

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ABCÍSIKO MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA COMPETITIVO

STANDARDIZATION OF A PROTOCOL FOR ABSCISIC ACID QUANTIFICATION THROUGH THE COMPETITIVE ELISA TECHNIQUE

Lucía Huánuco¹, Raymundo Gutiérrez² y Giovanna Müller³

Resumen

La respuesta fisiológica más resaltante de las plantas frente al estrés hídrico por sequía es la síntesis de la fitohormona Ácido abscísico (ABA). Una solución a los cambios ambientales es lograr un mejor uso eficiente de agua, por ello la predicción en la magnitud de la señalización de ABA puede tener gran importancia en la agroecología; además, permitirá la optimización de las técnicas de riego en zonas áridas que necesitan de cultivos que limiten el uso de éste recurso natural. Hasta el momento, la metodología más específica y confiable para su cuantificación es el Ensayo de Inmuno-absorbancia Ligado a Enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) del tipo competitivo indirecto. Es por esta razón que el presente estudio utilizó esta técnica con la finalidad de establecer un protocolo reproducible y accesible que permita determinar concentraciones de ABA. La metodología consistió en evaluar diferentes concentraciones de los anticuerpos y antígeno, así como del sustrato; siendo las condiciones óptimas que permitieron obtener la mejor sensibilidad y reproducibilidad del protocolo las especificadas a continuación: cobertura con el conjugado ABA-BSA 300 ng/ml, MAC 252 (anticuerpo monoclonal específico para ABA) a 1:80 000, Antirat IgG a 1:2 000 y sustrato PNPP en 1 mg/ml. Obteniéndose al final ecuaciones lineales cuyos valores de R^2 se presentaron en un rango de 0.95-0.99 así como diferencias significativas entre los controles positivos y negativos.

Palabras clave: Estrés hídrico, ácido abscísico (ABA), Ensayo de Inmuno absorbancia Ligado a Enzimas (ELISA), MAC 252, agroecología.

Abstract

The most highlighted physiological response of plants to water stress by drought is the synthesis of the plant hormone Abscisic Acid (ABA). A solution to environmental changes is to achieve a better efficient use of water. For this reason, predicting the magnitude of ABA signaling may have considerable importance in agroecology; in addition, will allow the optimization of irrigation techniques in arid zones that need crops that limit the use of this natural resource. The most specific and reliable methodology for quantification of the enzyme is the indirect competitive type Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). For this reason the present study used this technique in order to establish a reproducible and accessible protocol that determines concentrations of ABA. The methodology included the evaluation of different antibodies, antigen and media concentrations. Results show that optimal conditions that allowed the highest sensitivity and reproducibility are: coverage ABA-BSA conjugate 300 ng / ml, MAC 252 (monoclonal antibody specific for ABA) to 1:80 000, antirat IgG 1: 2000 and PNPP substrate in 1 mg / ml. Linear equations obtained gave R^2 values in a range of 0.95-0.99 as well as significant differences between the positive and negative controls.

Key words: water stress, drought, abscisic acid (ABA), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), MAC 252, agroecology.

Introducción.

Si bien el nivel de ácido abscísico (ABA) es dinámico en los tejidos vegetativos durante su desarrollo, su concentración se vuelve significativa cuando es una herramienta de adaptación frente a varias formas de estrés ambiental (Hartung *et al.*, 1999; Sarmard *et al.*, 2007). Se define al estrés hídrico como

la respuesta a la falta o exceso de agua en las plantas (González, 1999), el cual afecta directamente sobre la producción de los cultivos debido a que altera las funciones de la planta (Heidari & Moaveni, 2009). En el caso de las plantas vasculares, las estrategias para minimizar los efectos negativos inducidos por la deficiencia de agua, pueden ser las modificaciones

morfológicas, mecanismos fisiológicos y finalmente procesos bioquímicos (Lobo da Costa, 2011). Es así que el aumento significativo en la síntesis de la fitohormona Ácido Abscísico durante el estrés hídrico, específicamente la sequía, hace que se le considere como “la hormona del estrés” (Taylor *et al.*, 2000; Heidari & Moaveni, 2009). La tolerancia a condiciones de sequía está directamente relacionada con la capacidad de producir ABA en la planta, sin embargo, esta relación también depende del genotipo o cultivar (Chaves *et al.*, 2002; Ortiz & Flores, 2008), intensidad y duración del estrés así como también de la etapa fenológica del cultivo (Barrios *et al.*, 1998). Esta fitohormona es considerada regula muchos aspectos agronómicos importantes del desarrollo de las plantas incluyendo un rol principal en la maduración de semillas y desarrollo del fruto. Se conoce que el ABA es esencial para regular el desarrollo de las plantas (Sharp & Lenoble, 2002; Chudasama & Thaker 2007).

Las técnicas inmunológicas han tenido grandes avances durante los últimos 30 años (Komy *et al.*, 2010). Son más rápidas, rentables, de alto rendimiento y mayor sensibilidad de muestreo que las técnicas cromatográficas (Zhang *et al.*, 2011). Las técnicas ELISA conllevan el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática (Takahashi, 1987). Leroux *et al.* (1985) determinaron que sólo los anticuerpos monoclonales permitirían la medición de pequeñas cantidades de ABA. La habilidad de los anticuerpos monoclonales (McAbs) radica en su especificidad y alta afinidad (Mertens, 1983) por lo que están menos influenciados a la interferencia de uniones no específicas con impurezas en los extractos crudos de plantas (Ross *et al.*, 1987; Quarrie *et al.*, 1988). La técnica ELISA competitivo indirecto, es la más usada para la cuantificación de sustancias muy pequeñas, como es el caso de las hormonas (Jordan, 2005). La base de la técnica recae en la competencia entre la forma conjugada del antígeno con la muestras por los sitios de unión al anticuerpo, la unión de éstos a un segundo anticuerpo enzimático puede ser detectada usando un sustrato adecuado que produzca color. La competencia entre el antígeno conjugado y la muestra interfiere con la habilidad del anticuerpo enzimático de unirse al anticuerpo monoclonal capturado, por lo cual la lectura en un espectrofotómetro es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (Asch, 2000).

Las primeras aplicaciones de esta técnica para la cuantificación del ABA fueron realizadas por Quarrie *et al.* (1988), quienes determinaron que el anticuerpo monoclonal MAC 62 (MAC 252) resulta ser el más específico. Cahill & Ward (1989) calificaron a este método como específico y confiable para la detección de ABA en extractos de tejido crudo de soya. Se ha establecido que la proteína portadora más utilizada y que brinda resultados satisfactorios es la Albúmina

Sérica Bovina-BSA (Jinqing *et al.*, 2011). Por último, se han implementado kits para el análisis de esta fitohormona; sin embargo, la mayoría de estos kits tienen dos desventajas: la poca estabilidad de los resultados obtenidos y el alto costo.

Debido a que la limitación del agua puede llegar a ser un obstáculo fundamental para la productividad primaria bajo escenarios futuros de climas más áridos, el ABA puede servir de apoyo a la agroecología. Precisamente la predicción en la magnitud de la señalización de ABA es crucial para la optimización de las técnicas de riego en zonas áridas, permitiendo lograr un mejor uso eficiente de agua y la expansión de cultivos que limiten el uso de éste recurso natural. En base a esto, se ha establecido y validado un protocolo accesible para cuantificar la fitohormona ácido abscísico mediante la aplicación de la técnica ELISA-competitivo-indirecto; permitiendo predecir la magnitud de la señalización de ABA y ser una herramienta para futuras investigaciones dentro de la temática agroecológica.

Materiales y métodos.

El establecimiento del protocolo se realizó en base a la técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) competitivo-indirecto, teniendo como referencias los protocolos previamente descritos por Asch (2000) y Kholova *et al.* (2010). Las concentraciones de ABA fueron determinadas usando el anticuerpo monoclonal MAC 252 de acuerdo a la recomendación dada por Quarrie *et al.* (1988).

Descripción del protocolo.

Conjugado ABA-BSA: El procedimiento se realizó en base al protocolo descrito y compartido por Kholova (2011).

Cobertura: La microplaca ELISA fue cubierta con la mezcla entre el tampón cobertura (Tampón carbonato 50 mM - pH 9.6: Na₂CO₃ 1.59 g/l, NaHCO₃ 2.93 g/l, Agua mQ) y el conjugado ABA-BSA. Posteriormente, las placas fueron selladas y cubiertas se guardaron a 4°C. Luego, se realizaron 3 lavados con tampón fosfato salino Tween 20 (Tampón de lavado - pH 7.4: 0.05% Tween-20 en PBS). Las placas sensibilizadas se almacenaron selladas y cubiertas a -20°C hasta su uso.

Preparación de diluciones: A partir de la menor dilución madre conocida de 2-cis, 4-trans-Ácido Abscísico (5000 ng/ml) (Diluciones madre de Ácido abscísico: 2-cis, 4-trans-Abscisic acid, 98%, synthetic (Sigma-Aldrich), Metanol), se prepararon diluciones en tampón TBS (Tampon Salino Trisma - pH 7.8: Trisma Base 6 g/l, MgCl₂*6H₂O 0.428 g/l, NaCl 8.85 g/l).

Primer anticuerpo: Se preparó el anticuerpo monoclonal MAC 252 en tampón PBS (Tampón fosfato salino 10mM - pH 7.4: NaCl (137 mM) 8 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l, KCl (2.7 mM) 0.2 g/l). A cada pozo de los estándares y controles

positivos, se les adicionó 75 µl; mientras que los controles negativos no contienen este anticuerpo. Para el paso de competencia las placas selladas y envueltas se incubaron a 4°C durante 3 horas. Luego se realizaron 3 lavados con tampón PBS-tween.

Segundo anticuerpo: El Segundo anticuerpo, Antirat IgG-peroxidasa, fue preparado en tampón TBS. Se dejó incubar durante 1 hora a 37°C-38°C. Finalmente, se realizaron 3 lavados con tampón PBS-tween.

Revelado: Al tampón sustrato (Tampón sustrato - pH 9.8: Dietanolamina 727.5%, HCl 422.5%) se le agregaron pastillas de paranitrofenil fosfato-pNPP. Se agregó en cada pocillo hasta cubrirlo y se dejó reaccionar a 37°C en baño maría durante 1 hora. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un equipo Sunrise™ - Tecan a 405 nm.

Curva de calibración del ácido abscísico.

La curva de calibración en cada microplaca ELISA se realizó de acuerdo a la distribución mostrada en la Tabla 1 y en base a 8 estándares (St1 > St8) de ABA. Cada estándar, contó con 3- 4 repeticiones mientras que los controles positivos (B+) y negativos (B-) con un promedio de 10 repeticiones (R); medidos a 405 nm mediante el uso de una lectora Sunrise™ - Tecan y en conjunto con el software Magellan 7.0. Finalmente, los valores de absorbancia fijados para cada estándar se obtuvieron en base al promedio de tres repeticiones usando además el método logit-log (Quarrie *et al.*, 1988).

Método logit-log.

El porcentaje de enlace (% E) para cada estándar se obtiene de acuerdo a la siguiente fórmula (Asch, 2000):

$$\% E = \frac{\text{estándar O.D} - \text{ENE O.D} * 100}{\text{E O.D} - \text{ENE O.D}}$$

En donde:

- % Enlace es el porcentaje total de unión posible observado para una determinada concentración de ABA después de ser corregido con la unión no específica.
- ENE O.D. representa el nivel de enlace no específico y debe ser restado a todas las lecturas.
- E O.D. representa al valor de absorbancia máxima en la cual ocurre el 100% de unión.

Finalmente, el logit del porcentaje de enlace es (Quarrie *et al.*, 1988):

$$\text{Logit } \% \text{Enlace} = \ln \left[\frac{\% E}{100 - \% E} \right]$$

Además, para demostrar si existen diferencias significativas entre los controles positivos y negativos, los resultados fueron procesados y analizados utilizando el software estadístico SAS/STAT.

Tabla 1: Asignación de estándares de ABA y controles positivos y negativos en una microplaca ELISA.

S t 1	S t 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8		
R	R	R	R	R	R	R	R	B +	B+
R	R	R	R	R	R	R	R	B +	B+
R	R	R	R	R	R	R	R	B +	B+
R	R	R	R	R	R	R	R	B +	B+
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Resultados y discusión.

Curva de calibración.

Si bien en anteriores procedimientos se describe el uso de una solución de bloqueo a base de leche al 1% (Kholova, 2010) en los ensayos realizados aquí se determinó que este paso no mejora la señal de la técnica. De acuerdo a los resultados, se analizaron principalmente los valores obtenidos en los controles positivos y negativos, se obtuvo un valor más alto de "B+ corregido" en las repeticiones del ensayo sin el uso del bloqueo.

Un paso muy importante es la reacción de competencia entre el ABA y el anticuerpo MAC 252. Una concentración muy alta de MAC 252 conllevará a que el conjugado inmovilizado (ABA-BSA) y el estándar agregado se unan al anticuerpo, lo que se visualizará en absorbancias muy parecidas entre los diferentes estándares. Esta situación ocurrió en concentraciones de 1:40 000 y 1:60 000 del MAC 252; sin embargo, con la dilución de 1:80 000 los estándares se diferenciaron y el control negativo (B-) se mantuvo en valores cercanos a 0.2, lo cual es óptimo (Asch, 2000) (Tabla 1).

El aumento en la concentración del ABA-BSA incrementa la señal de la prueba pero disminuye la sensibilidad del ensayo (Zhang *et al.*, 2011). Se realizaron pruebas variando la concentración del conjugado ABA-BSA adherido a la microplaca, desde 90 ng/ml, 300 ng/ml, 400 y 500 ng/ml. De acuerdo a las absorbancias se descarta la concentración menor a 300 ng/ml debido a que aumenta la desviación estándar, y la concentración de 500 ng/ml ya que aumenta de igual manera todos los valores de lectura. Es por eso que la concentración óptima de ABA-BSA y la dilución de MAC 252 quedaron determinadas en 300 ng/ml y 1:80 000 respectivamente.

Para determinar una buena relación entre el MAC252 y el Antirat IgG (segundo anticuerpo) se probaron las concentraciones 1:1000, 1:2000 y 1:3000. Se obtuvieron absorbancias más altas con el uso del

Antirat IgG a 1:1000 halladas también por otros (Cahill & Ward, 1989); pero las absorbancias de los negativos aumentaron a valores de 0.3. Se determinó que con la dilución 1:2000 se registraron mejores valores en los controles positivos, diferencias entre los estándares en diluciones 1:10 (1000 ng/ml hasta 1x10⁻⁴ ng/ml), y se mantuvo el control negativo menos reactivo (Abs. aproximada de 0.2) y la desviación estándar en la mayoría de los estándares en un valor menor a 0.03.

Finalmente, la concentración del sustrato fue determinada; aunque desde un inicio se usó a 2 mg/ml, se observó que al probar con 1 mg/ml se obtenía una buena reacción con menos reacción inespecífica y menor uso de material pero igual resultado en las concentraciones calculadas.

Como se muestra en la Figura 1, se logró obtener la correlación entre los intervalos de Logit del porcentaje de enlace (Logit %E) con los Logaritmos de Ácido abscísico (Log ABA) permitiendo visualizar que para una concentración específica de ABA, existirá un valor del porcentaje de enlace; adicionalmente, el modelo se ajusta a los datos obtenidos, lo que puede ser medido por el valor de R².

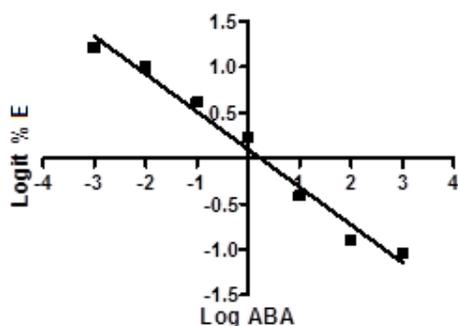


Figura 1. Gráfica lineal obtenida entre el Logaritmo de los estándares y Logit del porcentaje de enlace. La ecuación resultante del protocolo es: $\hat{y} = -0.434x + 0.0689$; $R^2 = 0.9793$.

De acuerdo a lo descrito, las condiciones que generan gráficas lineales y permiten la cuantificación del Ácido abscísico mediante el ensayo ELISA competitivo indirecto quedan establecidas de la siguiente manera:

1. Sensibilizar las microplacas ELISA con el conjugado ABA-BSA a 300 ng/ml. Sellar, envolver e incubar toda la noche a 4°C.
2. Realizar lavados con el tampón PBS-tween 20. Envolver y almacenar a -20°C.
3. Agregar los estándares, los controles positivos y negativos.
4. Adicionar el primer anticuerpo, MAC 252 diluido en tampón PBS, a una concentración de 1:80 000. Incubar durante 3 horas a 4°C.
5. Realizar lavados con el tampón PBS-tween 20.

6. Agregar el segundo anticuerpo Antirat-IgG diluido en tampón TBS pH 7.8, en la concentración de 1:2 000. Incubar la placa sellada y cubierta en estufa a 37°C durante 60 min.
7. Repetir el paso 5.
8. Finalmente, agregar el tampón sustrato a 1mg/ml de PNPP y revelar en Baño María a 37°C durante 30 min y luego 30 min más a temperatura ambiente.

Conclusiones.

- Podemos establecer que el presente protocolo desarrollado está estandarizado para cuantificar la fitohormona ácido abscísico mediante la aplicación de la técnica ELISA-competitivo-indirecto. La sensibilidad del ensayo está determinada por los valores R² que se encuentran en un rango de 0.95-0.99 y una diferencia significativa entre los controles positivos y negativos.
- Se lograron optimizar las concentraciones del primer anticuerpo MAC252 a 1:80 000 y del segundo anticuerpo Antirat-IgG a 1:2 000, con el antígeno conjugado (ABA-BSA) de manera tal que permitió obtener un ensayo reproducible.
- El protocolo establecido es reproducible y accesible; se podrá utilizar para el estudio del ABA y su interacción frente a la sequía en cultivos de interés.

Agradecimientos.

Al Centro Internacional de la Papa – CIP, a través del Proyecto FONTAGRO 8038-Aumento de la competitividad de los sistemas productivos de papa y trigo en Sudamérica ante el cambio climático, por el financiamiento del presente trabajo de investigación, y brindarme todas las facilidades para realizar la presente investigación; y al Dr. Folkard Asch por sus valiosas apreciaciones.

Literatura citada.

- Asch F. 2000. Determination of abscisic acid by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Technical Report. Taastrup, Denmark: Laboratory for Agrohydrology and Bioclimatology. Department of Agricultural Sciences. The Royal Veterinary and Agricultural University.
- Barrios A., Ritchie J. & Smucker A. 1998. El efecto de sequía en el crecimiento, la fotosíntesis y la intercepción de luz en frijol común. *Agronomía Mesoamericana*. 9 (2): 01-08.
- Cahill D. M. & Ward E. W. 1989. An indirect Enzyme-Linked Immunosorbent assay for measurement of Abscisic Acid in Soybean inoculated with *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea. *Phytopathology*. 79: 1238-1242.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodrigues M.L., Ricardo C.P.P., Osório M.L., Carvalho I., Faria T. & Pinheiro C. 2002. How plants cope with water stress in

- the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89: 907-916.
- Chudasama R. & Thaker V. S. 2007. Relationship between endogenous Abscisic acid and dry matter accumulation in developing seed and pod of Pigeon Pea (*Cajanus Cajan*). *World Journal of Agricultural Sciences* 3 (6): 833-842.
- González J.A. 1999. Eco-fisiología y morfología del estrés debido a factores adversos. Fisiología de la resistencia a sequía en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). En: Jacobsen S.E. & Mujica A. I Curso Internacional. Proyecto Quinoa. Lima, Peru. p: 3-20.
- Hartung W., Peuke A. & Davies W. J. 1999. Abscisic Acid—A Hormonal Long-Distance Stress Signal in Plants Under Drought and Salt Stress. *Handbook of Plant and Crop Stress*, 2 Ed. p: 731-747.
- Heidari Y. & Moaveni P. 2009. Study of drought stress on ABA accumulation and Proline among in different genotypes forage corn. *Research Journal of Biological Sciences* 4 (10):1121-1124.
- Jinqing J., Haitang Z., Junwei L., Junmin L. & Ziliang W. 2011. Development and Optimization of an Indirect Competitive ELISA for detection of Norfloxacin Residue in Chicken liver. *International Conference on Environmental Science and Technology* 6: 460-463.
- Jordan W. 2005. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Medical Biometrics Handbook*. p: 419-427.
- Kholova J., Hash C.T., Kumar P.L., Yadav R.S., Kocová M. & Vadez V. 2010. Terminal drought-tolerant pearl millet (*Pennisetum glaucum* L. R. Br.) have high leaf ABA and limit transpiration at high vapour pressure deficit. *Journal of Experimental Botany*. 61 (5): 1431-1440.
- Kholova J. 2011. Protocolo para conjugar el ABA con el BSA (correo electrónico). India. *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*.
- Komy M., Abou-Talbeb E., Aboshosha S. & El-Sherif E.M. 2010. Serological and molecular detection of late blight pathogen and disease development in potato. *International Journal of Agriculture and Biology*. 12: 161-170.
- Leroux B., Maldiney R., Miginiac E., Sossountzov L. & Sotta B. 1985. Comparative quantification of abscisic acid in plant extracts by gas-liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay using the avidin-biotin system. *Planta*. 166: 524-529.
- Lobo Da Costa R. & Lobato A. 2011. ABA-mediated proline synthesis in cowpea leaves exposed to water deficiency and rehydration. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 35: 309-317.
- Mertens R., Deus-Neumann B & Weiler E.W. 1983. Monoclonal antibodies for the detection and quantitation of the endogenous plant growth regulator, abscisic acid. *Federation of European Biochemical Societies*. 160:1-2.
- Ortiz L. & Florez V.J. 2008. Comparación cuantitativa de ácido abscísico y citoquininas en la tuberización de *Solanum tuberosum* L. *Solanum phureja* Juz et Buk. *Agronomía Colombiana* 26 (1): 32-39.
- Quarrie S.A., Whitford P. N., Appleford N. E., Wang T. L., Cook S. K., Henson, I. E. & Loveys B. R. 1988. A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscísico acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 173: 330-339.
- Ross G. S., Elder P., McWha J., Pearce D. & Pharis R. 1987. The development of an Indirect Enzyme Linked Immunoassay for Abscisic acid. *Plant Physiology*. 85: 46-50.
- Sarmard J., Shariati M. & Madadkar M. 2007. Relationship between endogenous Abscisic Acid and B-carotene synthesis in unicellular green alga *Dunaliella*. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. 2 (5): 559-564.
- Sharp R.E. & Lenoble M.E. 2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany* 53 (366): 33-37.
- Takahashi J. 1987. Evaluación de los métodos serológicos de látex y ELISA para la detección del virus Y de la papa (PVY) y del virus del enrollamiento de la papa (PLRV). Tesis Mag. Sc. Lima, Peru. *Universidad Nacional Agraria La Molina*
- Taylor I.B., Burbidge A. & Thompson A.J. 2000. Control of abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1563-1574.
- Zhang H.T., Jiang J.Q., Wang Z.L., Chang X.Y., Liu X.Y., Wang S.H., Zhao K. & Chen J.S.. 2011. Development of an indirect competitive ELISA for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin. *Journal of Zhejiang University Science B - Biomedicine & Biotechnology*. 12 (11): 884-891.

¹ Centro Internacional de la papa, La Molina, Lima, Perú. lucianohely@gmail.com.

² Centro Internacional de la papa, La Molina, Lima, Perú. raymundo.gutierrez.r@gmail.com.

³ Centro Internacional de la papa, La Molina, Lima, Perú. g.muller@cgiar.org.