

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA OBTENER ADN TOTAL DE *Phaseolus vulgaris* PARA ANÁLISIS DE ISTR

Alfonso Reyes-Martínez¹, Luis Gerardo Barriada-Bernal¹, Diana María Rivera-Rodríguez¹, Arnulfo Pajarito-Ravelero², Eli Amanda Delgado-Alvarado¹, Norma Almaraz-Abarca¹, Jesús Herrera-Corral¹, José Natividad Uribe-Soto¹, Néstor Naranjo-Jiménez¹

¹Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional
Sigma 119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, Durango, Durango, México, 34220

² Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP) de Durango
Km 4.5 Carretera Durango-El Mezquital, Durango, Durango, México

RESUMEN

Se modificaron y compararon dos métodos de CTAB para aislar ADN total a partir de tejido foliar de frijol variedad Pinto Saltillo. Diferencias en el proceso de trituración de los tejidos, concentración de los componentes de los reguladores de aislamiento y número de pasos de lavado del material genético producen diferencias significativas en la cantidad y la pureza del ADN obtenido. Del material genómico aislado por el método que permitió obtener la mayor cantidad (3996.249 ng/μL) y la mejor pureza ($A_{260}/A_{280} = 1.68$) de ADN, también fue posible amplificar secuencias ISTR.

ABSTRACT

Two CTAB methods to isolate DNA from foliar tissues of bean Pinto Saltillo were modified and compared. Differences in the tissue grinding, the isolation buffers composition, and in the number of wash steps of genetic material resulted in significant differences in the yield and purity of DNA isolated. From the DNA obtained by the method, which allowed obtaining the highest amount (3996.249 ng/μL) and purity ($A_{260}/A_{280} = 1.68$) of DNA, ISTR sequences were amplified by PCR.

INTRODUCCIÓN

Para la realización de estudios que involucran el uso de marcadores moleculares es necesario contar con protocolos de aislamiento de ADN que permitan obtener ese material en forma pura y en cantidad suficiente. De manera comercial existen kits que garantizan el aislamiento de ADN a partir de una gama muy amplia de especies; sin embargo, en muchos laboratorios de investigación se prefiere estandarizar los propios métodos según las especies particulares a estudiar, porque la cantidad y la calidad del ADN obtenido con los kits comerciales no siempre son las adecuadas, además de que su costo generalmente es elevado.

En la actualidad existen diferentes métodos para aislar ADN total de especies vegetales. Algunos de ellos consumen periodos largos de tiempo y son complicados, hacen uso de dos solventes orgánicos, como el fenol y el cloroformo, y de un proceso de diálisis para la purificación del ADN, como el desarrollado por Herrmann (1982); o el desarrollado por Palmer (1987), que es un poco más corto que el primero porque no incluye un paso de diálisis. Protocolos como el reportado por Rogers y Bendich (1988) son muy largos, porque requieren ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio durante 12 o 16 horas y pasos igualmente largos de diálisis para después eliminar de las muestras de ADN el cloruro de cesio.

La inclusión del detergente catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB por sus siglas en inglés) a los reguladores de extracción de ADN en vez del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS por sus siglas en inglés) por Shagai-Marroof et al. (1984) simplificó y redujo el tiempo empleado para aislar ADN de especies vegetales. El CTAB precipita los ácidos nucleicos como sales insolubles de CTAB en presencia de concentraciones bajas de cloruro de sodio, reduciendo la precipitación de polisacáridos y proteínas contaminantes, incluidas nucleasas, por lo que disminuye el riesgo de degradación del material genético (Shagai-Marroof et al., 1984).

Algunas especies son recalcitrantes para aislar ADN en forma pura, porque pueden contener altas cantidades de polisacáridos o de compuestos fenólicos, que son difíciles de separar del material genético (Tibbits et al., 2006; Cota-Sánchez et al., 2006) y que inhiben enzimas, como la ADN polimerasa que es requerida en las reacciones de PCR (reacción en cadena de polimerasa) (Kim et al., 1997). Para eliminar fenoles, se adicionan a los reguladores de aislamiento, compuestos como la polivinilpirrolidona (PVP), que absorbe esos compuestos, y también se adicionan sustancias caotróficas (desnaturalizantes) como el 2-mercaptoetanol, que inhibe la acción de enzimas fenoloxidasas (Scopes, 1994).

Phaseolus vulgaris es una especie que ha sido extensivamente manipulada para la generación de variedades. En México, uno de los centros de origen del género *Phaseolus*, existen más de 150 especies, de las cuales 50 se encuentran en México (Reyes et al., 2008); la mayoría de ellas ha sido caracterizada principalmente de manera morfológica y agronómica (Vidal-Barahona et al., 2006; Vargas-Vázquez et al., 2008). La caracterización molecular de variedades regionales y económicamente importantes de frijol se ha realizado para colecciones de Portugal (Coelho et al., 2009), de la Península Ibérica (Rodiño et al., 2006), y de Honduras (Guachambala-Cando y Rosas-Sotomayor, 2010). A pesar de la importancia del cultivo de esta especie en México, de la importancia que nuestro país tiene como centro de origen, lo valioso de los marcadores moleculares como parámetros de autenticidad de variedades, de monitoreo de pureza de variedades, y en el mejoramiento genético asistido, en México se han llevado a cabo pocos trabajos al respecto, entre ellos se encuentran los de Vidal-Barahona et al. (2006) y Vargas-Vázquez et al. (2008). Sin embargo, para que esos estudios puedan llevarse a cabo es necesario contar con métodos de aislamiento que permitan obtener ADN en calidad y cantidad adecuadas para poder ser amplificado por PCR o digerido por enzimas de restricción, y que sean accesibles en términos económicos y técnicos. En el presente trabajo se comparan los procedimientos de Keb-Llanes et al. (2002) y el Coelho et al. (2009), ambos con modificaciones, para aislar ADN de frijol. El ADN obtenido se amplificó con los marcadores moleculares ISTR (Inverse Sequence Tagged Repeat) para probar la eficiencia de cada método de aislamiento para estudios futuros de variabilidad genética basada en esos marcadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La variedad de frijol analizada, Pinto Saltillo, fue proporcionada por el Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP) de Durango. Diez semillas fueron germinadas y el material foliar fue colectado de cada una entre los 7 y 10 días después de la germinación.

Extracción de ADN

Modificación del protocolo de Coelho et al. (2009)

El ADN total de 10 plántulas se extrajo de manera individual a partir de tejido foliar (100 mg) pulverizado con nitrógeno líquido. Los tejidos pulverizados se combinaron con 800 µL de regulador de extracción, conteniendo CTAB al 2%, NaCl 1.4 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol al 2% y polyvinylpyrrolidone (PVP peso molecular 40 000) al 3%. Una diferencia

con el protocolo original de Coelho et al. (2009) es que esos autores adicionan 36 mg de PVP a los tejidos después de la adición de nitrógeno líquido y no como parte del regulador de extracción. Las muestras se incubaron a 65°C durante 60 minutos, después se combinaron con 600 µL de cloroformo, se agitaron y se centrifugaron (10 000 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente). El sobrenadante, fase acuosa conteniendo el ADN disuelto, se recuperó y se volvió a fraccionar con cloroformo. La fase acuosa resultante se combinó con 500 µL de isopropanol frío y se incubaron durante 30 min a -20°C para precipitar el ADN antes de centrifugarse (10 000 rpm durante 10 minutos). Se descartó el sobrenadante y la pastilla conteniendo el ADN se resuspendió en 300 µL de TE (Tris 10mM, EDTS 1mM) y 150 µL de NaCl 5M, después se adicionaron 900 µL de etanol absoluto frío, las muestras se incubaron a -20°C durante 30 minutos, se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µL de etanol al 75%. Este lavado con etanol es adicional al protocolo original de Coelho et al. (2009). Después de centrifugar a las condiciones ya señaladas, el sobrenadante se descartó, la pastilla de ADN se dejó secar a temperatura ambiente, y se resuspendió en 50 µL de TE.

Modificación del protocolo de Keb-Llanes et al. (2002)

El ADN total de 10 plántulas se extrajo de manera individual a partir de tejido foliar (100 mg), pulverizado con nitrógeno líquido. Los tejidos pulverizados se combinaron con 300 µL de regulador de extracción A (CTAB al 2%, Tris HCL 100 mM, pH 8.0, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, PVP 40 al 4%, ácido ascórbico al 0.1%, 2-mercaptoetanol 10 mM), 900 µL de regulador de extracción B (Tris-HCL 100 mM, pH 8.0, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM), y 100 µL de SDS 20%. Las muestras se incubaron a 65°C durante 30 minutos, después se combinaron con 410 µL de acetato de potasio 5M frío, y se centrifugaron (8000 rpm durante 15 minutos, a temperatura ambiente). Se recuperó el sobrenadante, se combinó con un volumen igual de cloroformo, se centrifugó a las condiciones ya señaladas y se recuperó la fase acuosa. La adición de cloroformo es una modificación al protocolo original de Keb-Llanes et al (2002). La fase acuosa se combinó con 800 µL de isopropanol frío y se incubó a -20°C durante 30 minutos para precipitar el ADN. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla, conteniendo el ADN se resuspendió en 800 µL de TE, 70 µL de acetato de sodio 3M (pH 5.2), y 500 µL de isopropanol (-20°C), después se incubó durante 60 minutos a -20°C. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos, la pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente antes de resuspenderse en 50 µL de TE

Cuantificación del ADN obtenido

La determinación de la cantidad de ADN obtenido se realizó de manera espectrofotométrica. Se tomaron 4 µL de cada solución individual de ADN y se combinaron con 996 µL de agua inyectable (dilución 1/250). Se determinaron los valores de absorbancia a 260 nm (A_{260}). La concentración de ADN en cada muestra se estimó considerando que una solución de ADN de concentración igual a 50 ng/µL tiene un valor de A_{260} de 1 (Chan, 1992).

Pureza del ADN obtenido

La determinación de la pureza de las soluciones de ADN se realizó de manera espectrométrica de acuerdo a Sambrook et al. (1989). De manera individual se registraron los valores de A_{280} y se calcularon los valores de la relación A_{260}/A_{280} , considerando las lecturas previas de A_{260} . Valores de esas proporciones iguales o mayores de 1.7 indicaron que el ADN se encontraba lo suficientemente libre de proteínas para poder ser amplificado por PCR.

Apreciación del tamaño molecular y de la integridad del ADN obtenido.

La apreciación del tamaño molecular y de la integridad de las muestras de ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa, de acuerdo a Andrews (1994). Se prepararon geles de agarosa al 0.8%, utilizando el regulador TAE (Tris-HCl 0.4 M, EDTA 2 M, ácido acético). La electroforesis se desarrolló a 70 volts. Los geles se tiñeron con Sybr Green.

Amplificación de loci ISTR por PCR

La amplificación de loci ISTR se realizó de acuerdo al método de Osorio et al. (2006), con los iniciadores F9 y B8. Para cada muestra individual se preparó una mezcla de reacción conteniendo los iniciadores F9 (TTACCTCCTCCATCTCGT) y B8 (ATACCTTTCAGGGGGATG) a 0.3 μ M, regulador 1X de PCR, $MgCl_2$ 3 mM, mezcla de nucleótidos 0.25 mM, Taq pol 1U, ADN molde 25 nM, agua para ajustar el volumen de reacción a 20 μ L. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un primer ciclo de desnaturalización a 95°C durante 3 min; 40 ciclos, comprendiendo un paso de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, uno de alineación a 45°C durante 1 min, y uno de extensión a 72°C durante 2 min; finalizando con 10 min a 72°C.

Análisis de datos

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y de comparación de medias por χ^2 cuadrada, usando el programa Stargraphics Centurion XV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de A_{260} y de la concentración de ADN aislado de cada uno de los 10 individuos analizados de manera independiente con las modificaciones de los métodos de Coelho et al. (2009) y de Keb-Llanes et al. (2002) se muestran en la Tabla 1. En esa tabla se observa que utilizando el método modificado de Coelho et al. (2009) fue posible obtener una concentración media de ADN de frijol variedad Pinto Saltillo de 3996.249 ng/ μ L, y con el método de Keb-Llanes et al. (2002) una concentración media de 290.416 ng/ μ L. Estos valores significativamente diferentes ($t = 5.83111$, $P = 0.0000159566$, $\alpha = 0.05$) indican que las variaciones entre los dos métodos determinan la cantidad de ADN que puede obtenerse a partir de tejido foliar de esa variedad de frijol. Las cantidades de ADN obtenidas por el método de Coelho et al. (2009) son suficientes para llevar a cabo análisis moleculares empleando no solo marcadores de ISTR sino también microsatélites, RAPD y AFLP de frijol, ya que, de acuerdo a Arif y Khan (2009) y a nuestros propios resultados de ISTR, cantidades de ADN variando entre 20 a 500 ng son requeridas para realizar esas caracterizaciones.

Algunos autores consideran que muestras de ADN que presentan valores mayores o iguales a 1.7 o 1.9 veces más cantidad de ADN con respecto a proteínas (valores de $A_{260}/A_{280} \geq 1.7$ o $A_{260}/A_{280} \geq 1.9$) representan muestras de ADN suficientemente puras (Sambrook et al., 1989; Towner, 1994), las cuales se pueden analizar con la mayoría de las técnicas moleculares. De acuerdo a la Tabla 1, solo el 40% de las muestras de ADN obtenidas a partir del método modificado de Coelho et al. (2009) cumplió con esa consideración de pureza, mientras que ninguna muestra obtenida con el protocolo de Keb-Llanes et al. (2002) alcanzó el valor de pureza señalado. Sin embargo, todas las muestras obtenidas con el protocolo modificado de Coelho et al. (2009) pudieron ser amplificadas con los iniciadores de ISTR evaluados en el presente estudio. Estos resultados sugieren que los requerimientos de pureza de muestras de ADN podrían en realidad ser más flexibles. Comparativamente, el método modificado de Coelho et al (2009) permitió obtener ADN de mayor pureza (valor medio de $A_{260}/A_{280} = 1.68$) que el modificado de Keb-Llanes et al. (2002), el cual permitió obtener ADN de tejido foliar de la variedad de frijol Pinto Saltillo con un valor promedio de pureza de 1.09 (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de A_{230} , A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{280} , y concentración de ADN de 10 individuos de frijol variedad Pinto Saltillo obtenido con el método de Coelho et al. (2009) y de Keb-Llanes et al. (2002).

Muestra	Método Modificado de Coelho et al. (2009)				Método Modificado de Keb-Llanes et al. (2002)			
	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	Concentración (ng/ μ L)	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	Concentración (ng/ μ L)
1	0.50	0.28	1.79	6308.33	0.01	0.02	0.92	237.50
	5	2			9	1		
2	0.30	0.18	1.67	3770.83	0.02	0.02	1.00	354.17
	2	1			8	8		
3	0.62	0.33	1.85	7770.83	0.02	0.02	1.08	275.00
	2	6			2	0		
4	0.35	0.20	1.74	4429.17	0.03	0.02	1.19	370.83
	4	4			0	5		
5	0.15	0.10	1.45	1895.83	0.04	0.04	1.18	608.33
	2	5			9	1		
6	0.21	0.12	1.74	2741.67	0.01	0.01	1.39	220.83
	9	6			8	3		
7	0.30	0.18	1.67	3833.33	0.02	0.02	1.04	300.00
	7	3			4	3		
8	0.09	0.06	1.58	1187.50	0.01	0.01	0.97	129.17
	5	0			0	1		
9	0.23	0.14	1.64	2904.17	0.01	0.01	1.04	195.83
	2	1			6	5		
10	0.41	0.24	1.68	5120.83	0.01	0.01	1.13	212.50
	0	3			7	5		
			1.68 \pm 0.1	3996.249 \pm 1902.3			1.09 \pm 0.1	290.35 \pm 126.77
			0	68			2	3

La integridad y el tamaño molecular del ADN obtenido con los métodos modificados de Coelho et al. (2009) y de Keb-Llanes et al. (2002) se muestran en la Figura 1. En esa figura se aprecia que el ADN obtenido con ambos métodos tuvo una migración electroforética baja (bandas cercanas a los pocillos de depósito de las muestras), lo que indica un tamaño molecular alto, el cual fue mayor a 10 000 pb (datos de marcador de tamaño molecular no mostrados), y bajo nivel de degradación, apreciado por el fondo tenue (“background”) a lo largo de los carriles del gel, lo cual es un criterio de integridad o bajo nivel de degradación de muestras de ADN (Towner, 1994). Cantidades variables de ARN fue aislado conjuntamente con el ADN, como puede ser apreciado por la intensidad de las bandas difusas al extremo opuesto de los depósitos en cada carril de la Figura 1. En la misma Figura 1 se observan cantidades menores de ADN obtenido con el método modificado de Keb-Llanes et al. (2002). Estos resultados indican que aunque los dos métodos de aislamiento evaluados en el presente estudio permitieron obtener ADN de alto peso molecular a partir de tejido foliar de frijol Pinto Saltillo, el modificado de Coelho et al. (2009) permite obtener mayor cantidad de material genético en mejor calidad.

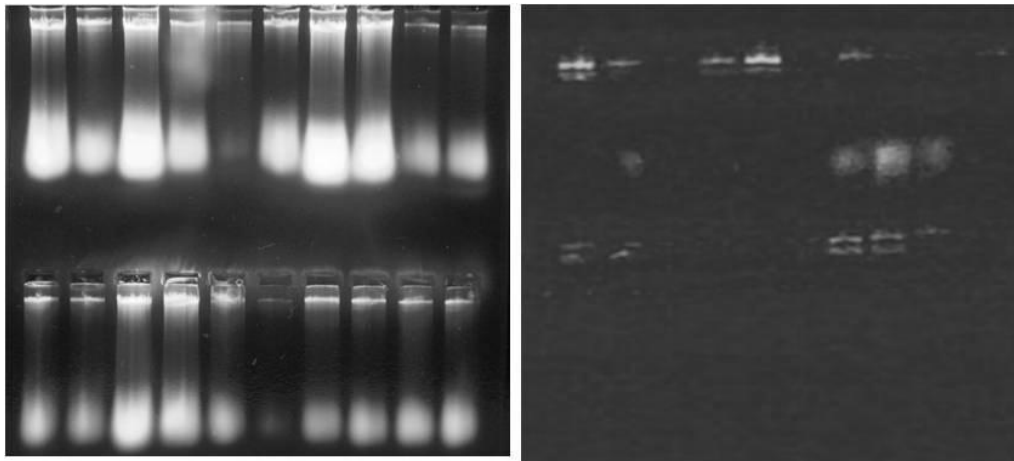


Figura 1. Gel de agarosa al 0.8% de muestras de ADN obtenidas a partir de tejido foliar de 10 individuos de frijol variedad Pinto Saltillo con (izquierda) el método modificado de Coelho et al. (2009) y (derecha) de los mismos individuos con el método modificado de Keb-Llanes et al. (2002).

De acuerdo a la Figura 2, los ISTR revelados por los iniciadores F9 y B8 generan perfiles de amplificación formados por dos bandas bien definidas, que representan dos secuencias ISTR de alrededor de 1000 y 1500 pb, en el genoma de la variedad Pinto Saltillo de frijol. Estos resultados apoyan el carácter universal de estos marcadores mencionado por Rhode (1996) e indican que el ADN obtenido con el protocolo aquí modificado de Coelho et al. (2009) puede ser amplificado con los iniciadores para marcadores ISTR.

Diferencias en los procesos de trituración de los tejidos vegetales, en la composición de los reguladores de aislamiento, y en los pasos de lavado con soluciones etanólicas generaron diferencias significativas en la cantidad, calidad y capacidad de amplificación del ADN aislado a partir de tejido foliar de frijol Pinto Saltillo. El protocolo resultante de las modificaciones hechas en el presente estudio al original de Coelho et al. (2009), las cuales simplifican a este último, puede ser usado para estudios de variabilidad genética de frijol, empleando marcadores ISTR.

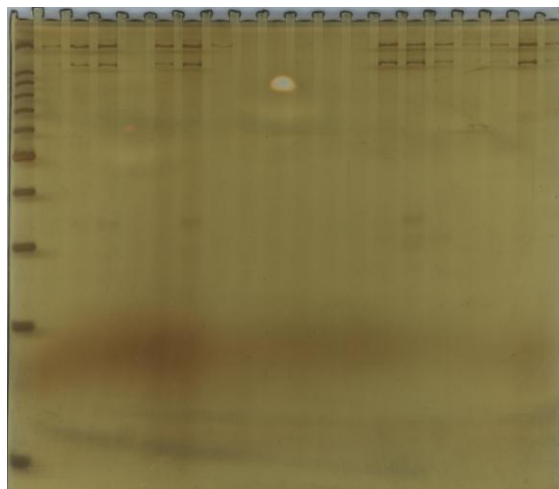


Figura 2. Gel de acrilamida al 6% de muestras de ADN obtenidas a partir de tejido foliar de 10 plantas de frijol Pinto Saltillo con el método modificado de Coelho et al. (2009), y amplificadas con los iniciadores F9 y B8, de ISTR.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, A. T. 1994. Electrophoresis of nucleic acids. In: Essential Molecular Biology. A Practical Approach. (Ed. Brown, T. A.). IRL Press, pp. 89-106.
- Arif, I. A., H. A. Khan. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation* 32: 9-17.
- Chan, T. W. V. 1992. Extraction of nucleic acids from clinical samples and cultured cells. In: Diagnostic Molecular Pathology. A Practical Approach (Eds. Herrington, C. S., J. O'D. McGee). IRL Press, Oxford, pp. 1-23.
- Coelho, R. C., M. A. Faria, J. Rocha, A. Reis, M. B. P. P. Oliveira, E. Nunes. 2009. Assessing genetic variability in germplasm of *Phaseolus vulgaris* L. collected in Northern Portugal. *Scientia Horticulture* 122: 333-338.
- Cota-Sánchez, J. H., K. Remrchuk, K. Ubayasena. 2006. Ready to use DNA extracted with CTAB method adapted for Herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter* 24: 161-167.
- Guachambala-Cando, M. S., J. C. Rosas-Sotomayor. 2010. Caracterización molecular de accesiones cultivadas y silvestres de frijol común de Honduras. *Agronomía Mesoamericana* 21: 51-61.
- Herrmann, R. G. 1982. The preparation of circular DNA from plastids. In: Methods in Chloroplast Molecular Biology (Eds. Edelman, M., R. Hallick, N. H. Chua). Elsevier. Amsterdam, pp. 259-280.
- Keb-Llanes, M., G. González, B. Chi-Manzanero, D. Infante. 2002. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 299a-299e.
- Kim, C. S., C. H. Lee, J. S. Shin, Y. S. Chung, N. I. Hyung. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acid Research* 25: 1085-1086.
- Osorio, Z. M. A., D. Infante, S. Molina. 2006. Variación genética asexual en *Agave cocui* Trelease. *Boletín Nakari* 17:1-7.
- Palmer, J.D. 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *The American Naturalist* 130: 6-29.
- Reyes, R. E., L. E. Padilla, O. Pérez, P. López. 2008. History, nature and bean's nutritious quality. *Revista Investigación Científica* 4: 1 – 21.
- Rhode, W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *Journal of Genetics and Breeding* 50: 249-261.
- Rodiño, A. P., M. Santalla, A. M. González, A. M. de Ron, S. P. Singh. 2006. Novel genetic variation in common bean from the Iberian Peninsula. *Crop Science* 46: 2540 – 2546.
- Rogers, S. O., A. J. Bendich. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In: Plant Molecular Biology Manual (Eds. Gelvin, S. B., R. A. Aschilperoo, D. P. S. Verma). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp. 1-10.
- Sambrook J., E. F. Fritish, T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Scopes, K. R. 1994. Protein Purification. Principles and Practice. Springer. Los Angeles, USA.

- Shagai-Marooof, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population genetics. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 81:8014 – 8018.
- Tibbits, W. N., White, T. L., Hodge, G. R., Borralho, N. M. G. 2006. Genetic variation in frost resistance of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* assessed by artificial freezing in winter. *Australian Journal of Botany* 4: 521-529.
- Towner, P. 1994. Purification of DNA. In: *Essential Molecular Biology. A Practical Approach Vol 1.* (Ed. T. A. Brown). IRL Press, Oxford, pp. 47-68.
- Vargas-Vázquez, M. L. P., J. S. Muruaga-Martínez, P. Pérez-Herrera, O. H. Gill-Langarica, G. Esquivel-Esquivel, M. A. Martínez-Damián, R. Rosales-Serna, N. Mayek-Pérez. 2008. Morphoagronomic characterization of the INIFAP collection of the cultivated form of common bean. *Agrociencia* 42: 787-797.
- Vidal-Barahona, A., L. C. Lagunes-Espinoza, E. Valadez Moctezuma, C. F. Ortiz-García. 2006. Morphological and molecular variability among native and commercial cultivars of black bean in Tabasco, México. *Revista Filogenética Mexicana* 29: 273 – 281.