinmin, C. y Onuselogu, C. (2022). rbcL gene in global molecular data repository. *Data in Brief*. 42:1-7.

Organización Mundial de la Salud. (2007). WHO monographs on selected medicinal plants: volumen 3. WHO Press. España. 376 p.

Pang, X., Liu, C., Shi, L., Liu, R., Liang, D., Li, H. y Chen, S. (2012). Utility of the trnH-psbA intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis. *PloS one*. 7: e48833.

Peterson, P. M., Romaschenko, K. y Soreng, R. J. (2014). A laboratory guide for generating DNA barcodes in grasses: a case study of *Leptochloa* sl (Poaceae: Chloridoideae). *Webbia*. 69: 1-12.

Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. and Achaz, G. (2011). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*. 21(8): 1864-1877

Reyes-Matamoros, J., Martínez-Moreno, D., Fuentes-López, J. G. y Basurto-Peña, F. (2022). Importancia relativa de las especies medicinales ofertadas En el mercado de Tepeaca, Puebla, México. *Polibotánica*. 54: 271-289.

Rodríguez-Chávez, J. L., Egas, V., Linares, E., Bye, R., Hernández, T., Espinosa-García, F. J., y Delgado, G. (2017). Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 195: 39-63.

Roe A. D. y Sperling F. A. H.. 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44:325–45.

Särkinen, T., Staats, M., Richardson, J. E., Cowan, R. S., & Bakker, F. T. (2012). How to open the treasure chest? Optimising DNA extraction from herbarium specimens. *PLOS One*. 7: 1-9.

Scotland, R. W., Olmstead, R. G. y Bennett, J. R. (2003). Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Systematic Biology*. 52: 539-548.

Sharma, A., Folch, J. L., Cardoso-Taketa, A., Lorence, A. y Villarreal, M. L. (2012). DNA barcoding of the Mexican sedative and anxiolytic plant *Galphimia glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*. 144: 371- 378.

Smith, M.A., Poyarkov, N.A. Jr, Hebert, P.D.N. (2008) COI DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge. *Molecular Ecology Resources*. 8: 235– 246.

Šutovská, M., Capek, P., Kočmalová, M., Pawlaczyk, I., Zaczyńska, E., Czarny, A. y Fraňová, S. (2014). Characterization and pharmacodynamic properties of *Arnica montana* complex. *International Journal of Biological Macromolecules*. 69: 214-221.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725–2729.

Techen, N., Parveen, I., Pan, Z., y Khan, I. A. (2014). DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current opinion in Biotechnology*. 25: 103-110.

Van Rossum, F. y Raspé, O. (2018). Contribution of genetics for implementing population translocation of the threatened *Arnica montana*. *Conservation Genetics*. 19: 1185-1198.

Veldman, S., Otieno, J., Gravendeel, B., van Andel, T. y de Boer, H. (2014). Conservation of endangered wild harvested medicinal plants: use of DNA barcoding. En: Gurib-Fakim, A. Eds. *Novel Plants Bioresources Applications in Food Medicine and Cosmetics*, pp. 81-88. John Wiley & Sons. U.K.

Waizel-Bucay, J., y Cruz-Juárez, M. D. L. (2014). *Arnica montana* L., planta medicinal europea con relevancia. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 5: 98-109.

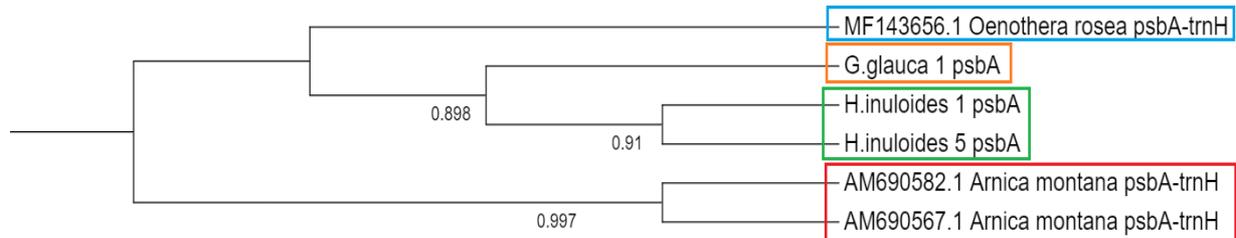
Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y. y Chen, S. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PloS one*. 5: e13102.

Anexos

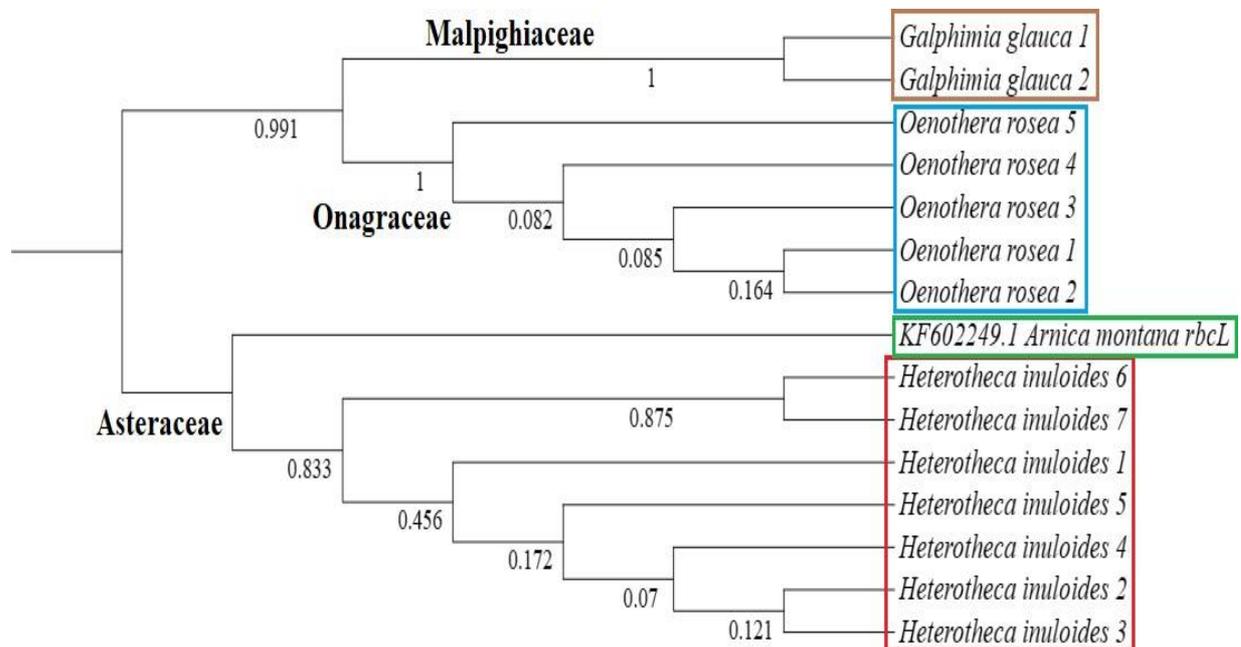
Anexo 1. Lista de individuos de *H. inuloides*, *G. glauca* y *O. rosea* con su clave correspondiente dentro del acervo de materiales herborizados en el Herbario Nacional (MEXU).

| Especie | Clave en MEXU | Estado de proveniencia |
|------------------|---------------|------------------------|
| <i>G. glauca</i> | 1454723 | Querétaro |
| <i>G. glauca</i> | 1252951 | Veracruz |
| <i>G. glauca</i> | 1216095 | Oaxaca |
| <i>G. glauca</i> | 1314666 | Guanajuato |
| <i>G. glauca</i> | 1363482 | Michoacán |
| <i>G. glauca</i> | 1507527 | Querétaro |
| <i>G. glauca</i> | 1474036 | Oaxaca |

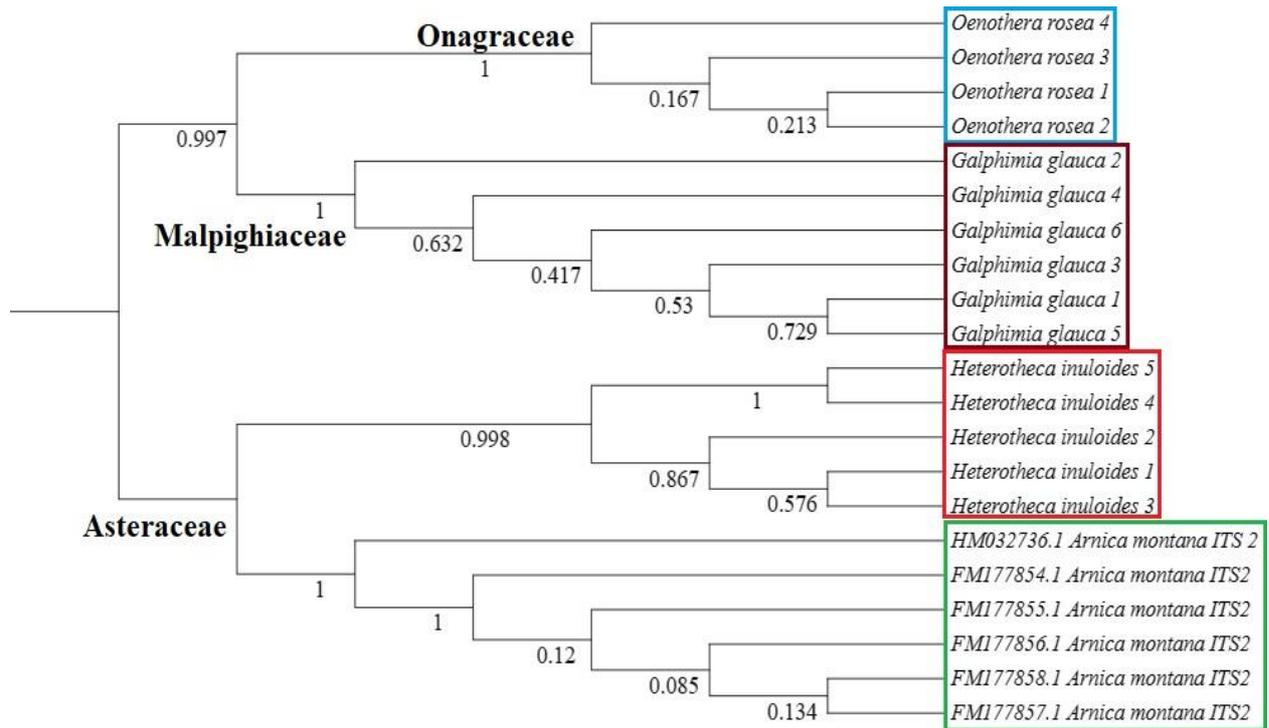
| | | |
|---------------------|---------|------------------|
| <i>H. inuloides</i> | 1383723 | Estado de México |
| <i>H. inuloides</i> | 1472804 | Puebla |
| <i>O. rosea</i> | 1344295 | Durango |
| <i>O. rosea</i> | 1185222 | Estado de México |



Anexo 2. Árbol inferido mediante el método de Máxima verosimilitud y el modelo de sustitución de nucleótidos Kimura de 2 parámetros a partir del interespaciador génico *trnH-psbA*. Los números en las ramas representan el soporte de Bootstrap (1000 réplicas) y se resaltan en diferentes colores cada una de las especies. Los análisis fueron realizados en el software Mega XI (Tamura et al., 2021).



Anexo 3. Árbol inferido mediante el método de Máxima verosimilitud y el modelo de sustitución de nucleótidos Tamura de 3 parámetros a partir del gen *rbcL*. Los números en las ramas representan el soporte de Bootstrap (1000 réplicas) y se resaltan en diferentes colores cada una de las especies. Los análisis fueron realizados en el software Mega XI (Tamura et al., 2021).



Anexo 4. Árbol inferido mediante el método de Máxima verosimilitud y el modelo de sustitución de nucleótidos Tamura de 3 parámetros a partir del espaciador nuclear *ITS2*. Los números en las ramas representan el soporte de Bootstrap (1000 réplicas) y se resaltan en diferentes colores cada una de las especies. Los análisis fueron realizados en el software Mega XI (Tamura et al., 2021).

Anexo 5. Secuencias consenso de los marcadores moleculares *rbcL* e *ITS2*, generadas a partir de las muestras de árnica de monte y árnica morada obtenidas en el mercado, mismas que corresponden con mayor probabilidad de identidad a *Chrysactinia mexicana* y *Cuphea aequipetala*, respectivamente.

| Árnica de monte (<i>Chrysactinia mexicana</i>) | |
|--|---|
| <i>rbcL</i> | CAAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTTAAAGATTATAAATTGACTTATTATACTCCTGAATATGAAA CCAAGGATACTGATATCTTGGCAGCATTTCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCGCCTGAAGAAG CAGGGGCCGAGTAGCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACTGTATGGACCGATGGACTT ACGAGCCTTGATCGTTACAAAGGCCGATGCTATGGAATCGAGCCTGTTCTGGAGAAGACAATCA ATATATTGCTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACT TCCATTGTAGGTAATGTATTTGGATTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAAGATTTGCGAATC CCTACTGCGTATGTTAAAACCTTCGAGGGTCCGCCTCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTG AACAAGTATGGTCGTCCTGTTGGGATGTACTATTAACCTAAATTGGGGTTATCCGCTAAAAC TACGGTAGAGCTTGTATGAA |
| <i>ITS2</i> | CCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTTGGTTGAGGGCACGTCTGC CTGGGCGTCACGCATCTTGTCGCCCCACCATGCTTCCTTTTTGCTGGATGTATTTGGGGCGGGGGC GGAGATTGGTCTCCCATGCCTACGTGGTGTGGCTGGCCTAAACAGAAGTCCCTCAAGAGGATCG CAGACTAGTGGTGGTTTGTAAGATAGTTGCTCGTGTGTGCTCTTGATTGTTGAGGGAGAAAGA |

| | |
|--|--|
| 2 | TCTTAAAATAACCCGATGTGTTGTCTTTTTGATGATGCTTCGATCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGAC TACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTTACAAGGATTCCCTTAGTAA CGGCGAGCGAACCGGGAATGGCCCAGCTTGAAAATCGGGAACGGCG |
| Árnica morada (<i>Cuphea aequipetala</i>) | |
| r b c L | GTGTTGGATTCAAAGCCGGTGTAAAGATTATAAACTGACTTATTATACTCCTGAATATGAAACCA AAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCCGCCTGAGGAAGCAG GGGCTGCAGTAGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACCTGGACAACCTGTGTGGACCGATGGGCTTACCA GCCTGGATCGTTATAAAGGAAGATGCTACCACATCGAGCCTGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATAT ATATGTTATGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAATATGTTTACTTCCA TTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAAGCTCTGCGTGCTCTACGTCTGGAGGATCTGAGAATTCCCTA CTGCATATGTTAAAACCTTCCAAGGCCACCTCATGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAGTTGAACA AGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAACCGAAATTGGGGTTATCTGCTAAGAACTACG GTTCGAGCGGTTT |
| I T S 2 | TGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGACGCCATTTCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGG GTGTACGCATTACCTCGCCCCAAACCCACTTGTGGTGTATGGGAGCGGAACATGGTCTCCCGTGG CGCATTGCTGCGGTTGGCCTAAATATGAGCACGGGAGCGGCGTATTCCGCGACGCACGGTGGTGG TAATATTTCCCCCTCGGGCACCAGTCCGGAGCGACCTCCCATAGATTTGCTCGACGGCCTTCCACT AAACAAACGCGACCCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGG AAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAATGCCACCATGAAAA TCGAGCACCTTC |

Anexo 6. Tamaño promedio de las secuencias consenso de los diferentes marcadores moleculares utilizados para las seis especies selectas del complejo árnica. Los espacios en blanco representan ausencia de secuencias.

| | <i>rbcL</i> | <i>ITS2</i> | <i>psbA-trnH</i> | <i>rpl32-trnL</i> |
|-----------------------|-------------|-------------|------------------|-------------------|
| <i>A. montana</i> | 652 pb | 684 pb | 396 pb | |
| <i>H. inuloides</i> | 556 pb | 442 pb | 262 pb | 465 pb |
| <i>O. rosea</i> | 555 pb | 410 pb | 353 pb | 541 pb |
| <i>G. glauca</i> | 553 pb | 444 pb | 448 pb | 1028 pb |
| <i>C. mexicana</i> | 554 pb | 446 pb | | |
| <i>C. aequipetala</i> | 546 pb | 409 pb | | |