



MARCADORES MOLECULARES ISSR PARA IDENTIFICACIÓN DE HIJUELOS DE AGAVES

ISSR MOLECULAR MARKERS FOR IDENTIFICATION OF AGAVE SPROUTS

Karla L. Vega-Ramos¹, Marco A. Gutierrez-Coronado^{1*}
y Juan F. Gómez-Leyva²

¹Instituto Tecnológico de Sonora, Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Ciudad Obregón, Sonora, México. ²Instituto Tecnológico de Tlajomulco, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Tlajomulco, Jalisco, México.

*Autor de correspondencia (mgutierrez@itson.edu.mx)

RESUMEN

México cuenta con una gran diversidad de especies de *Agave*, lo que ha permitido el aprovechamiento de sus azúcares fermentables para la elaboración de bebidas alcohólicas como el tequila y el mezcal. Ambos productos están protegidos con una denominación de origen, pero elaborados a partir de agaves distintos. Cuando el mezcal puede elaborarse a partir de más de 14 especies de *Agave*, el tequila sólo se produce a partir del *Agave tequilana* Weber cv azul. En años recientes, se han incorporado nuevos productores de mezcal que no cuentan con la habilidad en la identificación de material para propagar, siendo la caracterización morfológica de los hijuelos una alternativa, lo cual resulta una tarea demandante y en ocasiones poco precisa, debido a la falta de experiencia. Con la finalidad de contar con una herramienta rápida y confiable en la identificación de especies de *Agave*, se evaluaron marcadores ISSR (Inter Secuencias Simples Repetidas) para detectar polimorfismos entre especies de *Agave tequilana*, *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. karwinskii*, estos tres últimos utilizados en la producción de mezcal. Empleando hijuelos de cada especie, se evaluaron seis iniciadores ISSR, presentando un patrón de amplificación diferencial y consistente. A partir de nueve parámetros morfológicos se determinó por medio de análisis de componentes principales (ACP) que los primeros tres componentes representan el 70 % de la variación, con lo que se logra identificar las especies de agaves evaluadas, lo que coincide en el agrupamiento de éstas con el obtenido a partir de los marcadores ISSR. Se considera que los seis iniciadores evaluados son una herramienta rápida y efectiva para la diferenciación genética entre las especies y que puede apoyar a las organizaciones regulatorias al cumplimiento de las normativas para asegurar la calidad del mezcal y el tequila, así mismo a las grandes destilerías o palenques que tienen la necesidad de comprar a terceros su materia prima.

Palabras clave: ISSR, mezcal, polimorfismo, tequila.

SUMMARY

Mexico has a great diversity of *Agave* species, which has allowed the use of its fermentable sugars for production of alcoholic beverages such as tequila and mezcal. Both products are protected with a designation of origin but made from different agaves. While mezcal can be made from more than 14 species of *Agave*, tequila is only produced from *Agave tequilana* Weber cv azul. In recent years, new mezcal producers have been incorporated that do not have the ability to identify material to propagate, being the morphological characterization of the suckers an alternative, which is a demanding and sometimes inaccurate task, due to the lack of experience. In order to have

a fast and reliable tool for the identification of *Agave* species, ISSR markers (Inter Simple Sequence Repeats) were evaluated to detect polymorphisms between species of *Agave tequilana*, *A. angustifolia*, *A. potatorum* and *A. karwinskii*, the last three used in the production of mezcal. Using suckers of each species, six ISSR primers were evaluated, presenting a differential and consistent amplification pattern. Using nine morphological parameters, it was determined by principal component analysis (PCA) that the first three components represent 70 % of the variation, with which it is possible to identify the evaluated agave species, which coincides in the grouping of these, with that obtained from the ISSR markers. The six primers evaluated are considered to be a fast and effective tool for genetic differentiation between species and that they can support regulatory organizations in complying with regulations to ensure the quality of mezcal and tequila, as well as large distilleries or palenques that have the need to buy their raw material from third parties.

Index words: ISSR, mezcal, polymorphism, tequila.

INTRODUCCIÓN

México es reconocido como centro de origen del género *Agave*, el uso de este género va desde la obtención de fibras, alimento, forraje y principalmente la producción de bebidas alcohólicas (Ortega *et al.*, 2000). Esta última actividad representa un importante porcentaje del producto interno bruto de México y de ingresos para la población dedicada a las actividades relacionadas con el cultivo, desde la plantación hasta la cosecha, comercialización e industrialización de *Agave*.

El tequila y el mezcal poseen una denominación de origen y son reguladas bajo las Normas Oficiales Mexicanas NOM-006-SCFI-2012 (SE, 2012) y NOM-070-SCFI-2016 (SE, 2017), respectivamente, donde se establece que el tequila se elabora sólo a partir de piñas de *Agave tequilana* Weber cv azul, a diferencia del mezcal, el cual puede ser elaborado de 14 especies, siempre y cuando éstas no sean utilizadas para la elaboración de otras bebidas con denominación de origen del mismo estado, y en cumplimiento a la normativa

en vigor. El *Agave angustifolia* es la especie más utilizada en la producción de mezcal, y con mayor avance en su paquete tecnológico, a diferencia de las otras especies que son en su mayoría silvestres, cultivadas o semicultivadas (Carrillo, 2007).

La propagación de los principales Agaves utilizados en la producción del tequila y el mezcal es mediante la reproducción asexual a través del rizoma (hijuelos), que en teoría permiten obtener clones fenotípica y genéticamente idénticos a la planta madre (Torres-Morán *et al.*, 2006), tal es el caso de *A. tequilana* y *A. angustifolia*. La edad óptima de un agave para reproducirse es entre tres y cinco años, y puede dar origen anualmente a entre uno y dos hijuelos. Dependiendo de la especie, algunas se propagan solamente por semillas, tal es el caso de *A. karwinskii* y *A. potatorum* que se propagan de manera sexual, vía que resulta más compleja ya que los agricultores cortan la inflorescencia al inicio de su desarrollo para promover la acumulación de azúcares en el tallo, evitando su reproducción y disminuyendo las poblaciones silvestres (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013; Pérez-Negrón y Casas, 2007).

Ante el surgimiento de nuevos productores de tequila y mezcal, se ha generado la necesidad de contar cada vez con mayor superficie establecida del cultivo de *Agave*, actualmente existen más de 144 mil hectáreas de *A. tequilana* Weber cv azul utilizadas para la producción de tequila (CRT, 2017) y más de 20 mil hectáreas registradas ante el consejo regulador del mezcal (CRM, 2019), generando con esto la necesidad de contar con material propagativo sano, vigoroso y correctamente identificado de acuerdo con la especie de interés.

La identificación de especies de *Agave* fundamentada en medidas anatómicas no es una labor sencilla (Verduzco-Martínez *et al.*, 2009) y en las piñas cosechadas que llegan a las destilerías resulta imposible, ya que pierden todos sus descriptores varietales. Los marcadores moleculares han resultado ser una herramienta útil en la caracterización de especies de *Agave* (Gil-Vega *et al.*, 2006; Rodríguez-Garay *et al.*, 2009) es una alternativa rápida y de fácil acceso en especies de difícil identificación (Davis, 1996).

Los trabajos de variabilidad genética en *Agave* han sido apoyados por el uso de marcadores moleculares, los cuales se han consolidado como una herramienta confiable, que ha permitido un desarrollo exponencial en el conocimiento de las bases genéticas de diversas respuestas y procesos presentes en los organismos (Astorga, 2008). Entre las técnicas más utilizadas se encuentran los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random

Amplified Polimorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats); estos últimos utilizados en trabajos de relaciones genéticas de *Agave cocui* y otras especies del mismo género, así como en la determinación de la variabilidad genética entre individuos de las especies *A. cocui* Trel. *A. angustifolia* Haw. y *A. tequilana* (Dávila, 2007). Los marcadores ISSR se utilizan por su rápida implementación y por su bajo costo al establecer diversidad genética (Awasthi *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2003; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2005). La interpretación de este tipo de marcadores se realiza con la lectura de geles, donde las amplificaciones repetitivas idénticas con secuencias de anclaje diferentes que proporcionan patrones y son analizados como marcadores dominantes, lo que significa que son bialélicos con bandas presentes o ausentes, las cuales se registran como los dos alelos de un locus (Wolfe y Liston, 1998).

En las plantas de *Agave*, pertenecientes a la familia *Asparagaceae*, se han utilizado diferentes tipos de marcadores moleculares como los RAPDs (Gil *et al.*, 2001; Rodríguez-Garay *et al.* 2009) en la caracterización de *A. tequilana*, los AFLPs en estudios de variabilidad de *A. fourcroydes* (Infante *et al.*, 2003), en diferentes variedades de *A. tequilana* (Gil *et al.* 2001), así como también los espaciadores inter-secuencias (ITS) de los genes ribosomales nucleares usados por Bogler y Simpson (1996) para estudios filogenéticos en la subfamilia. Las ventajas que ofrece la técnica de ISSR sobre otros marcadores son principalmente sobre la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad debida a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR; asimismo, no son necesarias altas concentraciones de ADN y no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio (Reddy *et al.*, 2002).

El objetivo del presente estudio fue comparar la caracterización morfológica de hijuelos y el empleo de marcadores moleculares ISSR en la diferenciación de *A. angustifolia*, *A. karwinskii*, *A. potatorum* y *A. tequilana*, especies utilizadas en la producción de tequila y mezcal, con la finalidad de contar con una herramienta precisa, accesible y rápida en la identificación de especies de *Agave*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

Se colectaron cinco plantas por cada especie de *Agave* bajo estudio; las plantas de *Agave karwinskii* (Cuixe) y *A. potatorum* (Tobalá) tuvieron su origen en la zona de Miahuatlán, Oaxaca, provenientes de la germinación de semillas en vivero por un periodo de 9 a 12 meses, el *A. angustifolia* (Espadín) provino de hijuelos de un calibre de piña de 5 cm del mismo municipio, mientras que los

hijuelos de *A. tequilana* "0" (5 cm de diámetro de piña) fueron colectados en el municipio de Tequila, Jalisco, dentro del área de la denominación de origen (DOT) (Figura 1).

Evaluación morfológica

Se evaluaron nueve caracteres cuantitativos de cada planta: longitud de planta en cm, diámetro de piña en cm, en la hoja se midió el ancho y la longitud en cm; en la espina apical la longitud en mm, distancia entre espina apical y lateral en mm, largo y ancho de espina lateral en mm y el número de espinas en 10 cm (Figura 2). Se realizó análisis multivariado de componentes principales de los datos obtenidos mediante el programa estadístico Infostat versión V2.0. 2020.

Caracterización molecular

La extracción de ADN se realizó con el método de CTAB (Bromuro de cetil trimetil amonio) (Wagner *et al.*, 1987).

Se realizó el corte de dos trozos de 1 cm² de la hoja más joven, lavada en una solución de cloro comercial 6 %. Se mezclaron 50 mg de tejido vegetal previamente pulverizado con nitrógeno líquido con 700 µL de CTAB 4 % (NaCl 1.4 M, β-mercaptoetanol 0.2 %, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM). La mezcla se agitó suavemente por inversión y se incubó por 60 min agitando cada 15 min; luego, la muestra se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron 700 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min; cuidadosamente se extrajo la fase acuosa y se depositó en un nuevo tubo. Se adicionaron 500 µL de isopropanol frío al tubo y se mezcló suavemente, incubándose a -20 °C por 30 min; se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min y se retiró el sobrenadante; se realizaron dos lavados con 500 µL de etanol 70 % centrifugando entre cada uno de ellos a 14,000 rpm por 5 min; finalmente, el pellet obtenido se dejó secar y se suspendió con una solución de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0. Se verificó la pureza mediante la relación de absorbancia A260/A280, así como la integridad de éste a través de la visualización en geles de agarosa 1.2 %.

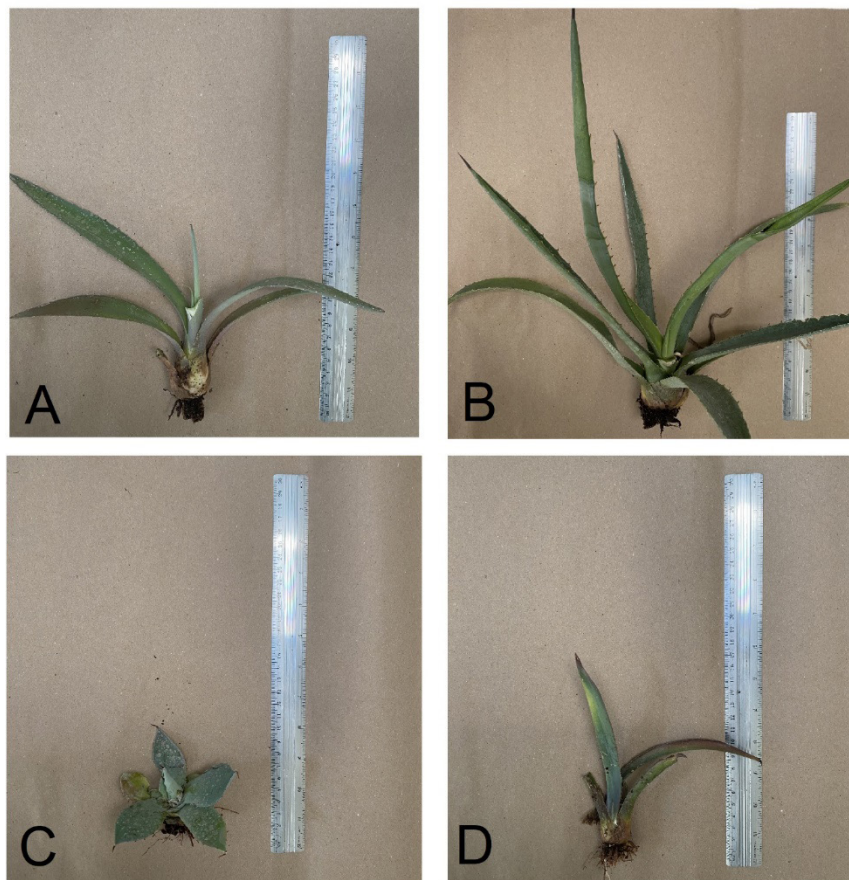


Figura 1. Especies de *Agave* utilizadas en el estudio. A) *A. angustifolia*, B) *A. karwinskii*, C) *A. potatorum*, D) *A. tequilana*.

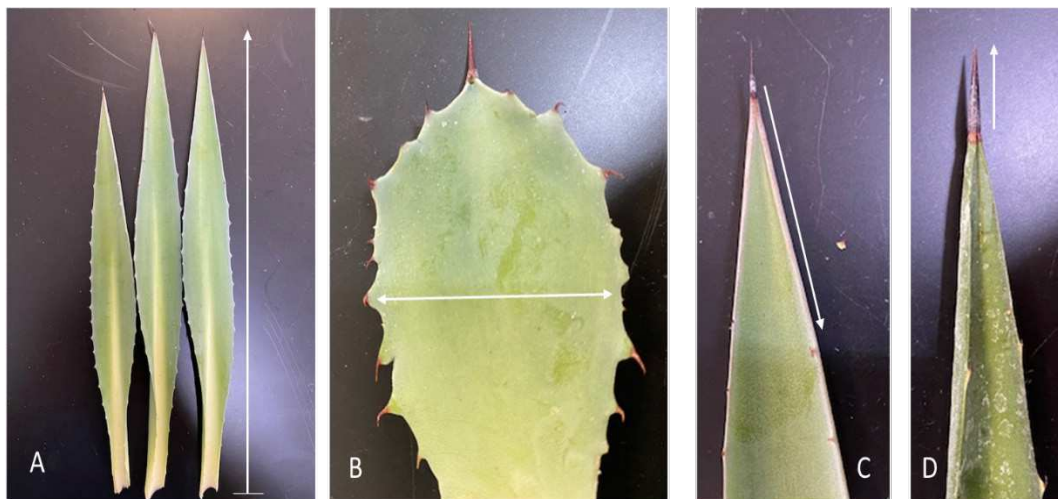


Figura 2. Descripción de algunos caracteres evaluados: A) longitud de hoja de *A. angustifolia*, B) ancho de hoja de *A. potatorum*, C) distancia entre la espina apical y lateral en *A. angustifolia*, D) longitud de espina apical de *A. karwinskii*.

Se evaluó un total de seis iniciadores ISSR (Cuadro 1) bajo las siguientes condiciones: para una reacción de 12.5 μ L se agregó $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, 0.5 U de Taq ADN polimerasa y 10 pmol de iniciador ISSR. La amplificación se realizó en un termociclador empleando 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 38 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, y una extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa 1.2 % teñidos con gelred (Biotium) a una concentración de 1X en una solución buffer TBE 1X (108 g Tris base, 55 g ácido bórico, 40 mL EDTA 0.5 M, pH 8.0).

Los productos de PCR con los diferentes iniciadores fueron leídos directamente de los geles tomando en cuenta bandas de entre 200 y 1200 pb medido con marcador de 1 kb (Invitrogen) y los patrones de bandeo ISSR fueron convertidos a código binario de 1 y 0 para presencia y ausencia, respectivamente. Los datos binarios fueron utilizados para generar una matriz de similitud usando el índice de Jaccard y se construyó un dendrograma a partir de la matriz empleando el método UPGMA (Método de grupos de pares no ponderados con media aritmética), así como un análisis de componentes principales para las variables morfológicas empleando el programa INFOSTAT V2.0.2020.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación morfológica

Los parámetros morfológicos evaluados presentaron una diferenciación a través de análisis de componentes principales (CP) de los hijuelos de *A. angustifolia*, *A. karwinskii*, *A. potatorum* y *A. tequilana*, coincidiendo con

la delimitación de especies desarrollada por Gentry (1982). Se observa que las plantas son separadas en cuatro grupos, de acuerdo con la variación morfológica, mostrando que es posible a través del análisis de CP diferenciar a *A. tequilana* de *A. angustifolia*, tal como lo reportaron Rodríguez-Garay et al., (2009) en estudios previos sobre caracterización morfológica de ambas especies.

El análisis de componentes principales (CP) explicó un 70 % de variación acumulada entre los componentes CP1 y CP2, valor cercano a lo reportado por Castañeda-Nava et al. (2019), en el cual el amplio porcentaje de variación permitió distinguir entre dos subespecies y dos variedades de *A. salmiana*. Las variables de mayor relevancia para CP1 fueron la longitud de la planta, número de hojas y longitud de espina apical, lo que coincide con el trabajo de Mora-López et al. (2011) (Figura 3). En el CP2 la variable de mayor influencia fue el número de espinas en 10 cm y el ancho de hoja, caracteres referidos como adecuados en la identificación de las especies *A. angustifolia*, *A. tequilana* y *A. salmianae* (Alfaro et al., 2007; Rodríguez-Garay et al., 2009), cabe señalar que los trabajos previos mencionados, han sido desarrollados en plantas adultas y no en hijuelos, indicando con esto la factibilidad de utilizar parámetros varietales para caracterización de especies desde edades tempranas o a lo largo de su ciclo de vida.

Caracterización molecular

La pureza y calidad del ADN obtenido fue fundamental para tener una buena resolución de los marcadores ISSR. Con el método utilizado en este estudio se obtuvo una buena integridad del ADN, sin la presencia de contaminantes como carbohidratos o ARN. La pureza se

Cuadro 1. Iniciadores ISSR utilizados en identificación de especies de *Agave*.

Iniciador	Secuencia	Productos Amplificados	Tm °C	Número de loci polimórficos
(GA) ₈ YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	23	48.0	17
G(AG) ₇ AC	GAG AGA GAG AGA GAG AC	16	49.0	10
(GA) ₈ C	GAG AGA GAG AGA GAG AC	17	47.5	14
(GA) ₈ YG	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	19	49.5	14
C(AG) ₇ AG	CAC ACA CAC ACA CAC AG	15	48.0	12
DDB(CCA) ₅	DDB CCA CCA CCA CCACCA	14	49.5	6

Tm: temperatura de alineamiento, R: G o A, Y: C o T.

obtuvo en el intervalo de 1.8 a 2.0 en la relación de longitud de onda 260/280 nm, presentando una calidad aceptable.

Con base en el patrón de amplificación obtenido en *Agave tequilana*, se seleccionaron los seis iniciadores que presentan mayor eficiencia en la determinación de variabilidad genética entre especies. Es importante resaltar que a pesar de que existe similitud en las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, la temperatura de alineamiento fue fundamental en la expresión del polimorfismo de las diferentes especies (Cuadro 1).

Los seis oligonucleótidos evaluados detectaron en total de 104 loci, el número de loci polimórficos fue de 73, lo que representa un porcentaje de 70 %. Los productos de amplificación mostraron un tamaño de entre 200 y 2000 pb, lo que coincide con estudios previos realizados en *A. tequilana* (Ángeles-Espino *et al.*, 2020) (Figura 4). Koskinen *et al.* (2004) y Nybom (2004) mencionaron que es posible observar diferencias entre individuos a nivel de nucleótidos, de acuerdo con el número de bandas amplificadas, entre mayor sea el número, mayor será la confiabilidad de los resultados.

Se sugiere utilizar varios marcadores de manera simultánea en estudios de variabilidad genética con el fin de establecer ventajas entre otros métodos como AFLPs o ratificar los resultados obtenidos con diferentes tipos de marcadores; por lo general, de tipo dominante como los RAPD e ISSR (Awasthi *et al.*, 2004; Bruneau *et al.*, 2005; Ducarme y Wesselingh, 2005); sin embargo, en el presente estudio el uso de sólo seis iniciadores fue suficiente para la diferenciación de las especies de *Agave* estudiadas.

Los datos obtenidos de los geles de agarosa fueron utilizados para la construcción de la matriz binaria, para obtener una matriz con el coeficiente de similitud de Jaccard, y un agrupamiento mediante el método UPGMA (Figura 5).

De manera general, es posible diferenciar los grupos de cada una de las cuatro especies incluidas en el estudio: *A. tequilana* (T1-5), *A. karwinskii* (K1-5), *A. angustifolia* (E1-5) y *A. potatorum* (P1-5) y el agrupamiento de cada una de ellas; ésto coincide con estudios de Dos Santos *et al.* (2015), donde los marcadores ISSR fueron efectivos en la separación de genotipos estudiados de *A. sisalana*, contribuyendo al conocimiento biológico de la especie en apoyo a su conservación.

Además de generarse una separación de las especies, se observa la formación de dos grupos G1 y G2, el primero compuesto por *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. tequilana* (Figura 5). Estudios realizados para determinar la variación de especies de *Agave* a través de caracteres morfológicos sugieren a *A. angustifolia* como antecesor de *A. tequilana* (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996), por lo cual se esperaba identificar esta relación en el dedrograma de la Figura 5; sin embargo, se observa un subgrupo (SB1) donde se aprecia que la relación genética es mayor entre las especies de *A. karwinskii* y *A. tequilana*, y no entre *A. angustifolia* y *A. tequilana*; este comportamiento coincide con lo reportado por Dávila *et al.* (2007), donde mostraron que existe una relación genética más estrecha entre *A. angustifolia* y *A. cocui* que con *A. tequilana*, explicada como un proceso de derivación genética por el uso extensivo del cultivo.

El G2 separó las plantas *A. potatorum*, y las señaló como las menos relacionadas con las otras especies evaluadas; este comportamiento podría estar explicado por el hecho de tratarse de una especie propagada por semilla. La mayor similitud se presentó en las plantas de *A. tequilana*, comportamiento que ha sido mencionado con anterioridad en el estudio de Gil *et al.* (2001).

Los oligonucleótidos (CA)_n usados en este estudio han sido empleados anteriormente en las amplificaciones de ISSR. Este tipo de marcadores, al ser multilocus dominantes, requiere un número bajo de iniciadores para proporcionar información relevante en el estudio del

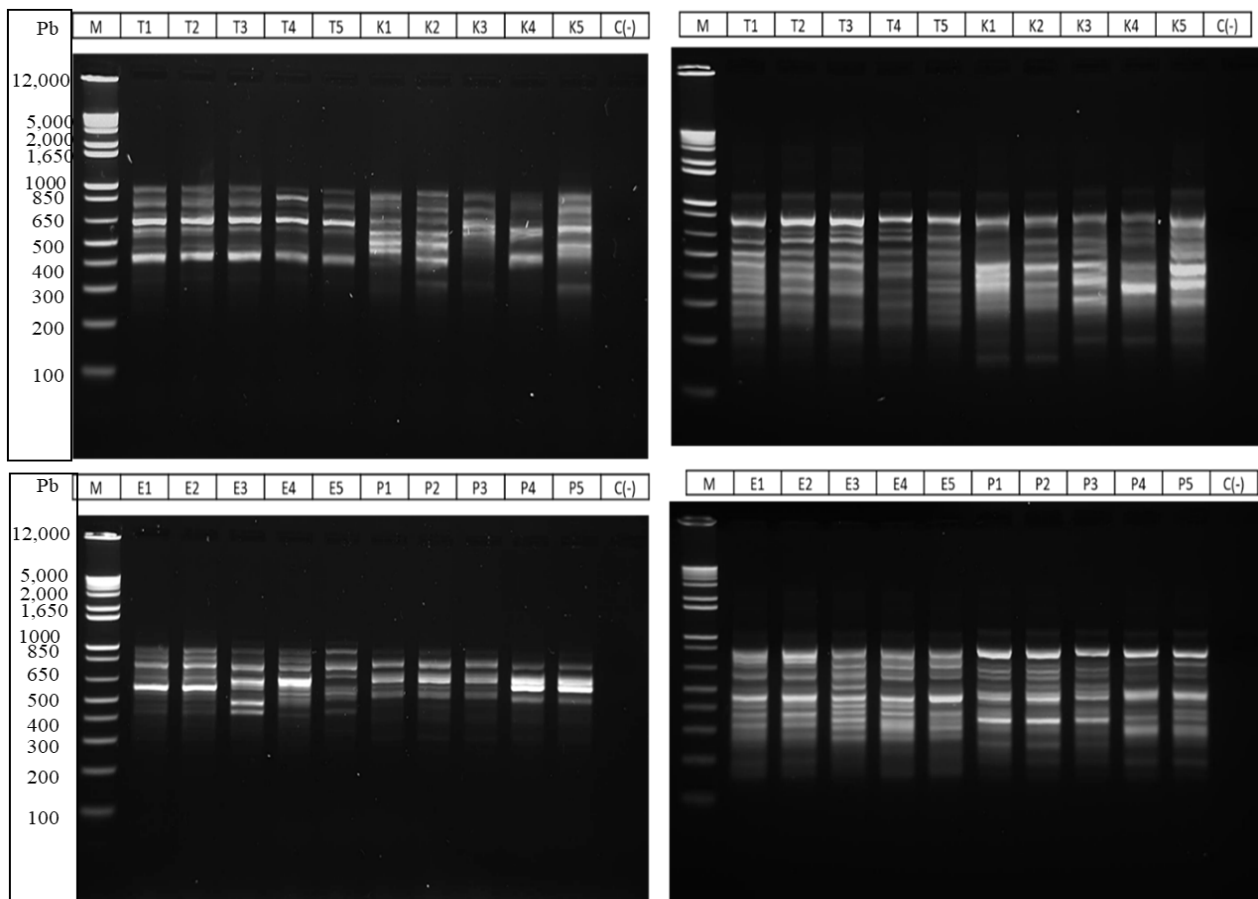
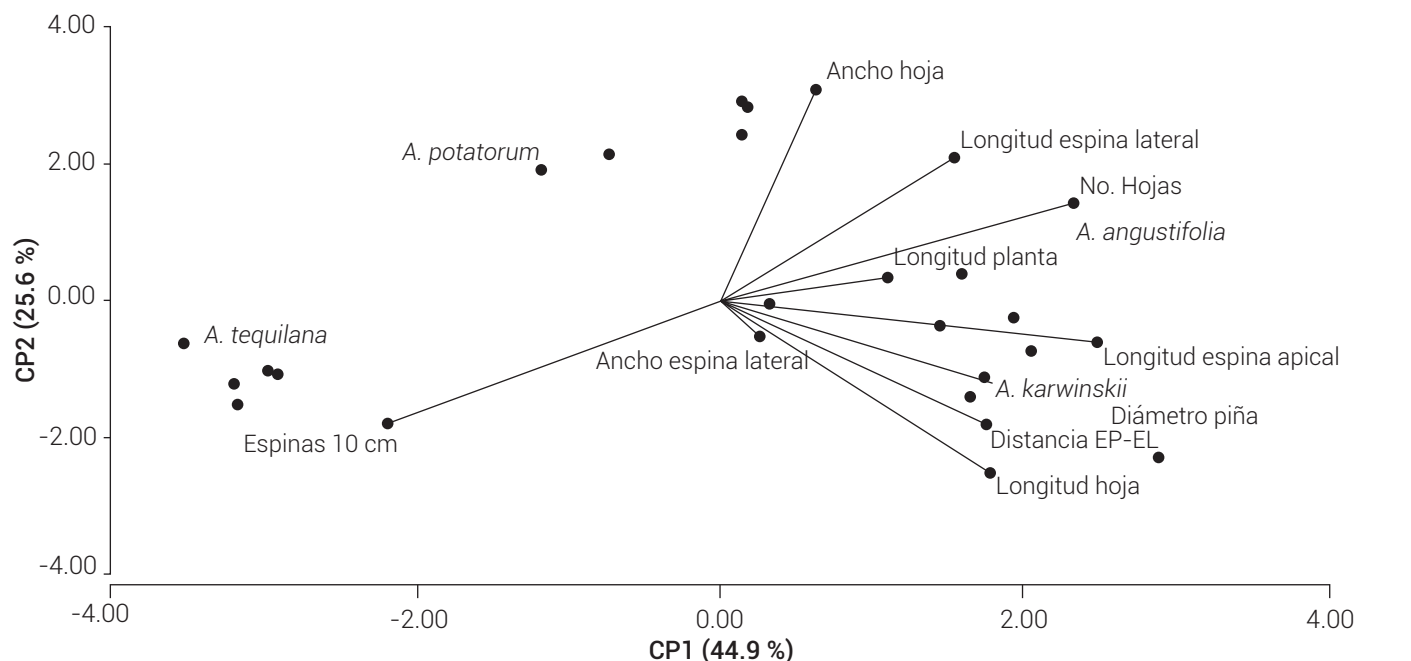


Figura 4. Amplificación ISSR en cuatro especies de *Agave* empleando el iniciador $(GA)_8YC$ (superior e inferior izquierdo) y el iniciador $(GA)_8C$ (superior e inferior derecho). T 1-5: *Agave tequilana*, K1-5: *A. karwinskii*, E1-5: *A. angustifolia*, P1-5: *A. potatorum*. M: marcador de peso molecular de 1 kb.

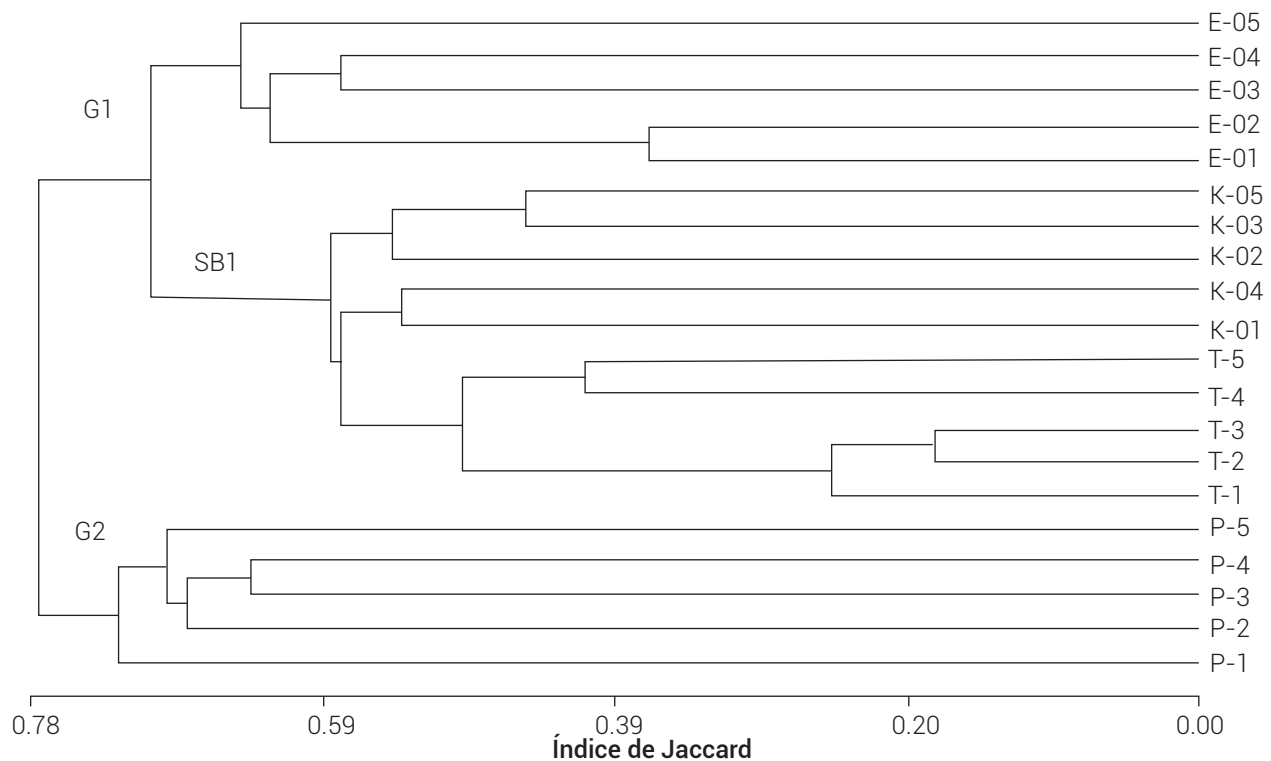


Figura 5. Dendrograma construido mediante el método UPGMA a partir del análisis ISSR para las muestras de *Agave*. (E) *A. angustifolia*, (K) *A. karwinskii*, (P) *A. potatorum*, (T) *A. tequilana*.

polimorfismo dentro y entre poblaciones de plantas (Xia *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

La caracterización morfológica de hijuelos utilizados en la producción de tequila y mezcal, así como la caracterización mediante marcadores ISSR son de utilidad en la diferenciación de las especies de *Agave* analizadas en este estudio cuando se utilizan hijuelos como material biológico, presentando un alto polimorfismo y fácil interpretación de los resultados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Azul Agricultura y Servicios S.A. de C.V. por el financiamiento del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Dugua X. and L. E. Eguarte (2013) Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments* 90:36-44, <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>
- Alfaro R. G., J. P. Legaria S. y J. E. Rodríguez P. (2007) Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave* spp.) del nororiente del estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30:1-12.
- Ángeles-Espino A., H. E. Dimas-Estrada, D. Ramirez-Alvarado, J. M. Cruz-Rubio, P. A. Palmeros-Suárez y J. F. Gómez-Leyva (2020) Caracterización molecular de mutantes de *Agave tequilana* inducidas con radiación gamma Co^{60} y su efecto en la acumulación de fructooligosacáridos. *Acta Universitaria* 30:e2696, <https://doi.org/10.15174/au.2020.2696>
- Astorga M. P. (2008) Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. In: Estado Actual del Cultivo y Manejo de Moluscos Bivalvos y su Producción Futura: Factores que Afectan la Sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, 20-24 de agosto 2007. Puerto Montt, Chile. A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. pp:277-287.
- Awasthi A. K., G. M. Nagaraja, G. V. Naik, S. Kanginakudru, K. Thangavelu and J. Nagaraju (2004) Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics* 5:1, <https://doi.org/10.1186/1471-2156-5-1>
- Bogler D. J. and B. B. Simpson (1996) Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *American Journal of Botany* 83:1225-1235, <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb13903.x>
- Bruneau A., S. Joly, J. R. Starr and J. N. Drouin (2005) Molecular markers indicate that the narrow Québec endemics *Rosa rooseaui* and *Rosa williamsii* are synonymous with the widespread *Rosa blanda*. *Canadian Journal of Botany* 83:386-398, <https://doi.org/10.1139/b05-012>
- Carrillo T. L. A. (2007) Los destilados de *Agave* en México y su denominación de origen. *Ciencias* 87:43-49.
- Castañeda-Nava J. J., J. M. Rodríguez-Domínguez, R. M. Camacho-Ruiz, J. Gallardo-Valdez, E. Villegas-García and A. Gutiérrez-Mora (2019) Morphological comparison among populations of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Asparagaceae), a species used

- for mezcal production in Mexico. *Flora* 255:18-23, <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.03.019>
- Colunga-García-Marín P., E. Estrada-Loera and F. May-Pat (1996) Patterns of morphological variation, diversity, and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatan, Mexico. *American Journal of Botany* 83:1069-1082, <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb12805.x>
- CRM, Consejo Regulador del Mezcal (2019) Informe Estadístico 2018. Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal A.C. Oaxaca, Oaxaca, México. <https://www.crm.org.mx> (Enero, 2019).
- CRT, Consejo Regulador del Tequila (2017) Reporte Anual 2016. Comité Técnico Agronómico. Consejo Regulador del Tequila, A. C. Zapopan, Jalisco, México. <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/> (Marzo 2022).
- Dávila M., M. A. Castillo y H. Laurentin (2007) Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en *Agave*. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)* 33:93-111.
- Davis J. I. (1996) Phylogenetics, molecular variation, and species concepts: species biology plays a critical role in modern phylogenetics. *BioScience* 46:502-511, <https://doi.org/10.2307/1312928>
- Dos Santos S. L. B., A. R. Passos, S. R. O. D. Queiroz, M. N. do Nascimento and F. S. Carneiro (2015) Genetic variability in populations of *Agave sisalana* Perrine detected by inter simple sequence repeats. *Bioscience Journal* 31:1624-1633, <https://doi.org/10.14393/BJ-v31n6a2015-26420>
- Ducarme V. and R. A. Wesselingh (2005) Detecting hybridization in mixed populations of *Rhinanthus minor* and *Rhinanthus angustifolius*. *Folia Geobotanica* 40:151-161, <https://doi.org/10.1007/BF02803231>
- Gentry H. S. (1982) *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press. Tucson, Arizona, USA. 670 p.
- Gil V. K., M. González C., O. Martínez V., J. Simpson and G. Vandemark (2001) Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341, <https://doi.org/10.1023/A:1017553107303>
- Gil-Vega K., C. Díaz., A. Nava-Cedillo and J. Simpson (2006) AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science* 170:904-909, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.014>
- Infante D., G. González, L. Peraza-Echeverría and M. Keb-Llanes (2003) Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science* 164:223-230, [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00404-1)
- Jin Y., T. He and B. R. Lu (2003) Fine scale genetic structure in a wild soybean (*Glycine soja*) population and the implications for conservation. *New Phytologist* 159:513-519, <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00824.x>
- Koskinen M. T., H. Hirvonen., P. A. Landry and C. R. Primmer (2004) The benefits of increasing the number of microsatellites used in genetic population studies: an empirical perspective. *Hereditas* 141:61-67, <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2004.01804.x>
- Mora-López J. L., J. A. Reyes-Aguero, J. L. Flores-Flores, C. B. Peña-Valdivia y J. R. Aguirre-Rivera (2011) Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género *Agave*. *Agrociencia* 45:465-477.
- Nybom H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13:1143-1155, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x>
- Ortega P. R., M. A. Martínez A. y J. J. Sánchez G. (2000) Recursos Fitogenéticos autóctonos. In: Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura. Informe Nacional. Ramírez V. P., R. Ortega P., A. López H., F. Castillo G., M. Livera M., F. Rincón S. y F. Zavala G. (eds.) Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. Chapingo, México. pp:77-95.
- Pérez-Negrón E. and A. Casas (2007) Use, extraction rates and spatial availability of plant resources in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico: the case of Santiago Quioitepec, Oaxaca. *Journal of Arid Environments* 70:356-379, <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.12.016>
- Reddy M. P., N. Sarla and E. A. Siddiq (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17, <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>
- Rodríguez-Garay B., J. A. Lomeli-Sención, E. Tapia-Campos, A. Gutierrez-Mora, J. García-Galindo, J. M. Rodríguez-Domínguez, ... and I. Vicente-Ramírez (2009) Morphological and molecular diversity of *Agave tequilana* Weber var. Azul and *Agave angustifolia* Haw. var. Lineño. *Industrial Crops and Products* 29:220-228, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.05.007>
- SE, Secretaría de Economía (2012) Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, Bebidas Alcoholicas-Tequila-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 13 de diciembre 2012. México, D.F. 15 p.
- SE, Secretaría de Economía (2017) Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, Bebidas Alcoholicas-Mezcal-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 23 de febrero 2017. Ciudad de México, 17 p.
- Torres-Morán M. I., M. M. Morales-Rivera, L. De la Cruz L. y A. R. Villalobos A. (2006) Identificación de polimorfismo entre hijuelos y plantas micropropagadas de *Agave tequilana* y *Agave cocui* usando ISTRs. *Scientia CUCBA* 8:203-206.
- Verduzco-Martínez J., C. I. Predo-Rojas y R. Mercado-Hernández (2009) Caracterización e identificación taxonómica del maguey. *Revista Salud Pública y Nutrición Esp.* 2:75-99.
- Wagner D. B., G. R. Furnier, M. A. Saghai-Maroo, S. M. Williams, B. P. Dancik and R. W. Allard (1987) Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:2097-2100, <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.2097>
- Wolfe A. D. and A. Liston (1998) Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: *Plant Molecular Systematics of Plants II. DNA Sequencing*. Soltis D. E., P. S. Soltis and J. J. Doyle (eds.). Springer. Boston, Massachusetts, USA. pp:43-86, https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6_2
- Xia T., S. Chen, S. Chen, D. Zhang, D. Zhang, Q. Gao and X. Ge (2007) ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 35:209-214, <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.09.016>
- Zizumbo-Villarreal D., P. Colunga-GarcíaMarín, E. Payro C., P. Delgado-Valerio and P. Gepts (2005) Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy-domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. *Crop Science* 45:1073-1083, <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0340>