

Diferenciación genética en poblaciones de *Salvia elegans* (Lamiaceae)

Bedolla-García B. Y.,¹ Lindig-Cisneros R. ² y Lara-Cabrera S. I. ^{1, ✉}

¹ Laboratorio de Sistemática Molecular, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Apartado Postal 18, Administración Santa María, Morelia Michoacán, México, 58091. Tel (52-443)2288993, Fax (52-443)3167412.

² Centro de Investigaciones en Ecosistemas. Universidad Nacional Autónoma de México (Campus Morelia). Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701. Ex Hacienda de San José la Huerta. Morelia, Michoacán, 58190, México.

Resumen

Salvia elegans Vahl es una especie polinizada por colibríes, común en el Eje Neovolcánico Transversal en México. En este estudio se determinó la variación genética de siete poblaciones de *S. elegans* utilizando marcadores RAPD para establecer criterios de colecta para restauración ecológica. Se evaluaron ciento noventa y un individuos provenientes de cinco poblaciones en Michoacán (Mil Cumbres, Laguna Larga, Jerahuaro, San Nicolás y Tepamal) y dos del Estado de México (Temascaltepec y Marquesa) representando un transecto a lo largo de su distribución en el Eje Neovolcánico Transversal. Los análisis basados en RAPD indicaron una diversidad genética (*h*) de 0.26 con 60% de polimorfismo. La prueba de AMOVA mostró mayor variación genética dentro de las poblaciones (59%) que entre ellas (41%). El árbol de UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei separó del agrupamiento principal a las poblaciones de San Nicolás, Tepamal y Marquesa. En base a esta diferenciación, se sugiere que la colecta de semillas para restauración se realice lo más cerca posible del sitio a restaurar.

Palabras clave: diversidad genética, RAPD, Lamiaceae, *Salvia elegans*.

Abstract

Salvia elegans Vahl is a hummingbird pollinated species common to the Transverse Mexican Volcanic Belt. In this study we determined the genetic variation of seven *S. elegans* populations using RAPD markers to generate collecting criteria for restoration ecology. One hundred and ninety one individuals were collected from five populations in Michoacán (Mil Cumbres, Laguna Larga, Jerahuaro, San Nicolás and Tepamal) and two in Estado de México (Temascaltepec and Marquesa), that represent a gradient across the geographical distribution in the Transverse Mexican Volcanic Belt. RAPD results indicated genetic variation (*h*) about 0.26 with 60% polymorphism. AMOVA showed higher genetic variation within (59%) than between (41%) populations. A UPGMA tree generated based on Nei's genetic distances separated from the main cluster the populations of San Nicolás, Tepamal and Marquesa; suggesting that seed collection should be done as close to the site as possible.

Keywords: genetic diversity, RAPDs, Lamiaceae, *Salvia elegans*.

Introducción

Salvia elegans Vahl de la familia Lamiaceae, es un arbusto a sufrútice, perenne de corta vida que mide de 0.8 a 2 m de altura. Se distribuye principalmente en bosques de oyamel, pino, encino o mesófilo a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal Mexicano aunque también se encuentra en el Norte de México en Sonora, Chihuahua y al Sur en Oaxaca; de 2550 a 3100 m s.n.m. (Ramamoorthy, 2001).

Salvia elegans es una especie que puede estar sujeta a polinización cruzada (observación personal) por varias especies de colibríes, incluyendo el colibrí migratorio (*Selasphorus rufus*) (Lara, 2006; Wester y Classen-Bockhoff, 2007). *S. elegans* es considerada un buen modelo de estudio del sotobosque debido a que es una especie característica de los bosques templados de la Meseta Purépecha y su importancia como recurso para aves residentes y migratorias.

Conocer la variación genética de las poblaciones es necesario para entender diversos aspectos de la biología de las especies

vegetales, y para establecer criterios para la colecta de semillas para reintroducción de poblaciones y restauración ecológica (Van der Mijnsbrugge *et al.* 2010). En el caso de la restauración de bosques de encinos y de coníferas en la región de la Meseta Purépecha, en donde se ha logrado establecer especies arbóreas, se busca recuperar la diversidad del sotobosque y la creación de hábitat para la fauna (Blanco-García y Lindig-Cisneros, 2005; Lindig-Cisneros *et al.* 2008). Con miras a generar estrategias de restauración útiles para bosques de coníferas del Eje Neovolcánico Transversal, se deben establecer estos criterios de colecta para especies arbustivas y herbáceas. La información sobre la diversidad genética es necesaria para evitar los problemas asociados con la selección inadecuada de la procedencia de las semillas (Falk *et al.* 2006; Bischoff *et al.* 2010).

El uso de los Fragmentos de ADN amplificadas al azar (RAPD) es cada vez menos frecuente debido a las conocidas limitantes que presentan (Williams *et al.* 1990); sin embargo, constituyen una herramienta útil y accesible para desarrollar criterios de manejo basados en la diversidad genética, que ha sido aplicado con éxito para el desarrollo de criterios para la transferencia de semillas con fines de restauración ecológica (Malaval *et al.* 2010). Adicionalmente, los RAPD se han utilizado exitosamente en estudios de diversidad genética de varios taxa incluyendo las siguientes especies en las Lamiaceae: *Eremostachys superba*

✉ **Autor de correspondencia:** Lara-Cabrera S. I. Laboratorio de Sistemática Molecular, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Apartado Postal 18, Administración Santa María, Morelia Michoacán, México, 58091. Tel (52-443)2288993, Fax (52-443)3167412. email: slaracabrera@gmail.com

Royle ex Benth. (Verma et al. 2007), *Hemigenia exilis* S. Moore (Mattner et al. 2002), *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling (Fracaro et al. 2006), *Lamiophlomis rotata* (Benth. ex Hook. F.) Kudô (Liu et al. 2006), *Scutellaria montana* Chapm. (Mitchell, 2001), *Stachys maritima* L. (Lopez-Pujol et al. 2003) y *Thymus caespititius* Brot. (Trindade et al. 2008). En *Salvia*, los RAPD se han utilizado para evaluar la diversidad genética de especies cultivadas y silvestres de *Salvia hispanica* L. (Cahill, 2004).

En este estudio se evaluó la variación genética basada en RAPD para siete poblaciones de *S. elegans* colectadas en el Eje Neovolcanico Transversal y se cuantificó la diversidad genética de las poblaciones.

Los valores de estructura y diversidad genética para *S. elegans* fueron similares a los obtenidos para otras especies de Lamiaceae polinizadas por colibríes.

Materiales y Métodos

Material vegetal y amplificación de RAPD

Se colectaron muestras de los individuos presentes en siete poblaciones de *Salvia elegans* en los Estados de México y Michoacán en la región Centro-Occidente de México (Figura 1) en el Eje Neovolcánico Mexicano. El sitio a restaurar se encuentra cercano a las poblaciones de San Nicolás y Tepamal (Michoacán) en la Planicie Tarasca de Michoacán separadas por solo 1.7 kms; Mil Cumbres, Laguna Larga y Jerahuaro se encuentran en la Sierra Chincua en Michoacán, distanciados linealmente entre sí de 9.4 a 24.8 kms (Tabla 1). Temascaltepec (Estado de México) se encuentra en la Sierra de Temascaltepec derivada del nevado de Toluca y se comunica con la Sierra Chincua por una área boscosa continua; Marquesa (Estado de México) se encuentra dentro del Corredor Biológico Ajusco- Chichinautzin separado de Temascaltepec por el Valle de Toluca.

Se colectaron las hojas jóvenes de 191 individuos que fueron tomadas al azar evitando vecinos cercanos cuando fue posible, los ejemplares de herbario se encuentran depositados en el Herbario Nacional (MEXU) y el Herbario del

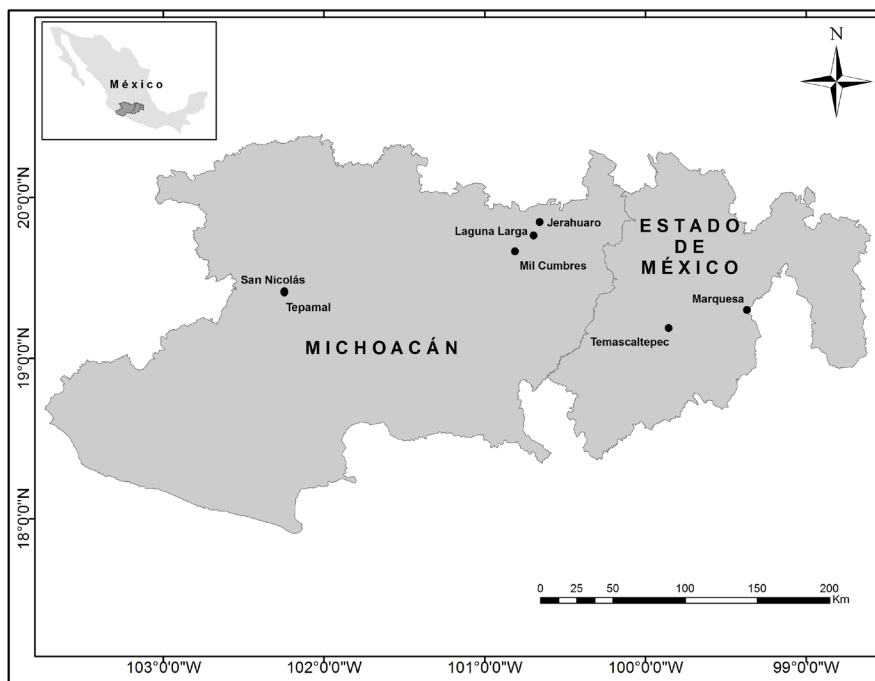


Figura 1. Ubicación de las poblaciones muestreadas de *Salvia elegans* in the Mexican en el Eje Neovolcánico Transversal.

Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío (IEB). La extracción del ADN se realizó siguiendo el método de Lefort y Douglas (1999), se determinó

la concentración del ADN utilizando un Espectrofotómetro (Jenway Designed modelo 6305) mediante la relación 260/280.

Tabla 1. Poblaciones de *Salvia elegans* muestreadas con espécimen (colector y número de ejemplar), número de individuos muestreados y número de individuos de la población, tipo de vegetación y altitud.

Población	Especimen	Muestra	Tamaño de la población	Tipo de vegetación	Coordenadas	Altitud (m)
Mil Cumbres	M. Castro 3	30	>100	Bosque de Pino-Encino	19°39'53" 100°48'40"	2634
Laguna Larga	M.E. Cornejo 2	30	>100	Bosque de Pino-Encino	19°45'53" 100°41'43"	2483
Jerahuaro	M.E. Cornejo 8	30	>100	Bosque de Pino-Encino	19°50'49" 100°39'26"	2606
San Nicolás	R. Lindig 1	13	15	Remanente de bosque de pino en tierra agrícola	19°24'60" 102°14'46"	2850
Tepamal	R. Lindig 2	30	>100	Remanente de bosque de pino en tierra agrícola	19°24'34" 102°14'47"	2735
Temascaltepec	S. I. Lara-Cabrera 123	29	29	Bosque de pino	19°11'16" 99°51'19.8"	3006
Marquesa	S.I. Lara-Cabrera 113	29	>100	Bosque de Oyamel	19°18'03" 99°22'03"	2924

Treinta y siete oligonucleótidos decámeros (Series OPA, OPC y OPF de Operon Technologies, Alameda, California, USA) fueron evaluados, de éstos, diez mostraron el mayor polimorfismo y reproducibilidad (**Tabla 2**). En la mayoría de los casos el ADN de cada planta se amplificó más de una vez con el mismo oligonucleótido y el patrón de amplificación generado fue comparado. La Reacción en Cadena de la Polimerasa se realizó en un volumen de 25 µl, el cual contenía 50 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 10 mg/ml BSA, 10 nm oligonucleótido, 1.5 unidades de *Taq* ADN polimerasa recombinante (Invitrogen, San Diego, California, USA) y 35 ng de ADN. Se utilizó un termociclador TC-412 Techne (Barloworld Scientific, Duxford, Cambridge, U.K.) con un programa de 44 ciclos, cada uno a 94 °C por 1 min, 36 °C por 1 min, 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 7 min.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis a 200 V por 1.5 h en geles de agarosa al 1.5% con buffer TBE y teñidos en bromuro de etidio. Los geles fueron visualizados y fotografiados bajo luz UV en un transiluminador 400 (La Jolla, California, USA). El tamaño molecular de los productos de los RAPD se estimó comparándolas con el marcador de 123-pb (Invitrogen, San Diego, California, USA).

Análisis de los datos

Los productos amplificados fueron codificados como presencia (1) o ausencia (0) de bandas homólogas para generar

una matriz con los diferentes fenotipos. Dado que los RAPD son marcadores dominantes, se asumió que cada banda representa el fenotipo de un locus (Williams *et al.* 1990). Solo se consideraron para la codificación y el análisis aquellos loci que mostraron amplificaciones claras en cada caso. Con estos datos se calculó la estructura genética básica, el porcentaje de polimorfismo (%P), heterocigocidad, índice de diversidad de Shannon (*I*) y diversidad genética de Nei (*H*), el grado de diversidad dentro de las poblaciones (Lewontin, 1972) y flujo génico (Nm) (McDermott y McDonald, 1993) mediante el programa POPGEN ver. 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Se consideró que las poblaciones no se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg. El índice de diversidad de Shannon ($I = -\sum p_i \log_2 p_i$) se considera robusto para marcadores dominantes donde los individuos heterocigotas no pueden ser reconocidos (Dawson *et al.* 1995). Adicionalmente se realizó una evaluación Bayesiana para obtener una estimación independiente de F_{ST} (θ y G_{ST} -B, análogos Bayesianos de F_{ST} y G_{ST} de Nei, respectivamente). Se importó la matriz original al programa HICKORY, version 1.0 (Holsinger y Lewis, 2003) utilizando el modelo completo, f (endogamia entre poblaciones)=modelo 0, θ =modelo 0, y modelo libre f . Se realizaron varias corridas con los parametros de 'default' (burn-in=50,000, sample=250000, Thin=50) para demostrar que los resultados son consistentes. Se

calculó la diversidad genética Bayesiana (H_B) como se establece en el programa HICKORY, que no asume poblaciones en equilibrio Hardy-Weinberg.

Los valores de F_{ST} pareada con 999 permutaciones, entre siete poblaciones y el análisis de varianza molecular (AMOVA) se calcularon en el programa GeneA1Ex (Peakall y Smouse, 2001) para investigar la variación genética separada entre y dentro de las poblaciones. El valor de significancia de los diversos componentes de la varianza se estimó por la distribución generada de 10,000 permutaciones al azar.

Se utilizó la matriz de distancias basada en los valores de F_{ST} pareados para generar los agrupamientos de las poblaciones con UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) utilizando una medida de similitud Euclidiana mediante el programa PAST v. 1.55 (Hammer *et al.* 2001). Se calcularon las correlaciones cofenéticas para estimar la distorsión durante el proceso de agrupamiento y los valores de soporte bootstrap para cada nudo con 1000 replicas. El estadístico de Mantel normalizado (r_M) (Mantel, 1967) se calculó en el programa TFPGA (Miller, 1997) para determinar la correlación entre las matrices de distancia genética y geográficas, su significancia se evaluó con la prueba de permutación con 10,000 iteraciones.

Resultados

De las 154 bandas amplificadas para todas las poblaciones el 95.45% fueron polimórficas (**Tabla 3**). Se obtuvieron porcentajes de polimorfismo por población en un rango de 46% a 66%, los valores más altos se obtuvieron para las poblaciones de Jerahuaro y Mil Cumbres (66 y 65%, respectivamente) mientras que los más bajos fueron para la población de San Nicolás (47%). En correspondencia con lo anterior, el índice de diversidad de Shannon (*I*) más alto fue para las poblaciones de Jerahuaro (0.31), Mil Cumbres (0.30) y Temascaltepec (0.30) y el más bajo para la población de San Nicolás (0.18). La diversidad genética bayesiana más alta fue para Jerahuaro y Temascaltepec con 0.22, y la más baja de 0.16 para San Nicolás.

La diversidad genética para las poblaciones (H_T , diversidad de la especie fue de 0.29, la diversidad genética de

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados y el número de bandas RAPD que se obtuvieron para 191 individuos.

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica	Número de bandas		
		Monomórficas	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	7	10
OPF-16	5'-GGAGTACTGG-3'	0	18	18
OPR-07	5'-ACTGGCCTGA-3'	0	21	21
OPR-14	5'-CAGGATCCCC-3'	0	16	16
OPR-15	5'-GGACAACGAG-3'	2	14	16
TOTAL		7	147	154

Tabla 3. Variación genética para las poblaciones de *Salvia elegans* basada en RAPD.

Población	%P	No	Ne	I	H	H _B
Mil Cumbres	65.58	1.58	1.31	0.30	0.1976	0.21
Laguna Larga	62.99	1.54	1.29	0.27	0.1803	0.19
Jerahuaro	66.23	1.66	1.34	0.31	0.2043	0.22
San Nicolás	46.75	1.46	1.18	0.18	0.1200	0.16
Tepamal	55.84	1.55	1.22	0.22	0.1448	0.17
Temascaltepec	61.69	1.61	1.32	0.30	0.2005	0.22
Marquesa	55.19	1.55	1.25	0.24	0.1613	0.19

Notas: %P=porcentaje de loci polimorficos, No=Número de alelos por locus; Ne=Número de alelos efectivos por locus, I=Índice de Shannon, H=Diversidad genética de Nei (asumiendo equilibrio Hardy-Weiberg), H_B=Heterocigocidad esperada (sin asumir equilibrio Hardy-Weinberg).

las poblaciones (H_S) de 0.17 y la diversidad entre poblaciones evidenciada con el índice G_{ST} (heterogeneidad entre poblaciones) resultó de 0.42. Estos estimadores equiparables calculados con inferencia Bayesiana en HICKORY reportan H_T de 0.31, H_S de 0.19 y G_{ST}-B de 0.38. La correlación de estas estimaciones entre poblaciones fue alta; para H vs H_B con una r = 0.97176, P = 0.00025; para H vs. I se obtuvo con una r = 0.9989, P = 6.3755E-08; y para H_B vs. I con una r=0.96833, P=0.00034.

El AMOVA para las poblaciones (Tabla 4) mostró que la mayor parte de la variación (%φ-st, porcentaje de diferenciación generalizado entre las poblaciones) se encuentra dentro de las poblaciones 59% (P<0.01) y 41% (P<0.01) entre las poblaciones. La estimación de flujo génico (Nm) entre las poblaciones fue menor de 1, siendo éste de 0.69.

El dendrograma de UPGMA (Figura 2) basado en las distancias F_{ST} (correlación cofenética=0.8691) muestra dos grandes grupos de poblaciones con soporte bootstrap del 100%; el primer agrupamiento contiene a las poblaciones de la Planicie Tarasca y la de Marquesa, las cuales están separadas por 300 kms; el segundo agrupamiento incluye a las tres poblaciones de la Sierra Chincua y Temascaltepec. El análisis de la identidad genética de Nei y la distancia genética entre las poblaciones (Tabla 5) mostró que las poblaciones de la Planicie Tarasca son las más similares (0.938), seguidas por las poblaciones de la Sierra Chincua y Temascaltepec, estas poblaciones se encontraron en un rango de 0.861 a 0.923. La población de la Marquesa se ubica en un rango de similitud de 0.861 con la de Tepamal y 0.772 de similitud con la de Temascaltepec.

Utilizando la prueba de Mantel (Mantel, 1967), se encontró una correlación estadísticamente significativa de las distancias genéticas y geográficas (r=0.4844, P=0.025).

Discusión

La utilidad de un marcador molecular dominante para estimar la estructura y diversidad genética de las poblaciones, además de contar con información para establecer criterios para el manejo con fines de restauración ecológica es prometedora. En este sentido los marcadores RAPD son relativamente sencillos de generar, no son tan caros como algunos otros marcadores,

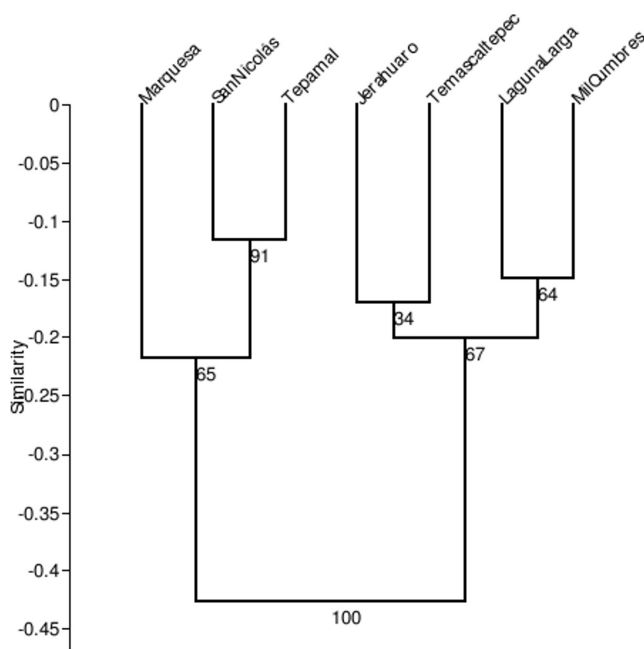


Figura 2. Dendrograma de UPGMA basado en los valores de F_{ST} pareados entre las poblaciones de *Salvia elegans*. Los números en las ramas indican el soporte bootstrap con 1000 replicas.

además de que se pueden utilizar sin contar con conocimiento previo del genoma de las especies evaluadas (Williams et al. 1990). Si bien la técnica de RAPD ha sido criticada por tener baja reproducibilidad, cuando se consideran sólo las bandas reproducibles se obtienen estimaciones de estructura genética robustas por los métodos tradicionales y de inferencia bayesiana como se demuestra por las correlaciones de H vs HB, H vs. I y HB vs. I en el presente estudio.

Los estudios de diversidad genética como este, hacen posible establecer plantaciones de restauración considerando la distancia genética entre las poblaciones de las cuales proceden las semillas, de tal forma que se pueden implementar ensayos con bases más sólidas, en particular con especies como *Salvia elegans* que forma poblaciones pequeñas y dispersas. En general, los ensayos de procedencias se han llevado a cabo con especies cuyas poblaciones cubren grandes extensiones, para las cuales la selección de procedencias, basándose en criterios como la altura sobre el nivel del mar, permite establecer zonas de colecta de manera sistemática sin muestrear directamente el genoma (Saenz-Romero y Tapia-Olivares 2008), *Salvia elegans* del Eje Neovolcánico Transversal mostró niveles de diversidad genética en concordancia con los encontrados previamente para otras especies polinizadas por aves (H_T= 0.246±0.163; H_S=0.181±0.123), y con las especies cuyas semillas se dispersan por gravedad (H_T= 0.298±0.091; H_S=0.150±0.029) o que habitan en bosques fragmentados (Loveless y Hamrick, 1984). No se han encontrado reportes de diversidad genética para salvias polinizadas por aves, el único reporte que se encontró es para *S. hispanica*, especie fuertemente autopolinizada, en la que se evaluó la diversidad de poblaciones silvestres (H_T = 0.15) y cultivares (Calhill 2004). Sin embargo, la diversidad genética total para *S. elegans* (0.29) fue similar a la obtenida para otros miembros de la familia Lamiaceae, al parecer

Cuadro 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Fuente de la variación	gl	Suma de cuadrados (SSD)	Estimación de componentes de la varianza (CV)	Porcentaje de variación (PV)	Significancia de la probabilidad (PS)
Entre poblaciones	6	1665.6	9.8	41	<0.00001
Dentro poblaciones	182	2564.5	14.1	59	<0.00001
Total	188	4230.1	23.9		

todas polinizadas por abejas; 0.26 en *Hemigenia exilis*, especie clonal endémica de suelos serpentinos (Mattner *et al.* 2002), tres especies perennes arbustivas del género *Ballota* (0.19-0.32) (Zaghloul *et al.* 2006). Los valores de diversidad obtenidos fueron menores que aquellos obtenidos para *Scutellaria montana* (0.37) una hierba endémica (Mitchell, 2001) y *Eremostachys superba* (0.47) hierba rizomatosa (Verma *et al.* 2007); pero más altos que aquellos de la hierba perenne endémica *Stachys maritima* (0.09) (López-Pujol *et al.* 2003).

Las poblaciones de la Planicie Tarasca están altamente diferenciadas de las demás poblaciones evaluadas con una identidad genética (GI) de 0.938, y distancia genética pareada (GD) de 0.064. Comparando el resto de las poblaciones con las de la Planicie Tarasca, se obtienen distancias genéticas mayores de 0.169 hasta 0.861 e identidades de 0.150 a 0.844. Estos resultados permiten establecer la hipótesis, para fines de restauración ecológica, de que las zonas de colecta de semillas deben ser lo más cercanas posible de los sitios en que se desea reintroducir esta especie, lo que debe ponerse a prueba en ensayos de restauración adecuados (Lara-Cabrera *et*

al., 2009).

Una limitación del uso de marcadores neutros, o casi neutros, a la selección es que no hay garantía de que la diversidad genética derivada se correlacione con el desempeño en campo de las plantas; sin embargo, algunos estudios indican que existe una relación más estrecha entre la diversidad genética de marcadores neutros de las poblaciones que se usan como fuente de semillas con el desempeño de las plantas en condiciones de restauración que con otras variables como la distancia geográfica (Travis y Grace, 2010); lo que apoya la utilidad de este tipo de evaluaciones para establecer criterios de colecta de semillas para restauración ecológica.

Agradecimientos

Este estudio se financió con proyectos otorgados a SILC: CONACyT Ciencia Básica 2005-J48731, Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH proyecto 8.16; y a RLC: CONACyT-SEMARNAT-C01-0760. Agradecemos a Javier Torres por el desarrollo del mapa y a dos revisores anónimos por la crítica revisión del manuscrito.

Referencias

- Blanco-García A, Lindig-Cisneros R (2005) Incorporating restoration in sustainable forestry management: Using pine bark mulch to improve native-species establishment on tephra deposits. *Restoration Ecology* 13: 703-709
- Bischoff A, Steinger T, Muller-Scharer H (2010) The Importance of Plant Provenance and Genotypic Diversity of Seed Material Used for Ecological Restoration. *Restoration Ecology* 18: 338-348
- Cahill JP (2004) Genetic diversity among varieties of Chia (*Salvia hispanica* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 773-781
- Dalsgaard B, González AMM, Olsen JM, Ollerton J, Timmermann A, Andersen LH, Tossas AG (2009) Plant-hummingbird interactions in the West Indies: floral specialization gradients associated with environment and hummingbird size. *Oecologia* 159: 757-766
- Dawson IK, Simons AJ, Waugh R, Powell W (1995) Diversity and genetic differentiation among sub-populations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based analysis. *Heredity* 74: 10-18
- Falk DA, Richards CM, Montalvo AM, Knapp EE (2006) Population and Ecological Genetics in Restoration Ecology. En DA Falk, MA Palmer, JB Zedler (eds), *Foundations of Restoration Ecology*. Island Press. EUA. pp 14-41
- Fracaro F, Echeverrigaray S (2006) Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of southern Brazil. *Biochemical Genetics* 44: 479-490.
- Franceschinelli EV, Jacobi CM, Drummond

Tabla 5. Distancia genética entre las poblaciones (GD) debajo de la diagonal e identidad genérica de Nei (GI) sobre la diagonal.

Población	Mil Cumbres	Laguna Larga	Jerahuaro	San Nicolás	Tepamal	Temascaltepec	Marquesa
Mil Cumbres	-	0.873	0.923	0.777	0.784	0.884	0.801
Laguna Larga	0.136	-	0.861	0.828	0.844	0.880	0.855
Jerahuaro	0.080	0.150	-	0.761	0.789	0.861	0.812
San Nicolás	0.252	0.189	0.273	-	0.938	0.247	0.191
Tepamal	0.244	0.169	0.237	0.064	-	0.227	0.150
Temascaltepec	0.123	0.128	0.149	0.781	0.797	-	0.772
Marquesa	0.222	0.157	0.209	0.826	0.861	0.258	-

Nota: Los valores de GD y GI de las poblaciones de la Planicie Tarasca en relación a las demás poblaciones se encuentran en negritas y subrayadas las de San Nicolás y Tepamal.

- MG, Resende MFS** (2006) The genetic diversity of two Brazilian *Vellozia* (Velloziaceae) with different patterns of spatial distribution and pollination biology. *Annals of Botany* 97: 585-592
- Gegear RJ, Burns JG** (2007) The birds, the bees, and the virtual flowers: can pollinator behavior drive ecological speciation in flowering plants?. *American Naturalist* 170:551-566
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD** (2001) *PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis*. Palaeontologia Electronica 4, 9pp
- Lara C** (2006) Temporal dynamics of flower use by hummingbirds in a highland temperate forest in México. *Ecoscience* 13: 23-29
- Lara-Cabrera S, Alejandre-Melena N, Medina-Sánchez E, Lindig-Cisneros R** (2009) Genetic diversity in populations of *Lupinus elegans* Kunth, implications for ecological restoration. *Revista Fitotecnica Mexicana* 32: 79-86
- Lefort F, Douglas GC** (1999) An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Science* 56: 259-263
- Lewontin RC** (1972) Apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381-398
- Lindig-Cisneros R, Sáenz-Romero C, Blanco-García A** (2008) Restauración adaptable en bosques templados del occidente de México. *Boletín de la Red Iberoamericana y del Caribe de Restauración Ecológica* 2: 5-7
- Liu J, Wang L, Geng Y, Wang Q, Luo L, Zhong Y** (2006) Genetic diversity and population structure of *Lamiophlomis rotata* (Lamiaceae), an endemic species of Qinghai-Tibet Plateau. *Genetica* 128: 385-394
- López-Pujol J, Orellana MR, Boseh M, Simon J, Blanche C** (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 Biology* 5: 504-512
- Loveless MD, Hamrick JL** (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 15: 65-95
- Malaval S, Lauga B, Regnault-Roger C, Largier G** (2010) Combined definition of seed transfer guidelines for ecological restoration in the French Pyrenees. *Applied Vegetation Science* 13: 113-124
- Mantel NA** (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220
- Mattner J, Zawko G, Rossetto M, Krauss SL, Dixon KW, Sivasithamparam K** (2002) Conservation genetics and implications for restoration of *Hemigenia exilis* (Lamiaceae), a serpentine endemic from Western Australia. *Biological Conservation* 107: 37-45
- McDermott JM, McDonald BA** (1993) Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* 31: 353-73
- Miller MP** (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 BC** (2001) Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae). *Evolution* 55: 1569-1580
- Nei M** (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323
- Peakall R, Smouse PE** (2001) *GenALEX V5: Genetic Analysis in Excel*. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia
- R Development Core Team** (2009) *R: A language and environment for statistical computing*. <http://www.R-project.org>. (10 Enero 2010)
- Ramamoorthy TP** (2001) *Salvia* L. En J Rzedowski, RG Calderón (eds), *Flora Fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología, A. C., CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán. 632-644
- Saenz-Romero C, Tapia-Olivares BL** (2008) Genetic variation in frost damage and seed zone delineation within an altitudinal transect of *Pinus devoniana* (*P. michoacana*) in Mexico. *Silvae Genetica* 57: 165-170
- Travis SE, Grace JB** (2010) Predicting performance for ecological restoration: a case study using *Spartina alterniflora*. *Ecological Applications* 20: 192-204
- Trindade H, Costa MM, Lima BAS, Pedro LG, Figueiredo AC, Barroso JG** (2008) Genetic diversity and chemical polymorphism of *Tymus caespititius* from Pico, Sao Jorge and Terceira Islands (Azores). *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 790-797
- Van der Mijnsbrugge K, Bischoff A, Smith B** (2010) A question of origin: Where and how to collect seed for ecological restoration. *Basic and Applied Ecology* 11: 300-311
- Verma S, Karihaloo JL, Tiwari SK, Magotra R, Koul AK** (2007) Genetic diversity in *Eremostachys superba* Royle ex Benth. (Lamiaceae), an endangered Himalayan species, as assessed by RAPD. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 221-229
- Wester P, Classen-Bockhoff R** (2007) Floral diversity and pollen Transfer Mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species. *Annals in Botany* 100: 401-421
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 5531-6535
- Yeh FC, Rong-Cai Y, Boyle T** (1999) *POPGENE v1.31*. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Edmonton, Alberta, Canada
- Zaghloul MS, Hamrick JL, Moustafa AA, Kamel WM, El-Ghareeb R** (2006) Genetic diversity within and among Sinai populations of three *Ballota* species (Lamiaceae). *Journal of Heredity* 97: 45-54