

## Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

**Variabilidad genética en plantas madre y vástagos de rizoma de *Agave* híbrido 11648**

**Genetic variability in mother plants and rhizome offshoots of *Agave* híbrido 11648**

Authors/Autores: Ballesteros Rodríguez, E., Sánchez Teyer, L. F.

ID: e1795

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1795>

Received/Fecha de recepción: October 21<sup>th</sup> 2024

Accepted /Fecha de aceptación: May 06<sup>th</sup> 2025

Available online/Fecha de publicación: May 08<sup>th</sup> 2025

Please cite this article as/Como citar este artículo: Ballesteros Rodríguez, E., Sánchez Teyer, L. F. (2025). Genetic variability in mother plants and rhizome offshoots of *Agave* híbrido 11648. *Revista Bio Ciencias*, 12, e1795. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1795>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

## Variabilidad genética en plantas madre y vástagos de rizoma de *Agave* híbrido 11648

## Genetic variability in mother plants and rhizome offshoots of *Agave* híbrido 11648

Variabilidad Genética en *Agave* híbrido 11648/

Genetic Variability in *Agave* hybrid 11648

Ballesteros Rodríguez, E.\* (0002-7196-1752), Sánchez Teyer, L. F. (0002-1714-0240)

Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México.

\*Corresponding Author:

[Elia Ballesteros-Rodríguez](mailto:Elia.Ballesteros-Rodriguez@ciicyuc.mx), Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México. Teléfono: (999) 981 3921. E-mail: [ely\\_br\\_2002@yahoo.com.mx](mailto:ely_br_2002@yahoo.com.mx)

### RESUMEN

El *Agave* híbrido 11648 es el agave que más se cultiva a nivel mundial para la producción de fibra y este se reproduce, principalmente, por vástagos clonales de rizoma. Para determinar la influencia de la propagación asexual en la reducción de la diversidad genética del híbrido 11648, este estudio evaluó la variabilidad genética entre plantas madre y sus vástagos clonales utilizando seis combinaciones de cebadores. Se generaron 586 marcadores AFLP, con un 40 % de polimorfismo y una diferenciación genética significativa ( $\Phi_{ST} = 0.455$ ,  $p = 0.0001$ ). Los índices de Shannon ( $I = 0.226$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e = 0.153$ ) muestran una baja diversidad genética. El conocimiento de la variabilidad genética es fundamental para desarrollar estrategias que favorezcan la generación de plantas más resistentes a enfermedades y ayuden a mitigar los efectos negativos de la baja diversidad genética a largo plazo.

### PALABRAS CLAVE:

*Agave*, AFLP, fibra, variabilidad genética.

### ABSTRACT

*Agave* hybrid 11648 is the most widely cultivated agave for fiber production worldwide and reproduces, mainly, by clonal rhizome shoots. To determine the influence of asexual propagation on the reduction of the genetic diversity of hybrid 11648, this study evaluated the genetic variability between mother plants and their clonal offspring using six primer combinations. 586 AFLP markers were generated,

with 40 % polymorphism and significant genetic differentiation ( $\Phi_{ST} = 0.455$ ,  $p = 0.0001$ ). The Shannon indices ( $I = 0.226$ ) and expected heterozygosity ( $H_e = 0.153$ ) show low genetic diversity. Knowledge of genetic variability is essential to develop strategies that favor generating more disease-resistant plants and help mitigate the negative effects of low genetic diversity in the long term.

## KEY WORDS

Agave, AFLP, fiber, genetic variability.

## Introducción

El Agave híbrido 11648 (H.11648) fue obtenido durante la primera mitad del siglo XX por George W. Lock en Tanzania, África, mediante el cruzamiento entre *Agave angustifolia* × *Agave amaniensis* Trel & Nowel y posterior retrocruza con *A. amaniensis* (Zhang *et al.*, 2013; Bautista-Montes *et al.*, 2022). Se caracteriza por la ausencia de espinas marginales y mayor contenido de fibra en las hojas comparado con *Agave fourcroydes* Lem. y *Agave sisalana* Perr. (Zhang *et al.*, 2013); según Hartemink & Kekem (1994), el H.11648 puede cosecharse antes y alcanzar un rendimiento de hasta 3 t ha<sup>-1</sup> en contraste con *A. sisalana*, que produce alrededor de 1.5 t ha<sup>-1</sup> de fibra utilizando la hoja completa. En consecuencia, el principal cultivo de agave a nivel mundial para la obtención de fibra es el del H.11648 (Jin *et al.*, 2020).

Las plantas del género *Agave* pueden propagarse tanto sexualmente, mediante semillas, como asexualmente a través de vástagos clonales de rizoma o bulbillos de inflorescencia (Abraham-Juárez *et al.*, 2015; Figueredo-Urbina *et al.*, 2017; Sánchez *et al.*, 2020). Aunque las poblaciones de agave que se propagan clonalmente mediante rizomas presentan homogeneidad genética (Infante *et al.*, 2003), su propagación asexual ha traído como consecuencia una pérdida de diversidad en los cultivos, incrementando su vulnerabilidad a diversos patógenos (Rivera-Lugo *et al.*, 2018; Trejo *et al.*, 2018; Klimova *et al.*, 2023; Figueredo-Urbina *et al.*, 2024). Aunque el H.11648 puede reproducirse por semilla, en la práctica se propaga principalmente mediante vástagos clonales de rizoma. La propagación asexual, en especies como *Agave tequilana* (Trejo *et al.*, 2018; Chávez-Sánchez *et al.*, 2022), *Agave mapisaga* (Figueredo-Urbina *et al.*, 2021) y *Agave fourcroydes* (Infante *et al.*, 2003), ha sido objeto de estudio debido a sus implicaciones en la variabilidad genética.

Estudios realizados en *A. fourcroydes* y *A. tequilana*, señalan que el análisis de la variabilidad genética permite identificar materiales élite que pueden ser seleccionados para reproducir plantas con características agronómicas superiores, tales como una mayor resistencia genética a las enfermedades o un rendimiento superior en la producción de fibra (Infante *et al.*, 2003; Chávez-Sánchez *et al.*, 2022). Ya que el empleo de marcadores moleculares ha probado su utilidad para la identificación de individuos con características deseables en programas de mejoramiento genético, el presente trabajo planteó como objetivo determinar la variabilidad genética en las plantas madre y sus vástagos clonales de rizoma del Agave híbrido 11648 empleando marcadores moleculares de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).

## Material y Métodos

### Material vegetal

Se colectaron hojas de seis plantas madre del H.11648 (designadas como P2 a P6) y de cinco vástagos clonales de rizoma de cada una de ellas. También se colectaron muestras de una planta madre en maceta (P1) y de dos de sus vástagos clonales como grupo de control. En total se analizaron 39 muestras, correspondientes a la suma de siete plantas madre y 32 vástagos clonales, colectadas en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., ubicado en Mérida, Yucatán. Para asegurar la homogeneidad de las muestras, se escogieron plantas sanas con una altura aproximada de 2 m para plantas madre y 0.6 m para sus vástagos; el grupo de control reportó una altura de 0.8 m para la planta madre y 0.3 m para sus vástagos.

La extracción de DNA se realizó a partir de un segmento de 1 cm de la base de la hoja, según el método de Echevarría-Machado *et al.* (2005), con ligeras adaptaciones. Primero, el tejido se molió en nitrógeno líquido y se tomó una muestra de 0.5 g a la que se añadió polivinilpirrolidona (Sigma-Aldrich®). A continuación, se incorporaron el tampón de extracción  $\beta$ -mercaptoetanol (100  $\mu$ L, 100mM) y SDS (100  $\mu$ L, 20 % Sigma-Aldrich®). Las muestras se incubaron a 65 °C durante 15 min en una incubadora AquaBath™ Thermo Scientific® y luego se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 12 h. Tras la incubación se añadieron 500  $\mu$ L de acetato de potasio 5M (Sigma-Aldrich®) y se mezclaron los tubos por inversión, después se incubaron 20 min en hielo. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 2 mL y se añadieron 300  $\mu$ L de sílice (Sigma-Aldrich®). Las muestras se mezclaron por inversión durante 5 min y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 6 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se dejó secar durante 1 h antes de ser re-suspendido en 50  $\mu$ L de agua estéril (PISA®). La evaluación de pureza y cuantificación de DNA se realizaron de acuerdo a lo descrito por Ballesteros-Rodríguez *et al.* (2022).

### Desarrollo de AFLP

Se llevaron a cabo análisis AFLP siguiendo el protocolo descrito por Vos *et al.* (1995), con ligeras modificaciones propuestas por Ballesteros-Rodríguez *et al.* (2022). En una evaluación preliminar de cinco plantas, se seleccionaron seis pares de cebadores EcoRI y MseI basándose en el número de bandas amplificadas. Los cebadores EcoRI utilizados, que estaban marcados con fluorescencia, fueron: AAC/CAT, ACG/CAT, ACT/CAT, AAC/CAC, ACG/CTA y ACT/CAC. Las bandas amplificadas fueron detectadas con un secuenciador de ADN Beckman Coulter CEQ 8800®.

### Análisis de datos

El análisis de datos se realizó conforme a lo descrito por Ballesteros-Rodríguez *et al.* (2022), empleando el software GeneMarker® v1.75 y el método de agrupamiento UPGMA del software NTSYSpc®. Se calcularon los valores de *bootstrap* a partir de 1000 árboles re-muestreados utilizando el software FreeTree (Felsenstein, 1985).

Se utilizó la matriz binaria generada con 586 marcadores AFLP para realizar un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el software GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). El AMOVA proporcionó métricas tales como: el porcentaje de loci polimórficos, el índice de información de Shannon (I) y la heterocigosidad esperada (He). Las métricas fueron calculadas bajo el supuesto de que cada locus representa un par de alelos y considerando la presencia y ausencia de los fragmentos AFLP en cada banda.

## Resultados y Discusión

A partir de seis combinaciones de cebadores en la amplificación selectiva, se obtuvieron 586 marcadores AFLP, generándose un promedio de 98 marcadores por combinación. El AMOVA determinó que el porcentaje de variación molecular entre plantas madre y vástagos fue de 55 % y dentro de cada planta madre y sus vástagos 45 %. Estos resultados indican una diferenciación genética significativa entre las plantas madre y sus vástagos, con un valor de  $\Phi_{ST} = 0.455$  ( $p = 0.0001$ ), lo que sugiere que los vástagos presentan una variabilidad genética distinta a las plantas madre (Tabla 1).

El porcentaje de polimorfismo observado varió en las plantas madre analizadas y sus vástagos, siendo del 28 % para la P1, 39 % para la P2, 41 % para la P3, 44 % para la P4, 36 % para la P5, 45 % para la P6 y 44 % para la P7. Con 40 % como media general de polimorfismo, puede inferirse que existe variabilidad genética entre las plantas madre y sus vástagos y, aunque comparten una base genética común, se observan ciertos cambios en el perfil genético de los vástagos. En *A. tequilana*, se ha documentado mediante análisis AFLP, variabilidad genética en materiales propagados asexualmente a través de rizomas (Torres-Morán *et al.*, 2005; 2013; Chávez-Sánchez *et al.*, 2022). Abraham-Juárez *et al.* (2009) reportaron 75 % de polimorfismo en vástagos clonales, mientras que los bulbillos de inflorescencia mostraron polimorfismo de 86 % y las plantas derivadas de semilla de 90 %.

El índice de información de Shannon ( $I = 0.226$ ) y el valor de heterocigosidad esperada ( $He = 0.153$ ) obtenidos en este estudio reflejan una diversidad genética relativamente baja entre las plantas madre y sus vástagos. Ambos valores sugieren que, aunque existe cierta variabilidad genética, la diversidad es limitada debido a la reproducción asexual, ya que tanto las plantas madre como los vástagos comparten una base genética similar.

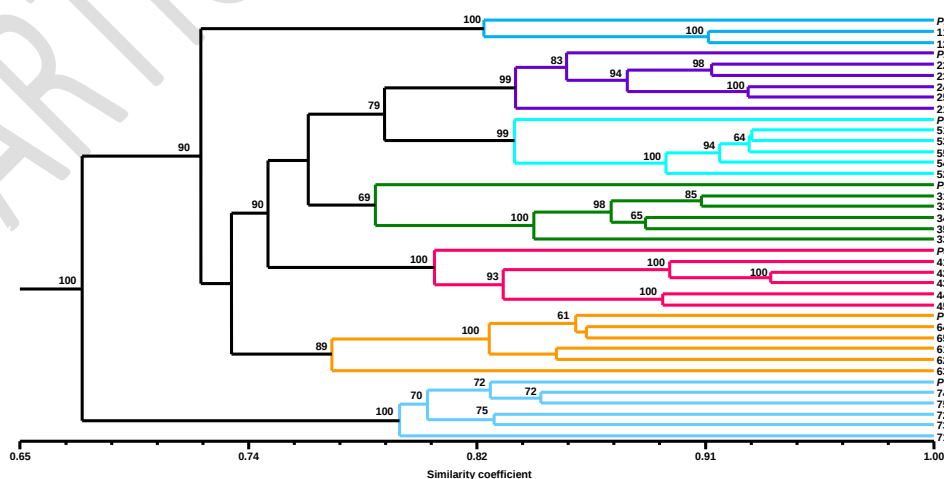
En estudios previos sobre *A. tequilana* Weber var. Azul, Ruiz-Mondragón *et al.* (2022), al analizar 68 plantas maduras en el estado de Jalisco, obtuvieron un valor de  $He = 0.120$ , similar a lo reportado en esta investigación. Con cinco plantas en Guanajuato mediante AFLP, Rivera-Lugo *et al.* (2018) reportaron un valor de  $He = 0.205$ , mientras que Vargas-Ponce *et al.* (2009), empleando ISSRs en 22 plantas recolectadas en Tequila, Jalisco, obtuvieron un valor de  $He = 0.118$ . Trejo *et al.* (2018), utilizando microsatélites en 23 plantas de campos cultivados en Tequila, Jalisco, reportaron  $He = 0$ , debido a que todos los individuos presentaron el mismo genotipo, aunque en poblaciones con menor manejo intensivo, observaron una mayor diversidad genética, por ejemplo, las variedades 'Sigüin' ( $He = 0.409$ ) y 'Chato' ( $He = 0.435$ ) presentaron niveles más altos de heterocigosidad esperada. De igual manera, Figueredo-Urbina *et al.* (2021), en el análisis de 19 variedades tradicionales de agave

pulquero (variedades de *A. americana*, *A. salmiana* y *A. mapisaga*) obtuvieron valores de He entre 0.204 y 0.721, lo que refleja una notable diversidad genética.

El índice de similitud genética entre los 39 individuos varió de 0.59 a 0.94. En la P1 y sus vástagos, el índice osciló entre 0.82 y 0.91; en la P2, entre 0.83 y 0.92; en la P3, de 0.77 a 0.91; en la P4, de 0.78 a 0.93; en la P5, de 0.83 a 0.93; en la P6, de 0.75 a 0.86; y en la P7, de 0.77 a 0.84. Estos resultados son similares a los reportados en *A. tequilana*, donde el coeficiente de similitud entre las plantas madre y sus vástagos varió de 0.770 a 0.890 (Torres-Morán *et al.*, 2010).

El dendrograma generado mostró dos grupos principales: uno compuesto por la P7 y sus vástagos clonales y otro que se subdivide en seis subgrupos (Figura 1). Se observa una notable similitud entre las plantas madre y sus vástagos, lo que concuerda con los hallazgos de Torres-Morán *et al.* (2010) en *A. tequilana*, aunque se evidencian diferencias en el patrón de bandas entre las plantas madre y los vástagos, así como entre los propios vástagos. Esta variabilidad es esencial para la mejora del agave, ya que permite la selección de individuos con características deseables en poblaciones clonadas. La selección y el cultivo *in vitro* podrían facilitar la obtención de materiales élite con mayor resistencia genética a enfermedades (Chávez-Sánchez *et al.*, 2022).

En los agaves cultivados, la variabilidad genética es variable y depende de factores como la especie, la intensidad del uso, las prácticas de manejo y el grado de domesticación. En *A. tequilana*, la propagación clonal ha sido ampliamente promovida, lo que ha resultado en una disminución de la variabilidad genética. En cambio, la variabilidad genética en las poblaciones silvestres de *Agave* tiende a ser alta, en parte debido a la intervención de polinizadores como los murciélagos nectarívoros, que desempeñan un papel crucial en la conservación de la diversidad genética (Figueredo-Urbina *et al.*, 2021; Ruiz-Mondragón *et al.*, 2022). Cabe señalar que el contraste de los resultados de esta investigación con los de otros estudios es complejo debido a las diferencias en las metodologías moleculares y los diseños de muestreo empleados.



**Figura 1.** Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre plantas madre y sus

vástagos clonales de rizoma. Los números indican el porcentaje de repeticiones de *bootstrap* obtenidas en cada nodo a partir de 1000 árboles re-muestreados. Las etiquetas corresponden a las siguientes identificaciones: P1 indica la planta madre; 11 y 12 son vástagos clonales de rizoma derivados de P1; P2 es otra planta madre, y 21, 22, 23, 24, 25 son vástagos clonales de rizoma derivados de P2, y así sucesivamente. Fuente: Elaboración propia a partir de los resultados AFLP

**Tabla 1.** Análisis de varianza molecular entre las plantas madre y vástagos clonales de rizoma del *Agave* híbrido 11648 mediante AFLP.

|                                            | gl | SCD      | MSD     | Varianza | $\Phi_{ST}$ | P-valor |
|--------------------------------------------|----|----------|---------|----------|-------------|---------|
| Entre plantas madre y vástagos             | 6  | 1873.526 | 312.254 | 46.350   | 0.455       | 0.0001  |
| Dentro de cada planta madre y sus vástagos | 32 | 1777.500 | 55.547  | 55.547   |             |         |
| Total                                      | 38 | 3651.026 |         |          |             |         |

gl: grados de libertad, SCD: Suma de cuadrados de las diferencias, MSD: Media de las desviaciones Cuadráticas. Los valores de P se derivaron de una prueba de permutación aleatoria con 10,000 permutaciones. Fuente: Elaboración propia

## Conclusiones

Este estudio muestra que, aunque la reproducción asexual es la principal vía de propagación, no se produce una homogeneización total en el perfil genético de los vástagos clonales. Los valores de polimorfismo, heterocigosidad esperada y diversidad genética son relativamente bajos, lo cual podría atribuirse a la propagación clonal. Sin embargo, el manejo adecuado de esta variabilidad genética a través de la selección podría facilitar la mejora genética de las poblaciones clonales.

Es importante señalar que la baja diversidad genética observada también conlleva riesgos, como la reducción de la capacidad de adaptación a cambios ambientales y una mayor vulnerabilidad a enfermedades. Por lo tanto, es fundamental el conocimiento de la variabilidad genética para generar estrategias que favorezcan la floración y producción de semillas viables, lo que, a su vez, podría contribuir a la creación de plantas más resistentes a enfermedades y mitigar los efectos negativos de la baja diversidad genética a largo plazo.

## Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, LFST; desarrollo de la metodología, EBR, LFST; manejo de software, EBR; validación experimental, EBR, LFST; análisis de resultados, manejo de datos, escritura y preparación del manuscrito, EBR; redacción, revisión y edición, EBR, LFST.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

## Financiamiento

Se agradece el financiamiento al proyecto CEAR 2018-02, otorgado por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías), en alianza con el IDRC (International Development Research Centre) y CIESAS (Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social), bajo el convenio C-873/2018.

## Agradecimientos

La primera autora agradece el apoyo recibido del programa de Estancias Posdoctorales por México convocatoria 2023 (1) del CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías).

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## Referencias

- Abraham-Juárez, M. J., Ramírez-Malagón, R., Gil-Vega, K. C., & Simpson, J. (2009). AFLP analysis of genetic variability in three reproductive forms of *Agave tequilana*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32, 171-175. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v32n3/v32n3a4.pdf>
- Abraham-Juárez, M. J., Hernandez, C. R., Santoyo, V. J. N., O'Connor, D., Sluis, A., Hake, S., Ordaz-Ortiz, J., Terry, L., & Simpson, J. (2015). Functionally different pin proteins control auxin flux during bulbil development in *Agave tequilana*. *Journal of Experimental Botany*, 66(13), 3893-3905. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv191>
- Ballesteros-Rodríguez, E., Escalante-Erosa, F., & Sánchez-Teyer, L. F. (2022). Variabilidad genética de maguey pulquero (*Agave spp.*) en la región Otomí-Huitzilapan, Estado de México. *Mexican Journal of Biotechnology*, 7(2), 1-15. <https://doi.org/10.29267/mxib.2022.7.2.1>
- Bautista-Montes, E., Hernández-Soriano, L., & Simpson, J. (2022). Advances in the Micropropagation and Genetic Transformation of *Agave* Species. *Plants*, 11(13), 1757. <https://doi.org/10.3390/plants11131757>
- Chávez-Sánchez, C., Mancilla-Margalli, N. A., Montero-Cortés, M. I., Gutiérrez-Miceli, F. A., Briceño-Félix, G. A., Simpson Williamson, J. K. & Avila-Miranda, M. E. (2022). Asexually propagated *Agave tequilana* var. azul exhibits variation in genetic markers and defence responses to *Fusarium solani*. *AoB Plants*, 14, 1-10. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plac027>
- Echevarría-Machado, I., Sánchez-Cach, L. A., Hernández-Zepeda, C., Rivera-Madrid, R. & Moreno-Valenzuela, O. A. (2005). A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotechnology*, 31, 129-135. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:129>
- Figueredo-Urbina, C. J., Álvarez-Ríos, G. D., García-Montes, M. A., & Octavio-Aguilar, P. (2021). Morphological and genetic diversity of traditional varieties of agave in Hidalgo State, Mexico. *PLoS ONE*, 16(7), Article, e0254376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254376>
- Figueredo-Urbina, C. J., Casas, A., & Torres-García, I. (2017). Morphological and genetic divergence between *Agave inaequidens*, *Agave cupreata* and the domesticated *Agave hookeri*. Analysis of their evolutionary relationships. *PLoS ONE*, 12(11), Article, e0187260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187260>
- Figueredo-Urbina, C. J., Arce-Cervantes, O., & Castañeda-Ovando, A. (2024). Diversidad de agaves utilizados para la producción de jarabe de aguamiel en el estado de Hidalgo, México. *Polibotánica*, 58, 265-290. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.58.19>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Hartemink, A. E. & Kekem, A. J. (1994). Nutrient depletion in ferralsols under hybrid sisal cultivation in Tanzania. *Soil Use and Management*, 10, 103-107. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.1994.tb00468.x>
- Infante, D., González, G., Peraza-Echeverría L. & Keb-Llanes M. (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, G., Huang, X., Chen, T., Qin, X., Xi, J., & Yi, K. (2020). The complete chloroplast genome of agave hybrid 11648. *Mitochondrial DNA Part B*, 5(3), 2345-2346. <https://doi.org/10.1080/23802359.2020.1775145>
- Klimova, A., Ruiz-Mondragón, K. Y., Aguirre-Planter, E., Valiente, A., Lira, R., & Eguiarte, L. E. (2023). Genomic analysis unveils reduced genetic variability but increased proportion of heterozygotic genotypes of the intensively managed mezcal agave, *Agave angustifolia*. *American Journal of Botany*, 110, 1-18. <https://doi.org/10.1002/ajb2.16216>

- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Rivera-Lugo, M., García-Mendoza, A., Simpson, J., Solano, E. & Gil-Vega, K. (2018). Taxonomic implications of the morphological and genetic variation of cultivated and domesticated populations of the *Agave angustifolia* complex (Agavoideae, Asparagaceae) in Oaxaca, Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 304(8), 969-979. <https://doi.org/10.1007/s00606-018-1525-0>
- Ruiz Mondragon, K. Y., Aguirre-Planter, E., Gasca-Pineda, J., Klimova, A., Trejo-Salazar, R. E., Reyes Guerra, M. A., Medellín, R. A., Piñero, D., Lira, R., & Eguiarte, L. E. (2022). Conservation genomics of *Agave tequilana* Weber var. azul: low genetic differentiation and heterozygote excess in the tequila agave from Jalisco, Mexico. *PeerJ*, 10, Article e14398. <https://doi.org/10.7717/peerj.14398>
- Sánchez, A., Coronel-Lara, Z., Gutiérrez, A., Vargas, G., Coronado, M. L., & Esqueda, M. (2020). Acclimatization and transplantation of *Agave angustifolia* Haw. vitroplants in wild conditions. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1593-1605. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2403>
- Torres-Moran, M. I., Escoto-Delgadillo, M., Molina-More, S., Rivera-Rodriguez D. M., Velasco-Ramirez A. P., Infante D., & Portillo L. (2010). Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103, 403-409. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9777-6>
- Torres-Morán, M. I., Infante D., Sánchez-González, J. J., Morales-Rivera, M. M. & Santerre A. (2005). Diversidad genética en *Agave tequilana* Weber var. azul proveniente de micropropagación. *Nakari*, 19(3), 1-8. [https://www.researchgate.net/profile/Diogenes-Infante/publication/225558156\\_Assessment\\_of\\_genetic\\_fidelity\\_among\\_Agave\\_tequilana\\_plants\\_propagated\\_a\\_sexually\\_via\\_rhizomes\\_versus\\_in\\_vitro\\_culture/links/661d9ec043f8df018d0e4bb3/Assessment-of-genetic-fidelity-among-Agave-tequilana-plants-propagated-a-sexually-via-rhizomes-versus-in-vitro-culture.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Diogenes-Infante/publication/225558156_Assessment_of_genetic_fidelity_among_Agave_tequilana_plants_propagated_a_sexually_via_rhizomes_versus_in_vitro_culture/links/661d9ec043f8df018d0e4bb3/Assessment-of-genetic-fidelity-among-Agave-tequilana-plants-propagated-a-sexually-via-rhizomes-versus-in-vitro-culture.pdf)
- Torres-Morán, M. I., Velasco-Ramírez A. P., Hurtado-de la Peña, S. A., Rodríguez-García, A. & Mena-Munguía S. (2013). Variability and genetic structure in a commercial field of tequila plants, *Agave tequilana* Weber (Agavaceae). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 8(1), 44-53. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2013.44.53>
- Trejo, L., Limones, V., Peña, G., Scheinvar, E., Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2018). Genetic variation and relationships among agaves related to the production of Tequila and Mezcal in Jalisco. *Industrial Crops and Products*, 125, 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.072>
- Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez-Castillo, J., Coello-Coello, J., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2009). Diversity and structure of landraces of *Agave* grown for spirits under traditional agriculture: A comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and commercial plantations of *A. tequilana*. *American Journal of Botany*, 96(2), 448-457. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800176>
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot J., Peleman, J. & Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Zhang, Y. M., Li, X., Chen, Z., Li, J. F., Lu, J. Y., & Zhou, W. Z. (2013). Shoot organogenesis and plant regeneration in *Agave hybrid*, No. 11648. *Scientia Horticulturae*, 161, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.047>