



Diversidad genética de *Agave cupreata* (Asparagaceae) evaluada mediante AFLP en tres municipios mezcalderos en el estado de Guerrero (México)

Genetic diversity of *Agave cupreata* (Asparagaceae) evaluated using AFLP in three mezcald-producing municipalities of Guerrero (Mexico)

Ballesteros Rodríguez, Elia^{id}; María J. García Castillo^{id}; Fabiola Escalante-Erosa^{id}; Lorenzo F. Sánchez Teyer*^{id}

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.

* Autor correspondiente: <santey@cicy.mx>

Resumen

Agave cupreata es una especie endémica de México, de relevancia cultural y económica utilizada en la producción de mezcal. Actualmente, esta especie enfrenta desafíos de conservación debido a la cosecha intensiva de sus poblaciones naturales, por lo que resulta importante conocer su variabilidad genética. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la variabilidad genética de *A. cupreata* en el estado de Guerrero, para generar información que contribuya al desarrollo de estrategias de conservación y manejo sostenible. Se analizaron tres poblaciones mediante marcadores moleculares AFLP con siete combinaciones de cebadores, encontrando un polimorfismo del 63,95 %. El análisis de la varianza molecular (AMOVA) mostró una diferenciación genética baja pero significativa entre poblaciones ($\Phi_{ST} = 0,043$, $p = 0,0002$), mientras que la heterocigosidad esperada ($HE = 0,3966-0,4102$) indicó una diversidad genética moderada. El análisis bayesiano identificó dos grupos genéticos.

► Ref. bibliográfica: Ballesteros Rodríguez, E.; García Castillo, M. J.; Escalante-Erosa, F.; Sánchez Teyer, L. F. 2026. Diversidad genética de *Agave cupreata* (Asparagaceae) evaluada mediante AFLP en tres municipios mezcalderos en el estado de Guerrero (México). *Lilloa* 63 (1): 103-119. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2356>

► Recibido: 12 de febrero 2026 – Aceptado: 2 de abril 2026 – Publicado: 5 de mayo 2026.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>



► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

Los resultados muestran alta variabilidad genética intrapoblacional y diferenciación moderada entre poblaciones, lo que resalta la importancia de conservar la diversidad genética de la especie.

Palabras clave: Conservación; marcadores; polimorfismo; variabilidad.

Abstract

Agave cupreata is an endemic species of Mexico with cultural and economic importance, used in mezcal production. Currently, the species faces conservation challenges due to the intensive harvesting of natural populations, making it important to understand its genetic variability. This study aimed to assess the genetic variability of *A. cupreata* in the state of Guerrero to provide supporting information for the development of conservation and sustainable management strategies. Three populations were analyzed using AFLP molecular markers with seven primer combinations, detecting 63.95% polymorphism. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed low but significant genetic differentiation among populations ($\Phi_{ST} = 0.043$, $p = 0.0002$), while expected heterozygosity ($HE = 0.3966-0.4102$) indicated moderate genetic diversity. Bayesian analysis identified two different genetic groups. The results show high intrapopulation genetic variability and moderate differentiation among populations, highlighting the importance of conserving the species' genetic diversity.

Keywords: Conservation; markers; polymorphism; variability.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* L. comprende más de 200 especies a nivel mundial, distribuidas principalmente desde el sur de Estados Unidos hasta Centroamérica (Eguiarte *et al.*, 2021). Sus características adaptativas le han permitido prosperar en condiciones adversas propias de regiones áridas y semiáridas, concediendo relevancia ecológica, económica y cultural a sus diversas especies (Raya *et al.*, 2023). México es considerado como centro de origen y diversificación del género, albergando cerca de 70 % de las especies conocidas (Eguiarte *et al.*, 2021). De acuerdo con el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, A.C. [COMERCAM, 2025], *Agave cupreata* Trel. & A. Berger es la especie más utilizada para producir mezcal en los estados de Guerrero y Michoacán.

Agave cupreata se reproduce exclusivamente por semilla y se caracteriza por tener un ciclo de vida monocárpico, en el que florece y produce semillas una sola vez antes de morir. Este ciclo puede durar entre siete y 15 años, generando hasta 3240 semillas viables por planta. Se considera que la práctica de recolección tiene un impacto negativo sobre las poblaciones de *A. cupreata* en la región de Chilapa, Guerrero, evidenciado por una disminución

promedio del dos por ciento anual en la densidad poblacional (Illsley *et al.*, 2007). Asimismo, Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villareal (2007) afirman que la recolección prematura de individuos para la producción de mezcal interrumpe el ciclo reproductivo, limitando así su regeneración natural.

Las especies de *Agave* que se reproducen sexualmente, tanto en condiciones silvestres como de cultivo, presentan una diversidad genética poco estudiada (Cabrera-Toledo *et al.*, 2020). La sobreexplotación de poblaciones naturales puede conducir a la reducción de esta diversidad debido a la disminución del tamaño efectivo poblacional y a la presión selectiva ejercida por la extracción recurrente (Yorisue *et al.*, 2020). En *A. cupreata*, la extracción de individuos reproductivos ha provocado un declive en las poblaciones naturales y plantea riesgos para su conservación a largo plazo (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013). Investigaciones previas han demostrado la utilidad de diversos marcadores moleculares en el análisis de la variación genética. Entre ellos se encuentran las repeticiones simples intercaladas (ISSR, marcadores nucleares dominantes asociados a microsatélites), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y el polimorfismo de la longitud de fragmento amplificado (AFLP) (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013; Figueredo-Urbina *et al.*, 2017, 2021). Los marcadores AFLP debido a su alta resolución y a su capacidad para detectar un gran número de polimorfismos a lo largo del genoma, han demostrado ser útiles para evaluar la variación genética y las relaciones entre poblaciones en especies vegetales (Bidyananda *et al.*, 2024). El objetivo del presente estudio es evaluar, mediante el uso de marcadores AFLP, la variabilidad genética de *A. cupreata* en el estado de Guerrero con el propósito de generar información que contribuya al desarrollo de estrategias de conservación y manejo sostenible de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y área de muestreo

Se colectaron 18 plantas sanas de aproximadamente 25 cm de altura de *A. cupreata*, en tres municipios del estado de Guerrero, México. El número de plantas colectadas fue determinado por el consentimiento de sus propietarios y se agruparon en tres poblaciones correspondientes a los municipios de origen: la población uno (PB1), de Coyuca de Catalán, 18°19'34"N 100°41'56"O, 240 m snm (tres individuos: CUP1 a CUP3); la población dos (PB2), de Eduardo Neri, 17°46'20"N 99°36'20"O, 1390 m snm (dos individuos: CUP4 a CUP5); y la población tres (PB3), de Chilapa de Álvarez, 17°35'35"N 99°10'41"O, 1840 m snm (13 individuos: CUP6 a CUP18) (Fig. 1). Aunque el tamaño de muestra fue limitado para PB1 y PB2, los marcadores AFLP permiten estimaciones confiables de variación genética incluso con muestras pequeñas, siempre que se analice un número suficiente de loci.

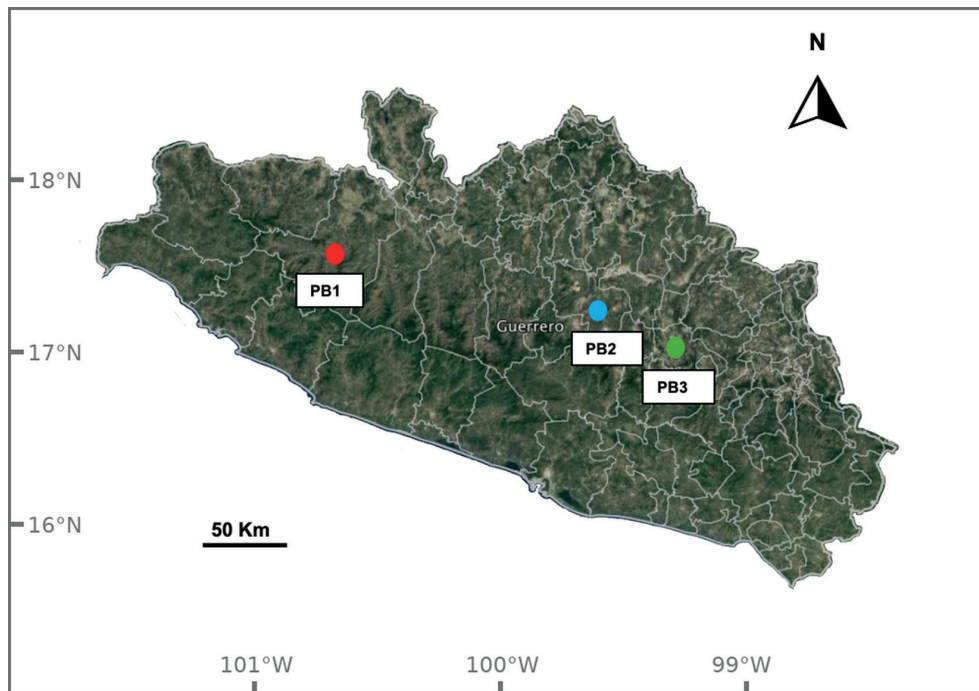


Fig. 1. Localización de los sitios de colecta de *Agave cupreata* en el estado de Guerrero, México. Los puntos indican los municipios de muestreo: Coyuca de Catalán (PB1), Eduardo Neri (PB2) y Chilapa de Álvarez (PB3).

Fig. 1. Location of the *Agave cupreata* collection sites in the state of Guerrero, Mexico. Dots indicate the sampling municipalities: Coyuca de Catalán (PB1), Eduardo Neri (PB2) and Chilapa de Álvarez (PB3).

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico, se cortó 1 cm de la base de una hoja de cada planta, eliminando la epidermis y almacenando las muestras a -80°C en papel aluminio para su posterior utilización. La extracción de ADN fue de acuerdo con el método de Echevarría-Machado *et al.* (2005) con adaptaciones descritas por Ballesteros-Rodríguez y Sánchez-Teyer (2025). El ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % utilizando un transiluminador UV DigiDoc-It™ (UVP, Analytik Jena, Cambridge, Reino Unido). La cuantificación de ADN se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Estados Unidos), con base en la lectura de absorbancia a 260 nm. La pureza de cada muestra se determinó mediante las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} .

Tabla 1. Cebadores de amplificación selectiva de AFLP utilizados para estimar los niveles de polimorfismo en poblaciones de *Agave cupreata* de Guerrero, México.

Table 1. Selective AFLP primers used to estimate polymorphism levels in populations of *Agave cupreata* from Guerrero, Mexico.

Cebadores EcoRI/ MseI	EcoRI secuencia (5'-3')	MseI Secuencia (5'-3')
ACT/CAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
ACT/CAT	5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
ACG/CAG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
ATG/CTA	5'-GACTGCGTACCAATTCATG-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
AGA/CAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
ACT/CTA	5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
ACT/CTT	5'-GACTGCGTACCAATTCAC-3'	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'

Desarrollo de los AFLP

Se realizaron AFLP según el protocolo descrito por Vos *et al.* (1995) y con las modificaciones propuestas por Ballesteros-Rodríguez *et al.* (2022). Para la selección de cebadores, se realizó una evaluación preliminar en cinco plantas con el objetivo de identificar pares que amplificarán bandas polimórficas y reproducibles. Con base en esta evaluación, se seleccionaron siete combinaciones de cebadores EcoRI/MseI (Tabla 1).

Preparación de muestras para Beckman CEQ 8800

Para la separación de los fragmentos AFLP, se mezclaron 2 μ L del producto de amplificación selectiva con 3 μ L de formamida SLS y se preparó la mezcla de carga añadiendo 25 μ L de solución de carga de muestra (SLS, GenomeLab®, N° 608082) y 0,25 μ L del marcador de tamaño STD 400 (DNA Size Standard Kit-400, GenomeLab®, N° 608098). Se añadió una gota de aceite mineral para sellar la placa. Las muestras se cargaron y separaron en el secuenciador de ADN Beckman CEQ 8800® (Beckman Coulter, Estados Unidos), y se generaron los electroferogramas para su posterior análisis.

Análisis de datos

El análisis de los electroferogramas se llevó a cabo mediante el empleo del software Gene Marker® v.1.75 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Estados Unidos). Los criterios de detección automática de fragmentos incluyeron una intensidad de fluorescencia superior a 50 unidades y un rango de tamaños de fragmentos de 60 a 250 pb, estimado con base en el marcador estándar STD 400, el cual abarca fragmentos de 60-420 pb. Los datos se clasificaron en una matriz binaria, en la que se asignó el valor de 1 a la presencia y 0 a la ausencia de una banda.

Para obtener el índice de similitud genética (IS) se utilizó la matriz binaria generada y se aplicó la fórmula de Nei y Li (1979), estimando la proporción de fragmentos compartidos entre individuos. El dendrograma se obtuvo mediante el coeficiente de Dice, utilizando como método de agrupamiento el UPGMA en el software NTSYSpc® v.2.20N (Rohlf, 2000) sobre la base de los marcadores AFLP generados con siete combinaciones de cebadores. Se calcularon los valores de *bootstrap* a partir de 1000 árboles re-muestreados utilizando el software FreeTree v.0.9.1.50 (Felsenstein, 1985).

En matrices binarias AFLP, los coeficientes de similitud basados en la fracción de fragmentos compartidos, como Dice, se emplean ampliamente para estimar relaciones genéticas entre individuos (Gort *et al.*, 2009; Al-Kiyam *et al.*, 2024). EL algoritmo jerárquico UPGMA construye dendrogramas representativos de estas relaciones a partir de matrices de distancia o disimilitud, y se utiliza comúnmente en estudios de diversidad genética con marcadores moleculares para identificar agrupaciones de genotipos con similitud relativa (Zhang *et al.*, 2018; Bidyananda *et al.*, 2024; Guo *et al.*, 2024).

Para estimar la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, se aplicó el análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el software GenAlEx v.6.5 (Peakall y Smouse, 2012) con 10 000 permutaciones. Con el mismo programa se estimaron parámetros de diversidad genética, tales como el número de alelos por locus (NA), el número efectivo de alelos (NE) y el índice de diversidad de Shannon (I). Estos cálculos se realizaron bajo el supuesto de que cada fragmento representa un locus con dos estados (presencia/ausencia de alelos), siendo la presencia dominante y la ausencia recesiva.

Para el análisis de la estructura genética, se aplicó el método de agrupamiento bayesiano mediante el programa de software Structure 2.3.4. (Pritchard *et al.*, 2000). Los análisis se realizaron bajo los modelos de mezcla y frecuencia de alelos correlacionados. Se realizaron 10 000 repeticiones de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC), con 100 000 períodos de descarte (burn-in) para cada ejecución. Se repitieron diez ejecuciones independientes para cada valor de K (K = 1 a K = 10). Este número de repeticiones se consideró adecuado para la convergencia de la cadena y la estabilidad de los parámetros, de acuerdo con estudios previos realizados con AFLP y otros marcadores moleculares (Álvarez-Holguín *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2024).

El número óptimo (K) de agrupamientos genéticos se obtuvo calculando la estadística ΔK mediante una prueba de Evanno *et al.* (2005); este análisis fue realizado mediante el uso del software StructureSelector (CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences). Adicionalmente, el software Structure se utilizó para estimar la heterocigosidad esperada (HE) y el parámetro estadístico F de Wright (F_{ST}). También se analizó el flujo génico (Nm), calculado con la fórmula: $Nm = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$ (Cheng *et al.*, 2020), utilizando el valor promedio de F_{ST} .

Tabla 2. Porcentaje de loci polimórficos en tres poblaciones de *Agave cupreata*.**Table 2.** Percentage of polymorphic loci in three populations of *Agave cupreata*.

Población	Sitio de colecta	Porcentaje de loci polimórficos
PB1	Coyuca de Catalán	59,47 %
PB2	Eduardo Neri	35,34 %
PB3	Chilapa de Álvarez	97,03 %
Media		63,95 %

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Polimorfismo y similitud genética

Se generaron un total de 1214 bandas con un promedio de 172 bandas por combinación. El porcentaje promedio de loci polimórficos (63,95 %) mostrado en la Tabla 2 indica una elevada variabilidad genética en las poblaciones analizadas de *A. cupreata*, particularmente en la PB3 (93,07 %). Estos resultados son similares a los reportados previamente para la misma especie por Martínez-Palacios *et al.* (2011), quienes encontraron 93 % de polimorfismo en el análisis de nueve loci isoenzimáticos en 12 poblaciones naturales. De igual manera, Aguirre-Dugua y Eguiarte (2013) encontraron altos niveles de variación genética utilizando marcadores ISSRs en cinco poblaciones naturales de *A. cupreata*, con un 89 % de polimorfismo. Los altos niveles de polimorfismo observados en este estudio podrían atribuirse a la reproducción por semilla de *A. cupreata*, confirmando los resultados obtenidos en investigaciones con plantas provenientes de semillas de *Agave potatorum* Zucc. (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013) y *Agave tequilana* Weber (Abraham-Juárez *et al.*, 2009), así como lo reportado en poblaciones silvestres de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck y *Agave angustifolia* Haw. utilizando AFLP (Lara-Ávila y Alpuche-Solís, 2016; Rivera-Lugo *et al.*, 2018).

El dendrograma obtenido muestra que, con un coeficiente de similitud de 0.50, se conformaron tres grupos (G1, G2 y G3) (Fig. 2). Los individuos de la población PB3 se distribuyeron en los tres grupos, mientras que los de PB1 y PB2 se agruparon dentro de G3. Algunos nodos del dendrograma presentaron valores de *bootstrap* significativamente altos, mientras que otros exhibieron un bajo nivel de soporte (Fig. 2). Según Hillis y Bull (1993), los valores de *bootstrap* altos indican que un nodo es consistente y estable bajo variaciones de los datos, mientras que los valores bajos muestran menor soporte estadístico y menor estabilidad del agrupamiento. Este bajo soporte podría estar asociado tanto con la variabilidad genética de las poblaciones analizadas como con las limitaciones derivadas del tamaño de la muestra.

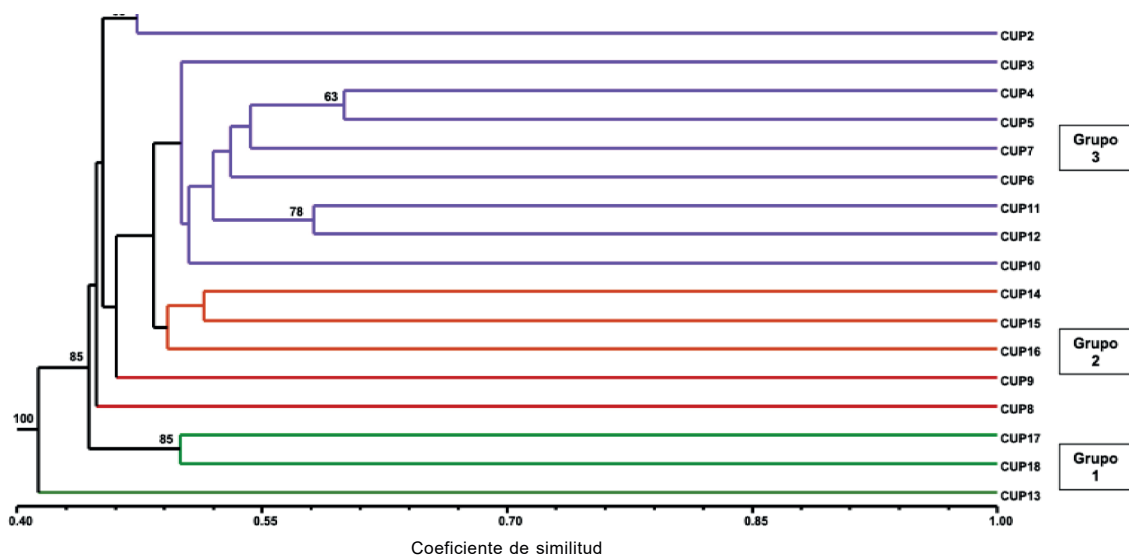


Fig. 2. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre 18 individuos de *Agave cupreata* pertenecientes a tres poblaciones de Guerrero, México. Los números indican el porcentaje de repeticiones de *bootstrap* obtenidas en cada nodo a partir de 1000 árboles re-muestreados (Identificación de los individuos: CUP1; CUP2; CUP3 y así sucesivamente).

Fig. 2. Dendrogram showing the genetic relationships among 18 individuals of *Agave cupreata* belonging to three populations from Guerrero, Mexico. The numbers indicate the percentage of *bootstrap* replications obtained at each node from 1000 resampled trees (Individual identification: CUP1; CUP2; CUP3, and so on).

Estos resultados coinciden con los de Martínez-Palacios *et al.* (2011), quienes, mediante un dendrograma UPGMA, no observaron un patrón geográfico claro y reportaron alta variabilidad genética. Asimismo, Avenaño-Arrazate *et al.* (2015) y Figueredo-Urbina *et al.* (2017) documentaron niveles elevados de variación genética y morfológica en poblaciones silvestres y cultivadas.

Diferenciación y diversidad genética

El AMOVA arrojó un valor de Φ_{ST} de 0,043 ($p = 0,0002$), lo que indica una diferenciación genética baja pero significativa entre las poblaciones (Tabla 3). La mayor parte de la variabilidad genética (96 %) se concentró dentro de las poblaciones, mientras que una fracción menor (4 %) se distribuyó entre ellas (Tabla 3). Esta baja diferenciación sugiere una alta variabilidad genética intrapoblacional y similitud entre poblaciones, asociadas con flujo génico, favorecido por la reproducción sexual de la especie (Wright, 1931).

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Aguirre-Dugua y Eguiarte (2013), para poblaciones naturales de *A. cupreata*, con 81 % de variación genética dentro de las poblaciones y 13 % entre ellas.

Tabla 3. Análisis de varianza molecular (AMOVA) en tres poblaciones de *Agave cupreata* mediante AFLP.

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) in three *Agave cupreata* populations using AFLP markers.

	gl	SCD	MSD	Varianza	Φ_{ST}	p-valor	% Varianza molecular
Entre poblaciones	2	570,983	285,491	10,953	0,043	0,0002	4
Dentro de poblaciones	15	3634,295	242,286	242,286			96
Total	17	4205,278					

Referencias: 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.

References: gl: degrees of freedom, SCD: sum of squared differences, MSD: mean squared deviations. p-values were derived from a random permutation test with 10 000 permutations.

Tabla 4. Estadísticas de diversidad genética de tres poblaciones de *Agave cupreata* de Guerrero, México.

Table 4. Genetic diversity statistics for three populations of *Agave cupreata* from Guerrero, Mexico.

Población	NA	NE	I
PB1	1,289 ± 0.026	1,476 ± 0,011	0,379 ± 0,009
PB2	0,972 ± 0.025	1,353 ± 0,014	0,245 ± 0,010
PB3	1,945 ± 0.009	1,652 ± 0,008	0,548 ± 0,005

Referencias: Número de alelos por locus (NA), número efectivo de alelos (NE) e índice de diversidad de Shannon (I). Los valores reportados corresponden a la media ± error estándar.

References: Number of alleles per locus (NA), effective number of alleles (NE), and Shannon's diversity index (I). The reported values correspond to the mean ± standard error.

En términos de diversidad genética (Tabla 4), los valores de NA obtenidos en este estudio son inferiores a los reportados por Figueredo-Urbina *et al.* (2017), quienes, empleando microsatélites como marcadores moleculares, obtuvieron valores de NA entre 4,40 y 3,25 para poblaciones silvestres y cultivadas, respectivamente. De manera similar, Martínez-Palacios *et al.* (2011), reportaron un valor de NA de 2,9. Los valores inferiores de NA obtenidos en este estudio podrían sugerir una menor diversidad genética en las poblaciones analizadas en comparación con las de los estudios citados. En cuanto al número efectivo de alelos (NE), también se observó que los valores obtenidos en el presente trabajo fueron inferiores a los reportados por Figueredo-Urbina *et al.* (2017), quienes encontraron valores de NE entre 2,46 y 2,34 en las poblaciones analizadas.

El índice de diversidad de Shannon (I) obtenido para la PB3 fue de 0,548, lo que sugiere una diversidad genética relativamente alta; este valor podría deberse en parte al mayor tamaño de muestra de PB3 en comparación con las otras poblaciones.

Estructura genética

Se observaron patrones de diferenciación genética entre las poblaciones de *A. cupreata*, de acuerdo con el análisis realizado en el programa Structure. La estimación del valor ΔK según el método de Evanno *et al.* (2005), mostró un pico más alto en $K = 2$ (Fig. 3 A y B), lo que indica que pueden integrarse en dos grupos según las diferencias en su composición genética (Fig. 3 C). Cabe aclarar que la inferencia podría verse limitada por el reducido tamaño de muestra de PB1 y PB2 ($n = 3$ y $n = 2$, respectivamente).

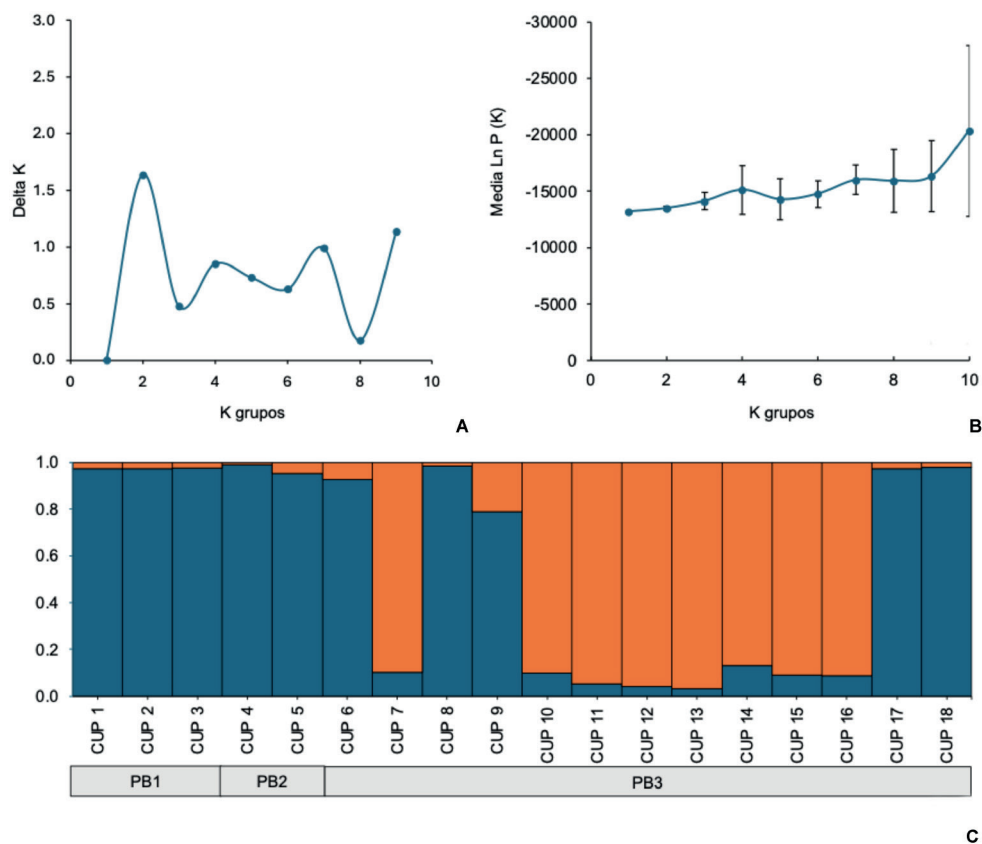


Fig. 3. A) Valores de delta K (ΔK). **B)** Probabilidad posterior promedio ($[\text{LnP}(K)]$) de la estructura genética de tres poblaciones de *Agave cupreata* de Guerrero, México. Valores desde $K = 1$ hasta $K = 10$. **C)** Análisis Structure con $K = 2$ realizado con base en 1214 fragmentos AFLP, el color representa la proporción de la probabilidad de pertenecer a cada grupo genético. PB1: Población 1, PB2: Población 2, PB3: Población 3.

Fig. 3. A) Delta K values (ΔK). **B)** Mean posterior probability $[\text{LnP}(K)]$ of the genetic structure of three populations of *Agave cupreata* from Guerrero, Mexico. Values from $K = 1$ to $K = 10$. **C)** Structure analysis with $K = 2$ based on 1214 AFLP fragments, colors represent the proportion of membership probability to each genetic group. PB1: Population 1, PB2: Population 2, PB3: Population 3.

Tabla 5. Heterocigosidad esperada (HE) y valor esperado de F_{ST} calculados para dos grupos genéticos de *Agave cupreata* mediante el software Structure.

Table 5. Expected heterozygosity (HE) and expected F_{ST} value calculated for two genetic groups of *Agave cupreata* using the Structure software.

	HE	F_{ST}
Grupo 1	0,3966	0,599
Grupo 2	0,4102	0,0039
Media	0,4034	0,301

En la PB3, fue observado un patrón mixto de estructura, lo que sugiere flujo genético. Este patrón podría explicarse por el hecho de que la especie se reproduce sexualmente, siendo polinizada principalmente por murciélagos (Flores-Torres y Galindo-Escamilla, 2017). La quiropterofilia, en combinación con las características florales que favorecen la alogamia de *A. cupreata* (Illsley *et al.*, 2007), podrían constituir un factor clave en la variabilidad genética. También, la poliploidía, presente en el 70 % de las especies de *Agave*, podría contribuir significativamente a esta diversidad, según lo reportado por Palomino *et al.* (2012) y Figueredo-Urbina *et al.* (2015).

Los valores de HE (Tabla 5) indican una diversidad genética moderada para los dos grupos genéticos definidos con Structure. Cabe mencionar, que los valores de HE pueden diferir de acuerdo con el marcador molecular utilizado. Figueredo-Urbina *et al.* (2017), obtuvieron, mediante microsatélites, valores de HE de 0,480 en poblaciones cultivadas y 0,510 en poblaciones silvestres; Martínez-Palacios *et al.* (2011), también para *A. cupreata*, reportaron un valor de HE de 0,467. En contraste, Aguirre-Dugua y Eguiarte (2013), reportaron valores menores de HE, entre 0,250 y 0,308, utilizando ISSR en cinco poblaciones provenientes de Guerrero y Michoacán. Debido a la escasa disponibilidad de estudios de diversidad genética en *A. cupreata*, y en particular a la ausencia de trabajos que utilicen marcadores AFLP, se realizó una comparación con resultados obtenidos mediante otros tipos de marcadores moleculares. Si bien estos valores no son estrictamente comparables debido a diferencias metodológicas, permiten contextualizar los niveles de diversidad genética observados en este estudio, los cuales se ubican dentro del rango reportado para la especie.

El valor promedio de F_{ST} obtenido en este estudio (0,301), sugiere un nivel moderado de diferenciación genética entre las poblaciones analizadas. Este valor es superior al promedio de 0,104 reportado anteriormente en poblaciones silvestres por Eguiarte *et al.* (2013). A su vez, el valor de 0,58 de flujo génico (Nm) indica que las poblaciones estudiadas están moderadamente estructuradas con diferenciación genética entre ellas, un patrón similar al reportado previamente ($Nm = 0,771$) por Aguirre-Dugua y Eguiarte (2013).

De acuerdo con Wright (1931), cuando el valor de Nm es mayor a 1, este es suficientemente alto para reducir la diferenciación genética, homogeneizando las poblaciones. En conjunto, los resultados del AMOVA, el análisis de estructura y el flujo génico muestran que la variación genética se concentra principalmente dentro de las poblaciones, mientras que la diferenciación entre ellas es baja pero significativa. El valor de Nm sugiere un intercambio genético moderado, suficiente para mantener similitud genética entre poblaciones, pero que no impide su diferenciación.

Aunque el tamaño de muestra en esta investigación es menor que el utilizado en otros estudios, se ha demostrado que los AFLP son marcadores eficientes para estimaciones de diversidad genética, incluso con pocos individuos (Rodríguez-Peña *et al.*, 2018). Como ejemplo, Morales-Nieto *et al.* (2020), utilizaron un tamaño de muestra de 10 individuos por población en *Pinus engelmannii*, obteniendo estimaciones robustas de diversidad genética. De manera similar, en *Impatiens parviflora* se evaluó la diversidad y estructura genética usando ocho pares de cebadores en cinco individuos por población (Jocienè *et al.*, 2022). Lo anterior permite afirmar que, siempre que se analice un número suficiente de loci, los estudios de estructura genética pueden llevarse a cabo sin comprometer la validez de los resultados (Nei, 1978).

Los resultados sugieren que las poblaciones naturales de *A. cupreata* mantienen alta variación genética; sin embargo, la utilización constante de los recursos sin un manejo adecuado podría amenazarla a largo plazo

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran alta variabilidad genética dentro de las poblaciones de *A. cupreata* y una diferenciación moderada entre ellas. El análisis de estructura genética identificó dos grupos genéticos, de acuerdo con los patrones de variación observados. Esto evidencia la importancia de conservar la diversidad genética de la especie como base para el diseño de estrategias de conservación y manejo sostenible, considerando la presión de extracción sobre las poblaciones naturales utilizadas en la producción de mezcal.

AGRADECIMIENTOS

EBR y MJGC agradecen el apoyo recibido del Programa de Estancias Posdoctorales por México, convocatorias 2022 (3) y 2023 (1), de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI). Asimismo, se reconoce el financiamiento otorgado a los proyectos FORDECYT 292474 y CF-2023-I-1877 por parte de la SECIHTI.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham-Juárez, M. J., Ramírez-Malagón, R., Gil-Vega, K. del C. y Simpson, J. (2009). AFLP analysis of genetic variability in three reproductive forms of *Agave tequilana*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32 (3): 171-175.
- Aguirre-Dugua, X. y Eguiarte, L. E. (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>
- Álvarez-Holguín, A., Morales-Nieto, C. R., Corrales-Lerma, R., Prieto-Amparán, J. A., Iracheta-Lara, I. Z. y Hernández-Quiroz, N. S. (2023). Genetic structure and environmental aptitude of sideoats grama [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.] populations in Chihuahua, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 13 (3): 830-845. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v13i3.5730>
- Al-Kiyyam, M., Shibli, R. A., Zatimeh, A., Tahtamouni, R. W., AlQudah, T. S. y Hassan, S. (2024). Evaluation of genetic diversity in Jordanian *Solanum nigrum* plants and genetic stability of *in vitro* grown plants using AFLP technique. *Jordan Journal of Biological Sciences* 17 (1): 123-128. <https://doi.org/10.54319/jjbs/170111>
- Avendaño-Arrazate, C. H., Iracheta-Donjuan, L., Gódinez-Aguilar, J. C., López-Gómez, P. y Barrios-Ayala, A. (2015). Caracterización morfológica de *Agave cupreata*, especie endémica de México. *Phyton* 84: 148-162.
- Ballesteros-Rodríguez, E., Escalante-Erosa, F. y 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/mxjb.2022.7.2.1>
- Ballesteros-Rodríguez, E. y 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>
- Bidyananda, N., Jamir, I., Nowakowska, K., Varte, V., Vendrame, W. A., Devi, R. S. y Nongdam, P. (2024). Plant genetic diversity studies: Insights from DNA marker analyses. *International Journal of Plant Biology* 15: 607-640. <https://doi.org/10.3390/ijpb15030046>
- Cabrera-Toledo, D., Vargas-Ponce, O., Ascencio-Ramírez, S., Valadez-Sandoval, L. M., Pérez-Alquicira, J., Morales-Saavedra, J. y Huerta-Galván, O. F. (2020). Morphological and genetic variation in monocultures, forestry systems and wild populations of *Agave maximiliana* of Western Mexico: implications for its conservation. *Frontiers in Plant Science* 11: 817. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00817>

- Cheng, J., Huixia, K. y Shubin, D. (2020). Population genetic structure and gene flow of rare and endangered *Tetraena mongolica* Maxim. revealed by reduced representation sequencing. *BMC Plant Biology* 20: 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02594-y>
- Colunga-GarcíaMarín, P. y Zizumbo-Villarreal, D. (2007). El tequila y otros mezcales del centro-occidente de México: domesticación, diversidad y conservación de germoplasma. En: P. Colunga-García Marín, A. Larqué-Saavedra, D. Zizumbo-Villarreal (Eds.), *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. México (pp. 113-131). México D.F.: CICY-CONACYT-CONABIO-SEMARNAT-INE.
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, A. C (COMERCAM). (2025). Informe estadístico 2025. Recuperado de: https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2025/06/INFORME_PUBLICO2025.pdf
- Echevarría-Machado, I., Sánchez-Cach, L. A., Hernández-Zepeda, C., Rivera-Madrid, R. y 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>
- Eguiarte, L. E., Aguirre-Planter, E., Aguirre, X., Colín, R., González, A., Rocha, M. y Souza, V. (2013). From isozymes to genomics: population genetics and conservation of *Agave* in Mexico. *The Botanical Review* 79: 483-506. <https://doi.org/10.1007/s12229-013-9123-x>
- Eguiarte, L. E., Jiménez Barrón, O. A., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., Gámez, N., Gasca-Pineda, J., Castellanos-Morales, J., Moreno-Letelier, A. y Souza, V. (2021). Evolutionary ecology of *Agave*: distribution patterns, phylogeny, and coevolution (an homage to Howard S. Gentry). *American Journal of Botany* 108 (2): 216-235. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1609>
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14 (8): 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Figueredo-Urbina, C. J., Álvarez-Ríos, G. D., García-Montes, M. A. y Octavio-Aguilar, P. (2021). Morphological and genetic diversity of traditional varieties of agave in Hidalgo State, Mexico. *PLoS ONE* 16 (7): e0254376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254376>
- Figueredo-Urbina, C. J., Casas, A., González-Rodríguez, A., Nassar, J. M., Colunga-García Marín, P. y Rocha-Ramírez, V. (2015). Genetic structure of coexisting wild and managed agave populations: implications for the evolution of plants under domestication. *AoB PLANTS* 7: plv114. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv114>

- Figueredo-Urbina, C. J., Casas, A. y Torres-García, I. (2017). Morphological and genetic divergence between *Agave inaequidens*, *A. cupreata* and the domesticated *A. hookeri*. Analysis of their evolutionary relationships. *PLoS ONE* 12 (11): e0187260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187260>
- Flores-Torres, A. y Galindo-Escamilla, A. (2017). Pollination biology of *Agave horrida* (Agavaceae) in the Chichinautzin mountain range, Central Mexico. *Botanical Sciences* 95 (3): 423-431. <https://doi.org/10.17129/botsci.1022>
- Gort, G., van Hintum, T. y van Eeuwijk, F. (2009). Homoplasy corrected estimation of genetic similarity from AFLP bands, and the effect of the number of bands on the precision of estimation. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 397-416. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1047-9>
- Guo, G., Tang, L. y Xu, Y. (2024). Genetic diversity and population genetic structure of *Jatropha curcas* L. accessions from different provenances revealed by amplified fragment-length polymorphism and inter-simple sequence repeat markers. *Forests* 15: 1575. <https://doi.org/10.3390/f15091575>
- Hillis, D. M. y Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42 (2): 182-192. <https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182>
- Illsley, C., Vega, E., Pisanty, I., Tlacotempa, A., García, P., Morales, P., Rivera, G., García, J., Jiménez, V., Castro, F. y Calzada, M. (2007). Maguey papalote: hacia el manejo campesino de un recurso colectivo en el trópico seco de Guerrero, México. En: P. Colunga-GarcíaMarín, L. Eguiarte, A. Larqué, D. Zizumbo-Villarreal (Eds.), *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. México (pp. 319-338). México D.F: CICY-CONACYT-CONABIO-SEMARNAT-INE.
- Jocienė, L., Stravińskaite, K., Krokaitė, E., Janulionienė, R., Rekašius, T., Paulauskas, A., Marozas, V. y Kupčinskienė, E. (2022). AFLP based genetic structure of Lithuanian populations of small balsam (*Impatiens parviflora* DC.) in relation to habitat characteristics. *Forests* 13 (8): 1228. <https://doi.org/10.3390/f13081228>
- Lara-Ávila, J. P. y Alpuche-Solís, A. G. (2016). Análisis de la diversidad genética de agaves mezcaleros del centro de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39 (3): 323-330. <https://doi.org/10.35196/rfm.2016.3.323-330>
- Li, M., Hu, R., Huang, W., Chen, T., Xie, W., Xie, H., Luo, X. y Lai, M. (2024). Genetic diversity and population structure analysis of *Pinus elliottii* germplasm resources in Jiangxi Province. *Life* 14: 1401. <https://doi.org/10.3390/life14111401>
- Martínez-Palacios, A., Gómez-Sierra, J. M., Sáenz-Romero, C., Pérez-Nasser, N. y Sánchez-Vargas, N. (2011). Diversidad genética de *Agave cupreata* Trel. & Berger: consideraciones para su conservación. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34 (3): 159-165.

- Morales-Nieto, C. R., Siqueiros-Candia, M., Álvarez-Holguín, A., Corrales-Lerma, R., Alarcón-Bustamante, M. y Martínez-Salvador, M. (2020). Estructura y diversidad genética en poblaciones de *Pinus engelmannii* Carr. en Chihuahua, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 43 (2): 197-204. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.2.197-204>
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89 (3): 583-590. <https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583>
- Nei, M. y Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76 (10): 5269-5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- Palomino, G., Martínez, J., Cepeda-Cornejo, V. y Pimienta-Barrios, E. (2012). Nuclear genome size and cytotype analysis in *Agave cupreata* Trel. & Berger (Agavaceae). *Caryologia* 65 (4): 281-294. <https://doi.org/10.1080/00087114.2012.752915>
- Peakall, R. y 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>
- Pritchard, J. K., Stephens, M. y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2): 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Raya, F. T., de Carvalho, L. M., José, J., da Cruz, L. P., Almeida, R. L., Delevatti, H. A., Silveira, N. M., da Silva, S. F., Pissolato, M. D., de Oliveira, A. B., dos Reis, W. J. V., de Abreu, L. G. F., Gutiérrez, J., Carazzolle, M. F., Soares, A. C. F., Nieto Sotelo, J., Ribeiro, R. V. y Pereira, G. A. G. (2023). Rescuing the Brazilian *Agave* breeding program: morphophysiological and molecular characterization of a new germplasm. *Frontiers in Chemical Engineering* 5: 1218668. <https://doi.org/10.3389/fceng.2023.1218668>
- Rivera-Lugo, M., García-Mendoza, A., Simpson, J., Solano, E. y 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: 969-979. <https://doi.org/10.1007/s00606-018-1525-0>
- Rodríguez-Peña, R. A., Johnson, R. L., Johnson, L. A., Anderson, C. D., Ricks, N. J., Farley, K. M., Robbins, M. D., Wolfe, A. D. y Stevens, M. R. (2018). Investigating the genetic diversity and differentiation patterns in the *Penstemon scariosus* species complex under different sample sizes using AFLPs and SSRs. *Conservation Genetics* 19: 1335-1348. <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1103-6>

- Rohlf, F. J. (2000). NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system (Version 2.20). Applied Biostatistics, Exeter Publishing Ltd., New York, USA. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/285632506_NTSYSpc_Version_20_User_Guide
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. y 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>
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159. <https://doi.org/10.1093/genetics/16.2.97>
- Yorisue, T., Iguchi, A., Yasuda, N., Yoshioka, Y., Sato, T. y Fujita, Y. (2020). Evaluating the effect of overharvesting on genetic diversity and genetic population structure of the coconut crab. *Scientific Reports* 10: 10026. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66712-4>
- Zhang, C., Sun, M., Zhang, X., Chen, S., Nie, G., Peng, Y., Huang, L. y Ma, X. (2018). AFLP-based genetic diversity of wild orchardgrass germplasm collections from Central Asia and Western China, and the relation to environmental factors. *PLoS ONE* 13 (4): e0195273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195273>