



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

FACULTAD DE BIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CONSERVACIÓN Y MANEJO DE LOS RECURSOS NATURALES

TESIS

**Diversidad genética en *Salvia elegans* Vahl. (Lamiaceae),  
poblaciones con potencial para restauración**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN  
CONSERVACIÓN Y MANEJO DE RECURSOS NATURALES**

Biol. Brenda Yudith Bedolla García

Directora de Tesis: Dra. Sabina Irene Lara Cabrera.

Morelia, Michoacán, junio de 2008

## Índice

Índice de figuras y cuadros.....	<i>i</i>
Resumen.....	1
I. Introducción .....	2
II. Marco teórico .....	4
2.1 Características de <i>Salvia elegans</i> Vahl .....	4
2.2. Diversidad genética .....	4
2.3. Diversidad genética en Lamiaceae .....	5
2.4 Aplicación práctica de aspectos genéticos implícitos en restauración ecológica...	6
2.5 Marcadores Moleculares.....	8
2.6 RAPD (Polimorfismos de ADN amplificados al azar).....	10
III. Objetivos.....	12
IV. Materiales y Métodos .....	13
Localización y colecta de las poblaciones de <i>Salvia elegans</i> .....	13
4.2 Extracción y cuantificación del ADN.....	14
4.3 Amplificación de ADN por medio de RAPD .....	14
4.4 Electroforesis y fotografiado de las muestras.....	15
4.5 Análisis de datos.....	15
4.5.1 Interpretación de los datos de RAPD .....	15
4.5.2 Registro de las bandas obtenidas .....	16
4.5.3 Diversidad genética .....	16
4.5.4. AMOVA (Análisis Molecular de Varianza).....	17
4.5.5. Distancias genéticas.....	17
V. Resultados.....	19
5.1 Análisis genética.....	19
5.2 Diversidad genética .....	19
5.3 Estructura Genética.....	20
5.4 AMOVA .....	20
5.5 Distancias genéticas.....	21
5.5.1 Prueba de Mantel.....	24
VI. Discusión.....	25
VII. Conclusiones .....	30
VIII. Literatura Citada .....	31
IX. Apéndices .....	37
Apéndice 1. Protocolo de extracción del ADN MINI-PREP .....	37
Apéndice 2. Protocolo de Cuantificación de ADN por espectrofotometría .....	40
Apéndice 3. Receta para geles de azarosa .....	41

## Índice de Figuras y Cuadros

Figura 1. Localización geográfica de las 8 poblaciones colectas de <i>S. elegans</i> .....	13
Figura 2. Representación grafica de la distribución de la variación molecular.....	21
Figura 3. Análisis de distancias genéticas representadas en el dendograma (UPGMA) basado en las distancias genéticas de Nei.....	22
Figura 4. Dendograma basado en el índice de Dice utilizando el método de agrupamiento UPGMA.....	23
Figura 5. Correlación entre las distancias geográficas y genéticas de Nei.....	24
Cuadro 1. Localización y descripción de los sitios de colecta .....	14
Cuadro 2. Número de bandas polimórficas y monomórficas obtenidas con los 10 oligonucleótidos ensayados en el presente estudio .....	19
Cuadro 3. Descripción de la variabilidad genética de 4 poblaciones de <i>S. elegans</i> .....	20
Cuadro 4. Análisis de Varianza Molecular para las poblaciones de <i>S. elegans</i> .....	20
Cuadro 5. Distancia genética entre las 8 poblaciones .....	22
Cuadro 6. Diferencia de las distancias geográficas en Kilómetros entre las 8 poblaciones de <i>S. elegans</i> .....	23
Cuadro 7. Patrones de variación genética dentro y entre poblaciones silvestres de varias especies de plantas, estimadas a partir de patrones de RAPD y usando el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA).....	27

---

## Resumen

El conocimiento de la estructura genética poblacional y diversidad genética de las especies es necesario para un buen manejo en conservación y/o restauración. *Salvia elegans* es una hierba leñosa que esta presente en bosques de coníferas distribuida a lo largo del Eje Neovolcánico. Se determinó la estructura genética de 8 poblaciones en *S. elegans* mediante la técnica de marcadores moleculares RAPD con 10 oligonucleótidos, que generaron 158 bandas, de las cuales el 95.5% fueron polimórficas. La variación genética total fue de 0.29; el AMOVA mostró mayor variación genética dentro de las poblaciones (59%), que entre poblaciones (41%), probablemente debido al tipo de reproducción; la adaptación a micro escala debido a la conducta del polinizador, y/o a las actividades antropogénicas que han ido fragmentando el hábitat. Los dendogramas UPGMA basados en las distancias genéticas de Nei y el coeficiente de Dice agruparon a las poblaciones de San Nicolás y El Tepamal por procedencia al igual que Mil Cumbres y Jerahuaró. Existe una relación significativa entre la distancia geográfica y la distancia genética ( $r = 0.3605$ ;  $P = 0.049$ ) indicando aislamiento geográfico. El actual estado de conservación de los bosques de coníferas probablemente se vio reflejado en los índices de diversidad, ya que poblaciones de las localidades de Mil Cumbres, Jerahuaró y Temascaltepec presentaron mayores índices de diversidad y se encuentran en áreas conservadas. Debido a que *S. elegans* es variable en su dinámica poblacional se recomienda a El Tepamal para utilizar como fuente de semilla para la restauración de bosques de coníferas en la región San Juan Nuevo Parangaricutiro.

## I. Introducción.

En las últimas décadas se ha manifestado la relevancia que tiene el conocer la variabilidad genética para la conservación y manejo de la biodiversidad (Loo 2005), ya que es el recurso principal que tienen las especies para evolucionar y adaptarse a cambios ambientales (Fisher 1930, Griffiths et al. 2000). En este sentido, la gran mayoría de los trabajos sobre genética han estado enfocados a la conservación de especies endémicas silvestres o en peligro de extinción, incluso a especies de importancia económica (Mattner et al. 2002, Susheel et al. 2007, Belaj et al. 2003).

Sin embargo, en los últimos 6 años la diversidad genética también ha tomado relevancia en el campo de la restauración ecológica, ciencia que tiene como propósito el restablecer, en la medida de lo posible, toda la gama de atributos, estructura y función original de un ecosistema (Lindig et al. 2005).

Recientes trabajos en restauración ecológica como el de Hufford y Mazer (2003), Rice y Emery (2003) y McKay et al. (2005) han dado lugar al surgimiento de un nuevo campo, denominado genética de la restauración, que es una síntesis de la restauración ecológica y genética de poblaciones. Hufford y Mazer (2003) plantean algunas interrogantes que debieran ser tomadas en cualquier proyecto de restauración: ¿cómo son afectadas las poblaciones existentes (adaptadas a sus condiciones locales) por la introducción de nuevos genes y genotipos?, ¿qué nivel de diversidad genética se requiere para tener éxito en un proyecto de restauración? y ¿en qué nivel la diversidad genética se mantiene estable?

A menudo, los ecólogos de la restauración se enfrentan con las consecuencias prácticas de esta variación genética cuando seleccionan material vegetal para introducir en los sitios a restaurar (Falk et al. 2005, McKay et al. 2005); por lo que es necesario una mayor atención en el diseño, implementación y expectativas de cualquier proyecto de restauración (Rice y Emery 2003). Si se conociera cómo la variación genética es distribuida entre y dentro de las poblaciones los ecólogos podrían mantener el flujo genético a través del tiempo y la adaptación local de las especies, evitando así la pérdida de variación genética (McKay et al. 2005). Con esta información se puede crear una directriz en la selección de los recursos genéticos en el proceso de restauración y delinear zonas de transferencia de semilla o regiones dentro de las cuales las plantas puedan moverse con pocas o nulas consecuencias

que afecten el vigor de la población (Hufford y Mazer, 2003).

Desafortunadamente, la gran mayoría de los estudios a nivel genético que se han realizado en el contexto de la reforestación, enfocados a especies del estrato arboreo, principalmente coníferas (Allnutt et al. 1999, Díaz et al. 2001, Newton et al. 2002) postergando la atención en la vegetación del sotobosque; debido a las dificultades asociadas con el manejo del gran número de especies de este estrato y su naturaleza dinámica (en términos fenológicos) que hace que su apariencia cambie radicalmente con las estaciones y la variación microclimática bajo el dosel del bosque.

Actualmente, en la región de Nuevo San Juan Parangaricutiro se desarrolla un proyecto global sobre restauración de bosques de coníferas en zonas perturbadas en colaboración con la Dirección Técnica Forestal de la Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro y financiado por CONACYT (SEMARNAT-CONACyT-2002-C01-0760), con el presente trabajo se pretende aportar conocimientos sobre la diversidad genética de *Salvia elegans* Vahl, que en el futuro podría constituir una especie candidata para restaurar el sotobosque de esta zona.

La intención de estudiar a *Salvia elegans*, es por dos razones: 1) es una especie que atrae principalmente colibríes (Wester y Clasen-Bockhoff 2007) y en un futuro, este dispersor podría ayudar en la recolonización por otras especies dispersadas del bosque, y 2) es una especie que dentro del género *Salvia* cuenta con la mayor distribución en tipos de vegetación en la zona como son: bosque de pino, bosque de pino-encino, bosque de pino-oyamel; así mismo presenta un amplio rango altitudinal que va desde los 2150 a 3200 msnm en esta zona (Medina et al. 2000)

Con este trabajo se evalúa un tema de frontera en el campo de la restauración ecológica al tomar en cuenta la variación genética, dentro y entre poblaciones de *Salvia elegans*, para contribuir a establecer lineamientos generales para colecta, introducción y reintroducción de especies nativas del sotobosque.

---

## II. Marco teórico.

### 2.1 Características de *Salvia elegans* Vahl.

*Salvia elegans* Vahl pertenece a la familia Lamiaceae; es una planta herbácea perenne o arbusto de porte bajo de 0.8 a 2 m de alto; láminas foliares ovadas con numerosas glándulas en el envés; brácteas ovadas, corola roja. Se distribuye ampliamente en la República, desde Sonora y Chihuahua hasta Veracruz y Oaxaca. Se encuentra en un rango altitudinal que va de los 2550 a los 3100 msnm. Habita en bosques de *Abies*, *Pinus*, *Quercus* y mesófilos de montaña (Ramamoorthy 2001).

### 2.2. Diversidad genética.

La diversidad genética constituye en última instancia el fundamento de la biodiversidad, es aquí donde las especies adquieren la variación heredable, materia prima de la evolución y selección natural. Esta diversidad genética está compuesta por una gran complejidad de alelos que van y vienen dentro de las poblaciones y se comparten entre ellas, por ejemplo en especies diploides, cada locus esta representado doblemente en el genoma de un individuo, lo que significa que tienen 2 copias de cada gen, una de la madre y otra del padre; si los alelos recibidos de los padres son iguales, el gen se llama homocígo, y si son diferentes, se llama heterocígo (Furnier 2004, Cambell et al. 1996))

De manera práctica, esta variación genética puede afectar la sobrevivencia y permanencia de los individuos. En un organismo diploide, cuando un individuo es homocigoto para un gen o locus, las mutaciones que no son benéficas son expresadas, lo que conduce a problemas de desarrollo, fisiológicos y conductuales de origen genético (Falk 2005).

La disciplina que estudia a los procesos que ocasionan cambios en los alelos se denomina genética de poblaciones (Cambell et al. 1996), ésta nos proporciona un marco de referencia del estado de una especie al muestrear los loci genéticos y estimar parámetros básicos como el número de alelos, diversidad genética, niveles esperados y observados de heterocigocidad y parámetros de variación dentro y entre poblaciones (Nelson 2005). Estos parámetros son importantes para la conservación y el manejo de los recursos genéticos (Furnier 2004)

Medir e interpretar los niveles y patrones de variación genética requiere de un entendimiento de las fuerzas evolutivas que moldean la variación (Hartl y Clark 1997). Estas fuerzas, selección, mutación, deriva genética y endogamia juegan un papel crucial en la extinción de poblaciones cuando sus individuos comienzan a disminuir, por ejemplo al reducirse la diversidad genética, las tasas de deriva genética incrementan y los alelos comienzan a extinguirse por un cambio más rápido que el de los generados por las mutaciones (Meffe y Carroll 1997). A continuación se describen estas fuerzas moldeadoras de la variación genética:

**Recombinación genética:** durante la meiosis, cromosomas homólogos, uno heredado de cada padre, tienden a formar sus genes por entrecruzamiento y después los cromosomas homólogos y los alelos son segregados al azar dentro de gametos separados. Los gametos de un individuo varían extensamente en su apariencia genética y cada cigoto es mantenido por una gran variedad única de alelos resultado de la unión azarosa de un óvulo y un espermatozoide, así una población contiene un vasto número de posibles combinaciones, por el contrario si el entrecruzamiento se da entre individuos relacionados, disminuye mucho el poder de recombinación aumentando la frecuencia de homocigotos, este fenómeno se conoce como endogamia (Cambell et al. 1996).

**Mutación:** a través de esta fuerza se generan nuevos alelos, una mutación puede afectar cualquier locus-gen de forma accidental aunque es raro y azaroso; es importante para la evolución porque es la fuente original de la variación genética que sirve como materia prima para la selección natural (Cambell et al. 1996).

**Selección natural:** proceso de interacción entre los organismos y su ambiente que resulta en una tasa de reproducción diferencial de los diferentes genotipos presentes en una población (Curtis et al. 2001). De todos los agentes microevolutivos que cambian el “pool genético”, sólo la selección natural es adaptativa porque acumula y mantiene genotipos favorables en una población; si el medio ambiente cambia, la selección responde favoreciendo a aquellos genotipos adaptados a nuevas condiciones (Cambell et al. 1996).

**Flujo genético –migración-:** es el intercambio o movimiento de gametos, individuos y poblaciones a una escala geográfica; este flujo puede actuar limitando la habilidad de las poblaciones a adaptarse a condiciones locales o promover la propagación de genes o

genotipos a través de un rango geográfico de distribución de una especie en particular (Dermott y Bruce 1993).

**Deriva genética:** es un cambio en el reservorio génico que ocurre como resultado del azar generalmente en poblaciones pequeñas (Curtis et al. 2001). Debido a que la deriva es un proceso aleatorio, el resultado no es el mismo en cada población y así puede causar la diferenciación entre poblaciones (Cambell et al. 2001).

### **2.3. Diversidad genética en Lamiaceae.**

Se han realizado varios trabajos en lamiaceae en cuanto a diversidad genética, por ejemplo en especies catalogadas como amenazadas se tiene a: *Thymus loscosii*, distribuida en España (Lopez-Pujol et al. 2004), *Eremostachys superba* distribuida en el Himalaya (Susheel et al. 2007), a pesar de estar amenazadas ambas presentan altos niveles de diversidad genética. También se tienen reportes de diversidad genética en especies endémicas como *Phlomis lychnitis* y *P. crinita* (Albaladejo y Aparicio 2007); *Hesperozygis ringens* (Fracaro y Echeverrigaray 2006); *Ballota undulata* y *B. saxatilis* (Zaghloul et al. 2006). Además Mattner et al (2002) reportan una especie de labiada endémica (*Hemigenia exilis*) de Australia utilizada en restauración por su capacidad de crecer en suelos ricos en metales, Lopez-Pujol et al (2003) estudian el efecto de la fragmentación de dunas en *Stachys maritima*; Mitchell (2001) examina el efecto del tamaño poblacional y el número de poblaciones vecinas (metapoblaciones) sobre la distribución y permanencia de la diversidad genética en *Scutellaria montana*, herbácea endémica de norte América. Desafortunadamente, no existen estudios sobre diversidad genética ni para el género *Salvia*, ni para la especie *S. elegans*.

### **2.4 Aplicación práctica de aspectos genéticos implícitos en restauración ecológica.**

La diversidad genética en el contexto de la restauración juega un papel importante porque provee la base para la adaptación de los seres vivos ante cualquier cambio ambiental, previene o aminora los efectos deletéreos de endogamia en pequeñas o aisladas poblaciones, y selecciona poblaciones para la obtención del germoplasma (Falk et al. 2005).

La constitución genética de una población introducida tiene un efecto importante en la persistencia a corto y largo plazo en las poblaciones nativas. Los genotipos pueden derivar de varias fuentes: incluyendo 1) poblaciones locales, 2) poblaciones distantes utilizadas comúnmente en situaciones de restauración y/o 3) cultivares (mezcla de genotipos con acumulación máxima de diversidad genética) (Lesica y Allendorf 1999); la elección del germoplasma dependerá del grado y tamaño del disturbio en la zona a restaurar.

Por ejemplo, cuando el disturbio es severo, se utilizan pocas especies, generalmente obtenidas fuera del área perturbada, por el contrario si la zona no está tan deteriorada se pueden utilizar especies nativas que mantengan la diversidad biológica y la función del ecosistema del lugar, ya que muchos animales especialmente los insectos requieren de plantas nativas específicas para su alimentación, o algunas aves para su anidación (Lesica y Allendorf 1999).

De manera práctica, cuando se seleccionan individuos como material vegetal realmente se seleccionan genes que interactuarán con los genes locales pudiendo incluso desplazar a los genotipos localmente adaptados. Hasta el momento no existe una regla general que se aplique a todas las especies para determinar a que distancia geográfica se deba coleccionar, porque las especies varían en el flujo genético entre las poblaciones, tamaño poblacional, etc (Hufford y Mazer 2003). Falk et al (2005) mencionan que para algunas especies si el rango geográfico de colecta es muy similar a lo largo del paisaje, las especies pueden ser colectadas a través de todo el rango; por el contrario, cada sitio puede reflejar una única adaptación local y el rango geográfico de genotipos recomendables puede ser muy pequeño, dentro del cual el material puede ser colectado. Esta idea está basada en el supuesto de que las poblaciones cercanas unas de otras y que las especies crecen bajo las mismas condiciones, por lo que se supone que las poblaciones genéticamente serán similares, incluyendo la variación ecotípica y los efectos del flujo genético

En general, existen algunos lineamientos para determinar la zona de transferencia de semillas: 1) la colección de semillas debe ser cerca del sitio de restauración para asegurar la similitud genética de poblaciones introducidas y locales, minimizando la depresión endogámica, 2) la zona de transferencia de semillas debe incorporar las historias de vida de las especies locales, 3) se debe de coleccionar el mayor número de individuos que represente la variación adecuada de la población y 4) evitar severos cuellos de botella, estableciendo

estudios de jardín común y evaluando los efectos de la traslocación de semillas (Hufford y Mazer 2003).

## 2.5 Marcadores Moleculares

En las últimas décadas se han desarrollado grandes avances en la biología molecular, y muchos de ellos han servido considerablemente en genética poblacional, evolución, biología de la conservación y mejoramiento genético de plantas (Avisé 2004). Uno de estos avances han sido los marcadores moleculares que son una serie de métodos de análisis genético-moleculares que se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y ADN, muchos de los cuales se basan en la amplificación *in vitro* del ADN conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Otero et al. 1997), la cual ha tenido gran aceptación por su simplicidad y potencial para examinar un gran número de individuos con una mínima cantidad de ADN (McDermott y McDonald 1993).

Estos marcadores generalmente no están afectados por la selección. De vez en cuando encontramos un marcador molecular con gran importancia adaptativa, como una mutación que elimina la función de una enzima necesaria, pero en la gran mayoría de los casos existe muy poca diferencia en la eficacia biológica entre los alelos alternativos (Furnier 2004). Por ello, los marcadores moleculares generalmente no demuestran una fuerte asociación con las variables del ambiente del sitio. Además, sirven como un indicador de procesos actuales e históricos que afectan el mantenimiento y distribución de la variación genética (Falk et al. 2005). Varios estudios que han utilizado marcadores moleculares han contribuido a la comprensión del mantenimiento de un sistema (tamaños poblacionales, distribución del flujo genético y el mantenimiento de la variación genética) (Cruzan 2001)

Los marcadores moleculares se pueden dividir en tres grupos: 1) proteínas (isoenzimas), 2) ácido ribonucleico (ARN) y 3) ácido desoxirribonucleico (ADN) (Nelson 2005).

**1) Proteínas (Isoenzimas):** Presentan diferentes formas alélicas para un locus en particular, son selectivamente neutras y se utilizan con marcadores hereditarios para cuantificar las frecuencias alélicas y genotípicas de los individuos (Pérez y Piñero 1997)

**2) ARN:** los marcadores de ARN (ADN transcrito pero no necesariamente traducido) en general no son útiles en estudios de genética de poblaciones debido a su inestabilidad y aislamiento (Nelson 2005).

**3) ADN:** los marcadores de ADN se pueden dividir en aquellos que detectan polimorfismos al azar y aquellos que están dirigidos a genes específicos. A continuación se realiza una breve descripción de algunos de los marcadores moleculares más importantes, entre los que se encuentran:

RFLP (Polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción): Esta técnica se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto tamaño molecular por efecto de una digestión con la misma enzima de restricción; detecta inserciones, eliminaciones y mutaciones puntuales que afectan los sitios de restricción; este marcador es considerado codominante (se pueden separar los alelos homocigos dominantes de los heterocigos) y no se requiere información previa de la secuencia de ADN; has sido útiles en estudios filogenéticos y de genética de poblaciones entre otros (Rafalski y Tingey 1993)

AFLP (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados): Consiste en marcadores genéticos generados por la combinación de enzimas restrictivas de ADN, ligación de secuencias de oligonucleótidos específicos (adaptadores) a los extremos de los fragmentos de restricción seguidos por dos amplificaciones por PCR usando oligonucleótidos específicos complementarios a los adaptadores, los productos se visualizan en geles de poliacrilamida o en un secuenciador; este marcador es dominante (no se distinguen alelos homocigos dominantes y heterocigos) y no se requiere conocimiento previo de la secuencia de ADN; esta técnica detecta altos niveles de polimorfismo y ha sido utilizada en la elaboración de mapas genéticos, análisis de paternidad, entre otros (Wolfe y Liston 1998)

ISSR (Repetición de secuencias simples): Este marcador de secuencia simple repetida es generado por PCR con un solo oligonucleótido, donde éste es diseñado por di o trinucleótidos repetidos de 5' o 3' terminando en secuencias de 1 a 3 nucleótidos. Este marcador es dominante y se requiere conocimiento previo de la secuencia de ADN, además el empleo de este marcador ha facilitado la identificación de especies cultivadas y ha arrojado datos preliminares para la generación de mapas genómicos (Wolfe y Liston 1998)

## 2.6 RAPD (Polimorfismos de ADN amplificados al azar).

Una de las técnicas más usadas desde que se desarrolló en el año 1990 es el RAPD (del inglés Random Amplified DNA polymorphism;), este es un marcador molecular hipervariable generado por la amplificación de segmentos aleatorios de ADN, ofrece ventajas ya que la técnica es rápida y no requiere del conocimiento previo sobre la secuencia del ADN del organismo en estudio (Williams et al. 1990). Se utiliza poco ADN (25 nanogramos aproximadamente), el número de loci que pueden ser examinados es esencialmente ilimitado y su detección no es radioactiva (Lara y Spooner 2001, Wolf y Liston 1998, Lynch y Milligan 1994, Williams et al. 1990).

La técnica es una variación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para que se lleve a cabo la reacción se requiere ADN del que se desea amplificar, una enzima termoestable (Taq polimerasa), magnesio como cofactor de la enzima, secuencias cortas de oligonucleótido (primers) y nucleótidos libres; la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante cambios de temperatura cíclicos. El ADN se desnaturaliza a temperaturas altas de 94°C y al disminuir la temperatura el oligonucleótido se alinea a uno o varios sitios homólogos en la cadena de ADN desnaturalizada. Para evitar alineaciones no homólogas se eleva la temperatura a 54°C y finalmente se mantiene la temperatura óptima para la enzima a 72°C y de esta forma comienza la fase de replicación (Otero et al. 1997). Los fragmentos pueden ser separados por su peso molecular en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (Lynch y Milligan 1994).

Los oligonucleótidos (primers) consisten en secuencias al azar y no discriminan entre regiones codificantes y no codificantes, por lo que es razonable pensar que el muestreo del genoma con esta técnica de RAPD sea más azarosa que con métodos convencionales (Lynch y Milligan 1994)

Esta técnica se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido a lo largo del genoma, dentro de una distancia amplificable; las bandas son generadas por la existencia de varios sitios de acoplamiento para un oligonucleótido particular (Otero et al. 1997). Los polimorfismos entre los individuos generados por los RAPD se deben a cambios por inserción o eliminación en la secuencia de los sitios de acoplamiento de los oligonucleótidos (Williams et al. 1990).

Los RAPD se conocen como marcadores dominantes/recesivos ya que el carácter que se obtiene es la presencia/ ausencia de una secuencia amplificable de ADN (Otero et al. 1997), además permiten una rápida evaluación de cuantos genotipos están presentes en una población y estima aproximadamente las diferencias existentes (Judd et al. 1999).

Existen varios estudios sobre la variación genética en varios taxa con esta técnica molecular RAPD entre los que destacan los realizados en: coníferas (Allnutt et al. 1999, Díaz et al. 2001, Newton et al. 2002), Solanaceas (Zheng et al. 2008), Fabaceas ( Martin y Hernandez 2000, Soares et al 2008, Ulloa et al. 2003), Magnoliaceae (Lu et al. 2002), Mimosoideae (Lacerda 2001), Brassicaceae (Chen et al. 2005); especies como el olivo (Belaj et al, 2002; Belaj et al. 2003), arroz (Ge et al. 1999), uva (Downie et al. 2000), *Ginko biloba* (Fan et al. 2004), *Coccinella septempunctata* (Haubruge 2002) y *Medicago sativa* (Jenczewski et al. 1999).

También se han realizado estudios de diversidad genética con este marcador en la familia Lamiaceae en especies como: *Hesperozygis ringens* (Fracaro y Echeverrigaray 2006), *Lamiophlomis rotata* (Liu et al. 2006), *Eremostachys superba* (Susheel et al. 2007). Desafortunadamente, no existen trabajos de diversidad genética con el marcador RAPD para el género *Salvia*, ni para la especie *S. elegans*.

### **III. Objetivos.**

#### Objetivo general

Determinar la estructura genética poblacional en *Salvia elegans* a través del marcador molecular RAPD

#### Objetivos particulares:

- Evaluar los niveles de variabilidad genética que hay en cada una de las poblaciones de *S. elegans*
- Determinar en que proporción se distribuye la variabilidad genética dentro y entre poblaciones de *S. elegans*
- Contribuir a la elección de poblaciones de *S. elegans* con elevada variabilidad genética para restaurar sitios degradados en San Juan Nuevo
- Determinar si existe correlación entre la distancia genética y geográfica de las poblaciones colectadas

#### **Hipótesis planteadas**

- Las poblaciones mas cercanas a San Juan Nuevo, la zona focal de este estudio, tendrán niveles de polimorfismo similar
- Las poblaciones de sitios degradados tendrán menor diversidad genética que las de los sitios más conservados

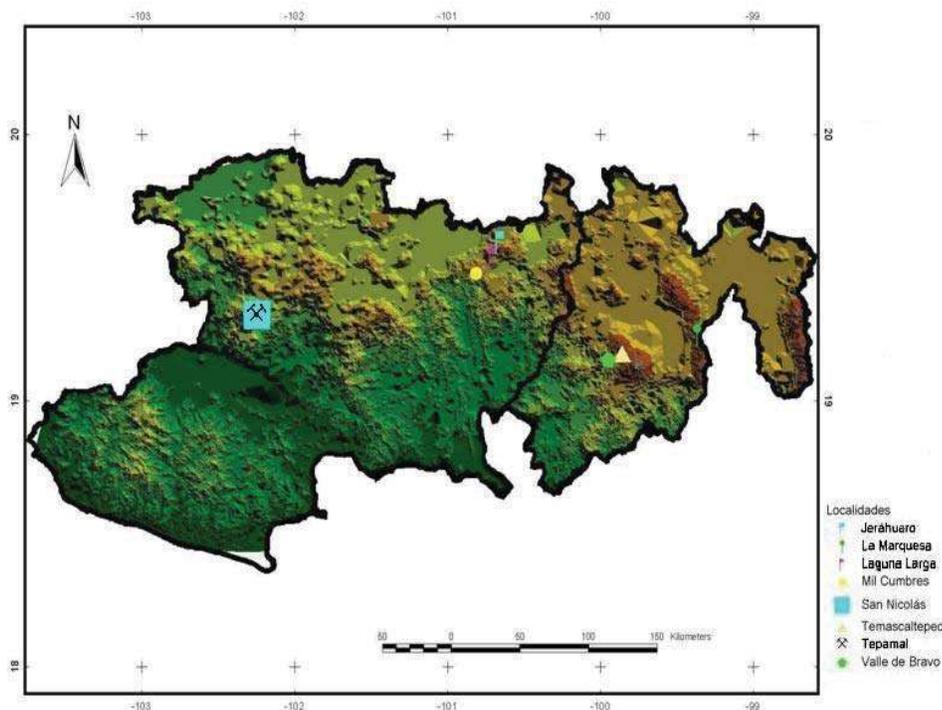
## IV. Materiales y Métodos.

### 4.1 Localización y colecta de las poblaciones de *Salvia elegans*.

Se colectaron un total de 8 poblaciones situadas en el Eje Neovolcanico Transversal, situadas en el Estado de México y Michoacán, 3 y 5 poblaciones colectadas respectivamente (Cuadro 1, Figura 1).

Se colectaron en promedio 30 individuos por población, a excepción de 2 poblaciones (San Nicolás, Michoacán y Valle de Bravo, Estado de México) donde se encontraron menos individuos. El tejido foliar de cada individuo fue colocado en tubos Eppendorf y transportado en hielo hasta el laboratorio donde se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la posterior extracción del ADN.

Figura 1. Localización geográfica de las 8 poblaciones colectas de *S. elegans*. en el Estado de México y Michoacán



Cuadro 1. Localización y descripción de los sitios de colecta

Estado	Localidad	Núm. indiv.	Coordenadas geográficas	Altitud msnm	Tipo de Vegetación
Michoacán	San Nicolás	13	19°24'60" 102°14'46"	2850	Bosque de pino
Michoacán	Tepamal	30	19°24'34" 102°14'47"	2735	Bosque de pino-oyamel
Michoacán	Camino a Laguna larga	30	19°45'53" 100°41'43"	2483	Bosque de Pino-encino
Michoacán	Carretera Mil Cumbres	30	19°39'53" 100°48'40"	2634	Bosque de Oyamel, pino-encino
Michoacán	Jerahuario	30	19°50'49" 100°39'26"	2606	Bosque de pino-encino
Estado de México	(123) carretera a Temascaltepec km. 25. Mpio. Zinacatepec	29	19°11'16" 99°51'19.8"	3006	Bosque de Oyamel
Estado de México	(124) carretera Valle de Bravo a Toluca	11	19°09'10" 99°56'52"	2682	Bosque de Pino
Estado de México	La Marquesa autopista México DF a Toluca km32	29	19°18'03" 99°22'03"	2924	Bosque de Oyamel

#### 4.2 Extracción y cuantificación del ADN

Se realizó la extracción del ADN genómico total de 228 individuos con el protocolo descrito por Lefort y Douglas (1999) con modificación del método CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) bromuro de cetiltrimetil amonio (Apéndice 1). Una vez obtenido el ADN genómico se cuantificó por medio de espectrofotometría. (Espectrofotometro modelo Jenway 6305) (Apéndice 2) y se estandarizó a una concentración de trabajo final de 35 a 50 ng/ $\mu$ L, aproximadamente.

#### 4.3 Amplificación de ADN por medio de RAPD

Se evaluaron 37 oligonucleótidos (Operon Technologies) de las series A, B, C, D, F, H y R, de los cuales se eligieron los que presentaron una mejor definición en el patrón de bandeo y mayor polimorfismo (Cuadro 2). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la variante RAPD's se llevó a cabo en un termociclador (Techne TC-412) y constó de 44 ciclos temperatura-tiempo: 1 minuto a 94°C (desnaturalización), 1 minuto a 36 °C

(alineación), 2 minutos a 72 °C (extensión) y una extensión final de 7 minutos a 72 °C. El volumen final de cada reacción fue de 25 µl: 15.5 µl de agua inyectable, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1.5 µl de oligonucleótidos (Operon Technology), diluidos a una concentración de 10nM, 1 µl de BSA a una concentración de 10 mg/ µl, 0.5 µl de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 2.5 µl de Buffer 10X PCR, 2 µl de dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10mM) y 1 µl de ADN diluido entre 35 a 50 ng / µl.

#### **4.4 Electroforesis y fotografiado de las muestras.**

Los productos obtenidos de la amplificación (PCR) fueron teñidos con bromuro de etidio (0.1µg/ml) y se separaron por electroforesis horizontal empleando geles de agarosa 1.5% con buffer TBE 0.5X a 100 Voltios durante 3 horas (Apéndice 4). De cada producto amplificado de la reacción de PCR se tomaron 15µl y se mezcló con 3µl de colorante tipo III 6X Buffer (azul de bromofenol 625mg, xilencianol 625mg, Glicerol 75ml y agua inyectable 75ml) (Sambrook y Russell, 2001) el cual fue cargado en cada carril del gel de agarosa. Se adicionó un marcador de peso molecular de 123pb ladder (Invitrogene) en el primer y último carriles utilizándolos como referencia para los diferentes tamaños de las bandas. Los diferentes patrones de bandeo obtenidos fueron teñidos y visualizados con luz ultravioleta a 320nm (Transilluminator UVP-400 Stratagene), la toma de fotografías de los geles se realizó con un rollo POLAROID modelo 667 para su posterior análisis.

#### **4.5 Análisis de datos.**

##### **4.5.1 Interpretación de los datos de RAPD.**

Los RAPD's son considerados como un marcador dominante ya que el patrón de bandeo que muestran se ve reflejado en la presencia o ausencia de bandas. El fenotipo banda-presente es dominante con respecto al fenotipo banda-ausente. Por lo que la banda al estar presente puede tener un genotipo homocigo dominante o heterocigo para el locus que se está amplificando, por ello no se pueden observar los genotipos heterocigotos. Se asume que cuando la banda está ausente es porque presenta el genotipo homocigo recesivo, para el sitio de amplificación de una banda específica (Liu 1998). Se consideran bandas polimórficas cuando las bandas están presentes en algunos individuos y bandas monomórficas cuando las bandas están presentes en todos los individuos analizados.

#### 4.5.2 Registro de las bandas obtenidas.

Con el patrón de bandeo obtenido para todas las poblaciones se realizó una matriz de datos binaria en el programa Excel, en la que cada fragmento amplificado se registró con (1) la presencia de la banda y con (0) la ausencia de la banda en cada individuo. Se realizó una interpretación de los patrones que presentaban las bandas amplificadas para cada oligonucleótido, tomando como base de referencia el marcador de peso molecular de 123 pb ADN Ladder (Invitrogene).

#### 4.5.3 Diversidad genética.

Para estimar los parámetros básicos de la estructura genética se utilizó el programa POPGEN v 1.31 (Yeh et al. 1999) en donde se midió el polimorfismo, el cual se calcula dividiendo el número de loci polimórficos ( $x$ ) entre el total de loci analizados ( $m$ ) en toda la población. También se evaluaron los niveles de diversidad genética (heterosigosis esperada para datos diploides asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg) a través del índice de Shannon ( $I$  ó  $H_o$ ) (Lewontin 1972) y el índice de diversidad de Nei ( $h$ ) (1973). El índice de Shannon considera a las bandas de cada individuo como un genotipo distinto, evaluando las similitudes y diferencias con base en la diversidad fenotípica de estas (Otero et al. 1997). Se calculó mediante la formula:  $H_o$  o “ $I$ ” =  $-\sum (p_i \log_2 p_i)$ , donde  $p_i$  es la frecuencia de cada una de las bandas amplificadas. Este índice es apropiado para datos cualitativos y es relativamente insensible a la naturaleza dominante de los RAPD (inhabilidad para detectar heterocigotos) (Dawson et al. 1995)

La diversidad genética con el índice de Nei (1987) se define como la probabilidad de que dos alelos tomados al azar sean diferentes para un mismo locus (Nei, 1987). Se calcula con la siguiente formula:  $H = 1 - \sum_k x_k^2$ , donde:  $x_k$  es la frecuencia del alelo  $k_{th}$  en la población está representada por  $x_k$ . La heterosis promedio es el valor de la heterocigosis promedio de todos los loci. Cuando la  $H = 1$ , indica que todos los individuos son heterocigos (Hedrick 2000).

Para conocer si hay diferencias significativas en la diversidad genética entre las 8 poblaciones se realizó una prueba de Wilcoxon con el programa JMP v 4.1 (Sall et al.

1995) y el procedimiento GenMod (Modelo lineal Generalizado) utilizando el programa SAS (Sistema de Análisis Estadístico) (SAS Institute Inc 1990).

La proporción de la diversidad entre las poblaciones se evaluó a través del  $G_{ST} = (H_T - H_{pop})/H_T$  donde  $H_T$  es la diversidad genética total dentro de la especie y  $H_{pop}$  es la diversidad promedio dentro de todas las poblaciones. También se determinó el flujo génico a partir del índice de diferenciación genética de Nei  $G_{ST}$  aplicando las siguientes fórmulas:  $N_m = 0.5 (1 - F_{ST} \text{ o } G_{ST}) / F_{ST} \text{ o } G_{ST}$  (McDermott y MacDonald 1993). Ambos parámetros ( $G_{ST}$  y  $N_m$ ) fueron estimados con el programa POPGEN v 1.31 (Yeh et al. 1999)

#### 4.5.4. AMOVA (Análisis Molecular de Varianza).

La estructura genética jerárquica se examinó a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA) propuesto por Excoffier *et al.* (1992). El AMOVA describe como la variación genética distribuida dentro y entre poblaciones, calcula también un índice de diferenciación genética entre poblaciones ( $F_{ST}$ ). Para los RAPD, primero se genera una matriz de presencia/ausencia, en donde la presencia de la banda es representada con el “1” y la ausencia de la banda con “0”, posteriormente el AMOVA crea una matriz de distancias que permite conocer la estructura genética de las poblaciones. Para este estudio el AMOVA fue realizado en el programa GenAlEx (Peakall y Smouse 2001).

#### 4.5.5. Distancias genéticas.

Cuando se tienen datos génicos de diferentes poblaciones, es importante saber que tan similares son éstas. Las distancias genéticas de Nei sirven para estimar cuánto han divergido las subpoblaciones de una sola población ancestral (Weir 1996). Para cualquier locus, la identidad genética de Nei (1972) es definida como:

$$I = \sum x_i y_i / (\sum x_i^2 \sum y_i^2)^{0.5}$$

Donde:  $x_i$  y  $y_i$  son las frecuencias de los alelos para un locus en una población.

La identidad genética  $I$  estándar de Nei (1972) para múltiples loci entre dos subpoblaciones de la población es:

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{0.5}$$

donde:  $J_x$ ,  $J_y$  y  $J_{xy}$  son las medias aritméticas de todos los loci de  $\Sigma x_i^2$ ,  $\Sigma y_i^2$  y  $\Sigma x_i y_i$  respectivamente; La identidad genética  $I$  de Nei puede asumir valores de cero a uno (Avice, 2004). Cuando es uno, las subpoblaciones son idénticas, lo que implica que las dos subpoblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas en todos los loci (Nei 1978) y cuando es cero, las subpoblaciones son muy diferentes, lo que implica ausencia de alelos compartidos entre estas por lo que pueden estar divergiendo (Hartl y Clark 1997). Basado en las distancias genéticas de Nei (1972) se produjo una matriz de distancias e identidad genética entre las 8 poblaciones y un dendograma UPGMA de salida, con el programa estadístico POPGEN (Yeh et al. 1999).

Con las distancias genéticas obtenidas de la matriz antes mencionada y las distancias geográficas de los sitios de colecta, se realizó una prueba de Mantel, que correlaciona estas variables y provee un valor de significancia. Esta prueba se llevó a cabo en el programa Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) (Miller 1997). También se realizaron 2 regresiones lineales entre altitud-diversidad genética y altitud-Gst (proporción de la diversidad genética entre poblaciones) para conocer si existe dependencia alguna entre estas variables en el programa JMP v 4.1 (Sall et al. 1995)

Paralelamente a este estudio, se utilizó el programa NTSYS-pc (Rohlf 1992) para agrupar a los individuos de cada población con el coeficiente de Dice el cual da peso a las bandas compartidas y no toma la ausencia compartida de bandas. El coeficiente de Dice (1945) es  $2a/(2a+b+c)$  donde a: es la presencia de una banda, b: es presencia/ausencia de una banda y c: ausencia/presencia de una banda, dando mayor peso a una banda compartida (1,1) que a las bandas que no coincidan (1,0 o 0,1) y no toma en cuenta cuando no hay presencia de banda (0,0). Con los datos analizados se generó un dendograma UPGMA en el mismo programa.

## V. Resultados.

### 5.1 Análisis genético

De los 202 individuos pertenecientes a las 8 poblaciones de *S. elegans* se obtuvieron un total de 158 loci, con un promedio de 19 fragmentos amplificados por oligonucleótido. El 95.5% de las bandas fueron polimórficas y el 4.5% monomórficas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de bandas polimórficas y monomórficas obtenidas con los 10 oligonucleótidos ensayados en el presente estudio

Oligonucleótido	Secuencia	Núm. de bandas monomórficas	Núm. de bandas polimórficas	Total
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	0	17	17
OPB-01	5'-GTTTCGCTCC-3'	0	13	13
OPB-12	5'-CCTTGACGCA-3'	0	13	13
OPD-19	5'-CTGGGGACTT-3'	0	16	16
OPD-20	5'-ACCCGGTCAC-3'	2	12	14
OPF-04	5'-GGTGATCAGG-3'	3	10	13
OPF-16	5'-GGAGTACTGG-3'	0	18	18
OPR-07	5'-ACTGGCCTGA-3'	0	22	22
OPR-14	5'-CAGGATTCCC-3'	0	16	16
OPR-15	5'-GGACAACGAG-3'	2	14	16
TOTAL		7	151	158

La comparación de los niveles de diversidad genética entre las 8 poblaciones, medida con el índice de diversidad de Shannon ( $H_o$ ) de cada oligonucleótido utilizado, mostró diferencia significativa ( $\chi^2=45.4$ ,  $P<0.0001$ ) con el programa JMP y ( $\chi^2=40.45$ ,  $P<0.0001$ ) y con el programa SAS. Esto nos indica que los niveles de diversidad son diferentes en las 8 poblaciones, sin embargo se desconoce la composición alélica.

### 5.2 Diversidad genética

El porcentaje de loci polimórficos fue diferente en todas las poblaciones, el menor porcentaje de loci polimórficos fue para la población de Valle de Bravo y el mayor porcentaje para Mil Cumbres. El número de alelos observados ( $n_a$ ) en las 8 poblaciones varió en un rango de 1.37 a 1.65, mientras que el número de alelos efectivos ( $n_e$ ) presentó un rango de 1.20 a 1.34, en ambos casos Valle de Bravo obtuvo los valores más bajos y Jerahuaro obtuvo los valores más altos. Tanto el índice de diversidad de Nei ( $H$ ) como el índice de Shannon ( $I$ ), reflejan una mayor diversidad genética en las poblaciones de Jerahuaro, Mil Cumbres y Temascaltepec, y una menor diversidad genética en las

poblaciones de San Nicolás y Valle de Bravo; La Marquesa y El Tepamal resultaron con una diversidad intermedia 0.16 y 0.14, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Descripción de la variabilidad genética de 4 poblaciones de *S. elegans*

Población	Número de alelos observados (na)	Número de alelos efectivos (ne)	Diversidad genética de Nei (H)	Índice de Shannon (I)	Número de loci polimórficos	Porcentaje de loci polimórficos
Mil Cumbres	1.60	1.30	<b>0.1976</b>	<b>0.31</b>	105	<b>66.4</b>
Laguna larga	1.63	1.30	0.1803	0.28	100	63.2
Jerahuario	1.65	1.34	<b>0.2043</b>	<b>0.31</b>	104	65.8
Valle de Bravo	1.37	1.20	0.1243	0.19	60	37.9
Temascaltepec	1.62	1.33	<b>0.2005</b>	<b>0.31</b>	99	62.7
Marquesa	1.55	1.26	0.1613	0.25	88	55.7
San Nicolás	1.47	1.19	<b>0.1200</b>	<b>0.19</b>	75	<b>47.5</b>
Tepamal	1.56	1.23	0.1448	0.23	89	56.3

### 5.3 Estructura Genética

La diversidad genética total fue de  $H_T = 0.29$ , el número promedio de alelos observados  $n_a = 1.95$ , el número efectivo de alelos  $n_e = 1.49$ . La diversidad promedio dentro de todas las poblaciones ( $H_{pop}$ ) fue de 0.16. Los valores de la diversidad genética en poblaciones subdivididas a partir de cada locus evaluada a través de la heterocigosis subpoblacional fue de  $H_S = 0.16$ , el flujo génico fue de  $Nm = 0.66$  y un  $G_{st} = 0.42$

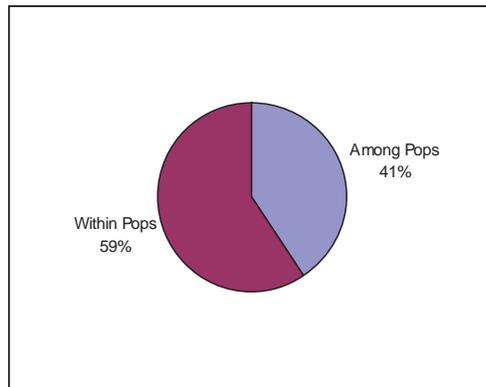
### 5.4 AMOVA

Los resultados del análisis molecular de varianza muestran que el 59% de la variación molecular de *S. elegans* se encontró dentro de las poblaciones y un 41% entre poblaciones (Cuadro 4, Figura 2). El índice de fijación subpoblacional ( $F_{st}$ ) fue de 0.42, lo que indica que hay una alta diferenciación genética entre subpoblaciones, debido a la reducción de heterocigotos por la subdivisión de la población según Wright (1978) ya que es mayor de 0.25 (Cuadro 4, Figura 2).

Cuadro 4. Análisis de Varianza Molecular para las poblaciones de *S. elegans*

Fuente de variación	Df	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	%	Prob
Entre poblaciones	7	1837.801	9.951	41%	
Dentro de poblaciones	194	2833.770	14.607	59%	0.010
<b>Total</b>	<b>201</b>	<b>4671.571</b>	<b>24.558</b>		

Figura 2. Representación grafica de la distribución de la variación molecular dentro y entre poblaciones.



### 5.5 Distancias genéticas

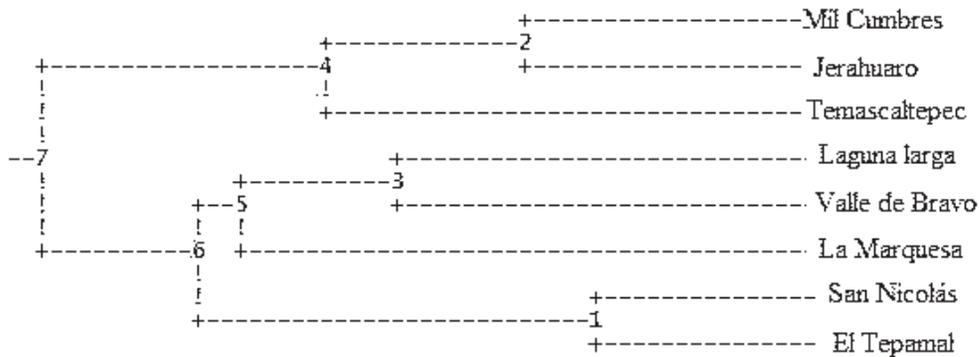
En el programa POPGEN v 1.31 (Yeh et al. 1999) se generó una matriz de identidad genética y distancias genéticas entre las 8 poblaciones (Cuadro 5), en general las distancias genéticas (Nei 1978) fueron bajas ( $DG= 0.0642$  a  $0.2721$ ), por lo tanto los valores de identidad genética fueron relativamente altos ( $I= 0.7618$  a  $0.9379$ ), el valor más bajo en cuanto a identidad genética ( $IG= 0.7618$ ) lo obtuvieron las poblaciones de San Nicolás y Jerahuaro, ambas son muy diferentes, lo que implica ausencia de alelos compartidos entre éstas, por lo que pueden estar divergiendo (Hartl y Clark 1997), concordando ambas poblaciones con el nivel más alto de distancia genética ( $DG= 0.2721$ ). El valor más alto de identidad genética ( $IG= 0.9379$ ) obtenido fue para El Tepamal y San Nicolás, lo que indica que las subpoblaciones son casi idénticas, concordando con la distancia geográfica, ya que solo están distanciadas por 1.7 km lo que implica que las dos poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas en todos los loci (Nei 1978).

Con las distancias genéticas de Nei obtenidas en el análisis anterior, se produjo un dendograma de UPGMA, la Figura 3 muestra la división de dos ramas grandes que agrupan a las poblaciones, el nodo 4 agrupa a las poblaciones de Mil Cumbres, Jerahuaro y Temascaltepec, el nodo 6 se divide en tres ramas, por un lado agrupa a las poblaciones de Laguna larga y Valle de Bravo, otra rama única separa a la población de La Marquesa y finalmente la última rama (nodo 1) agrupa a las poblaciones de San Nicolás y El Tepamal.

Cuadro 5. Distancia genética entre las 8 poblaciones. La identidad genética de Nei (IG) se presenta arriba de la diagonal y la distancia genética (DG) se presenta por debajo de la diagonal basado en las distancias genéticas de Nei.

DG/IG	Mil Cumbres	Laguna larga	Jerahuario	Valle de Bravo	Temascaltepec	La Marquesa	San Nicolas	El Tepamal
Mil Cumbres	*****	0.8727	0.9230	0.7862	0.8854	0.7992	0.7794	0.7850
Laguna larga	0.1362	*****	0.8612	0.8769	0.8751	0.8517	0.8304	0.8451
Jerahuario	0.0802	0.1494	*****	0.8019	0.8608	0.8072	0.7618	0.7898
Valle de Bravo	0.2405	0.1313	0.2208	*****	0.8218	0.8293	0.8326	0.8521
Temascaltepec	0.1217	0.1334	0.1499	0.1963	*****	0.7700	0.7821	0.7991
La Marquesa	0.2241	0.1605	0.2142	0.1871	0.2614	*****	0.8220	0.8592
San Nicolás	0.2492	0.1859	0.2721	0.1832	0.2457	0.1960	*****	0.9379
El Tepamal	0.2421	0.1683	0.2359	0.1601	0.2243	0.1517	0.0642	*****

Figura 3. Análisis de distancias genéticas representadas en el dendograma (UPGMA) basado en las distancias genéticas de Nei

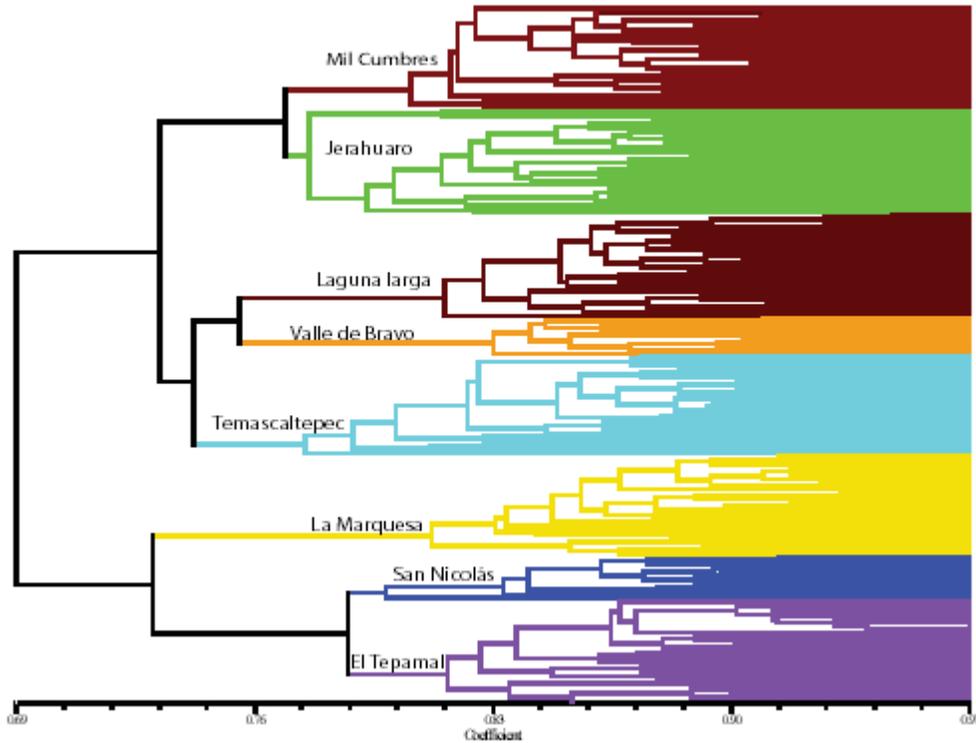


En el dendograma UPGMA basado en el coeficiente de Dice, muestra la división de 2 grandes ramas: la primera rama a su vez se subdivide en dos ramas, la primera agrupa a las poblaciones de Mil Cumbres y Jerahuario (separadas por 24.8 km) y la segunda rama agrupa a las poblaciones de Valle de Bravo, Temascaltepec y Laguna larga. La segunda gran rama agrupa a la población de San Nicolas, El Tepamal (a 1.7 km de distancia) y la Marquesa (300 km de San Juan Nuevo) (Figura 4, Cuadro 6).

Cuadro 6. Diferencia de las distancias geográficas en Kilómetros entre las 8 poblaciones de *S. elegans*.

Distancia geográfica	Mil Cumbres	Laguna Larga	Jerahuaro	Valle Bravo	Temascaltepec	Marquesa	San Nicolás	El Tepamal
Mil Cumbres	*****							
Laguna larga	16.1	*****						
Jerahuaro	24.8	9.4	*****					
Valle deBravo	104.9	100.6	103.7	*****				
Temascaltepec	110.9	105.6	108	9.4	*****			
Marquesa	154.6	145.7	145.5	61.5	52.2	*****		
San Nicolás	152.1	166	171.4	242.9	251.1	300.8	*****	
El Tepamal	152.4	166.4	171.8	242.7	251	300.7	1.7	*****

Figura 4. Dendograma basado en el índice de Dice obtenido para 202 individuos analizados de *S. elegans* utilizando el método de agrupamiento UPGMA

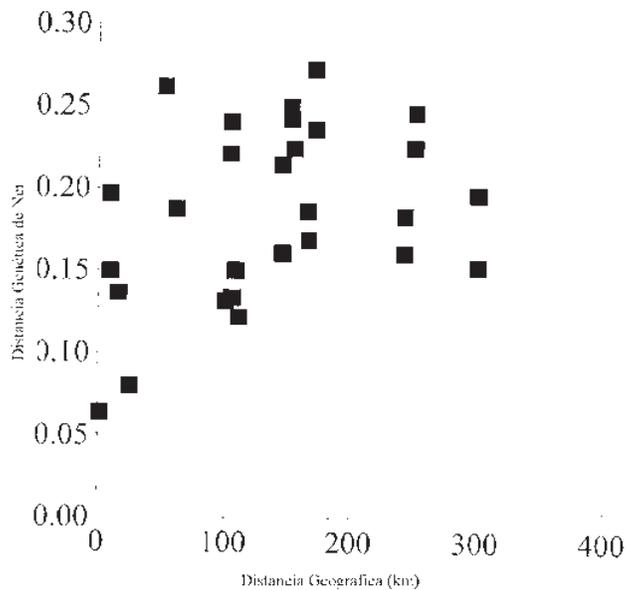


### 5.5.1 Prueba de Mantel

La prueba de Mantel (Millar, 1997), mostró que existe una relación significativa entre la distancia geográfica y la distancia genética de Nei (1978) con un valor  $r = 0.3605$ ;  $P = 0.049$  (Figura 5).

La regresión lineal entre la altitud y la diversidad no mostró el efecto combinado entre estas dos variables ( $r = 0.1438$ ,  $P = 0.733$ ). Tampoco la regresión lineal entre la altitud y  $G_{ST}$  ( $r = 0.015$ ,  $P = 0.711$ ) mostró dependencia alguna entre estas variables en el programa JMP v 4.1 (Sall et. al 1995)

Figura 5. Correlación entre las distancias geográficas y genéticas de Nei.



## VI. Discusión.

Utilizando la técnica de RAPD se determinó la variación y la estructura genética dentro y entre poblaciones de *S. elegans*. Esta investigación es uno de los pocos trabajos poblacionales que se han llevado a cabo en el género *Salvia*, incluso dentro de la familia Lamiaceae, lo que dificultó en gran medida encontrar valores de comparación con otros trabajos.

Los niveles de diversidad genética en *S. elegans* resultaron similares ( $H_T=0.29$ ), a los reportados en otras especies dentro de la misma familia Lamiaceae: *Stachys maritima* ( $H_T=0.09$ ) (López-Pujol et al 2003), *Hemigenia exilis* ( $H_T=0.26$ ) (Mattner 2002), *Scutellaria montana* ( $H_T=0.37$ ) (Mitchell 2001) y *Eremostachys superba* ( $H_T=0.47$ ) (Susheel et al 2001); sin embargo este valor obtenido para *S. elegans* resulta bajo al compararlo con otras especies distintas a la familia, por ejemplo: *Trifolium pratense* ( $H_T=0.33$ ) (Ulloa et al 2003), *Plathymenia reticulata* ( $H_T=0.39$ ) (Lacerda et al 2001) y *Pinus oocarpa* ( $H_T=0.40$ ) (Díaz et al 2001).

La diferenciación poblacional fue alta ( $G_{ST}=0.42$ ; (Nei 1977))( $F_{ST}=0.42$ ; (Wright 1978)), concordando con los bajos niveles de flujo génico ( $N_m=0.66$ ). Slatkin (1989) sugiere que cuando  $N_m < 1$  existe una fuerte diferenciación entre las subpoblaciones, por lo que la deriva genética actúa de manera independiente en cada subpoblación. Esto se debe a que si el flujo génico es bajo, se promueve la diferenciación genética en las poblaciones, provocando la adaptación local de estas. Lo anterior es reflejado en la adaptación que presenta *S. elegans* a condiciones locales muy particulares, por ejemplo lugares húmedos, sombreados, etc., además de crecer de forma discreta, espacialmente separadas.

Las poblaciones de Jerahuaro, Mil Cumbres y Temascaltepec presentaron la variación genética y el porcentaje de loci polimórficos más alta, este resultado puede ser explicado por tamaños poblacionales relativamente grandes (observaciones en campo), probablemente favoreciendo el entrecruzamiento con individuos de otras poblaciones cercanas, con niveles de variación genética altos, lo que concuerda con el número efectivo de alelos ( $n_e$ ) en las poblaciones de Temascaltepec, Jerahuaro y Mil Cumbres ( $n_e=1.33$ , 1.34 y 1.3, respectivamente), sugiriendo que se están conservando casi dos alelos por locus

---

minimizando las posibilidades de que exista endogamia, la posible fijación de alelos y una posible deriva génica.

En términos generales se comprueba la primera hipótesis planteada, en la que poblaciones mas cercanas geográficamente tenderían a tener valores semejantes de polimorfismo, con excepción de las poblaciones de Valle de Bravo y San Nicolás, ya que presentaron los niveles más bajos de variación genética así como bajo porcentaje de loci polimórficos; este resultado puede deberse a que el número de individuos colectados fue muy pequeño (alrededor de 12 individuos) reflejando quizá el tamaño reducido de estas dos poblaciones. En este sentido evidentemente existen otros factores que pueden influir en la diversidad genética de las poblaciones como; el tamaño efectivo de la población, las mutaciones, la selección natural, entre otras.

En general, la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones está ligada fuertemente con la historia de vida de las especies, particularmente en la forma de reproducción y de dispersión (Falk et al. 2005). Hamrick et al. (1979) menciona que las plantas leñosas con reproducción cruzada y ciclos de vida largos presentan mucha variación dentro de sus poblaciones. *S. elegans* no es una planta leñosa como tal aunque es considerada una herbácea leñosa que durante la época seca del año pierde el estrato aéreo, pero queda de manera latente la raíz y ramas de la planta, retoñando después de lluvias, por lo que se puede considerar que presenta ciclos de vida largos. En concordancia con este patrón *S. elegans* presentó una mayor variación genética dentro de poblaciones (59%), que la encontrada entre poblaciones (41%).

El cuadro 7 muestra los patrones de variación genética obtenidos dentro de las poblaciones de diferentes especies y algunas especies herbáceas de la familia Lamiaceae con RAPD's usando el análisis molecular de varianza. Se puede observar que *S. elegans* presenta valores muy bajos con respecto a otras especies con excepción de *Stachys maritima* y *Pseudotsuga menziesii*, incluso dentro de la misma familia. Desafortunadamente no existen estudios a nivel de género.

Cuadro 7. Patrones de variación genética dentro y entre poblaciones silvestres de varias especies de plantas, estimadas a partir de patrones de RAPD's y usando el Análisis Moléculas de Varianza (AMOVA).

Especie	Porcentaje de variación dentro de población	Referencia
<i>Banksia cuneata</i>	104.73	Maguire y Sedgley 1997
<i>Caesalpinia echinata</i>	42.00	Cardoso et al. 1998
<i>Cerastium fischerianum</i>	60.91	Maki y Horie 1999
<i>var.fischerianum</i>		
<i>Grevillea barklyana</i>	80.02	Hogbin et al. 1998
<i>Pinus chiapensis</i>	77.43	Newton et al. 2002
<i>Plathymenia reticulata</i>	87.7	Lacerda et al. 2001
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	63.00	Aagaard et al. 1998
<i>Trifolium pratense</i>	80.40	Ulloa et al. 2003
<b>Familia Lamiaceae</b>		
<i>Hemigenia exilis</i>	80.00	Mattner et al. 2002
<i>Eremostachys superba</i>	83.01	Susheel et al. 2007
<i>Stachys maritima</i>	68.40	Lopez-Pujol et al. 2003
<b><i>Salvia elegans</i></b>	<b>59.00</b>	Este estudio

Otro factor importante en la gran diferenciación intrapoblacional es el entrecruzamiento genético debido al comportamiento de los polinizadores. Hasta el momento sólo se ha reportado un colibrí (*Selasphorus rufus*) (Wester y Clasen-Bockhoff 2007) que poliniza a esta especie, aunque Dieringer et al. (1991) mencionan que también es visitada por abejas (*Thygater rubricata*, *Xylocopa tabaniformis*, *Bombus ephippiatus formosus* y *Bombus nigrodorsalis*). *S. rufus* puede migrar grandes distancias (6000 km) pero es muy territorial (Calder, 1993), esto puede reflejarse en los niveles de variación de *Salvia elegans*. En este sentido, Grant y Temeles (1992) sugieren que los colibríes (*Rufus*) al menos del oeste de Norte América presentan una correspondencia entre el largo del culmen y el largo del tubo floral de algunas plantas ornitófilas en la misma área, lo que propicia que los colibríes visiten ciertas áreas un poco restringidas, creando así diferenciación poblacional.

Para corroborar la relación del largo de la flor en *S. elegans* y su posible relación con *Selasphorus rufus*, adicionalmente a la evaluación de RADP, se midieron 64 flores de ejemplares colectados para este estudio molecular para conocer si existía alguna diferencia significativa en el tamaño de las flores (largo del tubo floral y largo de la flor) en las 8 poblaciones. Se encontró una diferencia significativa en las longitudes del tubo y de la flor para cada población ( $F= 8.5$ ,  $P< 0.0001$ ), siendo las más parecidas las de San Nicolás y Tepamal (23.4- 24mm); ambas difiriendo del resto de las poblaciones que en general

midieron entre 21-21.3 mm. Esta información sugiere que al igual que las poblaciones de Norte América (Grant y Temeles 1992) también hay diferencias en las longitudes de las flores en las distintas poblaciones, sin embargo no se puede asegurar que esta diferenciación se deba a los colibríes, ya que no se midió el largo de los culmines de estos.

De acuerdo al dendograma basado en las distancias genéticas de Nei (figura 3) y el dendograma de Dice (figura 4) varias poblaciones se agrupan por su procedencia: las poblaciones de San Nicolás y El Tepamal genéticamente son las más parecidas, por lo tanto la distancia genética entre ambas es pequeña, lo anterior concuerda ya que geográficamente ambas poblaciones están muy cerca (cuadro 7), además ambas presentan grados de perturbación similares, aunque ambas poblaciones se encuentran en bosque de pino, oyamel, realmente son un manchón generado por las actividades humanas en la región como ganadería y pastoreo en pequeña escala (comunicación personal Dr. Roberto Lindig). Estos fenómenos reflejan por un lado la agrupación de ambas poblaciones, al mismo tiempo que las separa del resto de las poblaciones. Otras poblaciones que también se agrupan por procedencia y/o grado de conservación son: Mil Cumbres y Jerahuaro (figura 3 y 4, cuadro 6), ya que son poblaciones muy cercanas geográficamente, bien conservadas y con altos niveles de diversidad. Con estas poblaciones también se agrupan Laguna Larga y Temascaltepec ambas conservadas y con altos índices de diversidad aunque no se agrupan por procedencia. Sin embargo, las poblaciones de Valle de Bravo y La Marquesa no mantienen un patrón definido en ambos dendogramas, en el dendrograma basado en distancias genéticas de Nei, Valle de Bravo y La Marquesa se agrupa con Laguna Larga, en el dendrograma de Dice se separan; quizá debido a la naturaleza de los RAPD, al bajo número de individuos presentes para Valle de Bravo o al aislamiento de La Marquesa (se encuentra en un manchón de bosque de oyamel, rodeado por la mancha urbana de la Ciudad de México y al lado de la Autopista a Toluca), esto pudiera generar la reducción de colibríes que polinicen las salvias de ese lugar. Estas observaciones concuerdan con la segunda hipótesis planteada en la que las poblaciones de sitios degradados tienen menor diversidad genética que las de los sitios más conservados.

De acuerdo a la prueba de Mantel, se encontró una débil, pero significativa relación entre las distancias genéticas y geográficas, lo que indica un aislamiento de las poblaciones por distancia geográfica. Esto se puede explicar por la conducta del polinizador, ya que como se mencionó anteriormente, son muy territoriales. Evaluando la posible relación de factores

ambientales con genéticos, se buscó una correlación entre altitud-diversidad genética, altitud-  $G_{st}$ , sin embargo no hubo una relación positiva, lo que nos indica que las poblaciones no están fuertemente afectadas por factores ecológicos como la altitud, sino a factores propios de la especie como tipo de reproducción, dispersión, etc.

Basados en estos resultados se recomienda para las estrategias de restauración ecológica en bosques de coníferas, coleccionar la semilla en la población más cercana al sitio que se pretende restaurar, en el caso de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, se recomienda coleccionar semillas de la población de El Tepamal. Esta población presentó el mayor porcentaje de polimorfismo y al ser la más próxima se evitaría la contaminación por genes no locales y potencialmente una inadecuada adaptación al sitio (Hufford y Mazer 2003, Rice y Emery 2003).

## VII. Conclusiones.

La evaluación con RAPD en términos generales reflejó el grado de conservación en la estructura genética de *Salvia elegans*, ya que las poblaciones de Mil Cumbres, Jerahuaro y Temascaltepec presentaron los mayores índices de diversidad quizá debido al grado de conservación de las poblaciones además de agruparse por procedencia.

A pesar de que la distribución de *S. elegans* se ubica a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal, existe diferenciación genética poblacional, quizá debido a las actividades antropogénicas que han ido fragmentando el hábitat, minimizando el intercambio de genes entre las poblaciones. Otro factor importante en la diferenciación poblacional puede deberse al tipo de reproducción y la adaptación a micro escala en factores bióticos y abióticos

La evaluación con RAPD resultó en buenos datos de diversidad genética para *Salvia elegans*, en términos de que fueron similares a otros obtenidos para especies de las Lamiaceae. Las poblaciones evaluadas están fuertemente diferenciadas entre sí dentro de ellas y fuertemente correlacionadas las distancias genéticas y geográficas. La diferenciación genética se sugiere esta dada por el comportamiento de los polinizadores o la misma biología de la planta por lo que se recomienda para programas de restauración utilizar las procedencias más cercanas al sitio a restaurar.

En el proyecto de Nuevo San Juan Parangaricutiro, se recomienda coleccionar la población de El Tepamal, ya que tiene un nivel de diversidad alto y es la más cercana al sitio a restaurar, evitando así la introducción de alelos foráneos que pudieran afectar el desempeño de la especie en el sitio, sin embargo para tomar una decisión final, se deben realizar estudios de procedencias en jardín común así como la variación morfológica.

## VIII. Literatura Citada.

- Aagaard J. E., K. V. Krutovskii y S. H. Strauss. 1998. **RAPDs and allozyme exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir.** *Heredity* 81:69-78.
- Albaladejo R. G. y A. Aparicio. 2007. **Population Genetic Structure and Hybridization Patterns in the Mediterranean Endemics *Phlomis lychnitis* and *P. crinita* (Lamiaceae).** *Ann Bot (Lond)*. 100(4):735-746.
- Allnutt T. R., A. C. Newton, A. Lara, A. Premoli, J. J. Armesto, R. Vergara, y M. Gardner. 1999. **Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer.** *Mol Ecol*. 8(6):975-987.
- Avise J. C. 2004. **Molecular Markers, Natural History and Evolution.** Sinauer. Segunda edición. pp511
- Belaj A., Z. Satovic, G. Cipriani, L. Baldoni, R. Testolin, L. Rallo, y I. Trujillo. 2003. **Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive.** *Theor Appl Genet*. 107(4):736-744.
- Belaj A., Z. Satovic, L. Rallo, y I. Trujillo. 2002. **Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA.** *Theor Appl Genet*. 105(4):638-644.
- Calder W. A. 1993. **Rufous Hummingbird (*Selasphorus rufus*).** En: Poole A. y F. Gill, (Ed.) *The Birds of North America*, No. 53 The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA, and The American Ornithologists' Union, Washington, D.C.
- Cambell N. A. 1996. **Biology.** The Benjamin/Cummings Editorial. Pp. 416-432
- Cardoso M. A., J. Provan, W. Powell, P. C. G. Ferreiras y D. E. de Oliveira. 1998. **High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae).** *Molecular Ecology* 7:601-608.
- Chen S., T. Xia, S. Chen y Y. Zhou. 2005. **RAPD profiling in detecting genetic variation in endemic *Coelonema* (Brassicaceae) of Qinghai-Tibet Plateau of China.** *Biochem Genet*. 43 (3-4):189-201
- Curtis H., N. S. Barnes, A. Schnek y G. Flores. 2001. **Biología.** 6ta edición. Panamericana. pp.1487.
- Dawson IK., A. J. Simons, R. Waugh y W. Powell. 1995. **Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays.** *Heredity* 75:10-18

- Diaz V., L. M. Muniz, y E. Ferrer. 2001. **Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*.** *Mol Ecol.* 10(11):2593-2603.
- Dieringer G., T. P. Ramamoorthy y P. Tenorio. 1991. **Floral visitors and their behavior to sympatric *Salvia* species (Lamiaceae) in Mexico.** *Acta Botánica Mexicana.* 13: 75-83
- Downie, D. A. 2000. **Patterns of genetic variation in native grape phylloxera on two sympatric host species.** *Mol Ecol.* 9(5):505-514.
- Excoffier L., P. E. Smouse y J. M. Quattro 1992. **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data.** *Genetic* 131:479-491.
- Falk D. A., C.M. Richards, A. M. Montalvo y E.E. Knapp. 2005. **Population and Ecological Genetics in Restoration Ecology** En: Palmer M. A., D.A. Falk y J. B. Zedler (Ed.) Foundations of Restoration Ecology. Island Press Washington pp. 14-41.
- Fan X. X., X. Z. Shen, Chen X. Y. y C. X. Fu. 2004. **Assessing genetic diversity of *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) populations from China by RAPD markers.** *Biochem Genet.* 42(7-8):269-278.
- Fracaro F. y S. Echeverrigaray. 2006. **Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of southern Brazil.** *Biochem Genet* 44(11-12): 479-490.
- Fischer R. A. 1930. **The genetical theory of natural selection.** Clarendon Press, Oxford. 272 p.
- Furnier G. R. 2004. **Métodos para medir variación genética en las plantas** En: Vargas H. J., B. Bermejo y F. T. Leding (Ed.) Manejo de los Recursos Genéticos Forestales. SEMARNAT-CONAFOR. pp. 21-30
- Ge S., G. C. Oliveira, B. A. Schaal, L. Z. Gao y D. Y. Hong. 1999. **RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from china and brazil.** *Heredity.* 82 (Pt 6):638-644.
- Grant V. y E. Temeles. 1992. **Foraging ability of rufous hummingbirds on hummingbird flowers and hawkmoth flowers.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 9400-9404
- Griffiths A. J., J. H. Miller, D. T. Suzuki, K. C. Lewontin y W. M. Gelbart. 2000. **An Introduction of genetic analysis.** Freeman and Company. USA. pp 860.
- Hamrick J. L., L. Linhart y J. B. Mitton. 1979. **Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plant.** *Annual Review Systematic* 10:173-200
- Haubruge, E., F. Vanlerberghe-Masutti, P. Collignon, and F. Francis. 2002. **The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation**

**in populations of *Coccinella septempunctata* in Belgium.** *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet.* 67(3):557-561.

Hartl, D. y A. G. Clark 1997. **Principles of population genetics.** SINAUER. USA. 112-153pp

Hedrick P. W. 2000. **Genetics of populations.** Segunda edición. Jones and Bartlett Publishers. USA. 279-301pp.

Hogbin P. M., D. J. Ayre y R. J. Whelan 1998. **Genetic variation and reproductive success of road verge populations of the rare shrub *Grevillea barklyana* (Protaceae).** *Heredity* 80:180-186.

Hufford K. M. y S. J. Mazer. 2003. **Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration.** *Trends in Ecology and Evolution* 18:147-155.

Jenczewski E., J. M. Prospero, and J. Ronfort. 1999. **Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes.** *Mol Ecol.* 8(8):1317-1330.

Kruger A. M., F. H. Hellwig, and C. Oberprieler. 2002. **Genetic diversity in natural and anthropogenic inland populations of salt-tolerant plants: random amplified polymorphic DNA analyses of *Aster tripolium* L. (Compositae) and *Salicornia ramosissima* Woods (Chenopodiaceae).** *Mol Ecol.* 11(9):1647-1655.

Lacerda D. R., M. D. Acedo, J. P. Lemos y M. B. Lovato. 2001. **Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado.** *Molecular Ecology* 10: 1143-1152

Lara –Cabrera S. y M. D. Spooner. 2001. **Sistemática Molecular y evolución de plantas cultivadas.** Instituto de Biología. UNAM, México. pp. 57-114.

Lefort F. y C. G. Douglas. 1999. **An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*.** *Ann. For. Sci.* 56: 259 – 263

Lesica P. y F. W. Allendorf. 1999. **Ecological genetics and the restoration of plant communities: mix or match?** *Restoration ecology* 7(1): 42-50

Lewontin R. C. 1972. **Apportionment of human diversity.** *Evol. Biol.* 6:381-398

Linding C. R., Blanco G. A. y Sáenz R. C. 2005. **Estrategias para la Restauración Ecológica de Bosques.** *Biológicas* 7:18-30

Liu B. H. 1998. **Statistical genomics/linkage, mapping and QTL analysis.** CRC Press. New York. USA. 611 pp.

- Liu J., L. Wang, Y. Geng, Q. Wang, L. Luo y Y. Zhong. 2006. **Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotata* (Lamiaceae), an endemic species of Qinghai-Tibet Plateau.** *Genetica* 128(1-3):385-394.
- Liu P., Y. S. Yang, C. Y. Hao y W. D. Guo. 2007. **Ecological risk assessment using RAPD and distribution pattern of a rare and endangered species.** *Chemosphere*. 68(8):1497-1505.
- López-Pujol J., M. R. Orellana, M. Boseh, J. Simon y C. Blanche. 2003. **Effects of habitat fragmentation on Allozyme Diversity and Conservation Status of the Coastal Sand Dune Plant *Stachys maritima* (Lamiaceae) in the Iberian Peninsula.** *Plant Biol.* 5:504-512
- Lynch M. y B. G. Milligan. 1994. **Analysis of population genetic structure with RAPD markers.** *Molecular Ecology* 3:91-99
- Magure T. L. y M. Sedgley. 1997. **Genetic diversity in *Banksia* and *Dryandra* (Proteaceae) with emphasis on *Bankasia cuneata*, a rare and endangered species.** *Heredity* 79:394-401.
- Maki M. y S. Horie. 1999. **Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal less genetic variation in endangers plant *Cerastium fischerianum* var. *molle* than in the widespread conspecific *C. fischerianum* var. *fischerianum* (Caryophyllaceae).** *Molecular Ecology* 8:145-150.
- Martin J. P. y J. E. Hernandez Bermejo. 2000. **Genetic variation in the endemic and endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath & Maire (Labiatae) using RAPD markers. Random amplified polymorphic DNA.** *Heredity* 85(5):434-4
- Mattner J., M. Zawko, Rossetto, S. L. Krauss, K. W. Dixon y K. Sivasithamparam. 2002. **Conservation genetics and implications for restoration of *Hemigenia exilis* (Lamiaceae), a serpentine endemic from Western Australia.** *Biological Conservation*. 107(1):37-45
- McDermott J. M. y B. A. McDonald 1993. **Gene flow in plant pathosystems.** *Annual Review Phytopathologic* 31:353-73.
- McKay J., C. Christian, S. Harrison y R. Kevin. 2005. **How local is local?-A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration.** *Restoration Ecology* 13(3):432-440
- Medina C., F. F. Guevara, M. A. Martínez, P. Silva-Sáenz, M. A. Chávez-Carbajal, y I. García. 2000. **Estudio Florístico en el área de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México.** *Acta Botánica Mexicana*. 52:5-41.
- Miller M. P. 1997. **Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) version 1.3.** A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.

Department of Biological Sciences – Box 5640, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ 86011-5640, USA

Mitchell B. C. 2001. **Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae).** *Evolution* 55(8):1569–1580

Nei M. 1978. **Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals.** *Genetics* 89:583-590.

Nelson C. D. 2005. **Marcadores de ADN, diversidad genética y Conservación de especies forestales** En: Vera C. G., J. J. Vargas H. y J. Dorantes L. (Ed.) Memorias del Simposium “Uso y Conservación de Recursos Genéticos Forestales” realizado en Jalapa, Veracruz 5 de noviembre de 2002. Colegio de Postgraduados-Comisión Nacional Forestal, México 91 p.

Newton A. C., T. R. Allnutt, W. S. Dvorak, R. F. Del Castillo y R. A. Ennos. 2002. **Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened Mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP markers.** *Heredity* 89(3): 191-198

Otero A., M. De La Cruz y K. Oyama. 1997. **El uso de los RAPD's como marcadores moleculares en plantas.** *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 85-117.

Peakall R. y P. E. Smouse. 2001. **GenA1Ex V5: Genetic Analysis in Excel.** Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenA1Ex/>

Perez N. N. y D. Piñero. 1997. **Isoenzimas.** *Bol.Soc. Bot. México* 60:77-84

Rafalski J. A. y S. V. Tingey. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. Elsevier Science. 9(8): 275-280

Ramamoorthy T. P. 2001 **Salvia I.** En: Rzedowski J. y R. G. Calderón (Ed.) Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de ecología, A. C., CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán. p. 636

Ramamoorthy T.P. y M. Elliott. 1998. **Lamiaceae en México: diversidad, distribución, endemismo y evolución.** En: Ramamoorthy T.P., R. Bye, A. Lot, y J. Fa. (Ed.) Diversidad biológica de México, orígenes y distribución Instituto de biología UNAM. México. pp. 501-526

Rice J. K. y N. C. Emery. 2003. **Managing microevolution: restoration in the face of global change.** *Front Eco Environ* 1(9): 469 – 478

Rohlf F. J. 2001. **NTSYSpc, Numerical Taxonomy System, version 2.1 for Windows 95/98/NT/2000/ME/XP.** Exeter Software, New York.

Sall J. N., M. H. Catherine, D. Tilley, R. Potter y B. Corcoran. 1995. **Programa estadístico JMP v. 4.1** SAS Institute

Sambrook J. y D. W. Russell. 2001. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 3ª ed. Cold Spring Harbor Lab.Press, New York.19-20 pp.

SAS Institute. 1990. **SAS/STAT user's guide** 6ª edición. SAS Institute Cary, NC.

Soares, T. N., L. J. Chaves, M. P. de Campos Telles, J. A. Diniz-Filho, and L. V. Resende. 2008. **Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* ("baru" tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil**. *Genetica*. 132(1):9-19.

Susheel V., L. K. Jawahar, K. T. Shailesh, M. Rani y K. K. Awtar. 2007. **Genetic diversity in *Eremostachys superba* Royle ex Benth. (Lamiaceae), an endangered Himalayan species, as assessed by RAPD**. *Genet Resour Crop Evol*. 54:221–229

Ulloa O., F. Ortega y H. Campos. 2003. **Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers**. *Genome* 46: 529–535

Valadez M. E., K. Gunter, J. Ramser, B. Huttel y A. Rubluo-Islas. 2001. **Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (Garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales**. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 24 . Núm. 1. Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C. Chapingo, México. Pp. 103 – 120.

Wester P. y Clasen-Bockhoff. 2007. **Floral diversity and pollen Transfer Mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species**. *Annals of Botany* 100: 401-421

Williams J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski. y S. V. Tingey. 1990. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers**. *Nucleic acids Research* 18: 6531-6535.

Wolf A.D. y A. Liston. 1999. **Contribution of PCR-based methods to plant systematic and evolutionary biology**. En: Soltis D. E., P. S. Soltis y J.J. Doyle (Ed.) *Molecular systematic of plants II, DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishers. New York. EUA. pp 43 – 86.

Yeh F. C., R. C Yang y T. Boyle. 1999. **POPGENE Version 1.31**. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research

Zaghloul, M. S., J. L. Hamrick, A. A. Moustafa, W. M. Kamel, and R. El-Ghareeb. 2006. **Genetic diversity within and among sinai populations of three *Ballota* species (Lamiaceae)**. *J Hered* 97(1): 45-54.

Zhang D. S., S. Chen, Zhang D. y Q. Gao. 2007. **Patterns of genetic variation in *Swertia przewalskii*, an endangered endemic species of the Qinghai-Tibet Plateau**. *Biochem Genet*. 45(1-2):33-50.

Zheng, W., L. Wang, L. Meng, and J. Liu. 2008. **Genetic variation in the endangered *Anisodus tanguticus* (Solanaceae), an alpine perennial endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau**. *Genetica*. 132(2):123-129.

## APÉNDICE

**Apéndice 1. Protocolo de extracción del ADN MINI-PREP reportado por (Lefort *et al.* 1999).**

1. Pesar de 100 a 120 mg de tejido.
2. Moler en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino.
3. Inmediatamente añadir 160 µl de solución CTAB previamente calentado en baño maría a 65°C.
4. Moler bien hasta que se obtenga una consistencia de pasta.
5. Añadir 600 µl de Solución La Porta.
6. moler bien hasta que se obtenga una consistencia homogénea y líquida.
7. Transferir a tubos Eppendorf de 1.5 ml esterilizados y etiquetados.
8. Agregar 100 µl de SDS al 20 %
9. Agitar vigorosamente (con las manos) durante dos minutos.
10. Incubar en baño María a 65°C.
11. A los cinco minutos de incubación agitar vigorosamente los tubos por 1 minuto e incubar otros 5 minutos en baño María.
12. Destapar los tubos y dejar enfriar un poco.
13. Agregar 180 µl de la Solución de Acetato de Potasio 5 M mantenida a -20°C.
14. Agitar los tubos durante 2 minutos.
15. Refrigerar durante 5 minutos a -20°C.
16. Centrifugar durante 20 minutos a 13,000 rpm.
17. Transferir el sobrenadante (aprox. 600 µl) a tubos nuevos.
18. Añadir 600 µl de isopropanol previamente enfriado a -20°C
19. Agitar suavemente los tubos.
20. Incubar a -20°C durante 15 minutos (se pueden quedar toda la noche).
21. Centrifugar a 13,000 rpm durante 20 minutos.
22. Tirar el sobrenadante y escurrir los tubos invirtiéndolos sobre una sanita.
23. Agregar 600 µl de TE y agitar hasta que el pellet se disuelva.
24. Centrifugar durante 10 minutos a 13,000 rpm.
25. Transferir la solución a tubos nuevos.
26. Agregar 600 µl de Isopropanol a -20°C y 60 µl de Acetato de Sodio 3M pH 5.
27. Agitar suavemente los tubos.

28. Incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.
29. Centrifugar durante 5 minutos a 13,000 rpm.
30. Tirar el sobrenadante y escurrir los tubos invirtiéndolos sobre una sanita
31. Dejar secar el ADN durante 30 minutos en la estufa a  $60^{\circ}\text{C}$
32. Resuspender 1 pellet en 100  $\mu\text{l}$  de agua estéril.
33. Una vez disuelto el pellet almacenar el ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Solución de la Porta (10 ml)

- 1 ml de TRIS 1M
- 1 ml de EDTA a 0.5 M
- 1 ml de Na Cl 5 M 6.9 ml de  $\text{H}_2\text{O}$
- 100  $\mu\text{l}$  de mercaptoetanol.

Solución CTAB (10 ml)

- 1 ml de TRIS 1M
- 4.5 ml de dd  $\text{H}_2\text{O}$
- 200 mg de CTAB
- 2.8 ml de Na Cl a 5 M
- 400  $\mu\text{l}$  de EDTA a 0.5M
- 400 mg de PVP-40
- 50 mg de ácido ascórbico
- 50mg de DIECA
- 100  $\mu\text{l}$  de mercaptoetanol

Solución SDS 20 %

- 200 g. de SDS
- 800 ml de dd  $\text{H}_2\text{O}$

Acetato de Potasio 5 M

- 49 g. de Acetato de Potasio (k)
- 100 ml de dd  $\text{H}_2\text{O}$

Solución de Acetato de Potasio.

- 60 ml de acetato de potasio 5 M

11.5 ml de ácido acético

28.5 ml dd H<sub>2</sub>O

Acetato de Sodio 3M.

40.8 g Acetato de sodio

100 ml dd H<sub>2</sub>O

TE

1 ml de TRIS 1M con un PH de 8

200 µl de EDTA a 0.5 M

Aforar a 100 ml. Esterilizar en autoclave.

---

## Apéndice 2. Protocolo de Cuantificación de ADN por espectrofotometría.

1. Se prende y se selecciona las unidades deseadas en este caso absorbancia, y se coloca a 260nm con respecto al espectro de rayos ultravioleta.
2. Para calibrar se llena una de las microceldas con un mililitro de H<sub>2</sub>O doblemente destilada y se introduce en el espectro y se presiona enter.
3. Una vez que se calibra a 0 de absorbancia se procede a medir las muestras.
4. En la otra microcelda se coloca 1 microlitro de ADN concentrado y se le adicionan 999 microlitros de H<sub>2</sub>O doblemente destilada, se agita un poco y se introduce al espectro se tapa y directamente da la lectura.
5. Para obtener las unidades se multiplica la absorbancia obtenida x 50mg/ml y después por 1000ng/ml para obtener como unidades ng/μl una llegado se aplica una regla de tres según a la concentración deseada para este caso fue de (50ng/μl) de la cual so lo se tomo 1 μl (25 ng/ μl).
6. Se obtiene la cantidad de ADN concentrado total para igualar a una dilución total de 50ml, para lo cual al valor obtenido de ADN se resta a 50 y el resultado se adiciona de H<sub>2</sub>O doblemente destilada para obtener un factor de dilución de 50ml para las reacciones de PCR.

### **Apéndice 3. Receta para geles de agarosa.**

#### **Geles de agarosa al 0.8 % para observar ADN total.**

Gel chico            0.16gr de agarosa en 20 ml de buffer TBE 0.5X + 3  $\mu$ l de bromuro de etidio.

Gel mediano        0.32gr de agarosa en 40 ml de buffer TBE 0.5X + 4  $\mu$ l de bromuro de etidio.

Gel grande         1.6 gr de agarosa en 200 ml de buffer TBE 0.5X + 5  $\mu$ l de bromuro de etidio.

#### **Geles de agarosa al 1.5% para PCR- RAPDs.**

Gel chico            0.30gr de agarosa en 20 ml de buffer TBE 0.5X + 5  $\mu$ l de bromuro de etidio.

Gel mediano        0.60gr de agarosa en 40 ml de buffer TBE 0.5X + 6  $\mu$ l de bromuro de etidio.

Gel grande         3.09 gr de agarosa en 200 ml de buffer TBE 0.5X + 8  $\mu$ l de bromuro de etidio.