

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE *LOBELIA VILLAREGALIS* (CAMPANULACEAE), ESPECIE EN PELIGRO ENDÉMICA DE JALISCO, MÉXICO

LETICIA HERNÁNDEZ-LÓPEZ¹, PILAR ZAMORA-TAVARES², JESSICA PÉREZ-ALQUICIRA^{*2,3},
 DARÍO FIGUEROA-GARCÍA¹ Y ARMANDO ARIAS-GARCÍA¹

¹ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Departamento de Botánica y Zoología, Zapopan, Jalisco, México.

² Universidad de Guadalajara, Laboratorio Nacional de Identificación y Caracterización Vegetal (LaniVeg), Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Zapopan, Jalisco, México.

³ Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, Ciudad de México, México.

*Autor para correspondencia: perezalquicira@gmail.com

Resumen

Antecedentes: *Lobelia villaregalis* es una especie endémica y en peligro de extinción en Jalisco, México. Conocer la estructura y diversidad genética de las poblaciones de especies en riesgo puede contribuir a mejorar las estrategias para su conservación. Esta información no se ha generado para *L. villaregalis*.

Preguntas: 1) ¿Presenta *L. villaregalis* niveles bajos de diversidad genética?, 2) ¿Existen diferencias genéticas entre sus poblaciones?

Especies de estudio: *Lobelia villaregalis* T.J. Ayers (Campanulaceae: Lobelioideae), herbácea perenne.

Sitio y años de estudio: Durante 2018-2020 se realizó trabajo de campo en el Área Natural Protegida Bosque La Primavera, Zapopan, Jalisco, para localizar nuevas poblaciones de la especie y recolectar material foliar.

Métodos: Se evaluó la diversidad y estructura genética de 87 individuos en cinco poblaciones utilizando marcadores moleculares ISSR.

Resultados: La diversidad genética promedio de *L. villaregalis* es baja ($H_e = 0.057$, $P = 48.17\%$, $I = 0.110$) así como la diversidad total ($H_T = 0.069$). El análisis de varianza molecular mostró que la mayor parte de la variación genética (92 %) ocurrió dentro de las poblaciones. La prueba de Mantel indica que no hay correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas para las cinco poblaciones estudiadas ($R = 0.64$, $P = 0.18$). Con el análisis de asignación genética se identificaron 4 grupos, sin embargo, no existe estructura genética ($G_{ST} = 0.060$).

Conclusiones: *Lobelia villaregalis* requiere acciones urgentes de conservación para mantener la diversidad genética de todas sus poblaciones, dando máxima prioridad a tres de ellas.

Palabras clave: Bosque La Primavera, diversidad genética, gel poliacrilamida, ISSR, *Lobelia villaregalis*, Lobelioideae.

Abstract

Background: *Lobelia villaregalis* is an endemic and endangered species in Jalisco, Mexico. Knowing the structure and genetic diversity of populations of species at risk can contribute to improving strategies for their conservation. This information has not been generated for *L. villaregalis*.

Questions: 1) Does *L. villaregalis* present low levels of genetic diversity?, 2) Are there genetic differences between its populations?.

Studied species: *Lobelia villaregalis* T.J. Ayers (Campanulaceae: Lobelioideae), herbaceous perennial.

Study site and dates: During 2018-2020, field work was carried out in El Bosque La Primavera Natural Protected Area, in Zapopan, Jalisco, in order to locate new populations of the species and collect leaf material.

Methods: The diversity and genetic structure of 87 individuals in five populations were evaluated using ISSR molecular markers.

Results: The average genetic diversity of *L. villaregalis* is low ($H_e = 0.057$, $P = 48.17\%$, $I = 0.110$) as well as the total diversity ($H_T = 0.069$). Molecular analysis of variance showed that most of the genetic variation (92 %) occurred within populations. The Mantel test indicates that there is no correlation between the genetic distances and the geographical distances for the five populations of the species ($R = 0.64$, $P = 0.18$). With the genetic assignment analysis, 4 groups were identified, however there is no genetic structure ($G_{ST} = 0.060$).

Conclusions: *Lobelia villaregalis* requires urgent actions of conservation to maintain the genetic diversity present in all its populations, giving the highest priority to three of them.

Keywords: Bosque La Primavera, genetic diversity, polyacrylamide gel, ISSR, *Lobelia villaregalis*, Lobelioideae.

La familia Campanulaceae incluye 84 géneros y cerca de 2,400 especies representadas en seis continentes y archipiélagos del mundo, sin embargo, Sudáfrica y Sudamérica se han identificado como los centros de mayor diversidad (Lammers 2007). La familia se ha dividido en cinco subfamilias de las cuales Campanuloideae y Lobelioideae son las de mayor distribución. La primera se encuentra principalmente en zonas templadas del Viejo Mundo, mientras que la segunda predomina en zonas tropicales y subtropicales. En la subfamilia Lobelioideae sobresale el género *Lobelia* L. por su riqueza de especies (437) y su amplia distribución (Lammers 2007, Gutiérrez-Sánchez *et al.* 2018, Kagame *et al.* 2021, Pérez-Pérez *et al.* 2022). Campanulaceae posee valor económico principalmente en la horticultura ya que algunas de sus especies se cultivan como ornamentales, entre las más conocidas se encuentran *Lobelia siphilitica* L., *L. erinus* L. y *L. cardinalis* L. (Lagomarsino *et al.* 2014). Otras especies se cultivan como comestibles en Europa y Asia; varias se usan en la medicina tradicional china (Lammers 2007). De algunas especies de *Lobelia* se obtienen compuestos farmacéuticos de valor comercial como la lobelina, utilizada en el tratamiento para la adicción a la nicotina (Marlow & Stoller 2003, Stead & Hughes 2012) y a otras drogas (Neugebauer *et al.* 2007).

En México la diversidad de Campanulaceae consta de 14 géneros y 118 especies (Gutiérrez-Sánchez *et al.* 2018, Rzedowski 2019, Pérez-Pérez *et al.* 2022). Dos géneros y cerca del 59 % de las especies son endémicas del país, donde destacan los estados de Oaxaca y Veracruz, por albergar la mayor riqueza y endemismo de la familia (Rzedowski 2019). Así mismo, la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental presentan un alto número de endemismos con 15 especies y un género y 10 especies respectivamente (Gutiérrez-Sánchez *et al.* 2018, Rzedowski 2019, Pérez-Pérez *et al.* 2022). *Lobelia* es el género más diverso con 86 taxones y representa cerca del 75 % de las Campanulaceae de México (Rzedowski 2019). En Jalisco se han reconocido 16 especies de Campanulaceae de las cuales 14 corresponden a *Lobelia* (Rzedowski 2019) y entre ellas se encuentra *Lobelia villaregalis* T.J. Ayers, herbácea perenne de 15-20 cm de alto con tallos decumbentes; inflorescencia racemosa con flores zigomorfas de color rosa-lila que presentan espolón cónico-cilíndrico (Ayers 1987), (Figura 1A-C). Es endémica con distribución restringida al Área Natural Protegida (ANP) Bosque La Primavera, en la parte central de Jalisco. Se encuentra en hábitats relativamente conservados con alta humedad, en laderas pronunciadas y taludes de arroyos con sustrato arenoso en bosque de pino-encino (Villa-Galaviz *et al.* 2020), (Figura 1D-G).

Las especies con poblaciones de tamaño reducido son más vulnerables a eventos estocásticos de tipo ambiental, demográfico o genético (Frankham 2003, Orme *et al.* 2005). Esa vulnerabilidad se acentúa por factores antropogénicos como introducción de especies exóticas, sobreexplotación y pérdida de hábitat debido a incendios forestales o cambios de uso del suelo. Entre los problemas genéticos más frecuentes en poblaciones reducidas se encuentra la disminución de diversidad genética debido a la pérdida de alelos a causa de la deriva genética y la endogamia (Ellstrand & Ellam 1993). La diversidad genética baja limita el potencial evolutivo, la capacidad de las poblaciones para sobrevivir a cambios en su hábitat y su vulnerabilidad a patógenos y predadores se puede incrementar, por lo que se le relaciona con el riesgo de extinción, en particular en especies raras y endémicas (Hamrick & Godt 1996, Cole 2003, Frankham 2003). El conocimiento de la variación genética dentro y entre poblaciones debería tener un papel fundamental en las estrategias para el manejo, conservación y restauración de especies silvestres en riesgo con poblaciones fragmentadas (Hamrick & Godt 1996, Frankham 2003, Castellanos-Hernández *et al.* 2017). Las especies amenazadas presentan tasas de extinción más altas, por lo que su conservación requiere de mayores esfuerzos (Orme *et al.* 2005) así mismo, se han posicionado como uno de los sustitutos (*surrogate species*) de mayor utilidad para identificar y evaluar áreas prioritarias de conservación (Myers *et al.* 2000, Huang 2011, Neel & Che-Castaldo 2013).

Los marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) amplifican regiones neutrales ubicadas entre microsatélites. Esta técnica permite realizar un muestreo amplio del genoma y obtener regiones polimórficas, aún en especies con baja diversidad genética. Tienen ventajas sobre otros marcadores ya que al ser regiones comunes entre diferentes genomas pueden amplificarse fácilmente en la mayoría de las especies, segregan de manera mendeliana y su costo es bajo (Zietkiewicz *et al.* 1994, Nagaoka & Ogiwara 1997). Los ISSR han permitido cuantificar la diversidad y estructura genética de plantas y su relación con el ciclo de vida, distribución geográfica, estrategias reproductivas, así como identificar poblaciones o taxa genéticamente únicos cuya conservación es prioritaria (Nybom 2004).

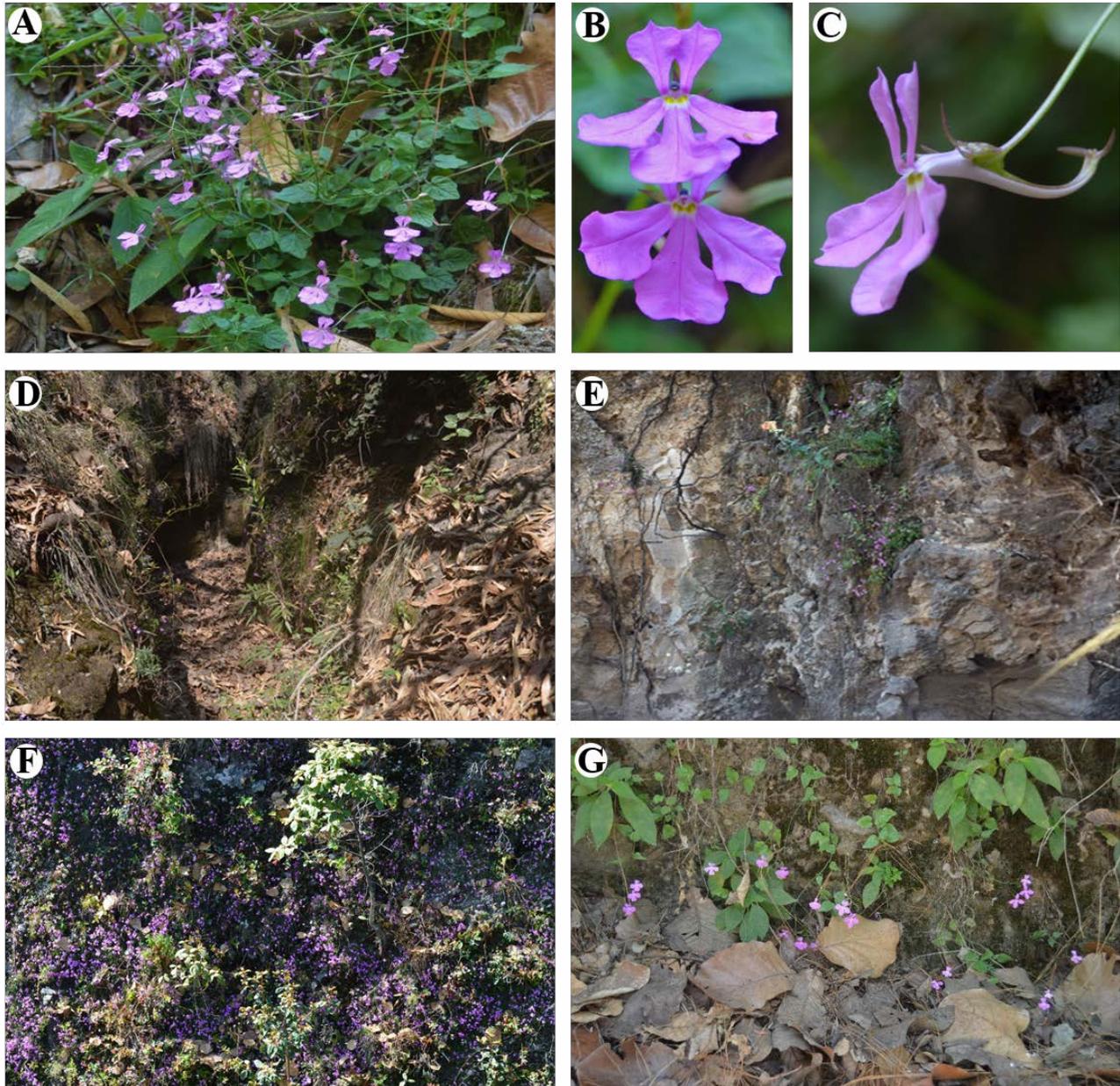


Figura 1. Características morfológicas de *Lobelia villaregalis* (A-C) y condiciones de su hábitat: D) Zona Geotérmica, E) Villa Panamericana, F-G) Espinazo. Fotografías de Darío Figueroa-García, excepto E) de Jesús Moreno Navarro.

La diversidad genética de solo cuatro especies de *Lobelia* se ha evaluado. Una de ellas es *Lobelia urens* L., una especie rara del sur de Inglaterra se estudió mediante isoenzimas (Daniels *et al.* 1997); en una lobelia gigante de Etiopía, *Lobelia rhynchopetalum* (Hochst. ex A. Rich.) Hemsl. se utilizaron marcadores ISSR (Geleta & Bryngelsson 2009). Por otra parte, en *L. inflata* L., originaria del noreste de Estados Unidos y Canadá y en *L. villosa* (Rock) H. St. John & Hosaka, endémica de Hawai, se utilizaron marcadores microsátélites (Hughes *et al.* 2014, Tran *et al.* 2015).

En *L. villaregalis* no se conoce la demografía de sus poblaciones, sus mecanismos de dispersión, la diversidad genética de sus poblaciones ni sus relaciones filogenéticas con respecto de otras especies de este género. Se han observado los visitantes florales (datos no publicados), la descripción del suelo y composición florística de su hábitat (Villa-Galaviz *et al.* 2020), así como las amenazas que enfrenta (Hernández-López & Munguía-Lino 2023). Entre

los principales impactos a sus poblaciones se encuentran incendios forestales, erosión del suelo, presencia de cultivos agrícolas y asentamientos humanos. Una evaluación preliminar del estado de riesgo utilizando los criterios de la UICN indica que *L. villaregalis* se encuentra en peligro de extinción (Hernández-López & Munguía-Lino 2023). Documentar la diversidad genética de esta especie es fundamental para contribuir a su manejo adecuado y conservación. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la diversidad y estructura genética de las poblaciones silvestres de *L. villaregalis* en el Área Natural Protegida Bosque La Primavera, Jalisco.

Materiales y métodos

Área de estudio. El Bosque La Primavera ostenta la categoría de Área de Protección de Flora y Fauna (APFFLP) y ocupa una superficie de 30,500 has. Se ubica en el centro del estado de Jalisco en las provincias de la Sierra Madre Occidental y el Eje Volcánico Transversal Mexicano, entre los 1,300 y 2,300 m snm (CONANP 2000). Se conocen únicamente cinco poblaciones de *Lobelia villaregalis*, todas dentro del APFFLP en un rango de elevación que va de los 1,530 a los 2,187 m snm y con bosque de encino-pino como vegetación dominante. Las localidades de las poblaciones son Espinazo (ESP) el cual consta de un paredón de 50 m de largo y entre 3-17 m de alto; Villa Panamericana (VP); La Venta (LV); Pinar de La Venta (PLV); y la Zona Geotérmica (ZG), una cañada pequeña formada por un arroyo temporal (Figuras 1D-G y Figura 2). La caracterización detallada de las localidades se encuentra en Hernández-López & Munguía-Lino (2023).

Material vegetal. Se realizaron visitas sistemáticas a cada población durante los meses de mayor floración (enero-abril). Se colectó tejido foliar de 18 individuos por población (dos hojas por cada individuo no mayores a 2 cm²). Las hojas fueron seleccionadas cuidadosamente, asegurándose que no presentaran daños estructurales, coloración inusual, proceso de envejecimiento o presencia de herbívoros. El tejido se tomó de ejemplares separados entre sí por 1 m aproximadamente.

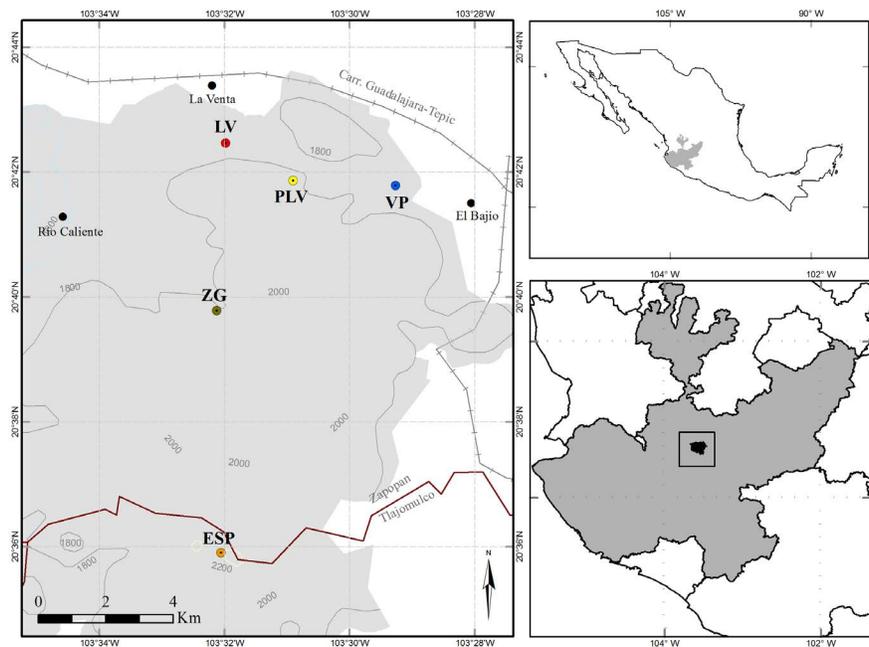


Figura 2. Área de estudio de *Lobelia villaregalis*. Los puntos en color representan las poblaciones muestreadas: La Venta (LV, rojo), Pinar de La Venta (PLV, amarillo), Villa Panamericana (VP, azul), Zona geotérmica (ZG, verde olivo) y Espinazo (ESP, naranja). El área en gris corresponde al polígono del área natural protegida Bosque La Primavera y los puntos negros son poblados o sitios conocidos como referencia.

Extracción de ADN y amplificación de marcadores ISSR. Para obtener el ADN genómico, se cortaron fragmentos de hojas de 1 cm² y se depositaron en tubos de 2 ml, se agregó un balín de tungsteno a cada tubo y se colocaron a -80 °C por 24 hr. El tejido restante fue resguardado como material duplicado a -20 °C. Las muestras fueron maceradas en un lisador de tejido (Tissue lyser, Qiagen) a 50 oscilaciones por min durante cinco min.

El ADN se extrajo usando el método CTAB de Doyle & Doyle (1987) con las siguientes modificaciones: el tiempo de incubación con CTAB se extendió a 50 min con agitación manual cada 5 min, y se agregó proteinasa K (20 mg/mL). El pellet de ADN se resuspendió en 100 µL de agua grado HPLC para su conservación a -20 °C. Se cuantificó y determinó la pureza de ADN por espectrofotometría en NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) (Sambrook & Russell 2001) y se verificó en geles de agarosa al 1 %. Se estandarizaron todas las muestras por medio de diluciones a una concentración de 20 ng/µL.

Se evaluaron 11 oligonucleótidos ISSR (6, 7, 16, 22, 814, 843, 844, 898, 899, 901, 902) que incluyen repeticiones CT, GT, CG, AC y AG. Para generar los marcadores moleculares ISSR se seleccionaron tres iniciadores que mostraron patrones de bandeo más polimórficos y reproducibilidad alta en la amplificación, tres di-nucleótidos: 7 (CT)₈RG, 843 (CT)₈RA y 844 (CT)₈RC.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se realizó y estandarizó en un termociclador Aeris™ (ESCO). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25µL, el cual contenía: HPLC = 14.8 µL, MgCl₂ [50 mM] = 2, Buffer 10X [100 µM Tris, 500 µM KCl] = 2.5, dNTPs [5 mM] = 0.5, Primer 7 = 2, Taq polimerasa recombinante [5 U/µL] = 0.2, DMSO = 1 y ADN [20 ng/µL] = 2 (Primer 843 con las mismas condiciones) y para el Primer 844 se modificó la cantidad de los siguientes componentes: HPLC = 13.8 µL, MgCl₂[50 mM] = 2.5, Buffer 10X [100 µM Tris, 500 µM KCl] = 3 (Sambrook & Russell 2001).

Las condiciones óptimas de PCR para los Primers 7 y 843 fueron: ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 4 min; 35 ciclos de tres pasos, el primero de 95 °C por 45 seg, 52 °C por 45 seg como temperatura de alineamiento y el tercero a 72 °C durante 1:30 min, para finalizar con un ciclo de amplificación a 72 °C durante 15 min. Para el marcador 844, la temperatura de alineamiento fue 56 °C.

Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6 % con urea 7 M en Buffer TBE 1X. Para conseguir una mejor polimerización, se agregaron 180 µL de APS 10 % por cada 35 ml de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en una cámara dual (CBS Scientific) a 220 V constantes y 400 amperios durante 5 hr o hasta que el buffer de carga indicó una distancia de migración de 20 cm. Para la visualización de los fragmentos se utilizó la técnica de tinción con nitrato de plata (Sanguinetti *et al.* 1994), modificando la concentración de nitrato de plata de 2 g a 3.5 g por litro.

Análisis de datos. El patrón de migración de los fragmentos ISSR se evaluó de forma manual sobre los geles de poliacrilamida. Los geles analizados incluyeron dos columnas de referencia de marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) para estimar el peso de las bandas. El bandeo para cada iniciador y población se registró en una matriz de datos considerando su presencia (1) o ausencia (0). Las bandas que alcanzaron la misma distancia de migración o peso molecular entre los individuos se consideraron fragmentos homólogos. Se utilizaron cuatro parámetros para medir la diversidad genética por población: 1) Proporción de loci polimórficos (P), 2) Heterocigosidad esperada (H_E) según Nei (1978) aplicando la corrección de Lynch & Milligan (1994) para marcadores dominantes, 3) Índice de diversidad de Shannon (I) y 4) Diversidad total de la especie (H_T), (Nei 1987) con Arlequin 3.5.2 (Excoffier & Lischer 2010). Se registraron los alelos comunes y privados para las cinco poblaciones de *L. villaregalis*. Las estimaciones de diversidad genética se realizaron con el programa GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse 2012), excepto H_T. Con el fin de evaluar si existen diferencias significativas en los niveles de diversidad genética entre las poblaciones, se realizó una prueba de Tukey en el programa Past4 (Hammer *et al.* 2001).

La diferenciación genética se evaluó utilizando cuatro parámetros: 1) Matriz de distancias genéticas pareadas no sesgada de Nei (D), (Nei 1972), 2) análisis de coordenadas principales (PCoA, por sus siglas en inglés), se realizó a nivel de población y a nivel de individuo, 3) análisis de varianza molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés) (Excoffier *et al.* 1992) y 4) coeficiente de diferenciación genética G_{ST} (Nei 1973). Las estimaciones se llevaron a cabo con el programa GenAlex 6.5

Para evaluar una posible correlación entre distancias genéticas y geográficas, se hizo una prueba de Mantel con GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse 2012). Se realizó un análisis de asignación genética utilizando STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000), en el que se utilizó el modelo de mezcla con frecuencias alélicas correlacionadas debido a que las poblaciones se encuentran geográficamente cercanas. El análisis se corrió con 1×10^6 pasos utilizando cadenas de Markov tipo Monte Carlo (MCMC por sus siglas en inglés) y *burn-in* de 1×10^5 . Se probó una K (número de grupos probables) de 1 a 5. Los resultados fueron analizados con el programa CLUMPAK (Kopelman *et al.* 2015) en línea (<https://tau.evolseq.net/clumpak/>), utilizando ΔK (Evanno *et al.* 2005) y Prob(K) (Pritchard *et al.* 2000) para encontrar los valores óptimos. Los resultados se visualizaron en DISTRUCT (Rosenberg 2003) y CLUMPAK.

Resultados

Los protocolos para extraer ADN y amplificar marcadores ISSR para *Lobelia villaregalis* fueron estandarizados. Se probaron 11 cebadores, de los cuales sólo tres mostraron patrones de bandedo polimórfico. Los cebadores elegidos generaron 120 bandas en conjunto y cada banda fue considerada como un locus. Se obtuvieron 35, 40 y 45 loci con los cebadores 7, 843 y 844, respectivamente (Apéndice 1). Se evaluaron 87 individuos en total, en promedio 18 individuos por cada una de las cinco poblaciones, excepto la población PLV en la que se analizaron sólo 15 individuos debido a lo reducido de la población.

Diversidad genética y diferenciación genética. El patrón de bandas de los individuos de las cinco poblaciones indica una diversidad genética promedio de $H_E = 0.057$, $P = 48.17\%$, $I = 0.110$ y la diversidad total $H_T = 0.069$. Los valores de diversidad por población oscilan entre $H_E = 0.045$, $P = 40.83\%$, $I = 0.087$ para la población VP, y $H_E = 0.074$, $P = 60.83\%$, $I = 0.143$ para la población de la ZG (Tabla 1). Las cinco poblaciones contienen alelos privados, siendo ESP y ZG las que presentan un mayor número con ocho y nueve, respectivamente, mientras que en VP solo se encontraron dos (Tabla 1). No hubo diferencias en los niveles de diversidad genética entre poblaciones, excepto entre ZG la cual significativamente tuvo mayor diversidad genética que la población VP.

Tabla 1. Diversidad genética por población y promedio de *Lobelia villaregalis*.

Población	Código ^a	<i>n</i>	H_E	P	I	LP
Espinazo	ESP	18	0.054	50.83	0.106	8
Villa Panamericana	VP	18	0.045	40.83	0.087	2
La Venta	LV	18	0.053	44.17	0.101	5
Pinar de la venta	PLV	15	0.059	44.17	0.112	4
Zona Geotérmica	ZG	18	0.074	60.83	0.143	9
Promedio	-	17.4	0.057	48.17	0.110	
Total			0.069			

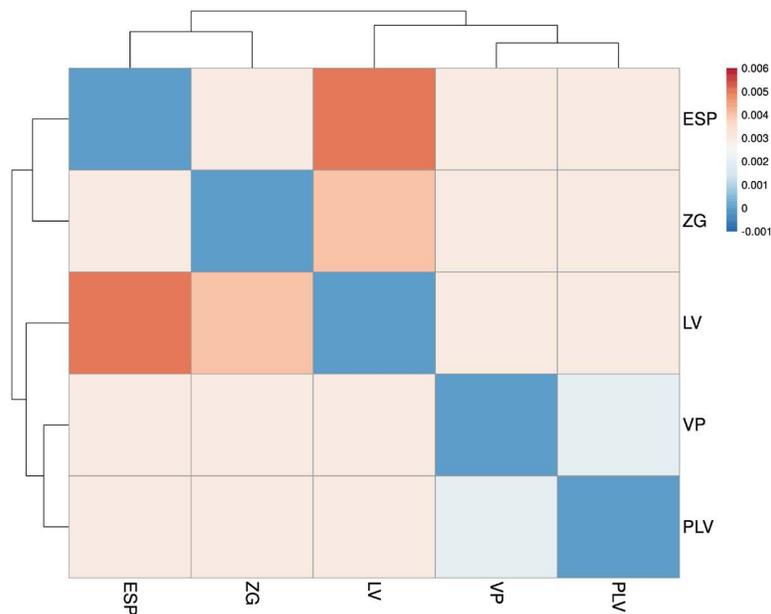
^a Código alfabético de población usado en el texto. *n* = Número de individuos, H_E = Heterocigosidad esperada (Nei 1973), P = Porcentaje de loci polimórficos, I = Índice de diversidad de Shannon (Lewontin 1972). LP = Loci privados.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones (92 %), indicando una alta variación entre individuos. La variación restante (8 %) se encontró entre las cinco poblaciones estudiadas (Tabla 2). Las distancias genéticas (*D*) entre las cinco poblaciones de *L. villaregalis* varían de 0.002 a 0.005, siendo las poblaciones PLV y VP las más similares; y LV y ESP las más distintas (Figura 3). El análisis de coordenadas principales (PCoA) a nivel de poblaciones muestra resultados similares, en donde, LV y ESP están más alejadas, así como ESP y ZG. Este resultado, se ajusta a que son las poblaciones más

Tabla 2. Análisis de varianza molecular en *Lobelia villaregalis*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Estimación de la varianza	Porcentaje de la variación
Entre poblaciones	4	62.74	15.69	0.543	8
Dentro de la población	82	512.13	6.246	6.246	92
Total	86	574.87		6.789	100

alejadas geográficamente. Mientras que las más cercanas genéticamente son PLV y LV, y PLV-VP (Figura 4A). La coordenada principal 1 explica el ordenamiento del 41.9 % de la variación, mientras que el PCoA2, explica el 21.61 %. El PcoA de los individuos indica que la coordenada principal 1 explica el 6.22 % y la 2 explica el 5.55 % de la variación. En el gráfico se observa un alto solapamiento entre los individuos de las 5 poblaciones, a excepción de algunos individuos (Figura 4B). La prueba de Mantel indica que no hay correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas para las cinco poblaciones de *L. villaregalis* ($R = 0.64$, $P = 0.18$). El análisis de asignación genética, de acuerdo a ΔK indicó la presencia de cuatro grupos genéticos, mientras $\text{Prob}(K) = 3$. Dado que cada grupo incluyó individuos pertenecientes a cada una de las cinco poblaciones, no hay estructura y por tanto se puede considerar un sólo grupo genético (Figura 5).

**Figura 3.** Mapa de calor de distancias genéticas pareadas no sesgadas de Nei (1972) en cinco poblaciones de *Lobelia villaregalis*.

Discusión

La diversidad genética total de *Lobelia villaregalis* ($H_T = 0.069$) es más baja de acuerdo con lo encontrado por Nybom (2004) en especies herbáceas y perennes ($H = 0.25$) y para especies endémicas ($H = 0.20$). En general, todas las poblaciones tienen diversidad genética baja. Las diferencias entre las poblaciones son ligeras y no tienen significancia estadística ($P \geq 0.050$), excepto la población ZG en la cual la diversidad genética fue mayor respecto a VP ($P < 0.05$). La diversidad genética promedio en esta especie es más baja ($H_E = 0.057$, $P = 48.17\%$, $I = 0.110$) en comparación con la registrada en cinco poblaciones de *L. villosa* ($H_E = 0.40$, 7.6 alelos por locus y 0.35 proporción

de alelos privados) (Tran *et al.* 2015) y en 10 poblaciones de *L. rhynchopetalum* ($H = 0.70$) utilizando marcadores ISSR (Geleta & Bryngelsson 2009). La diversidad genética total encontrada en *L. villaregalis* ($H_T = 0.069$) es menor a la reportada para *Omphalogramma souliei* Franch ($H_{sp} = 0.1762$), especie en peligro de extinción con sólo tres poblaciones silvestres, y cuya variación fue estimada también con marcadores ISSR (Huang *et al.* 2009). Sin embargo, no es tan baja si se contrasta con *L. inflata*, donde la heterocigosidad observada fue de cero, dado que esta especie mayormente se autopoliniza y el entrecruzamiento es raro o inexistente (Hughes *et al.* 2014). En *L. villaregalis* los resultados sugieren que existe cierto grado de entrecruzamiento ya que se han observado 17 morfoespecies como visitantes florales donde destacan 13 especies de lepidópteros, por lo que se sospecha de exogamia aunque su sistema de apareamiento no se ha determinado (datos no publicados). Lo anterior es congruente con los bajos niveles de diferenciación genética entre poblaciones.

Desde la descripción taxonómica de *L. villaregalis* (Ayers 1987), sus poblaciones han sufrido muchas presiones ambientales provocadas por la actividad humana (Hernández-López & Munguía-Lino 2023), entre ellas los incendios forestales. Según Huerta-Martínez & Ibarra-Montoya (2014) y Jardel-Peláez (2020) cerca del 90 % de la superficie del Bosque La Primavera se ha incendiado en al menos una ocasión durante el periodo 1998-2019, lo cual ha resultado en la pérdida anual de la masa forestal del 1.31 %. Aunque no se ha cuantificado el impacto de los incendios sobre *L. villaregalis*, Hernández-López & Munguía-Lino (2023) documentaron la pérdida parcial de dos poblaciones debido al fuego y al embate de la erosión ocurrida en la primera temporada de lluvias posterior a los incendios. Por ello se cree que estos eventos han provocado la reducción del tamaño poblacional (cuellos de botella) de especies como *L. villaregalis*, y por tanto la reducción de la diversidad genética.

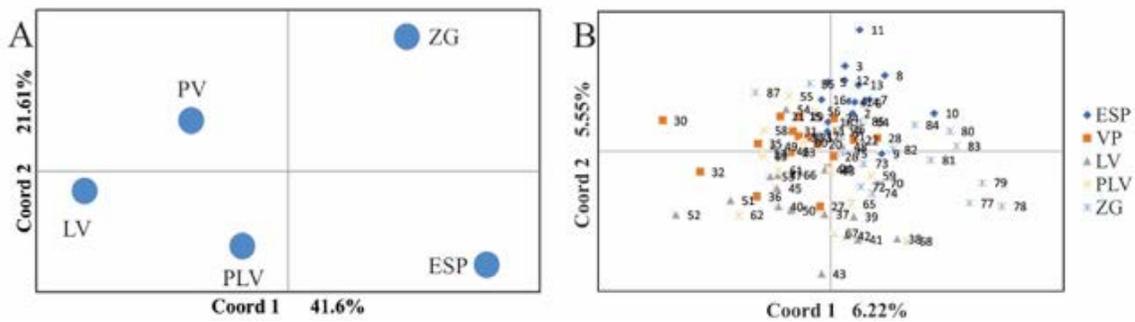


Figura 4. A) Análisis de coordenadas principales (PCoA) entre poblaciones y B) PCoA entre individuos de *Lobelia villaregalis* con base en distancias genéticas de Nei.

Por otro lado, se encontraron alelos privados en las cinco poblaciones, que van de dos a nueve. La presencia de alelos privados en todas las poblaciones de *L. villaregalis* es un elemento importante para diferenciar poblaciones, además, tales alelos pueden representar trayectorias evolutivas únicas como se sugiere para otras especies raras (Arft & Ranker 1998, Ávila-Díaz & Oyama 2007). Algunos autores han propuesto que los alelos privados o raros en las poblaciones tienen importancia evolutiva, figurando como posibles loci de valor adaptativo a las condiciones locales inusuales (Huenneke 1991, Arft & Ranker 1998). Sin embargo, estos alelos tienden a ocurrir en baja frecuencia y pueden perderse por deriva genética o bien pueden ser errores de genotipación (Luikart *et al.* 1998). Las poblaciones Zona Geotérmica (ZG) y Espinazo (ESP) presentan variación que no está en el acervo genético de las otras poblaciones y es posible que incluyendo un mayor número de marcadores genéticos pueda encontrarse más variación que sólo está presente en estas. Por lo cual, la conservación de ambas poblaciones debería ser prioridad. Además, estas poblaciones son vulnerables debido al uso del suelo y otros eventos antrópicos que ahí se han registrado. Por ejemplo, la población ZG de *L. villaregalis* con nueve alelos privados, se encuentra en un predio que desde la década de los 80's ha sido severamente impactado debido a la perforación de 13 pozos (Maciel-Flores & Rosas-Elguera 1992) y a la infraestructura relacionada con la exploración geotérmica por parte de la Comisión Federal de Electricidad (CFE) para la generación de electricidad. En algunos pozos la temperatura alcanza entre 231 y 299 °C a una profundidad

de 1,750-1,800 m (JICA 1986). Debido al impacto ambiental causado, en 1990 las actividades fueron suspendidas por las autoridades ambientales y el sitio fue contemplado en la zonificación del área natural protegida como zona de uso especial (CONANP 2000). Sin embargo, dicha suspensión no es definitiva y sigue latente la amenaza de que se retome el proyecto geotérmico con el consecuente impacto en el hábitat de *L. villaregalis*.

Por otra parte, la población Espinazo (ESP) donde se detectaron ocho alelos privados, se encuentra en un paredón casi vertical y sus cercanías. Este paredón fue formado en 1972 por la apertura de un camino que asciende desde el camino principal (ingreso por la caseta Mariano Otero) hasta una torre de vigilancia (Villa-Galaviz *et al.* 2020). Esta localidad se encuentra entre los 2,060-2,187 m snm, constituye la más alta elevación de las cinco localidades conocidas de la especie y albergaba la mayor densidad de individuos de *L. villaregalis* en un área reducida. Sin embargo, a principios del 2019 fue una de las poblaciones afectadas por un incendio forestal (Hernández-López & Munguía-Lino 2023). Además de las condiciones abióticas, las interacciones con otras especies y los mecanismos de dispersión son importantes en la estructura genética de las poblaciones (Wiens & Donogue 2004). Se desconocen los mecanismos de dispersión de *L. villaregalis*, aunque se ha sugerido que el viento y las escorrentías de agua podrían dispersar las semillas ya que miden 1 mm (Hernández-López & Munguía-Lino 2023).

La falta de correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas en *L. villaregalis* aunado a la baja diferenciación genética ($G_{ST} = 0.060$) podría explicarse por el alto flujo génico que posiblemente existió en periodos históricos o incluso flujo genético actual. También podría deberse a que las poblaciones actuales representan lo que era una sola población continua y el tiempo de fragmentación es muy reciente. La fragmentación de las poblaciones pudo ocurrir a consecuencia de los cambios climáticos, particularmente en periodos interglaciares, donde las condiciones son más cálidas y secas que en el periodo glacial (Mastretta-Yanes *et al.* 2015). A su vez la actividad de origen antrópico y los incendios, muchos de ellos provocados por humanos han contribuido a la reducción y fragmentación de las poblaciones. Dado que *L. villaregalis* crece en microhábitats muy específicos, particularmente paredes húmedas, su distribución no es continua sino en parches.

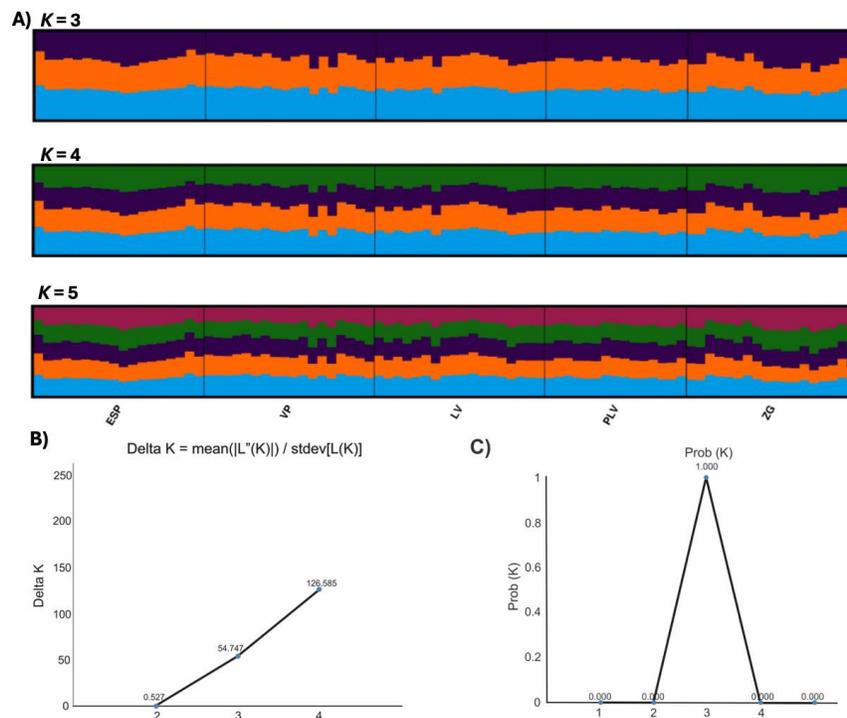


Figura 5. A) Análisis de asignación genética ($K = 3$ a 5) de cinco poblaciones de *Lobelia villaregalis* y 87 loci ISSR. B) Grupos identificados por el método de Evanno *et al.* (2005). C) Grupos identificados a partir de $Pr(K)$ de Pritchard *et al.* (2000).

En algunas poblaciones la red de arroyos de temporal en cuyas paredes crece la especie no llegan a juntarse, incluso algunos cauces drenan en direcciones opuestas; el arroyo que alberga la población VP drena al Este mientras que el de LV y PLV desagua hacia el Oeste. Lo anterior sugiere que la discontinuidad en los arroyos podría fungir como una barrera para la dispersión de la especie, quedando algunas poblaciones aisladas. Sin embargo, se requiere de continuar la investigación al respecto.

A pesar del aislamiento geográfico aparente, los resultados indican una alta conectividad genética, como ya se ha mencionado. En el ANP Bosque La Primavera se han registrado cerca de 12 especies endémicas del Occidente de México y tres especies microendémicas; *Populus primaveralepensis* A. Vázquez, Muñiz-Castro & Zuno, *Bletia x tamayoana* S. Rosillo ex R. Soltero (un híbrido natural) y *Lobelia villaregalis*. No se conocen estudios que documenten la diversidad genética ni las barreras para la distribución de estos taxones. Sin embargo, Vázquez-García *et al.* (2019) consideran que *Populus primaveralepensis* se encuentra en peligro crítico de extinción y hacen énfasis en su distribución reducida, confinado a relictos de bosque de galería. Esta condición de aparente preferencia por hábitats específicos se observa también en *L. villaregalis*, lo cual contribuye a su vulnerabilidad. Los individuos de *Lobelia villaregalis* forman cuatro grupos genéticos de acuerdo con el análisis de asignación. Todos los individuos comparten ancestría con los cuatro grupos. Por tanto, puede considerarse como una sola población. Este resultado es congruente con la baja diferenciación genética, y posiblemente este resultado se explica por la reciente fragmentación de las poblaciones, como se menciona anteriormente. En contraste con *L. villaregalis*, en *L. urens*, en donde se muestrearon seis poblaciones, se encontró una alta diferenciación genética ($G_{ST} = 0.265$) a través de isoenzimas (Daniels *et al.* 1997). Los autores sugieren que este aislamiento se debe a procesos actuales de fragmentación y a eventos históricos. En otras especies, como *Agave xylonacantha* Salm-Dyck, se encontró una variación genética promedio baja ($H_S = 0.183$) y baja diferenciación genética ($F_{ST} = 0.059$) entre poblaciones (Eguiarte *et al.* 2013). Se ha planteado que tales resultados se explican por la reciente divergencia de esta especie y que las poblaciones se encuentran geográficamente muy cerca. A su vez, en contraste con *L. villaregalis*, presenta poblaciones muy abundantes en la Sierra Madre Oriental (Eguiarte *et al.* 2013).

Los marcadores moleculares ISSR son una herramienta para evaluar la diversidad genética en *L. villaregalis*, dado que muestran un nivel alto de polimorfismo, permitiendo detectar variación genética entre individuos de la misma especie (Wolf 2005, Keser & Yaprak 2023, Medraoui *et al.* 2023). Se han utilizado para conocer la diversidad y estructura genética de orquídeas y otras especies endémicas amenazadas (Keser & Yaprak 2023, Lal *et al.* 2023). No obstante, el uso de otros marcadores moleculares, como los microsatélites o SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) al ser marcadores codominantes permitiría una mayor precisión en la cuantificación de la diversidad genética.

Este es el primer trabajo que analiza la diversidad genética de una especie en peligro de extinción y endémica de *Lobelia* en México y que además se encuentra en un área natural protegida. El hecho de que la especie se encuentre dentro de un área con decreto oficial de protección parece un escenario optimista dado que representa una mayor probabilidad de que la información derivada de este estudio sea tomada en cuenta para implementar acciones de manejo. Asimismo, nuestros resultados dan pauta para el desarrollo de futuras investigaciones en torno a la conservación de esta especie. Por ejemplo, se requiere documentar: ¿Cuáles son las características demográficas de las poblaciones de *L. villaregalis*?, ¿cuáles son sus mecanismos de dispersión?, ¿cómo es su sistema reproductivo?, ¿qué interacciones mantiene con otras especies?, ¿cuáles son sus polinizadores efectivos? La baja diversidad genética de *L. villaregalis* tiene implicaciones importantes en las estrategias para su conservación y muestra que la protección *in situ* de las cinco poblaciones registradas es urgente. Teniendo en cuenta que la especie alberga niveles de diversidad genética muy bajos y que cada una de sus poblaciones presenta alelos privados, se debe garantizar la conservación de la mayor variación genética posible que existe en cada población. Sin embargo, la máxima prioridad debería darse a las poblaciones Zona Geotérmica (ZG) y Espinazo (ESP) por presentar el mayor número de alelos únicos y a Villa Panamericana (VP) por estar sujeta a mayor presión derivada de las actividades humanas (Hernández-López & Munguía-Lino 2023). Además de la protección del hábitat, es indispensable el monitoreo de las poblaciones para detectar oportunamente eventos que podrían impactarlas de manera negativa, tales como incendios forestales o cambios de uso del suelo, los cuales se han incrementado en los últimos años. Relacionado con la conservación *in situ* y el moni-

toreo, se ha propuesto que las poblaciones de *L. villaregalis* sean designadas como sitios de exclusión (Hernández-López & Munguía-Lino 2023), especialmente al implementar el Programa de manejo del fuego que se ha propuesto en el ANP (Jardel-Peláez 2020). Así mismo, se requiere promover la conservación *ex situ* mediante su propagación y analizar la factibilidad de que sus semillas u otros propágulos puedan resguardarse en bancos de germoplasma. Por otra parte, es fundamental difundir la información disponible sobre *L. villaregalis* entre los propietarios de los predios donde la planta crece, también entre los administradores del área natural protegida y a la sociedad en general con el fin de promover el conocimiento sobre la especie y fomentar las medidas para la conservación de su hábitat.

Se documenta por primera vez la diversidad y estructura genética de una especie microendémica del género *Lobelia* y que se encuentra en un ANP. Se encontró que la diversidad genética de *L. villaregalis* es baja con respecto de otras especies endémicas en riesgo de extinción. Así mismo, las cinco poblaciones estudiadas no presentan estructura genética, por lo que puede considerarse como una sola población. Sin embargo, desde la perspectiva del manejo y conservación de biodiversidad, la protección *in situ* de todas las poblaciones es importante, dando máxima prioridad a tres de ellas. La conservación *ex situ*, entre otras estrategias complementarias se abordan en el trabajo.

Agradecimientos

Héctor Mariscal, Felipe Viera, Guadalupe Munguía, Marco Anguiano, Karen Rostro, Carolina Báez, Jesús Moreno y Daniel Ruiz colaboraron en el trabajo de campo para la recolecta de tejido foliar. Agradecemos a Guadalupe Munguía de la Unidad de Biogeografía de LANIVEG, por la elaboración del mapa y a Jesús Moreno por facilitarnos una de sus fotografías. El OPD Bosque La Primavera proporcionó apoyo logístico para acceder a algunos sitios en el ANP. Reconocemos las aportaciones de las editoras y de dos revisores anónimos las cuales enriquecieron el manuscrito.

Literatura citada

- Arft AM, Ranker TA. 1998. Allopolyploid origin and population genetics of the rare orchid *Spiranthes diluvialis*. *American Journal of Botany* **85**: 110-122. DOI: <https://doi.org/10.2307/2446560>
- Ávila-Díaz I, Oyama K. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **94**: 184-193. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.94.2.184>
- Ayers TJ. 1987. Four species from western Mexico new to *Lobelia* (Campanulaceae: Lobelioideae). *Brittonia* **39**: 417-422. DOI: <https://doi.org/10.2307/2807317>
- Cole CT. 2003. Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**: 213-237. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.030102.151717>
- CONANP [Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas]. 2000. Programa de Manejo Área de Protección de Flora y Fauna La Primavera. DF: México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).
- Castellanos-Hernández OA, Lepiz-Ildelfonso R, Castellanos-Enríquez GE, Rodríguez-Sahagún A, Torres-Morán MI. 2017. Relaciones genéticas basadas en marcadores ISTR entre formas silvestres, cultivadas en Jalisco, México. *Acta Botanica Mexicana* **118**: 53-63. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm118.2017.1200>
- Daniels RE, AF Raybould, Farkas JM. 1997. Conserving genetic variation in British populations of *Lobelia urens*. *Biological Conservation* **79**: 15-22. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(96\)00115-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(96)00115-2)
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.
- Eguarte LE, Aguirre-Planter E, Aguirre X, Colín R, González A, Rocha M, Scheinvar E, Trejo L, Souza V. 2013. From isozymes to genomics: Population genetics and conservation of *Agave* in México. *Botanical Review* **79**: 483-506.
- Ellstrand NC, Elam DR. 1993. Population genetic consequences of small population size, implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **24**: 217-242. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.001245>

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. **10**: 564-567. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>
- Frankham R. 2003. Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies* **326**: S22-S29. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1631-0691\(03\)00023-4](https://doi.org/10.1016/s1631-0691(03)00023-4)
- Geleta M, Bryngelsson T. 2009. Inter simple sequence repeat (ISSR) based analysis of genetic diversity of *Lobelia rhy-chopetalum* (Campanulaceae). *Hereditas* **146**: 122-130. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2009.02111.x>
- Gutiérrez-Sánchez RI, Castro-Castro A, González-Gallegos JG, López-Enríquez IL, Frías-Castro A. 2018. Synopsis of the spurred species of *Lobelia* section *Stenotium* (Campanulaceae) in Sierra Madre Occidental, Mexico, and the description of two new species. *Phytotaxa* **338**: 33-48. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.338.1.3>
- Hamrick JL, Godt MJW. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise JC, Hamrick JL, eds. *Conservation Genetics Case Histories from Nature*. New York: Chapman and Hall, pp. 281-304. ISBN: 978-0412055812
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 9.
- Hernández-López L, Munguía-Lino G. 2023. Distribución, estado de conservación y amenazas de *Lobelia villaregalis* (Campanulaceae) en el Bosque La Primavera, Jalisco. *Botanical Sciences* **101**: 725-743. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.3274>
- Huang H. 2011. Plant diversity and conservation in China: planning a strategic bioresource for a sustainable future. *Botanical Journal of the Linnean Society* **166**: 282-300. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01157.x>
- Huang Y, Zhang CQ, Li DZ. 2009. Low genetic diversity and high genetic differentiation in the critically endangered *Omphalogramma souliei* (Primulaceae): implications for its conservation. *Journal of Systematics and Evolution* **47**: 103-109. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2009.00008.x>
- Huenneke LF. 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. In: Falk DA, Holsinger KE, eds. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford: University Press, pp. 31-44. ISBN: 978-0195064292
- Huerta-Martínez FM, Ibarra-Montoya JL. 2014. Incendios en el Bosque La Primavera (Jalisco, México): un acercamiento a sus posibles causas y consecuencias. *CienciaUAT* **9**: 23-32.
- Hughes WP, Jaworski AF, Davis CS, Aitken SM, Simons AM. 2014. Development of polymorphic microsatellite markers for Indian tobacco, *Lobelia inflata* (Campanulaceae). *Applications in Plant Sciences* **2**: 1300096. DOI: <https://doi.org/10.3732/apps.1300096>
- Jardel-Peláez EJ. 2020. Programa de Manejo del Fuego del Bosque La Primavera. Centro Universitario de la Costa Sur, Universidad de Guadalajara. https://bosquelaprimavera.com/wp-content/uploads/Programa-de-Manejo-del-Fuego-Bosque-La-Primavera_2022.pdf (accessed June 26, 2024).
- JICA [Japan International Cooperation Agency]. 1986. La Primavera Geothermal Development Project in United Mexican States. Interim report. https://openjicareport.jica.go.jp/pdf/10299386_01.pdf (accessed November 1, 2023)
- Kagame SP, Gichira AW, Chen LY, Wang QF. 2021. Systematics of Lobelioideae (Campanulaceae): review, phylogenetic and biogeographic analyses. *PhytoKeys* **174**: 13-45. DOI: <https://doi.org/10.3897/phytokeys.174.59555>
- Keser AM, Yaprak AE. 2023. The assessment of genetic diversity and population structure of *Verbascum gypsicola* by ISSR markers for conservation purposes. *Nordic Journal of Botany* **2023**: e03660. DOI: <https://doi.org/10.1111/njb.03660>
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. 2015. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* **15**: 1179-1191. DOI: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>

- Lal A, Pant M, Pant G, Palni LMS, Kumar A, Kumar G. 2023. ISSR marker assisted genetic diversity assessment in natural populations of two endemic orchids *Aerides multiflora* and *Rhynchosstylis retusa* from Uttarakhand, India. *South African Journal of Botany* **157**: 151-158. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.03.031>
- Lagomarsino LP, Antonelli A, Muchhala N, Timmermann A, Mathews S, Davis CC. 2014. Phylogeny, classification, and fruit evolution of the species-rich Neotropical bellflowers (Campanulaceae: Lobelioideae). *American Journal of Botany* **101**: 2097-2112. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.1400339>
- Lammers TG. 2007. Campanulaceae. In: Kadereit JW, Jeffrey C, eds. *Flowering Plants Eudicots. The Families and Genera of Vascular Plants. Vol 8*. Heidelberg: Springer, pp. 26-56. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-31051-8_5
- Lewontin RC. 1972. The apportionment of human diversity. In: Dobzhansky T, Hecht MK, Steere WC, eds. *Evolutionary Biology*. New York NY: Springer, pp. 381-398. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9063-3_14
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* **89**: 238-247. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/89.3.238>
- Lynch M, Milligan BG. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**: 91-99. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1994.tb00109.x>
- Maciel-Flores R, Rosas-Elguera J. 1992. Modelo geológico y evaluación del campo geotérmico La Primavera, Jal., México. *Geofísica Internacional* **31**: 359-370. DOI: <https://doi.org/10.22201/igeof.00167169p.1992.31.4.1352>
- Marlow SP, Stoller JK. 2003. Smoking cessation. *Respiratory Care* **48**: 1238-1254.
- Mastretta-Yanes A, Moreno-Letelier A, Piñero D, Jorgensen TH, Emerson BC. 2015. Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of geology, geography and climate within the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Journal of Biogeography* **42**: 1586-1600. DOI: <https://doi.org/10.1111/jbi.12546>
- Medraoui L, Rabeh K, Ater M, Filali-Maltouf A. 2023. Genetic diversity analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) landraces from northwestern Morocco using ISSR and AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **71**: 1-16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-023-01665-x>
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca, GA, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853-858. DOI: <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nagaoka T, Ogihara Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **94**: 597-602. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220050456>
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* **106**: 283-292.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. USA: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **70**: 3321-3323 DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, NY: Columbia University Press.
- Neel C, Che-Castaldo JP. 2013. Predicting recovery criteria for threatened and endangered plant species on the basis of past abundances and biological traits. *Conservation Biology* **27**: 385-397. <https://www.jstor.org/stable/23525264>
- Neugebauer NM, Harrod SB, Stairs DJ, Crooks PA, Dvoskin LP, Bardo MT. 2007. Lobeline decreases methamphetamine self-administration in rats. *European Journal of Pharmacology* **571**: 33-38. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.003>
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* **13**: 1143-1155. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x>
- Orme CDL, Davies RG, Burgess M, Eigenbrod F, Pickup N, Olson VA, Webster AJ, Ding, TS, Rasmussen PC, Ridgely RS, Stattersfield AJ, Bennett PM, Blackburn TM, Gaston KJ, Owens IPF. 2005. Global hotspots of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature* **436**: 1016-1019. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature03850>
- Peakall R, Smouse PE. 2012. GenAlex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics* **28**: 2537e2539. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pérez-Pérez MA, Ayers TJ, Amith JD. 2022. A new species of *Lobelia* Campanulaceae: Lobelioideae) from the Sierra Madre Oriental, Mexico. *Phytotaxa* **568**: 1-7. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.568.1.1>

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Rosenberg NA. 2003. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**: 137-138. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.14718286.2003.00566.x>
- Rzedowski J. 2019. Inventario actualizado de las especies mexicanas de la familia Campanulaceae. *Botanical Sciences* **97**: 110-127. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.2085>
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual, 3ra ed.* New York: Cold Spring Harbor. ISBN: 0879695773
- Sanguinetti CF, Diaz N, Simpson AJ. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on acrylamide gels. *Biotechniques* **17**: 915-921. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.201400182>
- Stead LF, Hughes JR. 2012. Lobeline for smoking cessation. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2**: CD000124. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000124.pub2>
- Tran CT, Wiczorek AM, Morden CW. 2015. Genetic structure and diversity of rare hawaiian endemic, *Lobelia villosa* (Campanulaceae: Lobelioideae). *Pacific Science* **69**: 355-366. DOI: <https://doi.org/10.2984/69.3.5>
- Vázquez-García A, Muñiz-Castro MA, Martínez-González RE, Nieves-Hernández G, Pulido-Ávila MG, Hernández-Vera G, Zuno-Delgadillo O. 2019. *Populus primaveralepis* sp. nov. (Salicaceae, Malpighiales), a new species of white poplar from the Bosque La Primavera Biosphere Reserve in western Mexico. *European Journal of Taxonomy* **498**. DOI: <https://doi.org/10.5852/ejt.2019.498>
- Villa-Galaviz E, Hernández-López L, Harker M, Neri-Luna C. 2020. Descripción de aspectos del suelo y composición florística del hábitat de *Lobelia villaregalis* (Campanulaceae), especie endémica de Jalisco, México. *Polibotánica* **49**: 30-49. DOI: <https://doi.org/10.18387/polibotanica.49.3>
- Wiens JJ, Donoghue MJ. 2004. Historical biogeography, ecology and species richness. *Trends in Ecology and Evolution* **19**: 639-644. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.09.011>
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176-183. DOI: <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>

Editor de sección: Xitlali Aguirre Dugua

Contribución de los autores: LHL concibió el proyecto, realizó trabajo de campo, financió el trabajo de un técnico de laboratorio, redactó el manuscrito. PZT asesoró en el trabajo de laboratorio, realizó análisis de datos, colaboró en la redacción. JPA realizó análisis de datos y redactó el manuscrito. DFG participó en el trabajo de campo, realizó el trabajo de laboratorio, colaboró en la redacción. AAG asesoró en el trabajo de laboratorio, colaboró en la redacción. Todos los autores revisaron e hicieron aportaciones hasta lograr la versión final del manuscrito.

Entidades Financiadoras: El CUCBA-Universidad de Guadalajara otorgó recursos a la primera autora para la adquisición de algunos reactivos y material de laboratorio mediante el proyecto P3E 2021-2022.

Conflictos de interés: Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses, económicos o personales, en la información, presentación de datos y resultados de este artículo.

Apéndice 1. Secuencia de los iniciadores ISSR, temperatura de alineación, número y rango del tamaño de las bandas generadas por iniciador en el estudio de *Lobelia villaregalis*.

Iniciador	Secuencia	Tm °C¹	Núm. bandas	Peso molecular²
7	(CT) ₈ RG	52	35	160-990
843	(CT) ₈ RA	52	40	260-990
844	(CT) ₈ RC	56.2	45	150-1,000

¹Tm= Temperatura de alineación, ² tamaño en pares de bases (bp).