



Genetic variability of maguey pulquero (*Agave* spp.) in the Otomi-Huitzilapan region, State of Mexico

Variabilidad genética de maguey pulquero (*Agave* spp.) en la región Otomí-Huitzilapan, Estado de México

Elia Ballesteros-Rodríguez^{id}, Fabiola Escalante-Erosa, Lorenzo Felipe 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.

*Corresponding author

E-mail address: santey@cicy.mx (L. F. Sánchez-Teyer)

Article history:

Received: 16 November 2021 / Received in revised form: 21 January 2022 / Accepted: / 5 February 2022 / Published online: 1 April 2022.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2022.7.2.1>

ABSTRACT

Pulquero maguey has been related to the cultural inheritance of Otomi-communities since pre-Hispanic times. In the last 30 years, a gradual disappearance of pulquero maguey has been observed in the Otomi-Huitzilapan region, located in the State of Mexico, Mexico, thus, it is of great interest to analyze the genetic variability of this kind of maguey for future identification, monitoring and conservation purposes. This work had as objective to determine the genetic variability of the pulquero maguey individuals of the Otomi-Huitzilapan region using AFLP technique and the qualitative carbohydrate characterization present in the leaves juice employing high-performance thin layer chromatography (HPTLC). Of the selective amplification with six primer combinations, a total of 890 AFLP markers was obtained with 82.3% polymorphic. Identified carbohydrates such as fructose, glucose, sacarose, 1-kestose and nystose coincide with the ones reported in other *Agave* species. The results obtained make it possible to initially

quantify the variation existing in the plants evaluated. The carbohydrate profile signals that the pulquero maguey could be used in alternative industrial purposes.

Keywords: AFLP, carbohydrates, molecular marker, polymorphism.

RESUMEN

El maguey pulquero ha estado ligado a la herencia cultural de las comunidades otomíes desde tiempos prehispánicos. En los últimos 30 años se ha observado en la región Otomí-Huitzilapan, Estado de México, la desaparición paulatina de la población de magueyes, por lo que resulta de interés analizar su variabilidad genética con fines de identificación, monitoreo y conservación. El objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad genética de individuos de maguey pulquero de la región Otomí-Huitzilapan mediante la técnica de AFLP y la caracterización cualitativa de los carbohidratos presentes en el jugo de las hojas mediante la técnica de cromatografía en placa delgada de alta resolución (HPTLC). De la amplificación selectiva con seis combinaciones de cebadores seleccionadas, se obtuvo un total de 890 marcadores AFLP de los que 82.3% fueron polimórficos. Los carbohidratos identificados fructosa, glucosa, sacarosa, 1-kestosa y nistosa, coinciden con los reportados en otras especies de *Agave*. Los resultados obtenidos permitieron cuantificar de manera inicial la variación existente en las plantas evaluadas. El perfil de carbohidratos permite concluir que el maguey pulquero puede utilizarse para otros fines industriales.

Palabras clave: AFLP, carbohidratos, marcador molecular, polimorfismo.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, los otomíes ocupan el segundo lugar de población indígena en el Estado de México (INEGI, 2015) y se asientan, principalmente, en 21 municipios, la mayoría de ellos considerados de alta y media marginación. La región Otomí-Huitzilapan se ubica en el municipio de Lerma, en el Estado de México y se conforma por 11 pueblos relacionados entre sí, que poseen tierras en propiedad comunal (González-Ortiz, 2014). En la historia de las comunidades otomíes del Altiplano Central, el agave o maguey, como se le conoce comúnmente, ha jugado un papel preponderante por los múltiples usos de los que ha sido objeto; sin embargo, hoy en día se utiliza, sobre todo, para fines culinarios, para delimitar las parcelas de cultivo y, en muy contados casos, para la elaboración de pulque para autoconsumo.

De acuerdo con Alfaro *et al.*, (2007) existe una gran variedad de magueyes de los que se elabora pulque de diferente calidad, pero las especies de las que se obtiene el pulque en los estados de México, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala, así como en el valle de México, son: *A. salmiana*, *A. atrovirens* y *A. mapisaga* (Rzedowski & Calderón, 1990).

Los carbohidratos que almacenan el tallo y las hojas del maguey pulquero son importantes para la obtención de *aguamiel* (savia del maguey) que se utiliza para

la producción del pulque. El *aguamiel* que producen estas plantas es rico en sacarosa, fructosa, glucosa y polifruktanos (Valadez *et al.*, 2012; Peralta-García *et al.*, 2020). La caracterización de los compuestos presentes en los agaves ayuda a conocer su posible uso, en la salud como alimento funcional o ingrediente alimentario (Romero López *et al.*, 2015).

Aunque la elaboración de pulque ha estado ligada a la herencia cultural de las comunidades otomíes desde tiempos prehispánicos (Escalante *et al.*, 2016), en los últimos 30 años se ha observado en la región Otomí-Huitzizilapan la desaparición paulatina de la población de magueyes pulqueros, por lo que resulta de interés analizar su variabilidad genética con fines de identificación, monitoreo y conservación.

Los marcadores genéticos basados en ADN, tales como el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) y los microsatélites, se utilizan, frecuentemente, para la identificación de genotipos diferentes, así como para determinar relaciones genéticas entre los mismos, debido a que pueden caracterizar la variabilidad genética con mayor precisión y menor esfuerzo que los métodos morfológicos y de cariotipo (Chuang *et al.*, 2009). En este sentido, se considera que la técnica de AFLP permite la caracterización de ADN, sin importar su origen ni complejidad, de manera muy sensible y confiable, mediante la exploración rápida de los polimorfismos del genoma entero y la generación de un gran número de marcadores (Rojas *et al.*, 2007).

El conocimiento de la diversidad genética del maguey pulquero mediante marcadores moleculares basados en el ADN, según Figueredo-Urbina *et al.*, (2021), se limita a tan sólo cinco estudios, por lo que este trabajo se planteó como objetivo determinar la variabilidad genética de individuos de maguey pulquero de la región Otomí-Huitzizilapan, en el Estado de México, mediante la técnica de AFLP, con la finalidad de desarrollar estrategias de monitoreo y conservación. Adicionalmente, este estudio incorpora una caracterización cualitativa de carbohidratos presentes en las hojas de los magueyes, con fines comparativos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

La colecta de material se realizó en 10 parcelas no comerciales de Santa Cruz Huitzizilapan, comunidad perteneciente a la región Otomí-Huitzizilapan, ubicada en el municipio de Lerma, Estado de México (19° 23' 46.000" N; 99° 26' 57.998" O; 2750 m.s.n.m.).

Debido a que las plantas de maguey son recolectadas de su hábitat natural por parte de los productores de pulque de la región y establecidas en hileras en los límites de sistemas de milpas en ladera, se contó con el permiso de los productores para muestrear 20 plantas de maguey pulquero (*Agave spp.*) de 40 cm de altura, sanas y de plantas madres diferentes.

2.2. Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo según el método propuesto por Echevarría-Machado *et al.* (2005). La concentración se cuantificó con base en la lectura de absorbancia a 260 nm y la pureza se determinó en cada muestra por medio de las relaciones A260/A280 y A260/A230 por espectrofotometría (NanoDrop 1000[®], Thermo Scientific), la integridad fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

2.3. Desarrollo de AFLPs

El desarrollo de AFLPs se realizó según lo descrito por Vos *et al.*, (1995) con ligeras modificaciones. Se digirieron aproximadamente 300 ng de ADN genómico con enzimas de restricción 1U MseI y 4U EcoRI (New England Biolabs[®]) en una reacción de 20 μ L. La reacción de ligación se desarrolló con 20 μ L de ADN previamente digerido, 1x T4 ADN buffer ligasa (Invitrogen[®]), 5 pmol de adaptadores EcoRI, 50 pmol de adaptadores MseI y 1U T4 ADN ligasa (Invitrogen[®]) en una reacción de 30 μ L. La reacción de pre-amplificación se llevó a cabo con 12.5 μ L de la dilución 1:10 (v:v) del producto de ligación, buffer de PCR 10x, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 pmol cebador MseI, 1 pmol cebador EcoRI, y 0.5U Taq ADN polimerasa (Invitrogen[®]) en una reacción de 50 μ L.

La amplificación selectiva se realizó con 5 μ L de la dilución 1:10 (v:v) del producto de pre-amplificación, buffer de PCR 1x, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, cebador selectivo MseI 10.67 mM (Sigma-Aldrich[®]) sin marcaje con tres nucleótidos seleccionados por el usuario, cebador EcoRI selectivo 2.5 mM (Sigma-Aldrich[®]) marcado con colorante Well RED (D2, D3, D4) con tres nucleótidos selectivos y 0.5U Taq ADN polimerasa (Invitrogen[®]). Se probaron 10 combinaciones de cebadores EcoRI/MseI y se seleccionaron seis con base en el nivel de polimorfismo observado (Tabla 1). Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador Applied Biosystems 2720[®].

Las condiciones PCR fueron: 5 min a 94 °C; 16 ciclos de "touch-down" de 45 s a 94°C, 45 s a 60 °C (disminución de 0.5 °C por ciclo) y 30 s a 72 °C; 16 ciclos continuos de 45 s a 94°C, 45 s a 52°C y 30 s a 72°C y; 7 min a 72 °C. Posteriormente, se tomaron 25 μ L de solución de carga de muestra (SLS, Genome Lab[®], N° 608082), y a esta solución se agregaron 0.25 μ L de STD 400 (DNA Size Standard Kit-400 GenomeLab[®], N° 608098) y 2 μ L de muestra diluida (2 μ L de producto de amplificación selectiva más 3 μ L de formamida SLS) y una gota de aceite mineral para preparar la placa que se corrió en un secuenciador de ADN (Beckman CEQ 8800[®]).

Tabla 1. Cebadores de amplificación selectiva de AFLP utilizados.
Table 1. AFLP selective amplification primers.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Cebador	Secuencia (5'-3')
EcoRI		MseI	
*ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'	CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
*ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'	CTT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'
*ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
*AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'	CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
*AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'	CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
*ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	CTA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
ACT	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'	CTA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3
ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3
ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCACG-3'	CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3
AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'	CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3

*Combinaciones seleccionadas

2.4. Análisis de datos

Se utilizó el software Gene Marker[®] v 1.75 para obtener los perfiles polimórficos. 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 260 pb, estimados con base en el marcador de STD 400 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 & Li (1979). El dendrograma se obtuvo mediante el coeficiente de Dice, utilizando como método de agrupamiento UPGMA del software NTSYSpc[®] Version 2.20N, sobre la base de los 890 marcadores AFLP generados con seis combinaciones de cebadores. El número en los puntos de unión correspondieron al valor de robustez que soporta al nodo después de 1000 réplicas, se calcularon con el software Free Tree[®] Version 0.9.1.50. Los individuos se numeraron de 1P a 20P.

2.5. Identificación de carbohidratos

La preparación de las muestras consistió en cortar 1.5 cm a partir de la base de una hoja de cada planta, retirar la epidermis (parte verde) y extraer el jugo mediante estrujado colectándolo en tubos de 5 mL. El jugo reposó durante 30 minutos y, posteriormente, fue clarificado mediante centrifugación a 13,000 g (RCF, fuerza centrífuga relativa) durante 5 minutos; la solución sobrenadante fue transferida a tubos de 1.5 mL y almacenada a -3 °C.

El análisis de carbohidratos del jugo clarificado de maguey se realizó mediante la técnica de cromatografía en placa delgada de alta resolución (HPTLC). Las muestras fueron cargadas, utilizando un equipo CAMAG® (modelo Linomat 5-200150, S/N 200150), sobre cromatoplasas grado HPTLC con base aluminio de 20 × 10 cm (silica gel 60F254, Merck®). El desarrollo de las cromatoplasas se ajustó al método propuesto por CAMAG® con las siguientes modificaciones: i) como fase móvil se utilizó una mezcla de n-butanol/isopropanol/agua acidulada con ácido fórmico (10µL:mL) (3:5:1 v/v/v) con elución doble; ii) para la visualización de las bandas se utilizó como agente revelador una mezcla de etanol:H₂SO₄:anisaldehído (18:1:1). Se dejó correr la solución reveladora sobre la placa de manera homogénea y después se calentó a 75 °C durante 20 min hasta la visualización de las bandas coloridas. Las bandas de las muestras correspondientes a los estándares de referencia fructosa, glucosa, sacarosa, 1-kestosa y nistosa (f, g, s, 1-k y n) de Sigma-Aldrich® fueron identificadas de acuerdo con la relación de flujo (R_F). Los porcentajes de área fueron obtenidos mediante densitometría a una absorbancia de 400 nm utilizando el software winCATS®.

Para el análisis de carbohidratos, se generó una matriz binaria sobre los porcentajes de área obtenidos mediante densitometría a una absorbancia de 400 nm, en la que se asignó el valor de 1 a la presencia y 0 a la ausencia, se obtuvo un dendrograma mediante el coeficiente de Dice, utilizando como método de agrupamiento UPGMA del software NTSYSpc® Version 2.20N.

3. RESULTADOS

De la amplificación selectiva con seis combinaciones de cebadores seleccionadas, se obtuvo un total de 890 marcadores AFLP en un rango de 60 a 260 pb, de los que 732 (82.3%) fueron polimórficos, y en promedio se generaron 148 marcadores por combinación. Las combinaciones de cebadores que presentaron el mayor porcentaje de polimorfismo fueron EcoRI-AAC/MseI-CAG, EcoRI-AAC/MseI-CAT y EcoRI-ACG/MseI-CTA. El mayor polimorfismo se observó con la combinación AAC/CAG, con 186 bandas totales y 93% de polimorfismo. En contraste, las combinaciones ACA/CTT y ACG/CAT registraron 88 y 109 bandas totales, respectivamente, y polimorfismo de 63% (Tabla 2). Sólo 158 bandas fueron comunes entre los individuos y 117 fueron bandas específicas (Tabla 2). Los valores de polimorfismo indican que los individuos de maguey pulquero presentan alta variabilidad genética.

Tabla 2. Niveles de polimorfismo en 20 individuos de maguey pulquero para cada combinación de cebadores empleados en el análisis AFLP.

Table 2. Polymorphism levels in 20 maguey pulquero individuals for each primer combination used in the AFLP analysis.

Índices	Combinaciones de cebadores AFLP						Total
	ACA/ CAG	ACA/ CTT	ACG/ CAT	AAC/ CAT	AAC/ CAG	ACG/ CTA	
No. total de bandas	159	88	109	184	186	164	890
Bandas Polimórficas	129	55	69	165	173	141	732
Bandas monomórficas	30	33	40	19	13	23	158
Bandas específicas	27	5	11	24	25	25	117
% Polimorfismo	81	63	63	90	93	86	82

3.1. Índice de similitud

Los valores del IS fueron de 0.56 a 0.84 con 94.2% de los individuos, ubicándose en un rango de 0.56 a 0.69 y promediando un valor de 0.62. El dendrograma obtenido representa dos grupos con subgrupos entre los individuos, con excepción de los individuos 15P, 16P, 3P y 4P que se apartan notoriamente (Fig. 1).

3.2. Identificación de carbohidratos

Con el fin de comprender la composición de carbohidratos, enfocado a una selección posterior de individuos útiles para la producción de pulque, se evaluaron de manera cualitativa los perfiles de carbohidratos, los cuales fueron separados con HPTLC e identificados mediante estándares correspondientes a f, s, 1-k y n, resultando perfiles similares en las muestras, y con fructosa como componente mayoritario. En las muestras 2, 5 y 18 la fructosa fue el único componente detectable, mientras que en las muestras 13, 16 y 19 se presentaron, además de fructosa, cantidades mínimas de 1-kestosa y nistosa. Las muestras 1, 4, 8, 9 y 12 presentaron el mayor contenido de 1-k y la muestra 12 el mayor contenido de nistosa. Las muestras 1, 3, 6, 9 y 11 presentaron carbohidratos con mayor grado de polimerización (inulinas) que permanecieron en la línea de aplicación (Fig. 2).

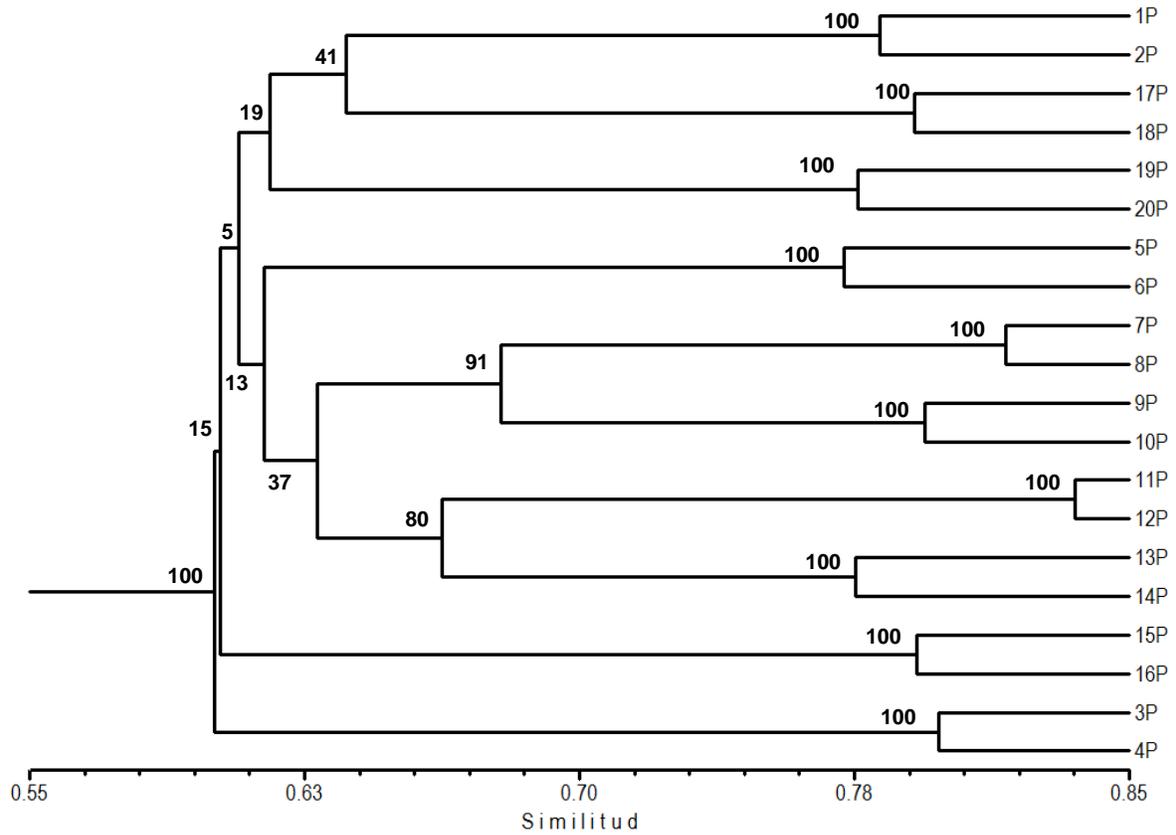


Fig. 1. Dendrograma de 20 individuos de maguey pulquero generado por la técnica AFLP.

Fig. 1. Dendrogram of 20 maguey pulquero individuals generated by the AFLP technique.

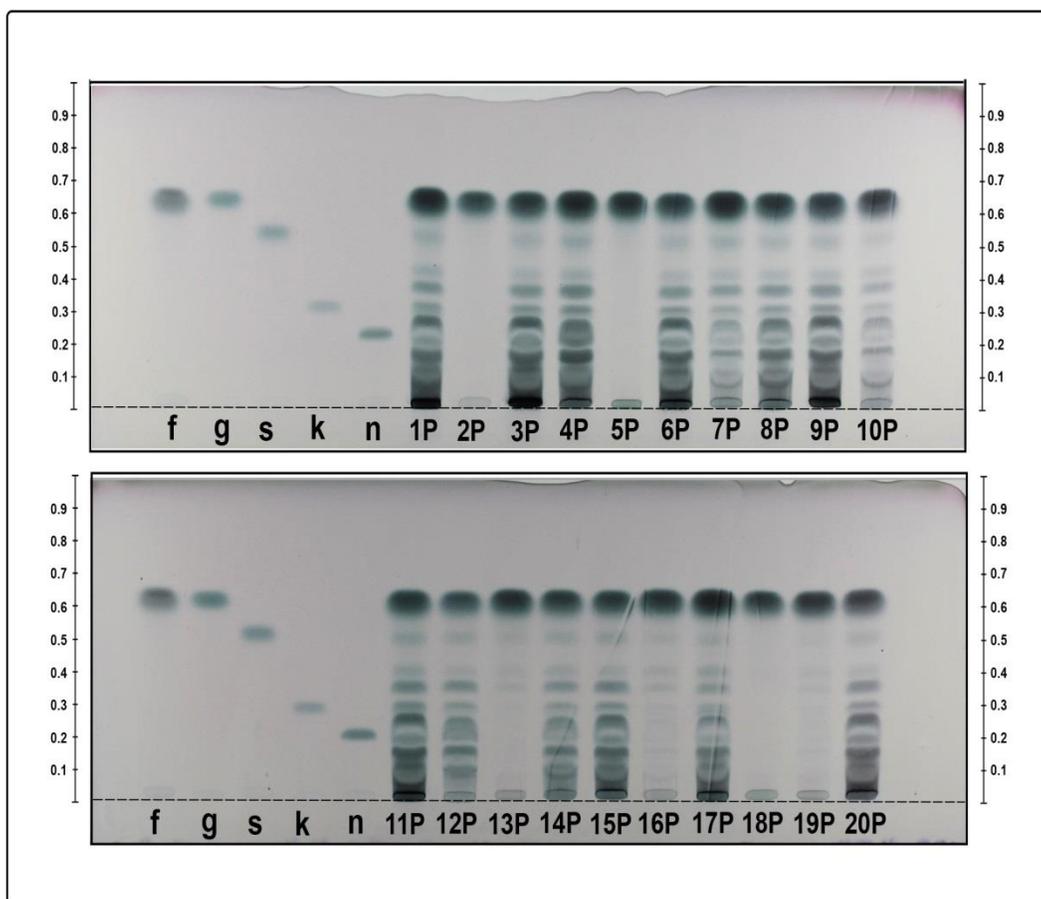


Fig. 2. Perfil cromatográfico por HPTLC de carbohidratos del jugo de maguey (estándares de referencia: f-fructosa, g-glucosa, s-sacarosa, 1-k-kestosa, n-nistosa).

Fig. 2. HPTCL carbohydrates chromatographic profile obtained from maguey juice (reference standards: f-fructose, g-glucose, s-sucrose, 1-k-kestose, n-nystose).

En el dendrograma obtenido se observaron tres grupos, el grupo I formado por individuos de maguey pulquero que presentaron f, g, s, 1-k, n; el grupo II de individuos con cantidades de nistosa no detectables y; el grupo III con cantidades de s, 1-k y nistosa no detectables (Fig. 3).

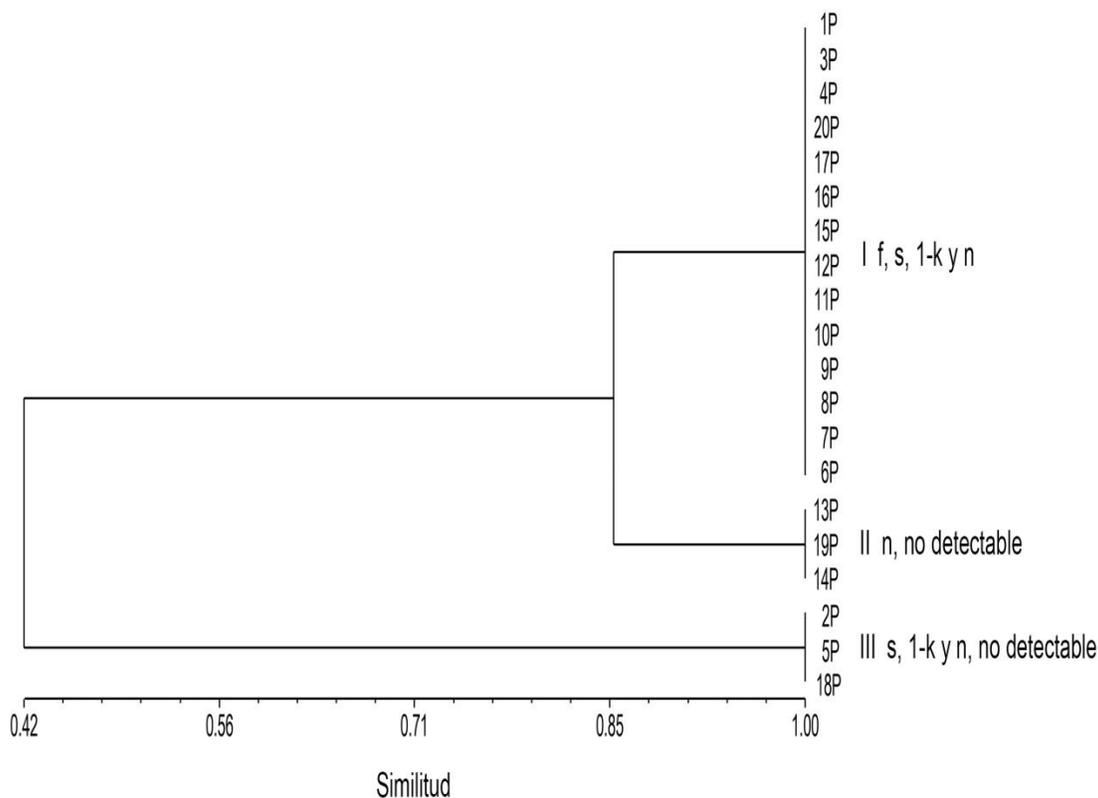


Fig. 3. Dendrograma de carbohidratos en 20 individuos de maguey (f-fructosa, g-glucosa, s-sacarosa, 1-k-kestosa y n-nistosa).

Fig. 3. Carbohydrates dendrogram in 20 maguey individuals (f-fructose, g-glucose, s-sucrose, 1-k-kestose and n-nystose).

4. DISCUSIÓN

Los valores obtenidos mediante AFLP indican una alta variabilidad genética entre los individuos de maguey pulquero evaluados; de acuerdo con Eguiarte *et al.*, (2013) el género *Agave* presenta altos niveles de variación genética. Lo anterior podría explicarse debido a que las plantas colectadas para este estudio fueron extraídas de su hábitat natural y establecidas en las parcelas de productores locales. De igual manera, el análisis sugiere una baja presión de selección, ya que la domesticación de especies silvestres, o la extracción recurrente de individuos involucra una reducción de la variación genética en poblaciones domesticadas en comparación con las silvestres (Doebley, 1989; Eguiarte *et al.*, 2013; Olsen & Wendel, 2013). Una alta diversidad genética en variedades silvestres de agave, en comparación con una disminución de la diversidad en variedades cultivadas

debido a la propagación vegetativa, ha sido reportada recientemente por Figueredo-Urbina *et al.*, (2021) en el estado de Hidalgo.

Los resultados de este estudio son similares a los de Álvarez-Ríos *et al.*, (2020) quienes utilizando la técnica de microsatélites, reportaron una alta diversidad genética en variedades de *A. salmiana*, *A. mapisaga* y *A. americana*; sin embargo, el presente análisis contradice lo publicado por Alfaro *et al.*, (2007) quienes encontraron, mediante la técnica RAPD, baja variabilidad genética en seis poblaciones de *A. salmiana* (var. ayoteco, manso y negro) y *A. mapisaga* (var. verde, carrizo y xilometl) del Estado de México, y a los estudios de Figueredo-Urbina *et al.*, (2017) en los que, con microsatélites, descubrieron bajos niveles de diversidad genética en *A. hookeri*, especie cultivada en el estado de Michoacán exclusivamente para la producción de pulque.

En otras especies de agaves, como es el caso de las mezcaleras, se ha reportado según la técnica de AFLP, una alta variabilidad genética en poblaciones silvestres de *A. salmiana* ssp. *crassispina* (Lara-Ávila & Alpuche-Solís, 2016). De igual manera, Rivera-Lugo *et al.*, (2018) encontraron altos niveles de polimorfismo en poblaciones silvestres de *A. angustifolia* var. *rubescens*, en comparación con *Agave tequilana* "Azul" y *A. angustifolia* "Sonora", que mostraron bajos niveles de polimorfismo atribuibles al nivel de manejo y propagación clonal empleados para obtener cultivos homogéneos.

Respecto a los grupos obtenidos en el dendrograma, las plantas 15P y 16P, y de manera notoria 3P y 4P, podrían ser producto de la cruce con otra especie de maguey que habita en la misma región, por lo que sería conveniente realizar estudios más profundos a nivel genético y morfológico de las poblaciones de magueyes pulqueros que se encuentran en los ecosistemas naturales de la región Otomí-Huitzilapan para determinar las especies y/o variedades presentes. Los carbohidratos identificados coinciden con lo reportado por García-Curbelo *et al.*, (2009), Salazar-Leyva *et al.*, (2016) y Godínez-Hernández *et al.*, (2016) donde la glucosa y fructosa no fueron detectadas en el jugo del tallo de *Agave salmiana*. Las diferencias en el perfil de carbohidratos podrían explicarse en función de la especie, el estado fisiológico y el órgano vegetal de extracción (Michel-Cuello *et al.*, 2021; Regalado Rentería *et al.*, 2021) y pueden ser útiles para seleccionar individuos, o líneas clonales de cultivo *in vitro* si se establecieran a través de propagación clonal como es el caso de diversos agaves en la industria de las bebidas alcohólicas. En este trabajo se determinó que existe variación en el perfil de carbohidratos de los individuos analizados, que permite de manera cualitativa identificar aquellos mayoritarios y agrupar los individuos con base en esas diferencias. Es necesario complementar el análisis con mediciones semicuantitativas y en diversos estadios de desarrollo.

Si bien el número de individuos incluidos en el análisis es bajo, estos son hijuelos de diversas plantas madre que se encuentran en crecimiento libre en su hábitat natural distribuido en toda la región. Una vez colectados, los productores los siembran en sus terrenos, por lo que pueden representar una muestra significativa de la diversidad existente dentro de dicho hábitat.

Los resultados en este estudio permitieron cuantificar, de manera inicial el nivel de variación existente entre individuos de maguey pulquero en la región otomí, siendo ésta la base para poder organizar un programa productivo de aprovechamiento del recurso genético, reduciendo la erosión genética causada por la extracción indiscriminada. La selección de individuos en el marco genético y perfiles de carbohidratos, de la mano con la propagación clonal son herramientas útiles para desarrollar una base con fines productivos de maguey pulquero en la región otomí.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento otorgado al proyecto CEAR 2018-02, del programa de Estancias Posdoctorales para Mujeres Mexicanas Indígenas en Ciencia, Tecnología, Ingenierías y Matemáticas del CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), 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. Los autores agradecen el apoyo técnico de la M.C. Miriam Monforte González, por el establecimiento de la técnica de HPTLC.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Alfaro G., Legaria J. & Rodríguez J. 2007. Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave spp.*) del nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30(1): 1-12.

Álvarez-Ríos G. D., Pacheco-Torres F., Figueredo-Urbina C. J. & Casas A. 2020. Management, morphological and genetic diversity of domesticated agaves in Michoacán, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 16 (3): 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13002-020-0353-9>.

CAMAG®. 2021. Quantification of carbohydrates in various matrices. <https://www.camag.com/applications/application-field/food-and-feed> Switzerland, (consultado Junio 10, 2021).

Chuang S., Chen C., Chen J., Chou W. & Sung J. 2009. Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. *Scientia Horticulturae*. 120(1): 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.09.020>.

Doebley J. F. 1989. Isozymic evidence and the evolution of crop plants. *In*: Soltis D. & Soltis P. (eds). *Isozymes in Plant biology*. Dioscorides Press. Portland, OR. pp 165– 191.

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>.

Eguiarte L. E., Aguirre-Planter E., Aguirre X., Colín R., González A., Rocha M., Scheinvar E., Trejo L. & Souza V. 2013. From isozymes to genomics: population genetics and conservation of *Agave* in México. *The Botanical Review*. 79: 483-506.

Escalante A., López Soto D. R., Velázquez Gutiérrez J. E., Giles-Gómez M., Bolívar F. & López-Munguía A. 2016. Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*. 7: 1-18.

Figueredo-Urbina C. J., Casas A. & 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): 1-24 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187260>.

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): 1-24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254376>.

García-Curbelo Y., López M. G. & Bocourt R. Fructanos en *Agave fourcroydes*, potencialidades para su utilización en la alimentación animal. 2009. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 43(2): 175-177.

Godínez-Hernández C. I., Aguirre-Rivera J. R., Juárez-Flores B. I., Ortiz-Pérez M. D. & Becerra-Jiménez J. 2016. Extraction and characterization of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 22(1): 59-72. <https://doi:10.5154/r.rchscfa.2015.02.007>.

González-Ortiz F. 2014. La región del colibrí y su carnaval metropolitano. *Indiana*. 31: 111-142.

INEGI. 2015. Estimaciones nacionales y por entidad federativa, México, <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/239923/04-estimaciones-nacionales-por-entidad-federativa.pdf> (consultado octubre 21, 2021).

Lara-Ávila J. P. & 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>.

Michel-Cuello C., Aguilar-Rivera N., López-Palacios C. & Cárdenas-González J. F. 2021. Fermentable carbohydrate metabolism in maguey mezcalero potosino

(*Agave salmiana*): HPLC characterization and evaluation. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 49(1): 1-14. <https://doi.org/10.15835/nbha49112154>.

Nei M. & Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76(10): 5269-5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>.

Olsen K. M. & Wendel J. F. 2013. A bountiful harvest: genomic insights into crop domestication phenotypes. *Annual Review of Plant Biology*. 64: 47-70. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120048>.

Peralta-García I., González-Muñoz F., Rodríguez-Alegría M. E., Sánchez-Flores A. & López-Munguía A. 2020. Evolution of fructans in aguamiel (*Agave Sap*) during the plant production lifetime. *Frontiers in Nutrition* 7: 1-15. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.566950>.

Regalado-Rentería E., Godínez-Hernández C. I., Aguirre-Rivera J. R., Camacho-Ruiz R. M., & Juárez-Flores B. I. 2021. Characterization of fructans from stems of *Agave salmiana* Otto ex Salm Dyck and *A. tequilana* F.A.C. Weber in full physiological maturity. *Botanical Sciences*. 99(2): 388-397. <https://doi.org/10.17129/botsci.2641>.

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: 969–979.

Rojas L., López J., Gómez-Kosky R. & Portal O. 2007. Empleo de los marcadores AFLP para la caracterización molecular de dos cultivos con interés agrícola. *Biotechnology Vegetal*. 7(2): 103-106.

Romero-López M. R., Osorio-Díaz P., Flores-Morales A., Robledo N. & Mora-Escobedo R. 2015. Composición química, capacidad antioxidante y el efecto prebiótico del aguamiel (*Agave atrovirens*) durante su fermentación *in vitro*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 14(2): 281-292.

Rzedowski R. J. & Calderón R. G. 1990. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología. Michoacán, México. pp 394.

Salazar-Leyva J. A., Osuna-Ruiz I., Rodríguez-Tirado V. A., Zazueta-Patrón I. E. & Brito-Rojas H. D. 2016. Optimization study of fructans extraction from *Agave tequilana* Weber azul variety. *Food Sci. Technol*. 36(4): 631-637. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.11216>.

Valadez B. R., Bravo V. G., Santos S. S., Velasco A. S. & Montville T. J. 2012. The artisanal production of pulque, a traditional beverage of the Mexican highlands. *Probiotics Antimicrobial Proteins*. 4: 140-144. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9096-9>.

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. *23 (21)*: 4407-4414.