



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

## **EVALUACIÓN DE TAMAÑOS DE MUESTRA DE SEMILLA DE TRIGO PARA DETERMINAR SU CAPACIDAD PREDICTIVA DE FITOPATÓGENOS**

**ARTURO MARTÍNEZ MIRAFUENTES**

**TESIS  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2015**

La presente tesis titulada: EVALUACIÓN DE TAMAÑOS DE MUESTRA DE SEMILLA DE TRIGO PARA DETERMINAR SU CAPACIDAD PREDICTIVA DE FITOPATÓGENOS, realizada por el alumno: Arturo Martínez Mirafuentes bajo la dirección del Consejo Particular indicado; ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERA



**Dra. Ana María Hernández Anguiano**

DIRECTORA DE TESIS



**Dra. Mónica Mezzalama**

ASESOR



**Dr. Mateo Vargas Hernández**

ASESORA



**M.C. Noemí Valencia Torres**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2015

# **Evaluación de tamaños de muestra de semilla de trigo para determinar su capacidad predictiva de fitopatógenos**

Arturo Martínez Mirafuentes, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

## **Resumen General**

Las pruebas de sanidad de semillas se realizan generalmente a partir de muestras obtenidas de un lote de semillas. La muestra a analizar deberá ser lo más homogénea posible y representativa del lote; cuando la distribución de las semillas contaminadas e infectadas es relativamente homogénea, el tamaño de muestra a obtener no es restrictivo. Si la distribución es heterogénea se requerirá de un mayor número de muestras en contraste con las condiciones homogéneas señaladas anteriormente. Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de reducir la intensidad de muestreo actual (10%) utilizada en los análisis para detectar en semilla de trigo los virus: Virus del mosaico estriado del trigo (WSMV, por sus siglas en inglés) y Virus mosaico estriado de la cebada (BSMV, por sus siglas en inglés), con la finalidad de reducir tiempos, costos, y material, pero sin disminuir la confiabilidad y precisión de los resultados de dichos análisis.

Para la detección del virus WSMV se formaron muestras simples (MS) con 10 g de semilla infectada de trigo harinero (*Triticum aestivum*) las cuales se mezclaron con 90 g de semilla sana. En total se prepararon 32 MS con nivel de infección (NI) de 10% a partir de las cuales se generaron los tamaños de muestra (TM): 20, 15, 10, 8, 6 y 4%, y se estableció la prueba ELISA con muestras de harina obtenidas de 2 g de semilla de cada MS. Para la detección del virus BSMV, a partir de dos lotes de semilla de trigo, uno naturalmente infectado con el virus BSMV y otro de semilla sana, se formaron tres sublotes de 50 g con 15, 10 y 5 % de nivel de infección (NI), y 210 muestras simples (MS) de 20 g, de las cuales 70 fueron con 15% de NI, 70 con 10% de NI, y las restantes 70 con 5% de NI. A partir de las MS se formaron tamaños de muestra (TM) de 15, 10 y 5 % con diferente NI, que dan origen a 36 muestras compuestas (MC) formadas con 25, 20, 15 y 10 MS. Se estableció la prueba con muestras de harina proveniente de 2 g de semilla de

cada sublote, MS y MC. Ambas pruebas se establecieron en placas de poliestireno de 96 pozos y los reactivos y protocolos empleados fueron de AGDIA®, DAS ELISA (2013) para los virus WSMV y BSMV.

Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que el aumento y la reducción del tamaño de muestra actual de 10% afectó significativamente ( $\alpha= 0.05$ ) la sensibilidad de la prueba ELISA para la detección de los virus WSMV y BSMV en muestras de trigo harinero. La sensibilidad de la prueba al virus WSMV fue baja cuando se analizaron las MS con todos los TM de 20, 15, 8, 6 y 4 % y nivel de infección (NI) de 10%. Lo anterior indica que el NI natural de la semilla de trigo es un factor importante a considerar para la detección del virus WSMV por la prueba ELISA. Mientras que los resultados obtenidos para la detección del virus BSMV mostraron que al disminuir el NI por debajo del 15% en los sublotes, MS y MC, se afecta significativamente ( $\alpha= 0.05$ ) la sensibilidad de la prueba ELISA al virus. Así mismo la sensibilidad de la prueba se ve afectada significativamente ( $\alpha= 0.05$ ), conforme disminuye el número de MS que forman una MC (<15 MS), y el tamaño de muestra. Se concluye que el nivel de infección natural de la semilla de trigo en sublotes, muestras simples y muestras compuestas es un factor importante a considerar para la detección del virus BSMV por la prueba ELISA. Similarmente, para la detección de este virus se debe también tener presente el número de muestras y el tamaño de la muestra con la que se vaya a formar la muestra compuesta.

Palabras clave: tamaño, semilla, muestra, infección, mosaico.

# Evaluation of sample sizes wheat seed to determine its predictive ability of phytopathogenic

Arturo Martínez Mirafuentes, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2015

## Abstract

The seed health tests are usually performed on samples obtained from a seed lot. The test sample should be as homogeneous as possible and representative of the lot; when the distribution of contaminated and infected seeds is relatively homogeneous, the sample size is not restrictive to obtain. If the distribution is heterogeneous will require a greater number of samples in contrast to the homogeneous one. Therefore the goal of this study was to evaluate the effect of reducing the intensity of current sample (10%) used in the analysis for detect viruses in wheat seed: *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) and *Barley stripe mosaic virus* (BSMV), in order to reduce time, cost, and materials, without compromising the reliability and accuracy of the results for the analyzed virus.

For detection of virus WSMV single samples (SiS) they were formed with 10 g of seed infected bread wheat (*Triticum aestivum*) which were mixed with 90 g of healthy seed. In total 32 MS were prepared with level of infection (LI) 10% from which the sample sizes (SaS) were formed: 20, 15, 10, 8, 6 and 4%, and the ELISA test was established with wheat flour samples obtained from 2 g of seed from each SiS. BSMV for detecting viruses from two wheat seed lots, one naturally infected with BSMV and other healthy seed three sublots of 50 g were formed with 15, 10 and 5% level of infection (LI), and 210 single samples (SiS) of 20 g, of which 70 were 15% LI, 70 to 10% of LI, and the remaining 70 with 5% LI. From SiS sample sizes (SaS) 15.10 5% with different LI, giving rise to 36 composite samples (CS) formed with 25, 20, 15 and 10 SiS were formed. The test was established with flour samples from 2 g wheat seed each subplot, SiS and CS. Both tests were established in polystyrene plates of 96 wells and reagents and protocols used were AGDIA®, DAS ELISA (2013) for WSMV and BSMV.

The results obtained in this study indicated that the increase and the reduction of current sample size of 10% significantly affected ( $\alpha = 0.05$ ) the sensitivity of the ELISA test for the detection of WSMV and BSMV in samples of wheat flour. The sensitivity of the test to WSMV was low when the SiS were analyzed with all TM 20, 15, 8, 6 and 4% level of infection (LI) of 10%. This indicates that the LI natural wheat seed is an important consideration for WSMV detection by ELISA test. While the results for BSMV detection showed that by reducing the LI below 15% in the sublots, SiS and CS, is significantly affected ( $\alpha = 0.05$ ) the sensitivity of the ELISA to the virus. Likewise, the sensitivity of the test is affected significantly ( $\alpha = 0.05$ ), with decreasing the number SiS that forming a CS (<15 SiS), and the sample size. It is concluded that the level of natural infection of wheat seed sublots, single samples and composite samples is an important consideration for BSMV detection by ELISA test. Similarly, for the detection of this virus should also keep in mind the number of samples and sample size with which it is to form the composite sample.

Keywords: size, seed, sample, infection, mosaic.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi padre dios por brindarme estos momentos tan maravillosos de mi vida profesional y por todas las cosas hermosas que me ha dado a lo largo de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para poder realizar mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por todos los conocimientos brindados durante mi estancia en esta institución.

A la Dra. Ana María Hernández Anguiano por ser una excelente consejera y por todo su apoyo y conocimiento brindado para el terminó de este documento.

A la Dra. Mónica Mezzalama por todo su apoyo brindado para la realización de esta investigación en el laboratorio de sanidad de semillas y por ser mi Directora de Tesis.

Al Dr. Mateo Vargas Hernández por su comprensión, consejos y apoyo para la culminación de este documento, y por ser parte de mi Consejo Particular

A la MC. Noemí Valencia Torres por ser parte de mi Consejo Particular y por su conocimientos brindados para la realización de la fase experimental de esta investigación.

Al CIMMYT por el apoyo de infraestructura, equipo, material vegetal, material de laboratorio y reactivos brindados para la realización de esta investigación.

A todos los profesores del área de Fitopatología que de alguna manera participaron en mi formación profesional.

Al personal del Laboratorio de Sanidad de Semillas del CIMMYT, MC. Gabriela, Liliana, Karina, Jose Luis y Rogelio por los consejos y apoyo durante la fase experimental de esta investigación

A Macrina, Juanito y don Eduardo por todo su apoyo recibido durante mi estancia en el colegio.

## **DEDICATORIAS**

A mi esposa Sandra Pedraza Segura por todo su apoyo y cariño, para culminar mis metas y por el cuidado diario de nuestros hijos.

A mis hijas Sharon y Karina, y a mi pequeñín Arturito, que han llenado mi vida de alegrías con sus travesuras e inquietudes, haciendo de mi vida más amena en los días difíciles.

A mis padres Leobardo Martínez Santamaría y Paula Mirafuentes Tepanohaya. por sus sabios consejos, enseñanzas y apoyo incondicional, para llegar hasta donde me encuentro ahora.

A mis hermanos Rubén, Gerardo, Mary Cruz y Ramiro por estar con migo en los momentos buenos y malos de mi vida, por sus consejos y apoyo incondicional.

A todos mis compañeros de maestría por los momentos tan agradables que pasamos juntos durante mi estancia en el colegio, en especial a Patito, Yolis, Laurita, Ere, Luisita, Serch, Yessi, Ed, Mary y Santis.

## CONTENIDO

<b>Resumen General</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	v
<b>Índice de Tablas</b> .....	xi
<b>Índice de Figuras</b> .....	xiii
<b>CAPÍTULO I Marco Teórico</b> .....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Hipótesis.....	2
1.3. Revisión de literatura.....	2
1.3.1. Trigo.....	2
1.3.2. Muestreo y tamaño de muestra.....	3
1.3.3. Movimiento y rango de hospedantes de los virus.....	8
1.3.3.1. Transmisión por semilla y polen infectado.....	9
1.3.3.2. Factores que afectan el porcentaje de semilla infectada.....	11
1.3.4. Pruebas de laboratorio.....	12
1.4. Bibliografía.....	14
<b>CAPÍTULO II Evaluación de tamaños de muestra de semilla de trigo para determinar la capacidad predictiva del método de detección ELISA del virus del mosaico estriado del trigo</b> .....	16
<b>RESUMEN</b> .....	16
<b>Abstract</b> .....	17
2.1. Introducción.....	18
2.1.1. Agente causal.....	19
2.2. Hipótesis.....	20
2.3. Materiales y Métodos.....	20
2.3.1. Formación de muestras simples.....	20
2.3.2. Establecimiento de prueba DAS-ELISA.....	21
2.3.3. Análisis estadístico.....	23

2.4. Resultados y Discusión.....	23
2.5. Conclusiones.....	25
2.6. Bibliografía.....	30

**CAPÍTULO III Evaluación de tamaños de muestra de semilla de trigo para determinar la capacidad predictiva del método de detección ELISA del Virus del mosaico estriado de la cebada.....**

<b>32</b>	<b>32</b>
RESUMEN.....	32
Abstract.....	33
3.1. Introducción.....	34
3.1.1. Síntomas.....	35
3.1.2. Agente causal.....	35
3.1.3. Transmisión del virus.....	36
3.1.4. Detección e identificación del virus.....	36
3.2. Hipótesis.....	37
3.3. Materiales y Métodos.....	38
3.3.1. Establecimiento de prueba DAS-ELISA.....	38
3.3.2. Preparación de sublotos, muestras simples y muestras compuestas.....	40
3.3.3. Preparación de muestras compuestas con diferente tamaño de muestra.....	41
3.3.4. Evaluación del número de muestras simples, tamaño de muestra y nivel de infección en muestras compuestas.....	42
3.3.5. Análisis estadístico.....	42
3.4. Resultados y Discusión.....	43
3.4.1. Efecto del nivel de infección en la sensibilidad de la prueba ELISA.....	43
3.4.2. Efecto del nivel de infección en muestras simples.....	44
3.4.3. Efecto del número de muestras simples, tamaño de muestra y nivel de infección en muestras compuestas.....	45
3.5. Conclusiones.....	48
3.6. Bibliografía.....	60
<b>Conclusiones Generales.....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE TABLAS

### Capítulo II

**Tabla 1.** Valores promedio de absorbancia de muestra original y de muestras simples (MS) con 10% de nivel de infección y diferente tamaño de muestra..... 27

**Tabla 2.** Resultados de comparaciones múltiples de medias usando la diferencia significativa honesta de Tukey, con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El Análisis de la Varianza se realizó con el modelo lineal correspondiente a un diseño de bloques completos al azar (DBCA) con sub-muestreo..... 29

### Capítulo III

**Tabla 3.** Comparación de valores de absorbancia (nm) entre sublotes de semilla con diferente nivel de infección (NI) del virus BSMV. Cada sublote constó de 50 g y las muestras de 2 g cada una para su análisis ..... 49

**Tabla 4.** Comparación de medias de absorbancia entre sublotes con diferente NI, diferencia significativa honesta (DSH) del método de Tukey con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza correspondió al modelo lineal de un diseño de bloques completos al azar sin sub-muestreo..... 50

**Tabla 5.** Comparación de valores promedio de absorbancia en muestras simples (MS) de semilla de trigo con diferente nivel de infección (NI) del virus BSMV ..... 51

**Tabla 6.** Comparación de medias de absorbancia en muestras simples (MS) de semilla de trigo con diferente nivel de infección (NI) del virus BSMV. Diferencia significativa honesta (DSH) del método de Tukey con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza correspondió al modelo lineal de un diseño de bloques completos al azar con sub-muestreo..... 53

**Tabla 7.** Comparación de valores promedio de absorbancia de muestras compuestas (MC) de semilla de trigo. Cada MC se formó con diferente número de muestras simples (**MS**), tamaño de muestra (**TM**) y nivel de infección (**NI**) de BSMV. Los valores de las repeticiones se obtuvieron con la prueba ELISA..... 54

**Tabla 8.** Comparación de medias generales de absorbancia entre muestras compuestas (MC) con diferente número de muestras simples (MS), tamaño de muestra (TM) y nivel de infección (NI). Diferencia significativa honesta (DSH) del método de Tukey con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza correspondió al modelo lineal de un diseño de bloques completos al azar sin sub-muestreo..... 57

**Tabla 9.** Comparación de medias de absorbancia entre muestras compuestas (MC) con diferente tamaño de muestra (TM). Diferencia significativa honesta (DSH) del método de Tukey con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza correspondió al modelo lineal de un diseño de bloques completos al azar sin sub-muestreo..... 58

**Tabla 10.** Comparación de medias de absorbancia entre muestras MC con diferente NI del virus BSMV. Diferencia significativa honesta (DSH) del método de Tukey con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza correspondió al modelo lineal de un diseño de bloques completos al azar sin sub-muestreo ..... 59

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo II

**Figura 1.** Valor promedio de absorbancia en nm de 32 muestras simples (línea marrón) con nivel de infección de 10 %, y tamaño de muestra de 20%. Valores superiores al umbral (línea azul) son positivos al virus WSMV..... 28

**Figura 2.** Valor promedio de absorbancia en nm de 32 muestras simples (línea marrón) con nivel de infección de 10 % y tamaño de muestra de 8 %. Valores superiores al umbral de absorbancia (línea azul) son positivos a WSMV..... 28

**Figura 3.** Comportamiento de los valores medios de los tamaños de muestra de las muestras MS y original (Control). Cada valor de la línea marrón representa la media de 32 muestras y los de la línea en azul, el umbral de absorbancia. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes ( $\alpha=0.05$ )..... 29

### Capítulo III

**Figura 4.** Tendencia de valores de absorbancia (nm) de muestras provenientes de sublotos con diferente nivel de infección (NI) del virus BSMV. La línea azul representa el umbral (0.197) a partir del cual la muestra se considera positiva..... 49

**Figura 5.** Tendencia de las medias de sublotos con diferente nivel de infección (NI) del virus BSMV. Cada valor de la línea marrón representa la media de 10 muestras; y, los de la azul el umbral (0.197) a partir del cual la muestra se considera positiva. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ )..... 50

**Figura 6.** Tendencia de las medias de absorbancia de muestras simples (MS) con diferente nivel de infección del virus BSMV, con Tukey  $\alpha=0.05$ . Cada valor de la línea marrón representa la media de 70 muestras MS y los de la azul, el umbral de absorbancia (0.22 nm). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes..... 53

**Figura 7.** Comportamiento de los valores promedio de absorbancia de muestras compuestas (MC) de semilla de trigo. Cada MC se formó con diferente número de muestras simples (MS, 25, 20, 15 y 10), tamaño de muestra (TM, 15, 10 y 5 %) y nivel de infección (NI, 15, 10 y 5 %) de BSMV. La línea azul indica el promedio del umbral de absorbancia (0.21 nm)..... 55

**Figura 8.** Tendencia de los valores promedio de absorbancia de muestras compuestas (MC) de semilla de trigo. Cada MC se formó con diferente número de muestras simples (MS, 25, 20, 15 y 10), tamaño de muestra (TM, 15, 10 y 5 %) y nivel de infección (NI, 15, 10 y 5 %) del virus BSMV. Los valores de la línea marrón indican el promedio de tres muestras MC; los de la punteada morada, la tendencia línea de los valores; y los de la azul, el promedio del umbral de absorbancia (0.21 nm)..... 56

**Figura 9.** Tendencia de las medias de muestras MC con diferente número de muestras MS infectadas con el virus BSMV. Cada valor de la línea marrón representa la media de 9 muestras MC (MS+TM+NI) y los de la azul, el umbral de absorbancia (0.21 nm). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ )..... 57

**Figura 10.** Tendencia de las medias de absorbancia de las muestras compuestas (MC) con diferente tamaño de muestra (TM) con Tukey  $\alpha=0.05$ . Cada valor de la línea marrón representa la media de 12 muestras MC y los de la línea en azul, el umbral de absorbancia. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes..... 58

**Figura 11.** Tendencia de las medias de absorbancia de las muestras MC con diferente nivel de NI del virus BSMV. Cada valor de la línea marrón representa la media de 12 MC y los de la azul, el umbral de absorbancia (0.21 nm). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes..... 59

## **CAPITULO I Marco Teórico**

### **1.1. Introducción**

Para evaluar características de una población (plagas y/o enfermedades) y calcular el tamaño de muestra óptimo, que a su vez ayude a estimar el tiempo y los costos del estudio, se debe tomar en cuenta la precisión y la confiabilidad. Desde un tamaño de muestra preliminar conocido del 10%, que se usó como referencia en el estudio de la sanidad de las semillas, se diseñan y evalúan tamaños de muestra que se desean estudiar. Para las diferentes alternativas de muestreo comparadas se evalúa: la confiabilidad de los resultados, los tiempos para la realización de las pruebas, los costos, la varianza, el coeficiente de variación, la factibilidad y la precisión del tamaño de muestra para la identificación de los problemas sanitarios.

El análisis de sanidad de semillas es una herramienta esencial para el control de patógenos transmitidos por semilla y sigue siendo una actividad importante para su regulación y control a través de los programas de certificación fitosanitaria y de cuarentena en el comercio nacional e internacional de semillas. Este análisis es un factor crítico para asegurar la conservación de la semilla en almacenamiento y para la obtención productiva de germoplasma para la investigación y reproducción de esas semillas. Lo anterior como consecuencia del incremento de responsabilidad, competitividad con la industria semillera, así como parte de las presiones de la industria del ramo, y la sanidad en los centros comerciales. El muestreo de semillas es la primera actividad fundamental en un programa de análisis de semillas confiable para la detección de patógenos de importancia fitosanitaria (Morrison, 1999).

### **Objetivos**

El objetivo general planteado en la presente investigación fue: Evaluar el efecto de reducir la intensidad de muestreo actual (10%) utilizada en los análisis para detectar en semilla de trigo los virus: i).- Virus del mosaico estriado del trigo (WSMV, por sus siglas en inglés) y ii).- Virus mosaico estriado de la cebada (BSMV, por sus siglas en inglés),

con la finalidad de reducir tiempos, costos, y material, sin disminuir la confiabilidad y la precisión de los resultados de dichos análisis.

## **1.2. Hipótesis**

Las hipótesis de trabajo en el presente estudio fueron:

- i. El incremento y reducción actual del tamaño de muestra de semilla de trigo no afecta la sensibilidad de las pruebas de sanidad de semillas.
- ii. El incremento en el número de submuestras utilizadas para formar muestras compuestas no afecta la confiabilidad de los resultados en las pruebas de sanidad de semillas.

## **1.3. Revisión de literatura**

### **1.3.1. Trigo**

El trigo es una de las plantas cultivadas más ampliamente adaptadas a nivel mundial, alcanzando hasta un 20% de la superficie cultivable. Es un cultivo de temporada fría, concentrándose su mayor producción entre los 30 y 60° latitud norte y entre los 27 y 40° latitud sur. Aunque, también es cultivado en el círculo Ártico y las elevaciones altas de los trópicos. La temperatura mínima para su crecimiento es de 3-4°C; la óptima, de 25°C; y la máxima, de 32°C. El mejor crecimiento del trigo es en suelos drenados y alturas desde el nivel del mar hasta elevaciones de 3,000 m. Puede crecer en áreas con precipitaciones anuales que van desde los 250 a 1,750 mm. Sin embargo, tres cuartas partes de la superficie cultivable se da en áreas con precipitaciones de 375 a 875 mm. En algunas partes del mundo el trigo se cosecha durante todo el año, pero la mayoría de la cosecha se da en los meses de abril y septiembre en el Hemisferio Norte y entre octubre y enero en el Hemisferio Sur.

El trigo, junto con el maíz y el arroz, provee el 75% de los carbohidratos y el 50% de la proteína consumible por el hombre. Es el más nutritivo y una excelente fuente de proteínas, carbohidratos, fibra, minerales y vitaminas.

Las pérdidas de producción en trigo se estiman entre un 25 y 30% por factores abióticos y bióticos, entre los que destacan las enfermedades ocasionadas por virus y hongos (Bockus, *et al.* 2010). Las infecciones del trigo por virus pueden causar respuestas diferentes, desde latentes hasta letales, dependiendo de la especie del virus. Las plantas de trigo pueden presentar síntomas foliares desde arrosamientos, mosaicos, amarillamientos y, en algunos casos, necrosis. Las infecciones por dos o más virus (infección múltiple) puede ser aditiva, sinérgica o protección cruzada, dependiendo de la especie del virus.

Los virus pueden ser transmitidos por injerto, savia, semilla, polen, animales, plantas, hongos, insectos y por el hombre (durante manipulaciones deliberadas o accidentales). También los ácaros y los nematodos pueden transmitir algunas especies de virus. Muchos virus son transmitidos mecánicamente a través de la savia, cuando las hojas de plantas infectadas rozan con hojas sanas (Bockelman, *et al.* 1981); sin embargo, los virus transmitidos principalmente por insectos son restringidos al floema, donde interfieren con el transporte de nutrientes e inducen clorosis general. (Bockus, *et al.* 2010).

Actualmente se conocen 30 diferentes virus que infectan trigo natural o experimentalmente. Estos virus varían en su morfología pudiendo encontrarse desde partículas filamentosas (varilla rígida o flexible) hasta isométricas y baciliformes. La mayoría de los virus contiene un genoma de RNA (*tritimovirus* Wheat streak mosaic virus – WSMV, *hordeivirus* Barley stripe mosaic virus – BSMV (Mathur and Cunfer, 1993, Mathre, 1997), pero algunos otros DNA (geminivirus *Maize streak virus*, *Wheat dwarf virus*). (Bockus, *et al.* 2010).

### **1.3.2. Muestreo y Tamaño de muestra**

Las pruebas de sanidad de semillas se realizan a partir de muestras tomadas de un lote de semillas. Por lo que es crucial que la muestra sea representativa y que se haya tomado con técnicas de muestreo estandarizadas. Los muestreos de prueba de sanidad de semillas suelen ser los mismos que se utilizan para las pruebas de

germinación, de pureza, para detección de malezas (nocivas y/o cuarentenadas) y para caracterizar lotes y otras semillas (ISTA, 2013).

Comercialmente los lotes de semillas son cantidades específicas que son identificadas por un número o algún otro código y, que por lo regular cumplen con ciertos estándares de calidad (ISTA, 2013). Un lote puede estar compuesto de semillas cosechadas de un solo campo de producción o de varias porciones de terreno. En algunos casos un lote está formado de una mezcla de semillas de diferentes sublotes que tienen calidad aceptable.

El objetivo del muestreo de semillas, como se indica en las reglas de análisis de semillas de ISTA es obtener una muestra de un tamaño adecuado para las pruebas, cuyos resultados deben reflejar la calidad del lote de semilla. Esto depende de dos componentes: la precisión con que la muestra representa el lote de semilla y la sensibilidad de las pruebas de laboratorio. Está comprobado que en muchos casos la fuente principal de variación en los resultados es el muestreo (ISTA, 2013).

Scott y Zummo (1995) evaluaron tamaños de muestra de grano de maíz para determinar el porcentaje de grano infectado por *Aspergillus flavus*. De ocho lotes de semilla se tomaron aleatoriamente por separado muestras para formar tamaños de muestra de 65, 130, 195 y 390 semillas para determinar el porcentaje de infección por *Aspergillus flavus*. Se formaron 6 muestras de 65 semillas, tres muestras de 130, 2 muestras de 195 y una de 390 semillas. Estos autores encontraron que el tamaño de muestra (TM) de 65 semillas fue insuficiente para obtener un nivel deseado de separación de medias, debido a que el cuadrado medio del error fue alto y el valor de F fue bajo, comparándolo con los TM más grandes. La diferencia de los valores de cuadrados medios del error y de F son mínimas entre los TM de 195 y 390 semillas. Concluyeron que el TM mínimo es de 200 granos para evaluar la incidencia por *A. flavus*. Mencionan que para conocer la probabilidad de detección de un patógeno similar a *A. flavus* usando diferentes tamaños de muestra (TM) y niveles de infección (NI), se puede aplicar la fórmula de probabilidad  $(=1-(1-p)^n)$ , donde  $p$  es el porcentaje

de infección del grano y  $n$  es el número de granos por muestra (1). Indican que cuando el NI natural es bajo se podrían obtener resultados falso negativos aun cuando el tamaños de muestra fuera grande. En contraste, cuando el NI está por arriba del 3%, un TM de 100 granos es suficiente para detectar al hongo con un 95% de probabilidad.

Moreno y Castillo (1978) encontraron que la clasificación de los árboles, según el porcentaje de café retenido en cada zaranda, no está influida por el tamaño de muestra empleado. Además, las tres series de medidas del tamaño de grano, obtenidas con muestras de diferente magnitud, están estrechamente correlacionadas. La disminución del tamaño de la muestra tampoco afectó la medida del grano en las variedades comerciales, y solamente produjo aumentos menores del dos en la variabilidad del experimento. Estos autores concluyeron que la muestra tradicional de 250 gramos, usada para estudios de tamaño de grano, puede reducirse a 100 o 50 gramos sin causar alteraciones en los resultados experimentales.

Priuo, *et. al.* (2001), mencionan que los organismos de certificación de semillas utilizan 400 tubérculos de papa para llevar a cabo análisis de sanidad. Estos autores encontraron que en muestras compuestas de 225 tubérculos de papa provenientes de terrenos de cultivo asintomáticos de mancha bacteriana resultaron positivas a *Ralstonia solanacearum* con un 95% de probabilidad (nivel de confianza). En cambio, en muestras compuestas de 150 tubérculos provenientes de terrenos de cultivo con 0.1 – 1.0 % de incidencia de mancha bacteriana, la bacteria se detectó con 96% de probabilidad. Así mismo, para muestras compuestas de 100 tubérculos colectados de cultivos con incidencia de mancha bacteriana de 1.1 – 3 %, la bacteria se detectó con una probabilidad del 96%. Concluyendo que el nivel de incidencia de mancha bacteriana en los tubérculos de papa determina el tamaño de la muestra compuesta a utilizar para la detección de *Ralstonia solanacearum*.

El coeficiente de variación (CV) es el parámetro estadístico de mayor relevancia en la estimación del tamaño de muestra necesario para describir la variabilidad de una

población, ya que entre mayor sea el valor del CV mayor será la cantidad de elementos a analizar para caracterizar adecuadamente a una población (Fernández, 2007).

Fernández (2007), encontró que el CV promedio de todos los caracteres evaluados fue de 14.57%, lo que indica que se trata de una población homogénea; ya que poblaciones con un CV mayor al 20% son consideradas como heterogéneas; y que siete de ocho caracteres evaluados tuvieron valores menores al 20%, excepto el de ramas totales en panoja (RTP). Observó que para todos los caracteres evaluados, el menor tamaño de muestra es el que da como resultado empleando el menor nivel de confianza ( $\alpha=0.05$ ) y el menor grado de precisión ( $d=10\%$ ), y por el contrario, el mayor tamaño de muestra es el resultado de utilizar el mayor nivel de confianza ( $\alpha=0.01$ ) con el mayor grado de precisión ( $d=5\%$ ).

Thomas, *et al.* (2005), encontraron que en graneles de semilla de trigo de 200 t infectado con *Microdochium nivale*, muestras compuestas de 40 muestras registraron un nivel de infección entre 1.7 y 9.5%, similar al registrado en muestras simples (menos de 10%). En tanto que en gráneles de semilla de trigo de 500 t infectados con el hongo, las muestras compuestas de 80 muestras registraron 11 % de nivel de infección y las muestras simples, menos del 20% de nivel de infección. Estos mismos autores, analizando graneles infectados con *Tilletia tritici*, encontraron que: en los graneles de 100 y 200 t las muestras compuestas de 40 muestras registraron 46.7 y 2.4 esporas por semilla de nivel de infección. En contraste, en el granel de 500 t, las muestras compuestas (80 muestras) registraron 0.08 esporas por semilla de nivel de infección. En conclusión, lo que estos autores observaron fue de que con forme se incrementa el tamaño del granel, se reduce el nivel de infección de la muestra compuesta.

Nyrop, *et al.* (1999), basados en la investigación del plan de muestreo, concluyeron que la densidad crítica tiene mayor influencia en las características funcionales, y también en la de decisión correcta e incorrecta del manejo integrado de plagas. Los cambios en la distribución del muestreo tienen poca influencia en la función de las características funcionales para los planes completos del conteo de muestras y

que las características funcionales son relativamente insensibles al incremento continuo del tamaño de muestra. Estos autores recomendaron que el desarrollo de un plan de muestreo debería ser para obtener una buena estimación del nivel de daño económico. Cuando se desarrollen planes de muestreo, uno debería comenzar por comprobar lo que se sabe acerca de la distribución del muestreo y realizar un análisis sensitivo para determinar si un perfeccionamiento de esta información está justificado. Y que el tamaño de la muestra debería basarse primero en la información de la muestra representativa. La información de la muestra es un buen indicador de la abundancia o incidencia de plagas en la unidad de manejo. La información de la muestra podría no ser representativa, si las observaciones de la muestra no son tomadas a lo largo de un universo de muestras, en el cual podría pasar cuando muy pocas muestras son tomadas.

Montesinos, *et al.* (2010), estudiaron tamaños de muestra para estimar y determinar el porcentaje de plantas transgénicas con un intervalo de confianza estrecho (CIW por sus siglas en inglés), encontrando que cuando incrementaban el tamaño de la muestra el CIW también incrementaba. Cuando el tamaño de muestra fue de 1 el CIW fue menor que 0.3, el CIW máximo se alcanzó cuando la prevalencia de plantas transgénicas fue de 0.5. Cuando el tamaño de muestra fue de 15 el CIW fue de  $\geq 0.7$  con un 0.3 de tasa de prevalencia de plantas transgénicas. Para un tamaño de muestra de 50, el promedio de CIW fue de  $\geq 0.7$  con una tasa de 0.1 de prevalencia de plantas transgénicas.

Miyamoto, *et al.* (2008), estudiaron tamaños de muestra para una estimación confiable de la diversidad genética en *Fraxinus excelsio*, evaluando los requerimientos de los tamaños de muestra para precisar la diversidad genética en árboles adultos y en familias formadas de 12 ha. Encontraron que las muestras relativamente grandes son requeridas para capturar la mayoría de alelos promedio presentes en la población adulta. En contraste, los tamaños de muestra pequeños son necesario para obtener coeficientes de variación (CV) pequeños de los heterocigotos esperados, como los promedios de la simulación son cercanos a los valores de la población de todos los

tamaños de muestra (pequeñas tendencias), aunque la varianza fue mayor en tamaños de muestra menores a 50 árboles. De hecho,  $CV=0.01$  fue posible con tamaño de 4 de muestra. Por lo tanto para obtener una probabilidad de 0.001 para diversidad genética se requiere de 31 individuos en promedio.

Lawrence, *et al.* (1995), estudiaron semillas colectadas de tamaños de muestra de especies de plantas de polinización cruzada para conocer su conservación genética. Estos investigadores encontraron que el tamaño apropiado fue de 172 plantas cuando solo toman una semilla por individuo. Aunque cuando ellos toman de 8 a 10 semillas por planta el tamaño se reduce de 20-30 plantas tomadas aleatoriamente.

Tavella, *et al.* (2014), estudiaron tamaños de muestra de 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6, 7.2, 8.4 y 9.6 m<sup>2</sup>, para evaluar el crecimiento de la maleza, encontraron que con un tamaño de muestra de 1.2 m<sup>2</sup> el coeficiente de variación fue de casi el 40%, pero con un tamaño de muestra de 2.4 m<sup>2</sup> el coeficiente de variación se redujo a 30.68%, reduciendo la varianza media de la muestra. De esta manera concluyeron que la relación entre el coeficiente de variación experimental (CV) y el tamaño de muestra (S) fue dado por la ecuación  $CV=37.57 S^{-0.15}$ , y que el tamaño de muestra óptimo es de 4.3 m<sup>2</sup>.

Sánchez (2003), estudió los tamaños de parcela de 2.16, 4.32, 6.48, 8.64 y 21.60 m<sup>2</sup>, adecuados para realizar evaluación de genotipos, encontrando que la variabilidad entre parcelas disminuyó al aumentar el tamaño de 2.16 a 21.60 m<sup>2</sup> y de acuerdo a su análisis sugiere utilizar una parcela experimental de 6.48 m<sup>2</sup>.

### **1.3.3. Movimiento y rango de hospedantes de los virus**

Uno podría imaginarse que un virus sobrevive por cientos de años en árboles de especies perennes. Sin embargo, siendo parásitos obligados, los virus usualmente dependen para su supervivencia de su capacidad para propagarse de un individuo susceptible a otro con bastante frecuencia. El conocimiento de las formas en las cuales los virus son transmitidos de planta a planta es importante por varias razones: desde el punto de vista experimental podemos reconocer una determinada enfermedad, como la

causada por un virus, sólo si somos capaces de transmitir el virus a individuos sanos por algunos medios y reproducir la enfermedad; los virus son económicamente importantes solo si pueden propagarse de planta a planta con bastante rapidez con relación con el ciclo de vida comercial normal de la cosecha; el conocimiento epidemiológico de un virus fitopatógeno es esencial para el desarrollo de medidas de control satisfactorias; las relaciones entre los virus y sus vectores invertebrados y fúngicos son en general, de considerable interés biológico.(Mattews, 1991).

#### **1.3.3.1. Transmisión por semilla y polen infectado**

**Transmisión por semilla.** Aproximadamente, uno de cada cinco virus de plantas conocidos es transmitido a través de semillas de plantas infectadas. La transmisión por semilla provee un medio muy eficiente de introducción de virus dentro del cultivo, como en las etapas tempranas, dando focos de infección aleatorizados en toda la plantación. Así, cuando algún otro método de transmisión pueda funcionar en la propagación del virus dentro del cultivo en crecimiento, la transmisión por semilla puede considerarse económicamente importante. Los virus pueden persistir en las semillas por largos períodos de manera que la distribución comercial de un virus transmitido por semilla puede ocurrir a grandes distancias.

Dos tipos de transmisión por semilla pueden ser distinguidos. Con el virus del mosaico del tabaco TMV en tomate, la transmisión por semilla es en gran parte debido a la contaminación de la plántula por medios mecánicos. Este tipo de transmisión puede ocurrir con otros tobamovirus. Los virus externamente pueden ser fácilmente inactivados por determinados tratamientos, eliminando todas o casi todas las infecciones por la semilla. Una pequeña parte, pero variable proporción de la semilla puede estar infectada en el endospermo donde los virus pueden persistir por muchos años. En el segundo y más común tipo de transmisión por semilla, el virus es localizado dentro de los tejidos del embrión. El embrión puede infectarse a través del ovario o del polen (Mattews, 1991).

**Transmisión a través de polen infectado.** La mayoría de los virus que se transmiten por semilla también se pueden transmitir por polen de plantas infectadas. Sin embargo, no todos ellos han sido probados experimentalmente. Por ejemplo, es más eficiente la transmisión de AMV por polen que por óvulo; mientras que, para el virus del mosaico de la lechuga se tiene 5% de transmisión a través del óvulo, y 0.5% por polen. Se considera que existe un alto porcentaje de infección de semilla cuando la planta infectada se autopoliniza, que cuando solo un gameto proviene de un individuo infectado.

El grado en el cual el polen infectado es un factor importante en la dispersión de los virus en las parcelas no ha sido estudiado a fondo. Aunque podría ser más importante económicamente en polinización cruzada en especies perennes, que en cultivos anuales. El polen infectado con ciertos virus puede causar efecto en la semilla cuando la planta polinizada está sana y con otros cuando la planta está infectada.

La transmisión de muchos virus a través de los gametofitos probablemente es más eficiente que la transmisión a través del polen. Experimentalmente la polinización cruzada mostro que la ruta principal para la transmisión por semilla de TRSV en soya fue por la infección de los gametófitos.

Matthews, (1991) menciona que partículas virales de BSMV y TRSV han sido encontradas dentro de granos de polen. Partículas del BSMV fueron observadas dentro de las células del citoplasma y núcleo, y también en células y tejidos involucrados en la embriogénesis. Este mismo autor menciona que el inmunomarcaje muestra que partículas del AMV están distribuidas ampliamente en óvulos, polen y anteras de alfalfa. Indica que el camino que estos virus siguen para infectar la célula huevo es vía espermias infectados, o solo núcleos infectados de esperma. Virus miembros del grupo de cryptovirus son inusuales ya que estos pueden transmitirse eficientemente a través del polen y semilla, pero no mecánicamente, injerto o vectores.

### 1.3.3.2. Factores que afectan el porcentaje de semilla infectada

**Virus y cepa de virus.** La cantidad de semilla infectada proveniente de plantas infectadas varía dependiendo del tipo de virus. Esta puede ser hasta un 100% como en el caso del virus TRSV en soya o del nepovirus de la mancha anular latente de la fresa en apio o de 1% de transmisión como en caso del timovirus latente de la papa andina; en cambio, del 3 al 15% de semilla infectada obtenidas de plantas de lechuga infectadas con el potivirus del mosaico de la lechuga. La transmisión por semilla del virus AMV y del potivirus del moteado del cacahuete en cacahuete varía considerablemente por las diferencias entre tipos de cepa (Mattews, 1991).

**Planta hospedante.** Algunos virus se transmiten por semilla a un amplio rango de especies hospederas. Por ejemplo, el nepovirus del anillo negro del tomate se transmite por semilla por varias especies pertenecientes a seis familias. Otros virus se transmiten por semilla de una especie hospedera pero no de otra. Por ejemplo, el virus del mosaico latente de la cuscuta fue transmitido en un 5% a través de semilla infectada de *Cuscuta campestris*, pero no a través de semilla de melón, trigo sarraceno o hierba carmín (Mattews, 1991).

Variedades de la misma especie hospedera a menudo varían bastante en el rango que ocurre la transmisión de un virus por semilla. Por ejemplo, el virus del mosaico de la lechuga no parece ser transmitido a través de la variedad cheshunt early giant. Los rangos de transmisión por semilla reportados para BSMV varían desde 0 hasta 75 % en diferentes cultivares de cebada. También hay variación de transmisión entre plantas de una misma variedad (Mattews, 1991).

**Tiempo en el cual la planta es infectada.** Generalmente, cuanto antes sea infectada la planta, mayor es el porcentaje de transmisión del virus a la semilla. Una excepción a esta tendencia parece ser BSMV en cebada, donde el porcentaje de semilla infectada aumento de manera constante, conforme el tiempo de infección se fue retrasando, alcanzando un máximo a los 10 días antes del espigamiento. Después de este tiempo el porcentaje disminuyo (Mattews, 1991).

**Ubicación de la semilla en la planta.** Parece no existir un patrón coherente en la forma de infección de la semilla en la planta. Por ejemplo, la posición de la semilla en la vaina y la ubicación de la vaina en la planta, no afecto el porcentaje de semilla de soya infectada con TRSV. En plantas que establecen su semilla sucesivamente durante su desarrollo, y la infección ocurriera cerca o durante el periodo de floración, podría dar una distribución, en la cual las semillas de mayor edad tendrían menor infección que las semillas jóvenes (Mattews, 1991).

**Edad de la semilla.** Algunos virus transmitidos por semilla se pierden rápidamente durante el almacenamiento; mientras otros persisten por años. En los primeros 4 años de almacenaje a 2°C, el virus de la mancha anular necrótica de la cereza en semillas de *Prunus pennsylvanica*, su porcentaje de infección se mantuvo constante en un 60-70%. Al sexto año disminuyo un 5% (Mattews, 1991).

**Alta temperatura.** Algunos virus transmitidos por semilla son resistentes a altas temperaturas estando infectando la semilla. Por ejemplo, el TRSV supervive por cinco años en semilla de soya a temperaturas entre 16-32°C, así como a 1-2°C, aunque la germinación de la semilla se vio afectada a altas temperaturas. La resistencia a altas temperaturas, pudiera deberse a la baja cantidad de agua y al alto contenido de proteínas en la semilla que estabilizan los efectos generales y mantienen intactas las partículas virales (Mattews, 1991).

#### **1.3.4. Pruebas de laboratorio**

En México existen varios laboratorios, públicos y privados, de diagnóstico fitosanitario reconocidos por la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) los cuales realizan pruebas de sanidad a semillas de importación y exportación.

En el laboratorio de sanidad de semillas del CIMMYT por ejemplo se realizan las siguientes pruebas de diagnóstico:

**Inspección visual:** Para detectar soros de carbón, agallas de nematodos, esclerocios de cornezuelos, semillas de malezas, daños por insectos y otras impurezas.

**Prueba de lavado de semilla y filtración:** Para revelar la presencia de esporas de hongos por ejemplo, teliosporas y esporas de carbón (*Tilletia* spp., *Urocystis* spp, *Ustilago* spp.), esporas de mildiú (*Peronosclerospora* y *Sclerophthora* spp.) y quistes de nematodos.

**Prueba en papel secante y congelamiento:** Para revelar la presencia de hongos imperfectos llevados por la semilla.

**Pruebas de germinación en invernadero:** Para obtener la expresión de síntomas de patógenos transmitidos por semilla y verificar la viabilidad de la misma. Si las plántulas presentan síntomas, deberán someterse a otras pruebas (p.ej. ELISA) para identificar el agente patógeno.

**ELISA** (Ensayo por inmunoabsorción de enzima ligada): para detectar bacterias y virus.

**Prueba de tinción de embrión:** Para la detección de *Peronosclerospora* y *Sclerophthora* spp, agente causal del mildiú veloso en semilla de maíz (Mezzalama, 2012, Warham *et al.*, 1996).

El análisis de sanidad de semillas es un componente importante en el manejo de enfermedades de cuarentena y, certificación fitosanitaria para la producción de semillas y de germoplasma. Debido a la baja frecuencia de la mayoría de los patógenos importantes transmitidos por semilla, los bajos umbrales económicos o del inicio de una epidemia, el muestreo para el análisis de sanidad de semillas, puede presentar problemas especiales (Morrison, 1999).

#### 1.4. Bibliografía

Bockus, W.W., R.L. Bowden, R.M. Hunger, W.L. Morrill, T.D. Murray and R.W. Smiley. 2010. Compendium of wheat diseases and pests. Third edition. The American Phytopathological Society.

Bockelman, H.E., E.L. Sharp, D.C. Sands, A.L. Scharen, D.E. Mathre, T.W. Carroll, J. Riesselman, R.F. Eslick and other staff of the dept. of plant Pathology. 1981. Field manual of common barley diseases. Montana agricultural experiment station.

www.agdia.com ELISA: Reagent set. Catalog No. SRA 19500.

Fernández, V.Z. 2007. Tamaño de muestra para caracterización y mantenimiento varietal en maíz. Tesis Maestría en Ciencias en Recursos Genéticos y Productividad: Producción de Semillas. Colegio de Postgraduados.

International Seed Testing Association. 2013. International rules for seed testing; Rules testing 2013. ISTA.

Lawrence, M. J., D. E. Marshall and P. Davies. 1995. Genetics of genetic conservation. II. Sample size when collecting seed of cross-pollinating species and the information that can be obtained from the evaluation of material held in gene Banks. *Euphytica*. 84:101-107.

Mathur, S.B. and B.M. Cunfer. 1993. Seed-borne diseases and seed health testing of wheat. Copenhagen: danish government institute of seed pathology for developing countries.

Mattews, R. E. F. 1991. Plant virology. Third Edition. Academic Press, Inc.

Mezzalama, M. 2012. Sanidad de semillas: Reglas y normas para el desplazamiento seguro de germoplasma. Tercera edición. México, D. F.: CIMMYT.

Montesinos, L. O.A., Abelardo M.L., José C., J., Kent E., Carlos M. H.S. 2010. Sample size for detecting and estimating the proportion of transgenic plants with narrow confidence intervals. *Seed Science Research*. 20:123-136.

Moreno-Ruíz, G. y Castillo-Zapata, J. 1978. La reducción del tamaño de la muestra en la medida del grano del café. *Cenicafé Colombia* 29:42-55.

- Morrison, R., H. 1999. Sampling in seed health testing. *Phytopathology* 89:1084-1087.
- Miyamoto, N., Juan F. F.M., Marie E. M.P., Paola B. and Nathalie F.L. 2008. What Sampling is needed for reliable estimations of genetic diversity in *Fraxinus excelsior* L. (Oleaceae). *Ann For. Sci.* 65:403. INRA, EDP Sciences.
- Nelson, P.E., T.A. Toussoun and W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium* especies: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press.
- Nyrop, J. P., Binns, M. R., and Van der Werf W. 1999. Sampling for IPM decision making: where should we Invest time and resources?. *Phytopathology.* 89:1104-1111.
- Priou, S., R. Torres., Alicia V., Liliam G., and F. de Mediburu. 2001. Optimisation of simple size for the detection of latent infection by *Ralstonia solanacearum* in potato seed tubers in the highlands of Peru. *Potato Research* 44:349-358.
- Sánchez, H., M. A. 2003. Selección combinada, cambios en parámetros genéticos y tamaño adecuado de parcela en calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber var. *stenosperma*) en el sistema milpa. Tesis Doctor en Ciencias en Genética. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. pp. 81, 83,89.
- Scott, G. E., and N. Zummo. 1995. Size of maize simple needed to determine Percent Kernel Infection by *Aspergillus flavus*. *Plant Disease* 79:861-864.
- Tavella, L.B., Silva, P.S.L., Oliveira, V.R., Fernandes, P.L.O. and Sousa, R.P. 2014. Weed control in corn and weed sample size for growth evaluations. *Planta Daninha, Vicoso-MG.* 32:1:51-59.
- Thomas, J.E., D.M. Kenyon, V. Cockerell and P. Thompson. 2005. Distribution of *Tilletia tritici* and *Microdochium nivale* in wheat seed bulks, and significance for seed sampling strategies. *Seed Testing International.* No. 129.
- Warham, E. J., L. D. Butler and R. C. Sutton. 1996. Seed testing of maize and wheat, a Laboratory guide. CIMMYT, México D. F. 84 p.

## **CAPITULO II Evaluación de tamaños de muestra de semilla de trigo para determinar la capacidad predictiva del método de detección ELISA del Virus del mosaico estriado del trigo**

Arturo Martínez Mirafuentes, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

### **Resumen**

El objetivo del presente capítulo fue determinar si el incremento o la reducción del tamaño de muestra (TM) actual de 10% afecta la sensibilidad de la prueba por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) para la detección del virus del mosaico estriado del trigo (WSMV, por sus siglas en inglés). A partir de muestras de semilla de trigo harinero (*Triticum aestivum*) naturalmente infectadas con el virus WSMV se formaron muestras simples (MS). Para esto se mezclaron 10 g de cada muestra infectada con 90 g de semilla sana. En total se prepararon 32 MS con nivel de infección (NI) de 10%. A partir de estas MS se formaron los tamaños de muestra (TM): 20, 15, 10, 8, 6 y 4% y se estableció la prueba con muestras de harina proveniente de 2 g de semilla de trigo de cada MS y placas de poliestireno de 96 pozos. Los reactivos y el protocolo empleado fue el de AGDIA®, DAS ELISA (2013) para el virus WSMV. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que el aumento o la reducción del tamaño de muestra actual de 10% afectó significativamente ( $\alpha=0.05$ ) la sensibilidad de la prueba ELISA para la detección del Virus WSMV en muestras simples de trigo. La sensibilidad de la prueba al virus fue baja cuando se analizaron las MS con todos los tamaños de muestra (20, 15, 8, 6 y 4 %) y nivel de infección de 10%. Lo anterior indica que el nivel de infección natural de la semilla de trigo es un factor importante a considerar para la detección del virus WSMV por la prueba ELISA.

Palabras clave: mosaico, tamaño, semilla, trigo, muestra.

## **CHAPTER II. Evaluation of sample sizes wheat seed to determine the predictive ability of the ELISA detection method of *Wheat streak mosaic virus***

Arturo Martínez Mirafuentes, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

### **Abstract**

The goal of this chapter was to determine whether the increase or reduction in sample size (SaS) Current 10% affects the sensitivity of the test for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of the *Wheat streak mosaic virus* (WSMV). From seed samples of bread wheat (*Triticum aestivum*) naturally infected with the WSMV single samples (SiS) were formed. To this 10 g of each sample infected were mixed with 90 g of healthy seed. SiS total 32 were prepared with level of infection (LI) of 10%. Beginning with these SiS sample sizes were formed: 20, 15, 10, 8, 6 and 4%, and the test was established from samples of flour 2 g of wheat seed from each SiS and polystyrene plates 96 wells. The reagents and the protocol used was the AGDIA®, DAS ELISA (2013) for WSMV. The results obtained in this study indicated that increasing or reducing the current sample size of 10% affection significantly ( $\alpha = 0.05$ ) the sensitivity of the ELISA test to detect the WSMV single samples. The sensitivity of the test virus was low when the SiS were analyzed with all the sample sizes (20, 15, 8, 6 and 4%) and level of infection of 10%. This indicates that the level of naturally infected wheat seed is an important consideration for WSMV detection by ELISA test.

Keywords: mosaic, size, seed, wheat, sample.

## 2.1. Introducción

El virus del mosaico estriado del trigo (Wheat streak mosaic virus, WSMV, por sus siglas en inglés) es el agente causal del mosaico estriado del trigo, inicialmente conocido como mosaico amarillento en Nebraska, por el año de 1922 (McKinney, 1937). El mosaico estriado del trigo es una enfermedad del trigo económicamente importante y ampliamente distribuida. Esta enfermedad se ha reportado en varias partes del mundo como Estados Unidos, Canadá, el este de Europa, la antigua Unión Soviética, Australia (Bockus, *et al.* 2010) y México (Sánchez-Sánchez, *et al.* 2001). Las áreas afectadas por la enfermedad pueden cubrir desde cientos de hectáreas hasta algunos metros de terreno o bien pequeñas áreas dentro de los mismos. Esta enfermedad puede presentarse en diferentes cultivos como cebada, maíz, arroz, avena, pastos anuales y perennes, y trigo (invierno y primavera) en los cuales puede ocasionar pérdidas considerables en el rendimiento (Christian y Willis, 1993).

### Dispersión del virus y agente vector

La dispersión del virus WSMV está estrechamente relacionada con la distribución de su vector el ácaro del trigo *Aceria tosichella* (Slykhuis, 1955). Jones, *et al.* (2005) y Coutts, *et al.* (2014) han reportado que este virus se transmite por semilla pero en niveles bajos (2%). Estos autores también mencionan que el virus se puede transmitir fácilmente por savia y que las plantas de las orillas de los terrenos cultivados son las primeras, si no es que las únicas, que se ven afectadas por la enfermedad.

Todos los estados larvarios y el estado adulto del ácaro del trigo llevan o acarrear en el intestino medio y grueso al virus WSMV pero no así los huevecillos. El periodo de adquisición es corto, de 15 min o un poco más, y la mayoría de los ácaros pueden permanecer infectivos de 7 a 9 días (Slykhuis, 1955).

Las temperaturas y los depredadores no son limitantes para el desarrollo del ácaro desde la etapa de huevecillo hasta la de adulto (8 a 10 días). Su número puede incrementarse significativamente en poco tiempo, cuando el medio ambiente es

favorable (Thomas, *et al.* 2004). Los ácaros tienen un tamaño de 0.3 mm de longitud, son generalmente de color blanco, cilíndricos, con cuatro patas diminutas seguidas por la cabeza. Aunque los ácaros son capaces de moverse a distancias cortas se dispersan principalmente por el viento.

## **Síntomas**

Los síntomas del mosaico estriado del trigo varían con el cultivar, la cepa del virus, el tiempo de infección y las condiciones del medio ambiente. Las plantas afectadas a menudo son enanas, con hojas moteadas y rayadas. Las estrías de las hojas son amarillo verdosas, paralelas y discontinuas. Las hojas totalmente infestadas con ácaros tienden a permanecer erectas con sus márgenes enrollados hacia la nervadura central superior (Bockus, *et al.* 2010). Esto se debe a que el ácaro vector se alimenta preferentemente de las hojas superiores, cerca de los márgenes, causando más tarde el enrollamiento de las hojas hacia la vena central superior, lo que les brinda protección (Paliwal and Slykhuis, 1967).

En trigo de invierno las infecciones de otoño son comunes aunque los síntomas, como enanismo y amarillamiento, generalmente se expresan en la primavera siguiente, cuando la temperatura es alta (Hunger, *et al.* 1992). Si se forman espigas éstas son total o parcialmente estériles. Las hojas en su mayoría, si no es que la planta completa, comienzan a amarillarse y necrosarse. Los síntomas en trigos de invierno son similares a los del trigo de primavera pero en estos últimos los tiempos de infección para la expresión de síntomas pueden ser mucho más cortos (Bockus, *et al.* 2010).

### **2.1.1. Agente causal**

El virus WSMV, clasificado inicialmente como miembro del género *Rymovirus* y posteriormente en 1999 en el género *Tritimovirus*, de la familia Potyviridae, se caracteriza por presentar partículas virales de tipo varilla flexible de 15 x 700 nm. Su genoma viral es del tipo RNA monocatenario positivo (cadena simple), con 9384 nucleótidos, con cola poly A en el extremo 3 (Stenger, *et al.* 1998). El virus produce inclusiones de tipo molinete membranoso y agregados en las células, alterando la

estructura de los organelos como el núcleo, cloroplastos y mitocondrias (Gao y Nassuth, 1993). El virus WSMV se inactiva térmicamente a 54°C por 10 min en savia (Jones, *et al.* 2005).

## **Objetivos**

Determinar si el incremento o reducción del tamaño de muestra (TM) actual de 10% a tamaños de 20, 15, 8, 6 y 4 % afecta la sensibilidad de la prueba ELISA para la detección del virus WSMV.

## **2.2. Hipótesis**

El aumento o reducción actual del tamaño de muestra de trigo del 10% al 20, 15, 8, 6 y 4 %, no afecta la sensibilidad de la prueba ELISA al virus WSMV.

## **2.3. Materiales y Métodos**

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad de Semillas del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en el Batán, Texcoco, Estado de México.

### **2.3.1. Formación de muestras simples**

A partir de 32 muestras de semilla de trigo harinero (*Triticum aestivum*) naturalmente infectadas con el virus WSMV se formaron muestras simples (MS). Para evitar errores de muestreo y dar a cada semilla la probabilidad de ser seleccionada, se tomó un peso base de 10 g de cada muestra y se mezcló con 90 g de semilla sana. De esta manera se formaron las 32 MS, cada una con un peso total de 100 g y nivel de infección (NI) del 10%. Siguiendo los protocolos de toma de muestra del laboratorio se formaron los siguientes tamaños de muestra (TM) con cada una de las MS: 20, 15, 10, 8, 6 y 4%, pesando en una balanza SHIMADZU UX820S 12.61, 11.13, 10, 7.2, 4.96 y 3.11 g de semilla respectivamente.

### **2.3.2. Establecimiento de prueba DAS-ELISA**

La prueba por inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) para la detección del virus WSMV se estableció con muestras de harina, provenientes de muestras MS de 2 g de semilla, en placas de poliestireno de 96 pozos. Durante el ensayo se utilizaron los siguientes materiales: micropipetas Finnpipette® de 2-20 µl, 20-200 µl, una micropipeta multicanal de 30-300 µl, una pipeta digital Eppendorf Xplorer® 0.25-5 ml, vasos de precipitado, volumen variado, puntas para micropipetas (enteras o sin punta) estériles, reservorios para micropipetas, una pipeta multicanal (1L), y tubos tipo falcón de 50 ml. Previo al establecimiento de la prueba se preparó una caja de plástico con dos sanitas humedecidas para formar una “cámara húmeda”, para incubar las placas, así como el diagrama de carga de acuerdo a un patrón preestablecido.

En general los reactivos empleados para el establecimiento de la prueba así como el protocolo siguiente fue de AGDIA®, DAS ELISA para el virus WSMV (2013).

#### **Sensibilización y lavado de placas**

El anticuerpo de cobertura se diluyó 1:200, para esto se mezclaron 7400 µl de búfer de cubrimiento (1X), pH 9.6, con 37 µl del anticuerpo cobertura. Con excepción de los pozos blanco, en cada pozo se adicionaron 100 µl de la dilución del anticuerpo de cobertura y se incubó por 4 h a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración a 4°C en cámara húmeda. Después de la incubación, se vació el contenido de la placa y se lavó con el búfer de lavado PBST (1X) con una pipeta multicanal. Este proceso se repitió tres veces y entre cada lavado se sacudió con fuerza la placa hacia abajo sobre una toalla de papel doblada para eliminar el exceso de líquido y las burbujas.

#### **Adición de muestras**

A cada uno de los tubos con las muestras de harina se les agregó 20 ml de búfer de extracción (1X) relación 1:10 (peso de muestra en g: volumen del búfer en ml). Con excepción de los pozos blanco, se agregaron 100 µl por pozo de cada una de las

muestras por duplicado, así como el control positivo, control negativo y el búfer, de acuerdo al diagrama de carga preestablecido. La placa se incubó por 2 h a temperatura ambiente o bien toda la noche en refrigeración a 4°C, en cámara húmeda. Al completarse la incubación la placa se vació y se lavó ocho veces con el búfer de lavado, con la finalidad de eliminar todo residuo de muestra. Entre cada lavado se sacudió con fuerza la placa hacia abajo sobre una toalla de papel doblada para eliminar el exceso de líquido y las burbujas.

### **Adición del conjugado enzimático**

Poco antes de usarse se diluyó la enzima conjugada (enzima fosfatasa alcalina) a una relación 1:200. Para lo cual se mezclaron 7400 µl del búfer ECI (1X) con 37 µl de concentrado de conjugado enzimático. Con excepción de los pozos blanco de la placa, en cada pozo se agregaron 100 µl de la dilución enzimática. Después de 2 h de incubación en cámara húmeda, la placa se vació y se lavó ocho veces con el búfer de lavado, con la finalidad de eliminar todo residuo de muestra. Entre cada lavado se sacudió con fuerza la placa hacia abajo sobre una toalla de papel doblada para eliminar el exceso de líquido y las burbujas.

### **Revelado de placa**

Para el revelado se preparó una solución PNP a 1 mg por ml con dos tabletas PNP disueltas en 10 ml de búfer PNP (1X) en un agitador Vortex Scientific Industries G-560. Se evitó tocar las tabletas y de exponer la solución PNP a luz intensa para evitar contaminación y desarrollo de falsos positivos por desarrollo de color en los pozos de las muestras negativas. Inmediatamente después de prepararse, se depositaron 100 µl del sustrato PNP en cada uno de los pozos de la placa y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 60 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se depositaron 70 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 3 molar por pozo para detener la reacción en la placa. La lectura de la placa se hizo en un espectrofotómetro BioTek ELx808 a 405 nm, previamente limpiado y secado con Kimwipes® kimtech science.

### **2.3.3. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con en el programa estadísticos SAS system for Windows 9.4, usando un modelo lineal correspondiente a un diseño en bloques completos al azar (DBCA) con sub-muestreo, y empleando el procedimiento del modelo lineal general (Proc GLM) y la prueba de comparaciones múltiples de medias utilizando la diferencia significativa honesta (DSH) del método de de Tukey, con un nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ).

### **2.4. Resultados y Discusión**

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la evaluación de tamaños de muestra (TM) de 20, 15, 10, 8, 6 y 4 % de las 32 muestras simples (MS) con nivel de infección (NI) de 10 % para la detección del virus WSMV con la prueba ELISA. Así mismo se presentan los valores promedio de absorbancia de las muestras originales, naturalmente infectadas.

Al graficar los valores promedio de absorbancia de las 32 MS se encontró que solo las muestras 31, 11 y 23, correspondientes a los tamaños de muestra (TM) de 20 y 8 %, respectivamente, resultaron positivas al virus WSMV (Figura 1). Los valores promedio de absorbancia registrados fueron de 0.35 para MS31, 0.37 nm para la MS 11 y 0.38 nm para la MS 23. En contraste, el resto de las MS con TM de 15, 10, 6 y 4 %, dieron resultados negativos al virus WSMV.

Los resultados anteriores podrían explicarse al considerar los valores bajos de absorbancia registrados en las muestras originales. Es posible que al formar las muestras simples con NI del 10%, (semilla sana + semilla infectada), ocurriera una “dilución” de la semilla infectada (valores de absorbancia cercanos al umbral 0.21 nm); situación similar pudo haber ocurrido al formar los TM. Probablemente, la sensibilidad de la prueba ELISA al virus WSMV es baja cuando se analizan lotes con NI bajos y esto explique porque la mayoría de las MS dieron como resultado falsos negativos.

Esta investigación simula lo que podría pasar si un embarque de muestras de semilla llega al laboratorio con un nivel de infección bajo o con solo algunas semillas infectadas. En este caso se esperarían falsos negativos por la baja sensibilidad de la prueba ELISA al virus WSMV. Por lo anterior el muestreo de semillas cobra relevancia en los programas de análisis de semilla para obtener resultados confiables, sobre todo cuando se trate de patógenos de importancia cuarentenaria (Morrison, 1999). El objetivo del muestreo es por lo tanto obtener una muestra de tamaño adecuado para que con la aplicación de pruebas de laboratorio precisas y sensibles se detecte a los patógenos asociados a la semilla (ISTA, 2013).

Considerando los resultados del análisis de varianza en este estudio se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) “todos los efectos de los tratamientos son iguales”; quedando entonces la conclusión en términos de la hipótesis nula “por lo menos un tratamiento produce un efecto diferente a los demás”, con una probabilidad de  $< 0.0001$ .

Este resultado respalda a los encontrados con la comparación múltiple de medias de absorbancia por tratamiento: Control, TM 20, TM 15, TM 10, TM 8, TM 6 y TM 4, los cuales se ilustran en la Tabla 2. Se encontró que entre los tamaños 15 y 8, 10 y 6 no existen diferencias significativas entre las medias (0.19, 0.18, 0.14, 0.13, respectivamente); en contraste, entre los TM 20, 4, y Control si hay diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ).

En la Figura 3 se ilustra el comportamiento de la comparación de los valores medios de absorbancia de la muestra original (control) y de los tamaños de muestra para las muestras simples. A diferencia de la muestra control, ninguno de los valores de los tamaños de muestra en MS supera el valor umbral. Lo anterior indica que las muestras simples con TM de 20, 15, 10, 8, 6 y 4 %, formadas a partir de la muestra original, no son apropiadas para la detección del virus WSMV con la prueba ELISA.

Con base a los resultados de la Tabla 2, estadísticamente la MS con TM15% pudiera parecer como la mejor muestra para la detección del virus WSMV, esto por

haber registrado el valor promedio más alto de absorbancia en referencia al resto de las muestras. Sin embargo, al comparar dicho valor con el valor umbral este último es mayor, por lo que la muestra se considera negativa al virus. En cambio, las MS con TM de 8 y 20 % obtuvieron dos y una muestra positivas al virus, respectivamente, de 32 muestras evaluadas. Estos resultados deberán tomarse con reserva debido a que estas muestras representan el 3.1 y el 6.2 % de las MS evaluadas para estos TM; es decir, no se supera el 90 % de confiabilidad para la detección del virus WSMV.

Scott y Zummo (1995) indican que cuando el nivel de infección natural del grano es bajo se podrían presentar problemas en la detección de patógeno aun en tamaños de muestra grandes durante los análisis sanitarios de semilla. En los análisis de semilla de este trabajo se tiene que tomar en consideración que los valores de absorbancia de las muestras de semilla original e infectada con el virus fueron bajos (Tabla 1). Al tomarlas como fuente para preparar las muestras MS con NI de 10% se diluyeron al mezclarlas con la semilla sana. Por lo que estos resultados indican que la prueba ELISA es poco sensible para la detección del virus WSMV cuando se trabaja con muestras con niveles de infección bajos.

Aunado a lo anterior, Jones, *et al.* (2005) y Coutts, *et al.* (2014) reportaron que la transmisión por semilla del virus WSMV es del 2%. Este dato es coincidente con los valores de absorbancia bajos registrados en las muestras originales infectadas naturalmente con el virus (Tabla 1). Por todo lo anteriormente indicado, se sugiere alguna otra prueba diferente a la de ELISA para el virus WSMV, que presenta baja transmisión por semilla, y para el cual la prueba de ELISA presenta baja sensibilidad, para prevenir su dispersión o introducción durante la distribución de semillas de trigo a zonas libres del mosaico estriado del trigo.

## **2.5. Conclusiones**

El aumento o la reducción del tamaño de muestra actual de 10% afectó significativamente ( $\alpha=0.05$ ) la sensibilidad de la prueba ELISA para la detección del

Virus del mosaico estriado del trigo (Wheat Streak Mosaic Virus – WSMV, por sus siglas en ingles) en muestras simples (MS) de trigo.

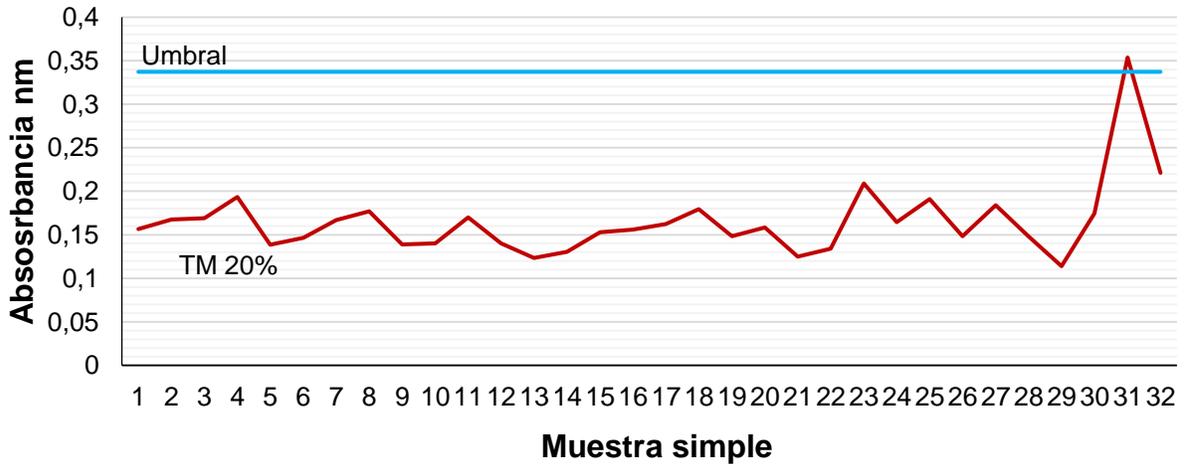
La sensibilidad de la prueba ELISA al virus WSMV fue baja cuando se analizaron muestras simples con tamaño de muestra de 20, 15, 8, 6 y 4 % y nivel de infección de 10%.

El nivel de infección natural de la semilla de trigo es un factor importante a considerar para la detección del virus WSMV por la prueba ELISA.

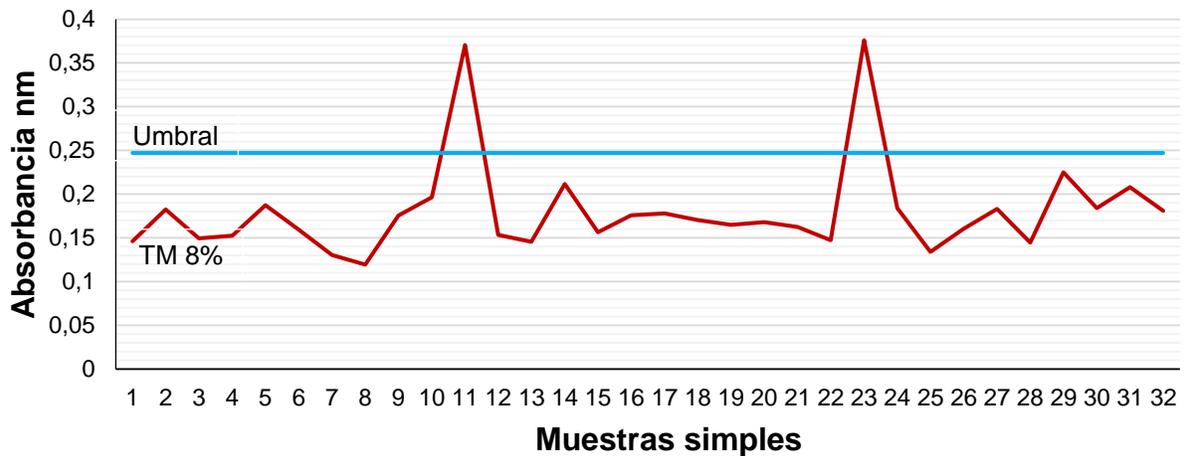
**Tabla 1.** Valores promedio de absorbancia de muestra original y de muestras simples (MS) con 10% de nivel de infección y diferente tamaño de muestra.

Muestra	Muestra original	Tamaño de muestra (%)					
		20	15	10	8	6	4
1	0.24	0.16	0.19	0.13	0.15	0.12	0.14
2	0.24	0.17	0.17	0.11	0.18	0.13	0.11
3	0.30	0.17	0.15	0.13	0.15	0.18	0.13
4	0.45	0.19	0.14	0.12	0.15	0.12	0.11
5	0.27	0.14	0.13	0.13	0.19	0.13	0.11
6	0.35	0.15	0.13	0.14	0.16	0.12	0.12
7	0.21	0.17	0.16	0.14	0.13	0.11	0.16
8	0.31	0.18	0.27	0.12	0.12	0.17	0.15
9	0.40	0.14	0.16	0.12	0.18	0.12	0.11
10	0.26	0.14	0.16	0.13	0.20	0.14	0.14
11	0.28	0.17	0.14	0.15	<b>0.37</b>	0.15	0.11
12	0.21	0.14	0.13	0.14	0.15	0.14	0.11
13	0.21	0.12	0.13	0.15	0.15	0.11	0.11
14	0.30	0.13	0.14	0.13	0.21	0.14	0.15
15	0.34	0.15	0.18	0.12	0.16	0.12	0.11
16	0.38	0.16	0.23	0.18	0.18	0.12	0.12
17	0.35	0.16	0.17	0.15	0.18	0.17	0.12
18	0.50	0.18	0.22	0.20	0.17	0.16	0.16
19	0.33	0.15	0.17	0.17	0.17	0.15	0.11
20	0.22	0.16	0.15	0.12	0.17	0.13	0.13
21	0.33	0.13	0.21	0.13	0.16	0.11	0.11
22	0.25	0.13	0.12	0.13	0.15	0.12	0.11
23	0.29	0.21	0.15	0.16	<b>0.38</b>	0.14	0.12
24	0.30	0.16	0.27	0.14	0.18	0.12	0.10
25	0.43	0.19	0.25	0.20	0.13	0.11	0.14
26	0.24	0.15	0.21	0.13	0.16	0.14	0.12
27	0.33	0.18	0.22	0.13	0.18	0.17	0.13
28	0.21	0.15	0.23	0.15	0.14	0.13	0.11
29	0.36	0.11	0.15	0.15	0.23	0.12	0.11
30	0.26	0.17	0.15	0.14	0.18	0.14	0.17
31	0.33	<b>0.35</b>	0.35	0.15	0.21	0.14	0.12
32	0.22	0.22	0.31	0.12	0.18	0.12	0.10
<b>MEDIA</b>	<b>0.30</b>	<b>0.17</b>	<b>0.19</b>	<b>0.14</b>	<b>0.18</b>	<b>0.13</b>	<b>0.12</b>

Umbral de absorbancia (nm): **0.20** para muestra original; **0.34** para TM 20; **0.39** para TM 15; **0.22** para TM 10; **0.25** para TM 8; **0.22** para TM 6; y, **0.19** para TM 4. Lecturas mayores al umbral se consideran positivas al WSMV (números en negritas).



**Figura 1.** Valor promedio de absorbancia en nm de 32 muestras simples (línea marrón) con nivel de infección de 10 %, y tamaño de muestra de 20%. Valores superiores al umbral (línea azul) son positivos al virus WSMV.

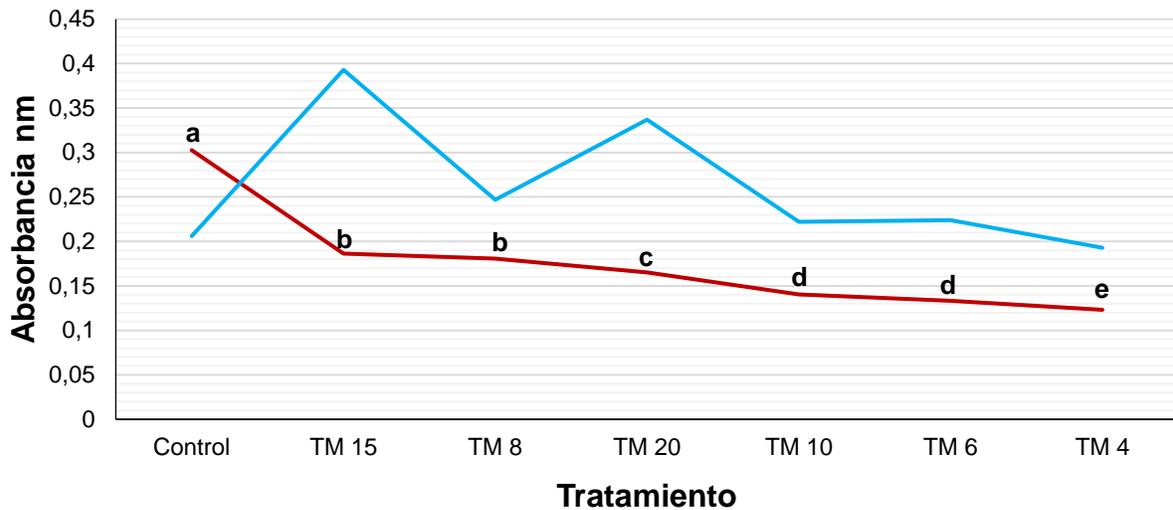


**Figura 2.** Valor promedio de absorbancia en nm de 32 muestras simples (línea marrón) con nivel de infección de 10 % y tamaño de muestra de 8 %. Valores superiores al umbral de absorbancia (línea azul) son positivos a WSMV.

**Tabla 2.** Resultados de comparaciones múltiples de medias usando la diferencia significativa honesta de Tukey, con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El Análisis de la Varianza se realizó con el modelo lineal correspondiente a un diseño de bloques completos al azar (DBCA) con sub-muestreo

Tratamiento	Media
Control	0.30 a
TM 15	0.19 b
TM 8	0.18 b
TM 20	0.17 c
TM 10	0.14 d
TM 6	0.13 d
TM 4	0.12 e

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.



**Figura 3.** Comportamiento de los valores medios de los tamaños de muestra de las muestras simples y la original (Control). Cada valor de la línea marrón representa la media de 32 muestras y los de la línea en azul, el umbral de absorbancia. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ).

## 2.6. Bibliografía

- Bockus, W. W., Robert, L. B., Robert, M. H., Wendell, L. M., Timothy, D. M. and Richard, W. S. 2010. Compendium of wheat disease and pests: *Wheat Streak Mosaic*. The American Phytopathological Society, pp. 115-117.
- Christian, M. L. and Willis, W. G. 1993. Survival of *Wheat Streak Mosaic Virus* in grass host in Kansas from wheat harvest to fall wheat emergence. *Plant Disease* 77:239-242.
- Coutts, B. A., Mirjana, B., Monica, A. K., Dustin, L. S. and Roger A. C. J. 2014. Epidemiology of *Wheat Streak Mosaic Virus* in wheat in a Mediterranean-type environment. *Eur J. Plant Pathol* 140:797-813.
- Gao, J. G. and Nassuth, A. 1993. Alteration of major cellular organelles in wheat leaf tissue infected with *Wheat Streak Mosaic Rymovirus* (Potyviridae). *Phytopathology* 83:206-213.
- Hunger, R. M., Sherwood, J. L., Evans, C. K. and Montana, J. R. 1992. Effects of planting date and inoculation date on severity of *Wheat Streak Mosaic* in hard red Winter wheat cultivars. *Plant Disease* 76:1056-1060.
- Jones, R. A. C., Coutts, B. A., Mackie, A. E. and Dwyer, G. I. 2005. Seed transmission of *Wheat streak mosaic virus* shown unequivocally in wheat. *Plant Disease* 89:1048-1050.
- McKinney, H. H. 1937. Mosaic disease of wheat and related cereals. US Department of Agriculture (Circular No. 442).
- Paliwal, Y. C. and J. T. Slykhuis. 1967. Localization of *Wheat Streak Mosaic Virus* in the alimentary canal of its vector *Aceria tulipae* Keifer. *Virology* 32:344-353.
- Slykhuis, J. T. 1955. *Aceria tulipae* Keifer (Acarina: Eriophyidae) in relation to the spread of *Wheat Streak Mosaic*. *Phytopathology* 45:116-128.
- Sánchez-Sánchez H., Henry, M., Cárdenas-Soriano E. and Alvizo-Villasana, H. 2001. Identification of *Wheat Streak Mosaic Virus* and its vector *Aceria tosichella* Keifer in México. *Plant Disease* 85:13-17.

Stenger, D. C., Hall, J. S., Choi, I. R. and French, R. 1998. Phylogenetic relationship within the family Potyviridae: *Wheat Streak Mosaic Virus* and *Brome Streak Mosaic Virus* are not members of the genus *Rymovirus*.

Thomas, J. B., Conner, R. L. and Graf, R. J. 2004. Comparison of different sources of vector resistance for controlling *Wheat Streak Mosaic* in winter wheat. *Crop Science* 44:125-130.

**CAPITULO III Evaluación de tamaños de muestra de semilla de trigo para determinar la capacidad predictiva del método de detección ELISA del Virus del mosaico estriado de la cebada**

Arturo Martínez Mirafuentes, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

**Resumen**

El objetivo del presente capítulo fue evaluar diferentes tamaños de muestra de semilla de trigo y niveles de infección para determinar la capacidad predictiva del método de detección ELISA (inmunoabsorción ligada a enzimas) del Virus mosaico estriado de la cebada (BSMV, por sus siglas en inglés). A partir de dos lotes de semilla de trigo harinero (*Triticum aestivum*), uno naturalmente infectado con el virus BSMV y otro de semilla sana, se formaron tres sublotos de 50 g con 15, 10 y 5 % de nivel de infección (NI), y 210 muestras simples (MS) de 20 g, de las cuales 70 MS fueron con 15% de NI, 70 con NI de 10% y las restantes 70 con 5% de NI. A partir de las MS se formaron tamaños de muestra (TM) de 15, 10 y 5 % con diferente NI, que dan origen a 36 muestras compuestas (MC) formadas con 25, 20, 15 y 10 MS. La prueba se estableció con muestras de harina proveniente de 2 g de semilla de trigo de cada sublote, MS y MC, en placas de poliestireno de 96 pozos. Los reactivos y el protocolo empleado fue el de AGDIA®, DAS ELISA (2013) para el virus BSMV. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que al disminuir el NI por debajo del 15% en sublotos, MS y en MC, afectó la sensibilidad de la prueba ELISA para la detección del Virus BSMV. Así también, conforme el número de MS que forman una MC (<15 MS) y el TM disminuyen, la sensibilidad de la prueba ELISA se vio afectada. Concluyendo que el nivel de infección natural de la semilla de trigo en lotes, MS y MC, es un factor importante a considerar para la detección del virus BSMV por la prueba ELISA, al igual que el número de muestras y el tamaño de muestra con la que esté formada una MC.

Palabras clave: muestra, mosaico, cebada, tamaño, infección.

## **CHAPTER III Evaluation of sample sizes wheat seed to determine the predictive ability of the ELISA detection method of *Barley stripe mosaic virus***

Arturo Martínez Mirafuentes, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

### **Abstract**

The goal of this chapter was to evaluate different sample sizes and wheat seed infection levels to determine the predictive ability of the detection method ELISA (enzyme-linked immunosorbent) of *Barley stripe mosaic virus* (BSMV). Beginning with two seed lots of bread wheat (*Triticum aestivum*), one naturally infected with BSMV and other healthy seed three sublots of 50 g with 15, 10 and 5% level of infection (LI), and 210 single samples (SiS) of 20 g were formed, of which 70 SiS were with 15% LI, 70 with 10% and the remaining 70 with 5% LI. From SiS sample sizes (SaS) 15, 10 y 5% were formed with different LI, giving rise to 36 composite samples (CS) formed with 25, 20, 25 and 10 SiS were formed. The test is established with flour samples from 2 g of wheat seed of each subplot, SiS and CS, plates 96-well polystyrene. The reagents and the protocol used was the AGDIA®, DAS ELISA (2013) for BSMV. The results obtained in this study indicated that the decrease LI below 15% in sublots, SiS and CS, affected the sensitivity of the ELISA test for the BSMV. Also, as the number of SiS forming a CS (<15 SiS) and SaS decrease the sensitivity of the ELISA was affected. Concluding that the level of infection natural of wheat seed lots, SiS and CS, is an important factor to consider for BSMV detection by ELISA, as the number of samples and the sample size, which is formed a CS.

Keywords: sign, mosaic, barley, size, infection.

### 3.1. Introducción

El mosaico estriado de la cebada es una enfermedad conocida en la primera década del siglo XX como “bandeado falso de la cebada”. Esta enfermedad se consideraba de naturaleza no parasítica pero en el año de 1951 se reportó al agente causal, el virus Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV por sus siglas en inglés) (Hagborg, 1954). Esta es quizás la primera enfermedad virosa en cereales descrita en los Estados Unidos. Actualmente, esta enfermedad se encuentra presente en la mayoría de las áreas productoras de cebada del mundo, incluyendo norte y sur América, Asia, África, Europa y Australia (Mathre, 1997; Bockus, *et al.* 2010).

Aunque en gramíneas el mosaico estriado de la cebada ocasiona pérdidas en producción y rendimiento, éstas no son considerables. Las pérdidas en producción son principalmente por la disminución de la fotosíntesis (Brakke, *et al.* 1988) y la inducción de esterilidad de óvulos y polen. Plantas infectadas con el virus BSMV producen significativamente menos espigas y semillas que las no infectadas, con decremento en el peso de la semilla. El rendimiento total de grano se reduce hasta un 35% en plantas enfermas. Sin embargo las pérdidas económicas registradas dependen de diversos factores como tipo de cultivar, nivel de infección, virulencia del virus y medio ambiente (Carroll, 1986; Mckinney and Greeley, 1965).

El virus BSMV ataca principalmente cebada, trigo y avena pero también se ha registrado que afecta algunas especies de pastos y plantas dicotiledóneas infectadas experimentalmente. Este virus se transmite por semilla (Crowley, 1959; Carroll, 1968; Carroll, 1972), polen y óvulo (Carroll, 1974; Carroll and Mayhew, 1976) así como por contacto. En cebada se transmite por semilla vía óvulo, pudiendo llegar a un 90% de transmisión, pero en trigo es por polen. En hospederos distintos a cebada la transmisión por semilla es relativamente ineficiente. Aparentemente este virus no tiene vectores, depende prácticamente de la semilla para su supervivencia y dispersión (Carroll, 1986; Mckinney and Greeley, 1965).

### **3.1.1. Síntomas**

En general las semillas infectadas con el virus BSMV son asintomáticas pero las plantas de trigo y cebada expresan síntomas muy similares a lo largo de las hojas. La expresión de estos síntomas se da al inicio del ciclo del cultivo y depende de la cepa del virus y de las temperaturas ambientales en las que se desarrolle el cultivo. Temperaturas entre 22° y 30°C, y días luminosos son favorables para la expresión de la enfermedad. Temperaturas menores a 20°C pueden limitar o enmascarar los síntomas debido a una lenta propagación sistémica del virus (Carroll, 1980; Mathre, 1997; Bockus, *et al.* 2010).

Plantas enfermas con mosaico estriado de la cebada normalmente pasan por una fase de clorosis aguda y una fase de necrosis crónica, ambas fases pueden incluir mosaicos severos, moteados amarillo-blanco, manchas de color amarillo-blanco, enanismo, arrosetamiento, y macollamiento excesivo. Al inicio de la enfermedad se desarrollan rayas cloróticas, amarillas o marrón, o mosaicos en la lámina foliar de las hojas más viejas y luego en las más nuevas. Síntomas adicionales dependen de la severidad de la cepa del virus, la forma y el tiempo en que ocurrió la infección (Carroll, 1980; Mathre, 1997; Bockus, *et al.* 2010).

En trigo los síntomas se manifiestan a través de mosaicos típicos. Las variedades susceptibles presentan enanismo, enrosetamiento, amacollamiento excesivo, esterilidad en flores y granos vanos. Las plantas son susceptibles en todos los estadios de crecimiento y desarrollan síntomas a la primera o segunda semana después de la infección. Mientras que en cebada los síntomas se presentan a través de estrías o rayas cloróticas en las hojas. Las variedades susceptibles desarrollan enanismo severo y amacollamiento excesivo (Carroll, 1986; Mathre, 1997).

### **3.1.2. Agente causal**

El mosaico estriado de la cebada es una enfermedad de los cereales transmitida por semilla y es ocasionada por el virus Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV por sus siglas en inglés). Este virus pertenece al género *Hordeivirus* y está formado por un

genoma que consta de tres partículas alargadas de ácido ribonucleico (RNA), designadas como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; pocas razas del virus tienen 2 o 4 partículas. Las partículas virales son varillas rígidas de aproximadamente 25 nm de ancho y de 100 a 150 nm de longitud, dependiendo de la cepa (Atabekov and Novikov, 1989; Jackson, *et al.* 1989). En savia el virus puede inactivarse térmicamente después de 10 min a 65-68°C pero puede persistir en hojas secas a -18°C o congeladas con nitrógeno líquido o en semillas por varios años (Bockus, *et al.* 2010).

### **3.1.3. Transmisión del virus**

El virus BSMV se transmite por semilla, savia y polen pero no por insectos vectores como áfidos. La savia es fácil y manualmente transferible entre plantas adyacentes en el terreno de cultivo, cuando las hojas son dañadas por el viento, granizo o animales. En trigo, las infecciones naturales aparentemente resultan de la transferencia de savia por el contacto entre plantas. Debido a que en la semilla el virus puede permanecer viable por varios años esta se constituye como la fuente de inóculo primario y la principal vía de transmisión del virus. Se menciona que en infecciones tempranas algunas razas del virus pueden tener un 100% de transmisión por semilla, aunque lo más común es del 50 al 60 por ciento. La transmisión por semilla se puede determinar directamente por la búsqueda del desarrollo de síntomas en plántulas crecidas en invernadero (Carroll, 1980; Mathre, 1997; Bockus, *et al.* 2010).

### **3.1.4. Detección e identificación del virus**

Para la detección e identificación del virus BSMV se utilizan diferentes técnicas y métodos. En campo, la inspección de plantas sospechosas para buscar síntomas característicos de la enfermedad; en plantas sospechosas, observaciones de preparaciones foliares al microscopio electrónico para detectar la presencia de partículas virales características; y en hoja y semilla, por pruebas serológicas como la de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) con anticuerpos específicos o con la prueba de PCR (por sus siglas en inglés) con iniciadores específicos (Jackson, *et al.* 1991).

La detección oportuna y la identificación del virus BSMV son esenciales para el control de la enfermedad del mosaico estriado de la cebada e importantes para su regulación y control a través de programas de certificación fitosanitaria y de cuarentena en el comercio nacional e internacional de semillas (Morrison, 1999).

Por lo anteriormente indicado en este capítulo se establecieron los siguientes objetivos e hipótesis.

### **Objetivo general**

Evaluar diferentes tamaños de muestra de semilla de trigo para determinar la capacidad predictiva del método de detección ELISA del Virus mosaico estriado de la cebada.

### **Objetivos específicos**

- I. Establecer si el nivel de infección de 15, 10 y 5 % afecta la sensibilidad de la prueba ELISA para la detección del virus mosaico estriado de la cebada (Barley Stripe Mosaic Virus – BSMV) en lotes y muestras de semilla de trigo.
- II. Probar si el incremento del número de muestra simples de 10, 15, 20 y 25 utilizadas para formar muestras compuestas afecta la sensibilidad de la prueba ELISA para la detección del virus BSMV.
- III. Determinar si el aumento o la reducción del tamaño de muestra usual de 10% a 15 y 5% afecta la sensibilidad de la prueba ELISA para la detección del virus BSMV.

### **3.2. Hipótesis**

- I. Los niveles de infección de 15, 10 y 5 % no afectan la sensibilidad de detección del virus BSMV de la prueba ELISA.
- II. El incremento en el número de muestras simples utilizadas para formar muestras compuestas no reduce la confiabilidad de los resultados en la prueba ELISA.
- III. El aumento o la reducción actual del tamaño de muestra de trigo de 10% a 15 y 5 %, no afecta la sensibilidad de la prueba ELISA.

### **3.3. Materiales y Métodos**

#### **3.3.1. Establecimiento de prueba DAS-ELISA**

La prueba por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) para la detección del virus BSMV se estableció con muestras de harina, provenientes de muestras de 2 g de semilla, en placas de poliestireno de 96 pozos. Durante el ensayo se utilizaron los siguientes materiales: micropipetas Finnpipette® de 2-20 µl, 20-200 µl, una micropipeta multicanal de 30-300 µl, una pipeta digital Eppendorf Xplorer® 0.25-5 ml, vasos de precipitado, volumen variado, puntas para micropipetas (enteras o sin punta) estériles, reservorios para micropipetas, una pipeta multicanal (1L), y tubos tipo falcón de 50 ml. Previo al establecimiento de la prueba se preparó una caja de plástico con dos sanitas humedecidas para formar una “cámara húmeda”, para incubar las placas, así como el diagrama de carga de acuerdo a un patrón preestablecido.

En general los reactivos empleados para el establecimiento de la prueba así como el protocolo siguiente fue de AGDIA®, DAS ELISA (2013) para el virus BSMV.

#### ***Sensibilización y lavado de placas***

El anticuerpo de cobertura se diluyó 1:200, para esto se mezclaron 10000 µl de búfer de cubrimiento (1X), pH 9.6, con 50 µl del anticuerpo de cobertura concentrado. Con excepción de los pozos blanco, en cada pozo se adicionaron 100 µl de la dilución del anticuerpo de cobertura y se incubó por 4 h a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración a 4°C en cámara húmeda. Después de la incubación, se vació el contenido de la placa y se lavó con el búfer de lavado PBST (1X) con una pipeta multicanal. Este proceso se repitió tres veces y entre cada lavado se sacudió con fuerza la placa hacia abajo sobre una toalla de papel doblada para eliminar el exceso de líquido y las burbujas.

#### ***Adición de muestras***

A cada uno de los tubos con las muestras de harina se les agregó 20 ml de búfer de extracción (1X) relación 1:10 (peso de muestra en g: volumen del búfer en ml). Con

excepción de los pozos blanco, se agregaron 100 µl por pozo de cada una de las muestras por duplicado, así como el control positivo, control negativo y el búfer, de acuerdo al diagrama de carga preestablecido. La placa se incubó por 2 h a temperatura ambiente o bien toda la noche en refrigeración a 4°C, en cámara húmeda. Al completarse la incubación la placa se vació y se lavó ocho veces con el búfer de lavado, con la finalidad de eliminar todo residuo de muestra. Entre cada lavado se sacudió con fuerza la placa hacia abajo sobre una toalla de papel doblada para eliminar el exceso de líquido y las burbujas.

### ***Adición del conjugado enzimático***

Poco antes de usarse se diluyó la enzima conjugada (enzima fosfatasa alcalina) a una relación 1:200. Para esto se mezclaron 10000 µl del búfer ECI (1X) con 50 µl del conjugado enzimático concentrado. Con excepción de los pozos blanco de la placa, en cada pozo se agregaron 100 µl de la dilución enzimática. Después de 2 h de incubación en cámara húmeda, la placa se vació y se lavó ocho veces con el búfer de lavado, con la finalidad de eliminar todo residuo de muestra. Entre cada lavado se sacudió con fuerza la placa hacia abajo sobre una toalla de papel doblada para eliminar el exceso de líquido y las burbujas.

### ***Revelado de placa***

Para el revelado se preparó una solución PNP a 1 mg por ml con dos tabletas PNP disueltas en 10 ml de búfer PNP (1X) en un agitador Vortex Scientific Industries G-560. Se evitó tocar las tabletas y de exponer la solución PNP a luz intensa para evitar contaminación y desarrollo de falsos positivos por desarrollo de color en los pozos de las muestras negativas. Inmediatamente después de prepararse, se depositaron 100 µl del sustrato PNP en cada uno de los pozos de la placa y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 60 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se depositaron 70 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 3 molar por pozo para detener la reacción en la placa. La lectura de la placa se hizo en un espectrofotómetro BioTek ELx808 a 405 nm, previamente limpiado y secado con Kimwipes® kimtech science.

### 3.3.2. Preparación de sublotes, muestras simples y muestras compuestas

A partir de dos lotes de semilla de trigo harinero (*Triticum aestivum*), uno de semilla naturalmente infectada (**SENI**) con el virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV) y otro de semilla sana (**SES**), se formaron sublotes de 50 g y muestras simples (**MS**) de 20 g de semilla.

**Preparación de sublotes.** El sublote se formó con el objetivo de establecer una prueba preliminar para confirmar la infección con el virus BSMV del lote SENI a utilizar para las diferentes pruebas. Para esto, se formaron tres sublotes de 50 g cada uno con diferente nivel de infección (NI 15, 10 y 5 %). En una balanza SHIMADZU UX820S se pesaron 7.5, 5 y 2.5 g de semilla SENI las cuales se mezclaron con 42.5, 45 y 47.5 g de semilla SES, respectivamente, para formar tres sublotes. De cada sublote de 50 g con NI de 15, 10 y 5 % se formaron 10 muestras (repeticiones) de 2 g cada una. Estas muestras se depositaron en tubos tipo falcón de 50 ml, debidamente identificados, obteniéndose un total de 30 muestras. Cada muestra de semilla se molió por separado en un molino Peter Instruments, y la harina obtenida se recuperó en el mismo tubo. Entre cada molienda se limpió el molino con aire a presión y los fragmentos de semilla, atorados en los discos del molino, se retiraron con una aguja de disección para evitar contaminación entre muestras. Finalmente, estas muestras se analizaron por ELISA de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

**Preparación de muestras simples.** A partir de semilla proveniente de lotes SENI y SES se formaron muestras simples (MS) con diferente nivel de infección (**NI**): 15, 10 y 5%. Cada muestra MS se preparó de acuerdo al grupo de NI correspondiente. **Grupo 15%**, 3 g de SENI con 17 g de SES; **grupo 10%**, 2 g de SENI con 18 g de SES; y, **grupo 5%**, 1 g de SENI con 19 g de SES. Una vez formadas las muestras MS estas se depositaron por separado en sobres de papel debidamente etiquetados. En total se prepararon 210 muestras simples divididas en tres grupos de NI, cada grupo con 70 MS. Posteriormente, de cada MS se tomaron 2 g de semilla y se depositaron en tubos tipo falcón de 50 ml, debidamente identificados, para molerse por separado previo a su análisis por ELISA de acuerdo al protocolo descrito arriba.

**Preparación muestras compuestas.** Con las MS de cada grupo de NI se formaron las siguientes muestras compuestas (**MC**). Muestra **MC25**, con 25 muestras MS; muestra **MC20**, con 20 muestras MS; muestra **MC15**, con 15 muestras MS; y, muestra **MC10**, con 10 muestras MS. En total se prepararon 12 muestras MC, cada una con tres niveles de infección, quedando etiquetadas de la manera siguiente.

Muestras **MC25**: MC25-15, MC25-10, MC25-5, para indicar el grupo de NI del que provienen las MS; es decir, al de 15, 10 y 5 %, respectivamente.

Muestras **MC20**: MC20-15, MC20-10, MC20-5, para indicar el grupo de NI del que provienen las MS; es decir, al de 15, 10 y 5 %, respectivamente.

Muestra **MC15**: MC15-15, MC15-10, MC15-5, para indicar el grupo de NI del que provienen las MS; es decir, al de 15, 10 y 5 %, respectivamente.

Muestra **MC10**: MC10-15, MC10-10, MC10-5, para indicar el grupo de NI del que provienen las MS; es decir, al de 15, 10 y 5 %, respectivamente.

### **3.3.3. Preparación de muestras compuestas con diferente tamaño de muestra**

Para formar muestras compuestas (MC) con diferente tamaño de muestra (**TM**), de cada una de las 12 muestras MC, con diferente nivel de infección, se tomaron por separado, 2.56, 1.9 y 1.0 g de semilla para formar muestras con TM de 15, 10 y 5%, respectivamente. Para formar el tamaño de 15% de la muestra MC25-15 se tomaron 2.56 g de semilla de cada una de las 25 MS con 15% de NI. Mientras que para formar el tamaño de 10%, se tomaron 1.9 g de cada una de las 25 muestras MS con 15% de NI. En tanto que para el tamaño de 5%, se tomó 1.0 g de cada muestras MS con 15% de NI de la muestra MC25-15. De igual manera se formaron los TM para cada una de las 11 MC restantes. En total se formaron 36 MC; 12 para el TM de 15%, 12 para el TM de 10% y 12 para el TM de 5%; cada MC con un peso de 64, 47.5 y 25 g, respectivamente.

Con fines prácticos de manejo, las MC anteriores se etiquetaron considerando primero la clave para el número de muestras simples, después la clave para el TM y por último la del NI. Por ejemplo, la muestra etiquetada como MC25-15-15 indica que se trata de una MC con 25 MS, con un peso de 64 g de semilla, con TM de 15% y con

15% de NI. En tanto que la muestra MC25-10-15 indica que se trata de una MC con un peso de 47.5 g de semilla, formada por 25 MS, con TM de 10% y con 15% de NI. Mientras que la muestra MC25-5-15 indica que se trata de una MC con un peso de 25 g de semilla, con 25 MS, con TM de 5% y con 15% de NI. Esta metodología se aplicó para el resto de las 33 MC.

#### **3.3.4. Evaluación del número de muestras simples, tamaño de muestra y nivel de infección en muestras compuestas**

Para determinar si el número de MS, la reducción del TM y el NI que conforman la MC, afectan la sensibilidad de la prueba ELISA al virus BSMV se analizaron cada una de las 36 MC. De cada muestra MC se formaron tres submuestras (repeticiones), de 2 g de semilla cada una, las cuales se depositaron en tubos tipo falcón de 50 ml, debidamente identificados. Cada una de las 108 muestras formadas se molió por separado en un molino Peter Instruments, y la harina obtenida se recuperó en el mismo tubo. Entre cada molienda se limpió el molino con aire a presión y los fragmentos de semilla atorados en los discos del molino se retiraron con una aguja de disección para evitar contaminación entre muestras. El procedimiento del análisis de las muestras se hizo como se describió en la sección 3.3.1. Establecimiento de prueba DAS-ELISA para la sensibilización y lavado de placas, adición de muestras, adición del conjugado enzimático y revelado de placas, del protocolo de AGDIA, DAS ELISA (2013) para BSMV.

#### **3.3.5. Análisis estadístico.**

Los datos de absorbancia obtenidos de la evaluación de los sublotes, MS y MC se analizaron con el programa estadísticos SAS system for Windows 9.4, usando para el análisis de la varianza el modelo lineal correspondiente a un diseño de bloques completos al azar (DBCA) con o sin sub muestreo, con el procedimiento del modelo lineal general (GLM) y prueba de comparaciones múltiples de medias usando la diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey, con un nivel de significancia del 5% ( $\alpha=0.05$ ).

### 3.4. Resultados y Discusión

#### 3.4.1. Efecto del nivel de infección en la sensibilidad de la prueba ELISA

En la **Tabla 3** se presentan los valores promedio de absorbancia registrados en sublotos de semilla con nivel de infección (NI) de 15, 10 y 5 % del virus mosaico estriado de la cebada (BSMV, por sus siglas en inglés) con la prueba ELISA. En esta tabla se observa que el NI afecta significativamente ( $\alpha=0.05$ ) la sensibilidad de la prueba (**Tabla 4**). Mientras que en el sublote con 15% de NI no se registraron muestras negativas al virus BSMV, en los de 10 y 5% de NI se registraron una y tres muestras negativas, respectivamente. Es decir, estos sublotos registraron muestras con niveles inferiores al valor umbral (0.197). Lo anterior indica que en sublotos con niveles de infección por debajo del 15 %, pueden resultar en falsos negativos debido a que el NI afecta la sensibilidad de detección de la prueba ELISA al virus BSMV.

La tendencia de los valores de absorbancia con el NI de 15% se encontró uniforme en contraste con la presentada con los NI de 10 y 5 %. En estos casos el comportamiento fue irregular, con valores ligeramente por arriba del umbral o bien por debajo de este (**Figura 4**). Estas irregularidades ponen de manifiesto la importancia de considerar el nivel de infección de los lotes de semilla en los programa de análisis de semillas para la detección de patógenos (Morrison, 1999).

En la **Figura 5** se presenta la tendencia de los valores medios de absorbancia de los tres niveles de NI probados. Conforme disminuye el NI de 15% a 10 y 5%, el valor de absorbancia decrece aproximadamente 21 y 59%, respectivamente. Es decir aunque la prueba ELISA detecta al virus BSMV en lotes con NI de 10 y 5% su confiabilidad (90 y 70 %) es menor respecto a la del NI de 15%, por los negativos que se presentaron al analizar cada muestra por separado de dichos sublotos (**Tabla 3**).

Estos resultados coinciden con los encontrados por Scott y Zummo (1995), mencionando que cuando el nivel de infección natural de *Aspergillus flavus* en semillas de maíz es de baja incidencia podría no detectarse aun en tamaños de muestra grande, pero cuando el patógeno está por arriba del 3% de nivel de infección, el

tamaño de muestra se puede reducir a 100 granos, que es suficiente para detectar al hongo con un 95% de probabilidad. Además que en comparación con el virus del estriado del trigo (WSMV) el virus estriado de la cebada posee un mayor porcentaje de transmisión por semilla (Crowley, 1959; Carroll, 1968; Carroll, 1986; Mckinney and Greeley, 1965).

### **3.4.2. Efecto del nivel de infección en muestras simples**

En la **Tabla 5** se muestran los resultados del análisis de 210 muestras MS con diferente nivel de infección (NI), las medias por grupo y las medias generales por NI. Con los tres niveles NI se registraron muestras con valores superiores al valor umbral (0.22). Similarmente, los valores de las medias por grupo y los de las medias generales también fueron superiores al del umbral. Sin embargo, al analizar los resultados por nivel y entre niveles se encontraron diferencias. El valor promedio (0.91) registrado con el nivel NI de 15% fue significativamente diferente ( $\alpha=0.05$ ) al registrado con los NI de 10 y 5%, los cuales presentaron valores similares estadísticamente (0.72 y 0.62, respectivamente) (**Tabla 6**). Esto indica que al reducir el nivel NI de 15% a 10 y 5% hay una disminución de 21 y 31.5%, respectivamente, de la sensibilidad de la prueba ELISA al virus BSMV. Estos resultados reafirman los anteriormente mencionados del punto 3.4.1., y los encontrados por Scott y Zummo (1995) que mencionan que conforme el nivel de incidencia natural de un patógeno en la semilla se reduzca es probable que no se detecte el organismo.

Al comparar el número de muestras MS con los valores de absorbancia menores al del umbral (0.22), las muestras con NI de 10 y 5% registraron el mayor número de MS (14 y 24 muestras, respectivamente) respecto a las muestras con NI de 15% (6 muestras). Es decir, conforme disminuyó el NI de 15% a 10 y 5% se incrementó el número de muestras negativas al virus BSMV (**Tabla 5**).

La **Figura 6** muestra la tendencia de las medias de absorbancia de muestras MS presentada por cada nivel NI. Conforme disminuye el nivel NI el valor de absorbancia decrece. En síntesis con un nivel de infección del 15% se tiene un 91.5 % de

probabilidad de detectar al virus BSMV por la prueba ELISA; de 80% con 10% y de 66% con 5% de NI.

El nivel de infección de una semilla o de incidencia del patógeno en el cultivo es clave para su detección (Scott y Zummo, 1995), además que determinan el tamaño de muestra o muestra compuesta, como lo encontrado por Priuo, *et al.* (2001), que la reducción del tamaño de muestra compuesta de tubérculos de papa están en función del nivel de incidencia por *Ralstonia solanacearum* en los cultivos.

### **3.4.3. Efecto del número de muestras simples, tamaño de muestra y nivel de infección en muestras compuestas**

La **Tabla 7** muestra los resultados obtenidos del análisis por triplicado de las 36 muestras compuestas (MC) con la prueba ELISA. En general los valores promedio de absorbancia de las MC resultaron por arriba del valor umbral de absorbancia (0.21). Aunque las muestras MC10-15-15, MC10-10-10 y MC10-10-5 registraron valores promedio por debajo del umbral, al promediar los valores de las repeticiones solo el de la muestra MC10-10-5 se mantuvo por debajo del umbral. Esto indica que cuando las MC se forman con un número inferior a 15 o igual a 10 MS, decrece la sensibilidad de la prueba ELISA al virus BSMV y la probabilidad de registrar falsos negativos se incrementa. Semejante a lo encontrado por Fernández (2007), mencionando que los tamaños de muestra pequeños dan como resultado el menor nivel de confianza y grado de precisión y que los tamaños de muestra mayores poseen un mayor nivel de confianza y grado de precisión, al igual que Montesinos, *et al.* (2010), Miyamoto, *et al.* (2008) y Lawrence, *et al.* (1995), requieren de un mayor tamaño de muestra para obtener mejores resultados. En contraste, Thomas, *et al.* (2005) en graneles infectados con *Tilletia tritici*, encontraron que al analizar un granel mayor (500 t) y aumentar el número de muestras (80) para formar una muestra compuesta el nivel de infección se redujo al 0.08 esporas por semilla, afectando la detección del patógeno.

Las **Figuras 7 y 8** muestran el comportamiento de los valores de las repeticiones de las MC y la tendencia lineal de los valores promedio de absorbancia de dichas muestras. Por otra parte, la **Tabla 8** muestra los resultados del análisis de la

comparación de las medias generales entre las MC con diferente número de MS. Este análisis indica diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre muestras. Específicamente señala diferencias entre las muestras con 25 y 20 MS con las de 15 y 10 muestras simples y las diferencias entre estas últimas. En la **Figura 9** se presenta la tendencia de las medias de las MC de acuerdo al número de MS la cual indica que conforme disminuye el número de MS en la MC, decrece el valor de absorbancia. Confirmando nuevamente lo encontrado por Fernández (2007) que menciona que los tamaños de muestra pequeños tienen menor nivel de confianza y grado de precisión y en cambio los tamaños de muestra mayores poseen un mayor nivel de confianza y grado de precisión. Por el contrario Thomas, *et al.* (2005) menciona que al aumentar el número de muestras que forman una muestra compuesta en graneles de 500 t infectado con *Tilletia tritici* el nivel de infección en las semillas se redujo.

Al comparar las medias de absorbancia entre MC con diferente tamaño de muestra (TM) se encontraron diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos (**Tabla 9**). Es de notar que estas diferencias se presentaron solamente entre las muestras compuestas con tamaño de 15 y 5% con la MC con TM de 10%. Esto es, entre los tamaños de 15 y 5% no existen diferencias significativas pero si entre estas y el tamaño de 10%. Lo anterior puede estar relacionado con el hecho de que la muestra MC10-10-5 registró dos muestras (repeticiones) con valor por debajo del umbral (**Tabla 7**). En este caso no se encontró una relación lineal entre el TM de la MC con el valor de absorbancia (**Figura 10**); es decir no hay una tendencia entre las medias de las CM de acuerdo al TM. Estos resultados concuerdan a los encontrados por Moreno y Castillo (1978), para la clasificación de árboles cafetaleros, donde la reducción del tamaño de muestra no afectó la medida del grano en las variedades comerciales, concluyendo que la muestra de 250 g usada para tamaño de grano se puede reducir a 100 o 50 g sin causar alguna alteración. Afín a lo encontrado por Thomas, *et al.* (2005) donde graneles de trigo de 200 y 500 t infectados con *Microdochium nivale* no existen diferencias en el porcentaje de infección al analizar muestras compuestas de 40 y 80 muestras respectivamente.

Cuando se desarrollan planes de muestreo, según Nyrop, *et al.* (1999), se debería comenzar por comprobar lo que se sabe acerca de la distribución del muestreo y realizar un análisis sensitivo para determinar si un perfeccionamiento de esta información está justificado, y que el tamaño de la muestra debería basarse en la información de la muestra representativa, ya que es un buen indicador de la abundancia o incidencia de plagas en la unidad de manejo.

En la **Tabla 10** se muestran los resultados del análisis de la comparación de las medias generales entre MC con diferente NI. Este análisis indica diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre las muestras con NI de 15, 10 y 5 %. En este caso hay una tendencia en el comportamiento de las medias de las CM de acuerdo a su nivel de infección, conforme disminuye el NI, decrece el valor de absorbancia de la MC (**Figura 11**). Similar a lo encontrado por Priuo, *et al.* (2001) al analizar muestras compuestas de tubérculos de papa, conforme el nivel de incidencia disminuye en el cultivo, donde provienen las papas, la detección de *Ralstonia solanacearum* se ve afectada y que además se requiere de una muestra compuesta mayor. Análogo a cuando el nivel de infección natural de *Aspergillus flavus* es muy bajo ni con tamaños de muestra mayores se detecta el patógeno, en cambio cuando el nivel de infección natural es alto (3%) se reduce el tamaño de muestra (Scott y Zummo, 1995).

Los resultados anteriormente descritos son evidencia de la especial importancia que se debe dar al muestreo como actividad fundamental en un programa de análisis de semillas (Morrison, 1999). Tal como lo menciona el ISTA (2013), un lote puede estar compuesto de semillas cosechadas de un solo campo o de varias porciones de terreno y, el objetivo del muestreo de semillas, es obtener una muestra de un tamaño adecuado para las pruebas, cuyos resultados deben reflejar la calidad del lote de semilla. El conocimiento que se tenga sobre el impacto que tienen el tamaño de muestra y el nivel de infección en muestreos de lotes de semillas permite determinar la probabilidad de seleccionar una muestra positiva o no al patógeno de interés lo cual se traducirá en confiabilidad de los resultados y en toma de decisiones acertadas sobre el destino final del lote evaluado.

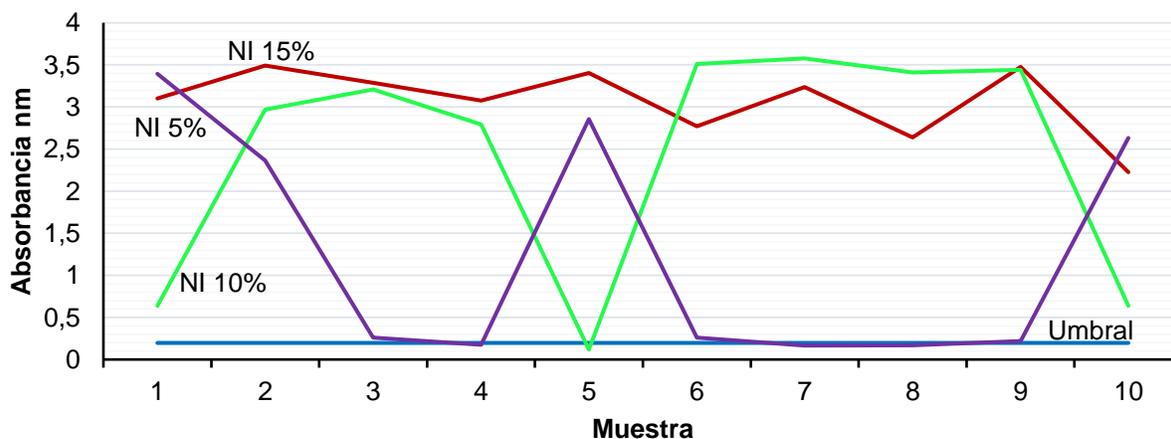
### **3.5. Conclusiones**

1. El tamaño de muestra de semilla de trigo afecto significativamente ( $\alpha=0.05$ ) la capacidad predictiva del método de detección ELISA al Virus del mosaico estriado de la cebada.
2. Los niveles de infección de 15, 10 y 5 % afectan proporcionalmente la sensibilidad de la prueba ELISA al virus BSMV.
3. El incremento en el número de muestras simples utilizadas para formar muestras compuestas incrementa la confiabilidad de la prueba ELISA al virus BSMV.
4. El aumento y la reducción actual del tamaño de muestra de trigo de 10% a 15 y 5 %, afectan significativamente ( $\alpha=0.05$ ) la sensibilidad de la prueba ELISA al virus BSMV.

**Tabla 3.** Comparación de valores de absorbancia (nm) entre sublotes de semilla con diferente nivel de infección (NI) del virus BSMV. Cada sublote constó de 50 g y las muestras de 2 g cada una para su análisis.

Muestra	NI de sublote (%)		
	15	10	5
1	3.10	0.64	3.40
2	3.49	2.97	2.37
3	3.29	3.21	0.26
4	3.08	2.79	0.18
5	3.40	0.12	2.86
6	2.77	3.51	0.26
7	3.24	3.58	0.17
8	2.64	3.41	0.17
9	3.48	3.44	0.22
10	2.23	0.64	2.63
$\bar{X}$	<b>3.07</b>	<b>2.43</b>	<b>1.25</b>

Muestras con valor superior a 0.197 se considera positiva al BSMV.  
 $\bar{X}$  = Media de sublote (número en negrita).

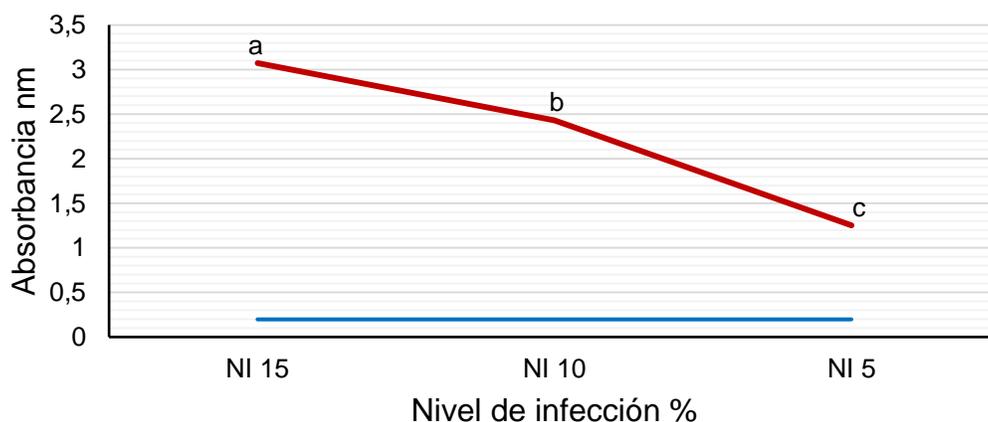


**Figura 4.** Tendencia de valores de absorbancia (nm) de muestras provenientes de sublotes con diferente nivel de infección (NI) del virus BSMV. La línea azul representa el umbral (0.197) a partir del cual la muestra se considera positiva.

**Tabla 4.** Comparación de medias de absorbancia entre sublotes con diferente NI, diferencia significativa honesta (DSH) del método de Tukey con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza correspondió al modelo lineal de un diseño de bloques completos al azar sin sub-muestreo.

NI de Sublote	Media
15	3.07 a
10	2.43 b
5	1.25 c

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.



**Figura 5.** Tendencia de las medias de sublotes con diferente nivel de infección (NI) del virus BSMV. Cada valor de la línea marrón representa la media de 10 muestras; y, los de la azul el umbral (0.197) a partir del cual la muestra se considera positiva. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

**Tabla 5.** Comparación de valores promedio de absorbancia en muestras simples (MS) de semilla de trigo con diferente nivel de infección (NI) del virus BSMV.

Claves de MS*	Nivel de infección		
	15	10	5
25	1.15	1.00	<b>0.18</b>
25	1.26	0.79	<b>0.12</b>
25	1.30	0.99	0.65
25	<b>0.15</b>	0.95	0.73
25	0.70	<b>0.20</b>	<b>0.12</b>
25	1.40	1.02	<b>0.11</b>
25	1.20	0.80	<b>0.10</b>
25	1.43	<b>0.14</b>	0.86
25	1.40	0.33	<b>0.11</b>
25	1.43	0.94	0.76
25	1.44	1.00	0.84
25	0.99	<b>0.20</b>	0.82
25	1.07	0.72	0.91
25	1.45	0.96	0.77
25	1.05	<b>0.18</b>	<b>0.13</b>
25	0.61	<b>0.12</b>	<b>0.12</b>
25	<b>0.13</b>	0.91	0.82
25	<b>0.13</b>	0.83	1.03
25	1.20	0.77	<b>0.15</b>
25	0.99	0.80	0.88
25	0.84	0.97	0.89
25	<b>0.15</b>	0.91	<b>0.13</b>
25	0.96	<b>0.20</b>	0.91
25	0.92	0.87	1.16
25	0.91	0.94	<b>0.18</b>
<b>Media</b>	<b>0.97</b>	<b>0.70</b>	<b>0.54</b>
20	1.15	0.24	<b>0.17</b>
20	0.31	<b>0.15</b>	1.12
20	0.86	0.87	0.66
20	1.11	<b>0.14</b>	1.38
20	0.75	<b>0.12</b>	<b>0.14</b>
20	0.99	0.78	1.21
20	1.03	<b>0.13</b>	<b>0.13</b>
20	0.88	0.48	1.23
20	1.03	0.75	1.32
20	0.87	0.76	0.97
20	1.05	0.96	1.07
20	1.01	0.25	1.29
20	0.98	0.76	1.06
20	0.95	0.76	<b>0.15</b>
20	1.04	0.75	0.88

20	<b>0.20</b>	<b>0.13</b>	0.88
20	0.97	<b>0.14</b>	<b>0.13</b>
20	0.80	1.12	<b>0.12</b>
20	0.91	1.08	<b>0.13</b>
20	0.83	0.99	<b>0.12</b>
<b>Media</b>	<b>0.89</b>	<b>0.57</b>	<b>0.71</b>
15	1.00	0.96	0.24
15	0.95	0.73	<b>0.18</b>
15	1.02	0.89	0.97
15	1.01	0.84	0.53
15	1.08	0.91	1.22
15	0.99	0.99	0.51
15	1.09	1.01	0.94
15	1.25	1.15	0.22
15	0.27	1.19	0.97
15	0.93	1.26	0.26
15	0.96	1.28	<b>0.17</b>
15	0.99	1.26	1.14
15	0.90	1.56	0.38
15	1.04	1.31	<b>0.16</b>
15	<b>0.20</b>	0.43	1.13
<b>Media</b>	<b>0.91</b>	<b>1.05</b>	<b>0.60</b>
10	0.92	0.88	0.35
10	0.95	0.98	0.19
10	0.98	0.26	1.07
10	0.90	0.71	1.26
10	0.95	0.92	1.27
10	0.37	0.68	1.10
10	1.10	<b>0.19</b>	0.39
10	1.02	<b>0.16</b>	<b>0.27</b>
10	0.73	0.35	<b>0.20</b>
10	0.75	1.17	1.07
<b>Media</b>	<b>0.87</b>	<b>0.63</b>	<b>0.72</b>
$\bar{X}$	<b>0.92</b>	<b>0.73</b>	<b>0.63</b>

\* El número de la clave de la muestra MS corresponde a la muestra MC a la que se integró la muestra MS.

Cada muestra MS consto de 20 g de semilla.

Umbral de absorbancia promedio = 0.22 nm.

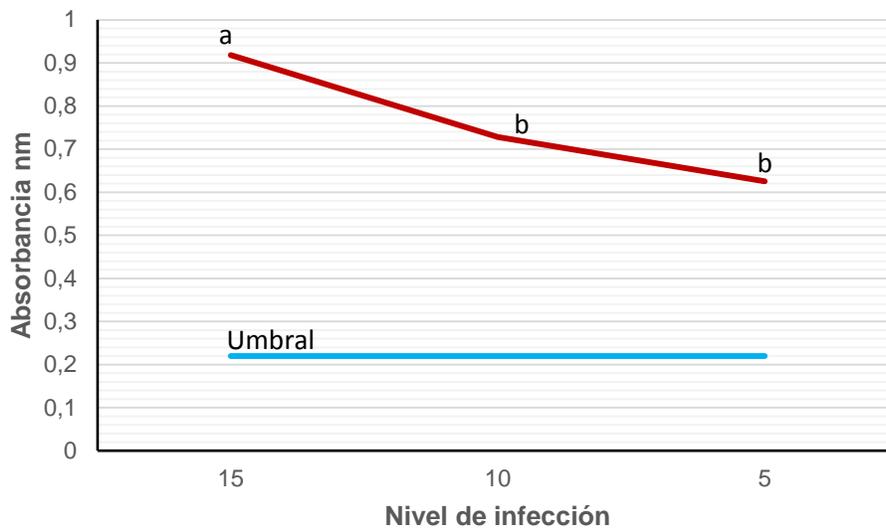
Lecturas menores al del umbral son negativas al BSMV (número en negrita).

$\bar{X}$ = Media general.

**Tabla 6.** Comparación de medias de absorbancia en muestras simples (MS) de semilla de trigo con diferente nivel de infección (NI) del virus BSMV. Diferencia significativa honesta (DSH) del método de Tukey con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza correspondió al modelo lineal de un diseño de bloques completos al azar con sub-muestreo.

Nivel de infección	Media
15	0.92 a
10	0.73 b
5	0.63 b

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.



**Figura 6.** Tendencia de las medias de absorbancia de muestras simples (MS) con diferente nivel de infección del virus BSMV, con Tukey  $\alpha=0.05$ . Cada valor de la línea marrón representa la media de 70 muestras MS y los de la azul, el umbral de absorbancia (0.22 nm). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

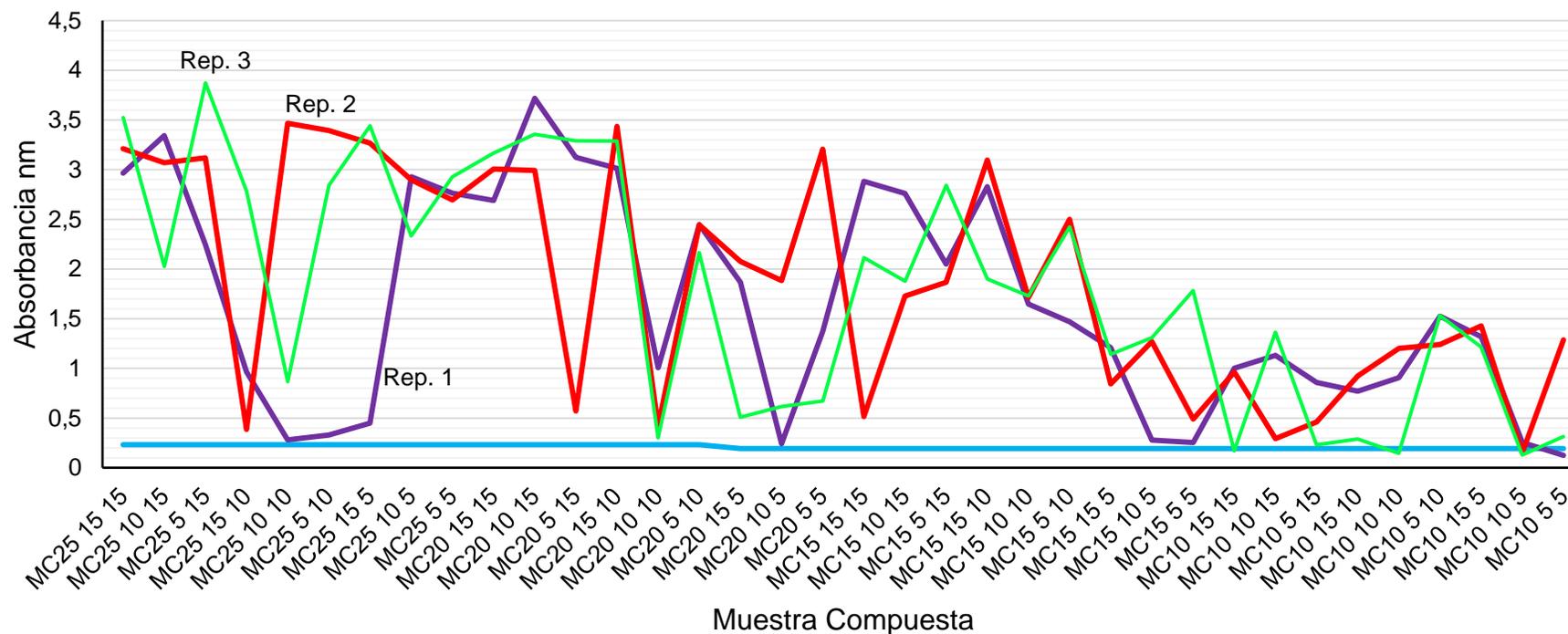
**Tabla 7.** Comparación de valores promedio de absorbancia de muestras compuestas (MC) de semilla de trigo. Cada MC se formó con diferente número de muestras simples (**MS**), tamaño de muestra (**TM**) y nivel de infección (**NI**) de BSMV. Los valores de las repeticiones se obtuvieron con la prueba ELISA.

Clave Muestra MC*	MS	TM	NI	Repetición			$\bar{X}$
				1	2	3	
MC25 15 15	25	15	15	2.97	3.21	3.52	3.23
MC25 10 15	25	10	15	3.34	3.07	2.03	2.81
MC25 5 15	25	5	15	2.25	3.12	3.87	3.08
MC25 15 10	25	15	10	0.97	0.39	2.78	1.38
MC25 10 10	25	10	10	0.28	3.47	0.87	1.54
MC25 5 10	25	5	10	0.33	3.40	2.84	2.19
MC25 15 5	25	15	5	0.45	3.27	3.44	2.39
MC25 10 5	25	10	5	2.93	2.90	2.33	2.72
MC25 5 5	25	5	5	2.76	2.70	2.93	2.80
MC20 15 15	20	15	15	2.69	3.01	3.17	2.95
MC20 10 15	20	10	15	3.72	2.99	3.36	3.36
MC20 5 15	20	5	15	3.12	0.57	3.29	2.33
MC20 15 10	20	15	10	3.01	3.44	3.29	3.25
MC20 10 10	20	10	10	1.01	0.42	0.30	0.58
MC20 5 10	20	5	10	2.45	2.44	2.17	2.35
MC20 15 5	20	15	5	1.87	2.08	0.51	1.48
MC20 10 5	20	10	5	0.24	1.89	0.62	0.91
MC20 5 5	20	5	5	1.37	3.21	0.67	1.75
MC15 15 15	15	15	15	2.88	0.52	2.11	1.84
MC15 10 15	15	10	15	2.76	1.73	1.88	2.12
MC15 5 15	15	5	15	2.05	1.87	2.84	2.25
MC15 15 10	15	15	10	2.83	3.10	1.90	2.61
MC15 10 10	15	10	10	1.65	1.71	1.73	1.70
MC15 5 10	15	5	10	1.47	2.50	2.42	2.13
MC15 15 5	15	15	5	1.21	0.84	1.14	1.07
MC15 10 5	15	10	5	0.28	1.27	1.31	0.95
MC15 5 5	15	5	5	0.26	0.49	1.78	0.84
MC10 15 15	10	15	15	1.00	0.96	<b>0.17</b>	0.71
MC10 10 15	10	10	15	1.13	0.29	1.36	0.93
MC10 5 15	10	5	15	0.86	0.46	0.23	0.52
MC10 15 10	10	15	10	0.77	0.93	0.29	0.66
MC10 10 10	10	10	10	0.91	1.20	<b>0.15</b>	0.75
MC10 5 10	10	5	10	1.53	1.24	1.53	1.43
MC10 15 5	10	15	5	1.32	1.43	1.22	1.32
MC10 10 5	10	10	5	0.26	<b>0.15</b>	<b>0.13</b>	0.18
MC10 5 5	10	5	5	<b>0.13</b>	1.29	0.31	0.58

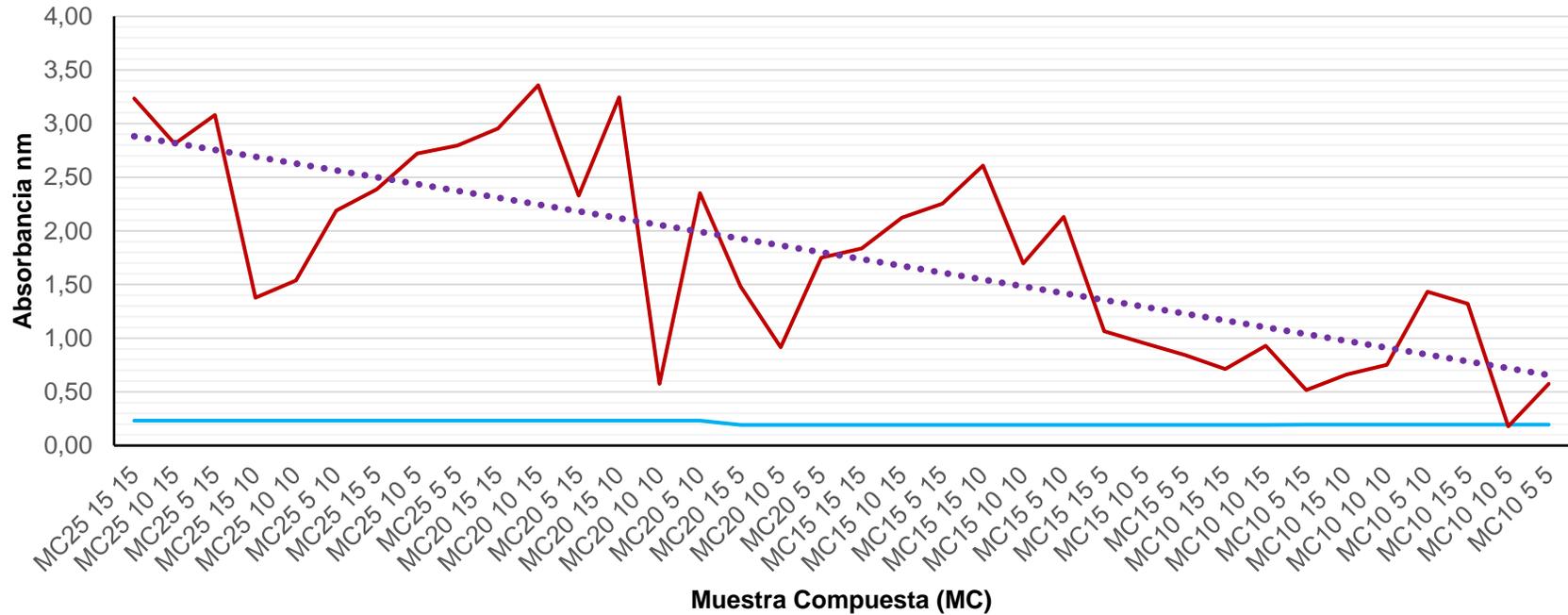
Umbral de absorbancia promedio= 0.21 nm.

\*Muestra con valor menor al del umbral se considera negativa al BSMV (número en negrita).

$\bar{X}$ = media de las tres repeticiones



**Figura 7.** Comportamiento de los valores promedio de absorbancia de muestras compuestas (MC) de semilla de trigo. Cada MC se formó con diferente número de muestras simples (MS, 25, 20, 15 y 10), tamaño de muestra (TM, 15, 10 y 5 %) y nivel de infección (NI, 15, 10 y 5 %) de BSMV. La línea azul indica el promedio del umbral de absorbancia (0.21 nm).

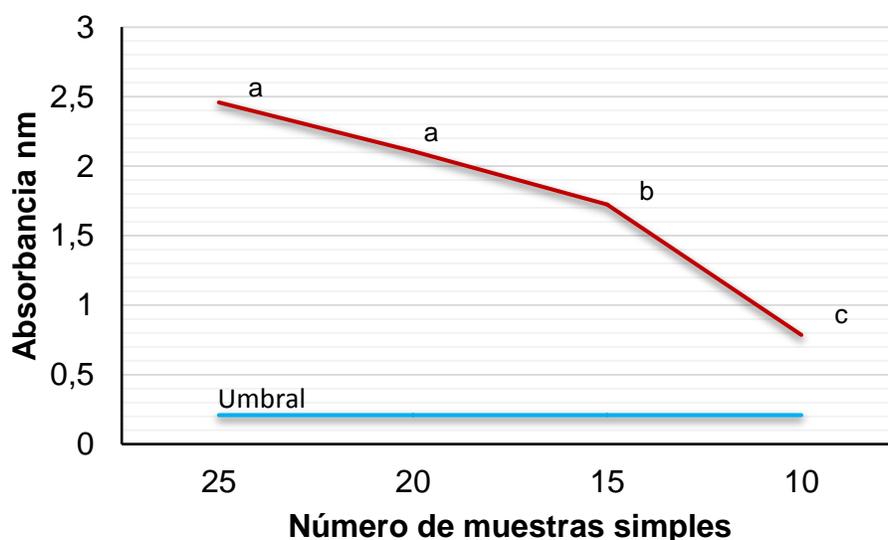


**Figura 8.** Tendencia de los valores promedio de absorbancia de muestras compuestas (MC) de semilla de trigo. Cada MC se formó con diferente número de muestras simples (MS, 25, 20, 15 y 10), tamaño de muestra (TM, 15, 10 y 5 %) y nivel de infección (NI, 15, 10 y 5 %) del virus BSMV. Los valores de la línea marrón indican el promedio de tres muestras MC; los de la punteada morada, la tendencia línea de los valores; y los de la azul, el promedio del umbral de absorbancia (0.21 nm).

**Tabla 8.** Comparación de medias generales de absorbancia entre muestras compuestas (MC) con diferente número de muestras simples (MS), tamaño de muestra (TM) y nivel de infección (NI). Diferencia significativa honesta (DSH) del método de Tukey con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza correspondió al modelo lineal de un diseño de bloques completos al azar sin sub-muestreo.

Número de Muestras	
MS	Media
25	2.46 a
20	2.11 a
15	1.72 b
10	0.79 c

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

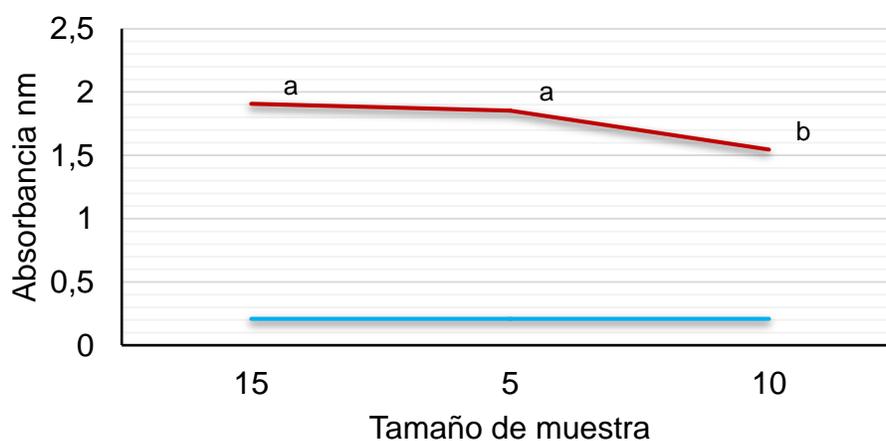


**Figura 9.** Tendencia de las medias de muestras MC con diferente número de muestras MS infectadas con el virus BSMV. Cada valor de la línea marrón representa la media de 9 muestras MC (MS+TM+NI) y los de la azul, el umbral de absorbancia (0.21 nm). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

**Tabla 9.** Comparación de medias de absorbancia entre muestras compuestas (MC) con diferente tamaño de muestra (TM). Diferencia significativa honesta (DSH) del método de Tukey con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza correspondió al modelo lineal de un diseño de bloques completos al azar sin sub-muestreo.

TM de muestra MC	Media
15	1.91 a
5	1.85 a
10	1.55 b

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

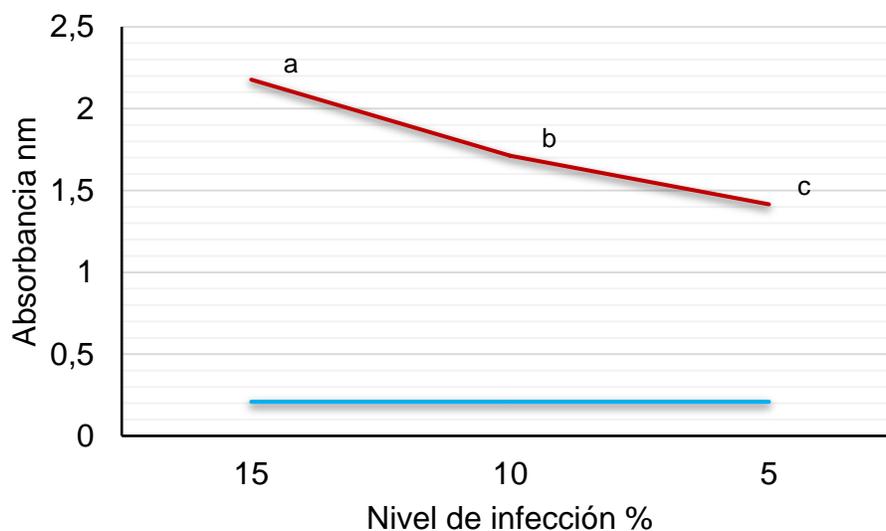


**Figura 10.** Tendencia de las medias de absorbancia de las muestras compuestas (MC) con diferente tamaño de muestra (TM) con Tukey  $\alpha=0.05$ . Cada valor de la línea marrón representa la media de 12 muestras MC y los de la línea en azul, el umbral de absorbancia. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

**Tabla 10.** Comparación de medias de absorbancia entre muestras MC con diferente NI del virus BSMV. Diferencia significativa honesta (DSH) del método de Tukey con nivel de significancia al 5% ( $\alpha=0.05$ ). El análisis de la varianza correspondió al modelo lineal de un diseño de bloques completos al azar sin submuestreo.

NI de muestra MC	Media
15	2.18 a
10	1.71 b
5	1.42 c

Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.



**Figura 11.** Tendencia de las medias de absorbancia de las muestras MC con diferente nivel de NI del virus BSMV. Cada valor de la línea marrón representa la media de 12 MC y los de la azul, el umbral de absorbancia (0.21 nm). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

### 3.6. Bibliografía

- Atabekov, J. G. and Novikov, V. K. 1989. *Barley stripe mosaic virus*. Descriptions of Plant Viruses. No. 344. Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists, Kew, England.
- Bockus, W.W., R.L. Bowden, R.M. Hunger, W.L. Morrill, T.D. Murray and R.W. Smiley. 2010. Compendium of wheat diseases and pests. Third edition. The American Phytopathological Society.
- Brakke, M. K., White, J. L., Samson, R. G. and Joshi, J. 1988. Chlorophyll, chloroplast ribosomal RNA, and DNA are reduced by *Barley stripe mosaic virus* systemic infection. *Phytopathology* 78:570-574.
- Carroll, T. W. 1969. Electron microscopic evidence for the presence of *Barley stripe mosaic virus* in cells of barley embryos. *Virology* 37:649-657.
- Carroll, T. W. 1972. Seed Transmissibility of two strain of *Barley stripe mosaic virus*. *Virology* 48:323-336.
- Carroll, T. W. 1974. *Barley stripe mosaic virus* in sperm and vegetative cells of barley pollen. *Virology* 60:21-28.
- Carroll, T. W. 1980. *Barley stripe mosaic virus*: Its economic importance and control in Montana. *Plant Disease* 64:136-140.
- Carroll, T. W. 1986. Hordeiviruses: Biology and pathology. p 373-395. In: *The Plant Viruses*. Vol. 2. M. H. V. Van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat, Eds. Plenum, N.Y.
- Carroll, T. W. and Mayhew, D. E. 1976. Anther and pollen infection in relation to the pollen and seed transmissibility of two strains of barley stripe mosaic virus in barley. *Canadian Journal of Botany* 54:1604-1621.
- Crowley, N.C. 1959. Studies on the time of embryo infection by seed-transmitted viruses. *Virology* 8:116-123.
- Hagborg, W. A. F. 1954. Dwarfing of wheat and barley by the *Barley stripe-mosaic* (false stripe) virus. *Canadian Journal of Botany* 32:24-37.
- Jackson, A. O., Hunter, B. G. and Gustafson, G. D. 1989. Hordeivirus relationships and genome organization. *Annual Reviews Phytopathology* 27:95-121.

- Jackson, A. O., Petty, I. T. D., Jones, R. W., Edwards, M. C., and French, R. 1991. Molecular genetic analysis of *Barley stripe mosaic virus* pathogenicity determinants. Canadian Journal Plant Pathology 13:163-177.
- Mathre, D. E. 1997. Compendium of Barley Diseases. Second Edition. The American Phytopathological Society.
- McKinney, H. H. and Greeley, L. W. 1965. Biological characteristics of *Barley stripe mosaic virus* strain and their evolution. Agriculture Research Service, U.S. Department of Agriculture. Technical Bulletin No. 1324.
- Morrison, R., H. 1999. Sampling in seed health testing. Phytopathology 89:1084-1087.

## Conclusiones Generales

1. El aumento y la reducción del tamaño de muestra actual de 10% afectó significativamente ( $\alpha = 0.05$ ) la sensibilidad de la prueba por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) para la detección de los virus: Virus del mosaico estriado del trigo (WSMV, por sus siglas en inglés) y Virus mosaico estriado de la cebada (BSMV, por sus siglas en inglés), en semilla de trigo harinero (*Triticum aestivum*).
2. La sensibilidad de la prueba ELISA al virus WSMV fue baja cuando se analizaron muestras simples (MS) con tamaño de muestra (TM) de 20, 15, 8, 6 y 4 % y nivel de infección (NI) de 10%. En general, no se detectó al virus con estos tamaños y nivel de infección.
3. El tamaño de muestra de semilla de trigo afectó la capacidad predictiva de la prueba ELISA al virus BSMV.
4. Con la reducción del NI de 15% a 10 y 5%, la sensibilidad de la prueba decreció aproximadamente 21 y 59%, respectivamente. La prueba ELISA detecta al virus BSMV en sublotos con NI de 10 y 5% pero su confiabilidad (90 y 70 %) es menor respecto a la mostrada con NI del 15%, por las muestras con valores negativos que se presentan al analizar cada muestra por separado, en dichos sublotos.
5. El incremento en el número (a 25, 20 y 15) de muestras MS utilizadas para formar muestras compuestas (MC) incrementó la confiabilidad de la prueba ELISA al virus BSMV. Cuando las muestras MC se formaron con un número igual a 10 muestras MS, decreció la sensibilidad de la prueba al virus BSMV y se incrementó la probabilidad de registrar falsos negativos.
6. El aumento del TM a 15 % incremento la sensibilidad de la prueba ELISA al virus BSMV pero se redujo con 5 %.

## ANEXOS

# Reagent Set

## DAS ELISA, Alkaline phosphatase label

### List of contents

Lot number	Item	96 wells	500 wells	1000 wells	5000 wells
_____	Capture antibody	0.150 ml	0.275 ml	0.525 ml	2.525 ml
_____	Alkaline phosphatase enzyme conjugate	0.150 ml	0.275 ml	0.525 ml	2.525 ml
	<i>The above items should be stored at 4° C.</i>				
_____	96-well microtiter plates, strip or solid	1 strip	5 solid	10 solid	50 solid
	<i>The above items can be stored at room temperature.</i>				

### Materials required, but not provided

- Carbonate Coating Buffer (formulation on page 5)
- PBST Wash Buffer (formulation on page 5)
- ECI Buffer (formulation on page 5)
- PNP Substrate Buffer (formulation on page 5)
- PNP Substrate Tablets (ACC 00404)
- General Extract Buffer (formulation on page 5)
- Buffer packs containing the above required items can be purchased from Agdia (ACC 00111)
- Distilled or purified water
- Paper towels
- Micropipette
- Micropipette tips
- Sample grinding device such as:
  - Agdia sample mesh bag (ACC 00930)
  - Agdia tissue homogenizer (ACC 00900)
  - Mortar and pestle
- Airtight container for incubations
- **When testing blueberry leaves or other acidic hosts, the recommended extraction buffer is Agdia's General extract buffer 3 (GEB3) (ACC 00360).**

### Limitations

**Expiration:** This test should be used within 1 year of purchase.

**Storage:** Test results may be weak or the test may fail if storage instructions are not followed properly.

**Buffers:** Do not store 1X buffers from day to day. Buffers should be warmed to room temperature prior to use.

**Dilutions:** Read all labels carefully prior to preparing solutions to assure proper antibody concentrations. All antibody dilutions have been optimized for the greatest possible sensitivity and specificity based on available isolates and hosts. Using dilutions other than those listed can lead to potential false positives or false negatives.

### Precautions

Prevent direct skin and eye contact with, or ingestion of, product components. Obtain medical attention in case of accidental ingestion of kit components. Always wash hands thoroughly after using this product.

### Technical Service

If you have any questions about using this kit, please contact Agdia, Inc. Monday – Friday by phone (574-264-2014 or 800-622-4342) or by email ([info@agdia.com](mailto:info@agdia.com)).

# Reagent Set

## DAS ELISA, Alkaline phosphatase label

### Coating testwells of ELISA plate

1. Prepare humid box      Prepare a humid box by lining an airtight container with a wet paper towel. Keeping testwells in a humid box during incubation will help prevent samples from evaporating.

2. Prepare capture antibody      **Note: All antibodies and enzyme conjugates should be prepared in a container made of a material such as polyethylene or glass that does not readily bind antibodies. Do not use polystyrene.**

**Note: 96 testwell reagents have a different dilution ratio than larger reagent sets. Please read label on capture antibody bottle for appropriate dilution ratio.**

The capture antibody is provided as a concentrated solution and must be diluted with carbonate coating buffer before use. The recommended antibody to buffer ratio is given on the label.

Prepare the volume of carbonate coating buffer needed for the test. You will need 100  $\mu$ l of carbonate coating buffer for each test well you are using. A full plate will require about 10 ml. Then, add the appropriate volume of concentrated capture antibody to the carbonate coating buffer at the dilution on the label.

*Example 1: If the dilution given on the bottle of concentrated capture antibody is 1:200, and you are preparing 10 ml of capture antibody solution, you should mix 10 ml of carbonate coating buffer with 50  $\mu$ l of the concentrated capture antibody. Mix the prepared capture antibody solution thoroughly and use immediately.*

*Example 2: If the dilution given on the bottle of concentrated capture antibody is 1:100, and you are preparing 10 ml of capture antibody solution, you should mix 10 ml of carbonate coating buffer with 100  $\mu$ l of the concentrated capture antibody. Mix the prepared capture antibody solution thoroughly and use immediately.*

3. Coat plate      Pipette 100  $\mu$ l of the prepared capture antibody into each well.

4. Incubate plate      Incubate the plate in a humid box for 4 hours at room temperature or overnight in the refrigerator (4°C). Do not store coated plates longer than 24 hours. If long term storage is desired, contact Agdia about postcoat buffers.

5. Wash plate      Empty the wells into a sink or waste container. Fill the testwells completely with 1X PBST, and then quickly empty them again. Repeat 2 more times.

Hold the plate upside down and tap firmly on a folded paper towel to remove excess liquid.

**Note: Use freshly coated plates immediately.**

### Grind and dilute samples

When possible, select samples showing symptoms. Leaf tissue is primarily used in ELISA testing however; stem, seed, and other tissue can also be tested. Please note that various tissues even from the same plant may have different pathogen concentrations. In some cases, composites of up to ten leaves per test well can be used to make testing more economical, but it is important to not composite too many plant samples per well as sensitivity of the test can be adversely affected. **For test specifics and limitations please visit our website.**

Use Agdia's general extract buffer (GEB) to grind and dilute samples.

Grind plant tissue in sample extraction buffer at a 1:10 ratio (tissue weight in g: buffer volume in ml). You will need 100  $\mu$ l of diluted sample extraction per testwell, plus an additional amount to assure easy dispensing. You can use Agdia's sample mesh bags (ACC 00930), Agdia's tissue homogenizer (ACC 00900), a mortar and pestle, or other grinding devices to grind samples. If you are using a

# Reagent Set

## DAS ELISA, Alkaline phosphatase label

### Test Procedure

#### 1. Dispense samples

mortar and pestle, wash and rinse it thoroughly between samples.

Following your loading diagram, dispense 100 µl of prepared sample into sample wells. Dispense 100 µl of positive control into positive control wells, and dispense 100 µl of sample extraction buffer into buffer wells.

#### 2. Incubate plate

Set the plate inside the humid box and incubate for 2 hours at room temperature or overnight in the refrigerator (4°C).

#### 3. Prepare enzyme conjugate

**Note: Always prepare enzyme conjugate within 10 minutes before use.**

The bottle of alkaline phosphatase enzyme conjugate is supplied as a concentrate and must be diluted with ECI buffer before use. The recommended conjugate to buffer ratio is given on the label. Dispense the appropriate volume of prepared ECI buffer into a dedicated container. You will need 100 µl of buffer for each testwell you are using. Then, add the alkaline phosphatase enzyme conjugate according to the dilution given on the labels.

**Note: 96 testwell reagents have a different dilution ratio than larger reagent sets. Please read label on enzyme conjugate bottle for appropriate dilution ratio.**

*Example 1: If the dilution given on bottle of concentrated alkaline phosphatase enzyme conjugate is 1:200, and you are preparing 10 ml of enzyme conjugate solution, you should first dispense 10 ml of ECI buffer. Then, add 50 µl of the concentrated enzyme conjugate to the ECI buffer.*

*Example 2: If the dilution given on bottle of concentrated alkaline phosphatase enzyme conjugate is 1:100, and you are preparing 10 ml of enzyme conjugate solution, you should first dispense 10 ml ECI buffer. Then, add 100 µl of the concentrated enzyme conjugate to the ECI buffer.*

After adding the enzyme conjugate, mix thoroughly. It is important to mix the enzyme conjugate solution well.

#### 4. Wash plate

When the sample incubation is complete, wash the plate. Use a quick flipping motion to dump the wells into a sink or waste container without mixing the contents.

Fill all the wells completely with 1X PBST, and then quickly empty them again. Repeat 7 times.

After washing, hold the frame upside down and tap firmly on a folded paper towel to remove all droplets of wash buffer.

Inspect the testwells. All wells should be free of plant tissue. If tissue is present repeat the wash step and tap firmly on a paper towel.

#### 5. Add enzyme conjugate

Dispense 100 µl of prepared enzyme conjugate per well.

#### 6. Incubate plate

Incubate the plate in the humid box for 2 hours at room temperature.

#### 7. Prepare PNP solution

Each PNP tablet (ACC 00404) will make 5 ml of PNP solution, at a concentration of 1 mg/ml, about enough for five 8-well strips.

About 15 minutes before the end of the above incubation step, measure 5 ml of room temperature 1X PNP buffer for each tablet you will be using. Then, without touching the tablets, add the PNP tablets to the buffer.

**Note: Do not touch the PNP tablets or expose the PNP solution to strong light. Light or contamination could cause background color in negative wells.**

# Reagent Set

## DAS ELISA, Alkaline phosphatase label

### 8. Wash plate

As before, wash the plate 8 times with 1X PBST.

Inspect the wells looking for the presence of air bubbles. Tap firmly on the paper towel to remove remaining wash buffer and any air bubbles. If air bubbles are still present they may be broken with a clean pipette tip.

### 9. Add PNP substrate

Dispense 100  $\mu$ l of PNP substrate into each testwell.

### 10. Incubate plate

Incubate the plate for 60 minutes. Plates should be protected from direct or intense light.

### 11. Evaluate results

Examine the wells by eye, or measure on a plate reader at 405 nm. Air bubbles which are present at the time of reading can alter results, if in the light path. Agdia recommends that bubbles be eliminated prior to reading.

Wells in which color develops indicate positive results. Wells in which there is no significant color development indicate negative result. Test results are valid only if positive control wells give a positive result and buffer wells remain colorless.

Results may be interpreted after more than 60 minutes of incubation as long as negative wells remain virtually clear.

# Reagent Set

## DAS ELISA, Alkaline phosphatase label

### Buffer Formulations

#### Carbonate Coating buffer (1X)

Dissolve in distilled water to 1000 ml:

Sodium carbonate (anhydrous)	1.50 g
Sodium bicarbonate	2.93 g
Sodium azide	0.2 g

Adjust pH to 9.6. Store at 4° C.

#### PBST Buffer (Wash Buffer) (1X)

Dissolve in distilled water to 1000 ml:

Sodium chloride	8.0 g
Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	1.15 g
Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	0.2 g
Potassium chloride	0.2 g
Tween-20	0.5 g

Adjust pH to 7.4

#### ECI Buffer (1X)

Add to 1000 ml 1X PBST:

Bovine serum albumin (BSA)	2.0 g
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20.0 g
Sodium azide	0.2 g

Adjust pH to 7.4. Store at 4° C.

#### PNP Buffer (1X)

Dissolve in 800 ml distilled water:

Magnesium chloride hexahydrate	0.1 g
Sodium azide	0.2 g
Diethanolamine	97.0 ml

Adjust pH to 9.8 with hydrochloric acid. Adjust final volume to 1000 ml with distilled water. Store at 4° C.

#### General Extract Buffer (GEB 1X)

Dissolve in 1000 ml of 1X PBST:

Sodium sulfite (anhydrous)	1.3 g
Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20.0 g
Sodium azide	0.2 g
Powdered egg (chicken) albumin, Grade II	2.0 g
Tween-20	20.0 g

Adjust pH to 7.4. Store at 4°C.

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA MUESTRAS ORIGINALES WSMV**

Protocolo **WSMV - Muestras Originales**

Formato placa: 96 pocillos

Absorbancias Filtro 1: 405nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$
<b>A</b>	0.144	0.09	0.12	0.301	0.312	<b>0.31</b>	0.369	0.388	<b>0.38</b>	0.292	0.301	<b>0.30</b>	0.208	0.228	<b>0.22</b>			
<b>B</b>	0.248	0.233	<b>0.24</b>	0.387	0.416	<b>0.40</b>	0.352	0.345	<b>0.35</b>	0.412	0.451	<b>0.43</b>						
<b>C</b>	0.248	0.237	<b>0.24</b>	0.276	0.251	<b>0.26</b>	0.474	0.517	<b>0.50</b>	0.231	0.24	<b>0.24</b>						
<b>D</b>	0.31	0.288	<b>0.30</b>	0.281	0.28	<b>0.28</b>	0.323	0.33	<b>0.33</b>	0.332	0.331	<b>0.33</b>						
<b>E</b>	0.477	0.424	<b>0.45</b>	0.213	0.209	<b>0.21</b>	0.217	0.218	<b>0.22</b>	0.212	0.209	<b>0.21</b>						
<b>F</b>	0.28	0.25	<b>0.27</b>	0.213	0.208	<b>0.21</b>	0.344	0.323	<b>0.33</b>	0.351	0.367	<b>0.36</b>				0.1	0.104	0.10
<b>G</b>	0.428	0.263	<b>0.35</b>	0.296	0.299	<b>0.30</b>	0.249	0.253	<b>0.25</b>	0.258	0.264	<b>0.26</b>				0.098	0.108	0.10
<b>H</b>	0.212	0.206	<b>0.21</b>	0.334	0.341	<b>0.34</b>	0.296	0.292	<b>0.29</b>	0.357	0.306	<b>0.33</b>				4.316	4.267	<b>4.29</b>
G11	G12	$\bar{X} * 2$																
0.10	0.11	<b>0.21</b> Umbral de absorbancia																

Experimento: **TRIGO WSMV MO**

Anticuerpo: **1:200**

Fecha: **2013-10-02**

Dilución de la muestra: **1:10**

No. de Placa: **1**

Conjugación: **1:200**

Operador: **A.M.M.**

Substrato: **1:1 mg/ml**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	BLANCO		8	8	16	16	24	24	32	32		
<b>B</b>	1	1	9	9	17	17	25	25				
<b>C</b>	2	2	10	10	18	18	26	26				
<b>D</b>	3	3	11	11	19	19	27	27				
<b>E</b>	4	4	12	12	20	20	28	28				
<b>F</b>	5	5	13	13	21	21	29	29				
<b>G</b>	6	6	14	14	22	22	30	30				Búfer
<b>H</b>	7	7	15	15	23	23	31	31				Control negativo
												Control positivo

### RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA TM20% WSMV

Protocolo: **WSMV TM 20%**

Formato placa: 96 pocillos

Absorbancias Filtro 1: 405nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$	
<b>A</b>	0.122	0.103	0.11	0.18	0.174	0.18	0.149	0.163	0.16	0.136	0.193	0.16	0.196	0.246	0.22				
<b>B</b>	0.165	0.148	0.16	0.137	0.141	0.14	0.158	0.167	0.16	0.135	0.247	0.19							
<b>C</b>	0.184	0.151	0.17	0.138	0.142	0.14	0.179	0.18	0.18	0.146	0.151	0.15							
<b>D</b>	0.183	0.155	0.17	0.168	0.172	0.17	0.145	0.152	0.15	0.179	0.189	0.18							
<b>E</b>	0.208	0.179	0.19	0.147	0.133	0.14	0.157	0.16	0.16	0.144	0.152	0.15							
<b>F</b>	0.147	0.13	0.14	0.122	0.125	0.12	0.122	0.128	0.13	0.111	0.117	0.11				0.163	0.205	0.18	
<b>G</b>	0.159	0.134	0.15	0.131	0.13	0.13	0.137	0.131	0.13	0.17	0.179	0.17				0.144	0.193	0.17	
<b>H</b>	0.182	0.152	0.17	0.154	0.152	0.15	0.22	0.198	0.21	0.389	0.318	<b>0.35</b>				4.274	4.325	<b>4.30</b>	
G11	G12	$\bar{X} * 2$																	
0.14	0.19	<b>0.34</b>	Umbral de absorbancia																

Experimento: **WSMV - TM20%**

Anticuerpo: **1:200**

Fecha: **2013-10-15**

Dilución de la muestra: **1:10**

No. de Placa: **1**

Conjugado: **1:200**

Operador: **A.M.M**

Substrato: **1:1 mg/ml**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blanco		8	8	16	16	24	24	32	32		
<b>B</b>	1	1	9	9	17	17	25	25				
<b>C</b>	2	2	10	10	18	18	26	26				
<b>D</b>	3	3	11	11	19	19	27	27				
<b>E</b>	4	4	12	12	20	20	28	28				
<b>F</b>	5	5	13	13	21	21	29	29				
<b>G</b>	6	6	14	14	22	22	30	30				Búfer
<b>H</b>	7	7	15	15	23	23	31	31				Control negativo
												Control positivo

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA TM15% WSMV**

Protocolo: **WSMV TM15%**

Formato placa: **96 pocillos**

Absorbancias Filtro 1: 405nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$
<b>A</b>	0.125	0.125	0.13	0.275	0.256	0.27	0.223	0.237	0.23	0.22	0.322	0.27	0.385	0.236	0.311			
<b>B</b>	0.2	0.179	0.19	0.162	0.166	0.16	0.168	0.175	0.17	0.226	0.279	0.25						
<b>C</b>	0.179	0.165	0.17	0.148	0.164	0.16	0.24	0.204	0.22	0.212	0.21	0.21						
<b>D</b>	0.156	0.15	0.15	0.139	0.137	0.14	0.165	0.167	0.17	0.216	0.229	0.22						
<b>E</b>	0.142	0.133	0.14	0.134	0.133	0.13	0.155	0.152	0.15	0.261	0.204	0.23						
<b>F</b>	0.138	0.129	0.13	0.128	0.129	0.13	0.201	0.209	0.21	0.155	0.151	0.15				0.192	0.187	0.19
<b>G</b>	0.131	0.131	0.13	0.138	0.137	0.14	0.119	0.122	0.12	0.158	0.148	0.15				0.189	0.204	0.20
<b>H</b>	0.178	0.151	0.16	0.185	0.18	0.18	0.151	0.15	0.15	0.339	0.366	0.35				4.194	4.286	<b>4.24</b>
G11	G12	$\bar{X} * 2$																
0.19	0.20	<b>0.39</b>		Umbral de absorbancia														

Experimento: **WSMV - TM15%**

Anticuerpo: **1:200**

Fecha: **2013-10-15**

Dilución de la muestra: **1:10**

No. de Placa: **1**

Conjugado: **1:200**

Operador: **A.M.M**

Substrato: **1:1 mg/ml**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blanco		8	8	16	16	24	24	32	32		
<b>B</b>	1	1	9	9	17	17	25	25				
<b>C</b>	2	2	10	10	18	18	26	26				
<b>D</b>	3	3	11	11	19	19	27	27				
<b>E</b>	4	4	12	12	20	20	28	28				
<b>F</b>	5	5	13	13	21	21	29	29				
<b>G</b>	6	6	14	14	22	22	30	30				Búfer
<b>H</b>	7	7	15	15	23	23	31	31				Control negativo
												Control positivo

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA TM10% WSMV**

Protocolo: **WSMV TM10%**

Formato placa: 96 pocillos

Absorbancias Filtro 1: 405nm

	<b>1</b>	<b>2</b>	$\bar{X}$	<b>3</b>	<b>4</b>	$\bar{X}$	<b>5</b>	<b>6</b>	$\bar{X}$	<b>7</b>	<b>8</b>	$\bar{X}$	<b>9</b>	<b>10</b>	$\bar{X}$	<b>11</b>	<b>12</b>	$\bar{X}$
<b>A</b>	0.082	0.088	0.09	0.123	0.123	0.12	0.176	0.186	0.18	0.135	0.138	0.137	0.123	0.126	0.125			
<b>B</b>	0.122	0.134	0.13	0.118	0.119	0.12	0.146	0.15	0.15	0.211	0.194	0.203						
<b>C</b>	0.103	0.113	0.11	0.129	0.132	0.13	0.213	0.196	0.20	0.126	0.127	0.127						
<b>D</b>	0.122	0.133	0.13	0.142	0.149	0.15	0.174	0.17	0.17	0.132	0.133	0.133						
<b>E</b>	0.111	0.123	0.12	0.138	0.144	0.14	0.123	0.12	0.12	0.149	0.148	0.149						
<b>F</b>	0.125	0.126	0.13	0.142	0.152	0.15	0.13	0.132	0.13	0.144	0.148	0.146				0.109	0.112	0.11
<b>G</b>	0.138	0.132	0.14	0.128	0.13	0.13	0.128	0.126	0.13	0.142	0.132	0.137				0.112	0.11	0.11
<b>H</b>	0.135	0.146	0.14	0.123	0.126	0.12	0.16	0.163	0.16	0.156	0.146	0.151				4.205	4.17	<b>4.19</b>

G11 G12  $\bar{X} * 2$

0.11 0.11 **0.22** Umbral de absorbancia

Experimento: **WSMV - TM10%**

Anticuerpo: **1:200**

Fecha: **2013-09-19**

Dilución de la muestra: **1:10**

No. de Placa: **1**

Conjugado: **1:200**

Operador: **A.M.M**

Substrato: **1:1 mg/ml**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	Blanco		8	8	16	16	24	24	32	32		
<b>B</b>	1	1	9	9	17	17	25	25				
<b>C</b>	2	2	10	10	18	18	26	26				
<b>D</b>	3	3	11	11	19	19	27	27				
<b>E</b>	4	4	12	12	20	20	28	28				
<b>F</b>	5	5	13	13	21	21	29	29				
<b>G</b>	6	6	14	14	22	22	30	30				Búfer
<b>H</b>	7	7	15	15	23	23	31	31				Control negativo
												Control positivo

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA TM8% WSMV**

Protocolo: **WSMV TM8%**

Formato placa: 96 pocillos

Absorbancias Filtro 1: 405nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$
<b>A</b>	0.092	0.091	0.09	0.125	0.114	0.12	0.176	0.176	0.18	0.187	0.181	0.18	0.178	0.184	0.18			
<b>B</b>	0.154	0.138	0.15	0.179	0.172	0.18	0.184	0.172	0.18	0.145	0.123	0.13						
<b>C</b>	0.188	0.177	0.18	0.189	0.204	0.20	0.171	0.17	0.17	0.162	0.159	0.16						
<b>D</b>	0.154	0.145	0.15	0.37	0.371	<b>0.37</b>	0.173	0.157	0.17	0.174	0.192	0.18						
<b>E</b>	0.168	0.137	0.15	0.152	0.155	0.15	0.164	0.172	0.17	0.142	0.147	0.14						
<b>F</b>	0.171	0.204	0.19	0.15	0.141	0.15	0.169	0.156	0.16	0.202	0.248	0.23				0.115	0.121	0.12
<b>G</b>	0.165	0.154	0.16	0.224	0.199	0.21	0.145	0.15	0.15	0.173	0.195	0.18				0.124	0.123	0.12
<b>H</b>	0.135	0.126	0.13	0.155	0.158	0.16	0.351	0.401	<b>0.38</b>	0.209	0.207	0.21				4.181	4.199	<b>4.19</b>

G11 G12  $\bar{X} * 2$

0.124 0.123 **0.247** Umbral de absorbancia

Experimento: **WSMV - TM8%**

Anticuerpo: **1:200**

Fecha: **2013-09-24**

Dilución de la muestra: **1:10**

No. de Placa: **1**

Conjugado: **1:200**

Operador: **A.M.M**

Substrato: **1:1 mg/ml**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blanco		8	8	16	16	24	24	32	32		
<b>B</b>	1	1	9	9	17	17	25	25				
<b>C</b>	2	2	10	10	18	18	26	26				
<b>D</b>	3	3	11	11	19	19	27	27				
<b>E</b>	4	4	12	12	20	20	28	28				
<b>F</b>	5	5	13	13	21	21	29	29				
<b>G</b>	6	6	14	14	22	22	30	30				Control negativo
<b>H</b>	7	7	15	15	23	23	31	31				Control positivo

### RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA TM 6% WSMV

Protocolo: **WSMV TM 6%**

Formato placa: 96 pocillos

Absorbancias Filtro 1: 405nm

	<b>1</b>	<b>2</b>	$\bar{X}$	<b>3</b>	<b>4</b>	$\bar{X}$	<b>5</b>	<b>6</b>	$\bar{X}$	<b>7</b>	<b>8</b>	$\bar{X}$	<b>9</b>	<b>10</b>	$\bar{X}$	<b>11</b>	<b>12</b>	$\bar{X}$
<b>A</b>	0.086	0.088	0.09	0.164	0.166	0.17	0.12	0.126	0.12	0.116	0.118	0.12	0.12	0.121	0.12			
<b>B</b>	0.123	0.123	0.12	0.119	0.117	0.12	0.165	0.179	0.17	0.113	0.113	0.11						
<b>C</b>	0.131	0.133	0.13	0.137	0.133	0.14	0.168	0.161	0.16	0.133	0.137	0.14						
<b>D</b>	0.195	0.157	0.18	0.159	0.149	0.15	0.148	0.134	0.14	0.17	0.164	0.17						
<b>E</b>	0.116	0.114	0.12	0.144	0.128	0.14	0.126	0.128	0.13	0.142	0.125	0.13						
<b>F</b>	0.123	0.134	0.13	0.115	0.112	0.11	0.112	0.114	0.11	0.122	0.118	0.12				0.106	0.11	0.11
<b>G</b>	0.117	0.118	0.12	0.142	0.137	0.14	0.119	0.122	0.12	0.133	0.137	0.14				0.105	0.119	0.11
<b>H</b>	0.113	0.115	0.11	0.117	0.118	0.12	0.131	0.139	0.14	0.145	0.14	0.14				4.216	4.19	<b>4.20</b>

G11 G12  $\bar{X} * 2$

0.11 0.12 **0.22** Umbral de absorbancia

Experimento: **WSMV - TM6%**

Anticuerpo: **1:200**

Fecha: **2013-09-26**

Dilución de la muestra: **1:10**

No. de Placa: **1**

Conjugado: **1:200**

Operador: **A.M.M**

Substrato: **1:1 mg/ml**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	Blanco		8	8	16	16	24	24	32	32		
<b>B</b>	1	1	9	9	17	17	25	25				
<b>C</b>	2	2	10	10	18	18	26	26				
<b>D</b>	3	3	11	11	19	19	27	27				
<b>E</b>	4	4	12	12	20	20	28	28				
<b>F</b>	5	5	13	13	21	21	29	29				
<b>G</b>	6	6	14	14	22	22	30	30				Búfer
<b>H</b>	7	7	15	15	23	23	31	31				Control negativo
												Control positivo

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA TM4% WSMV**

Protocolo: **WSMV TM4%**

Formato placa: 96 pocillos

Absorbancias Filtro 1: 405nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$
<b>A</b>	0.083	0.081	0.08	0.152	0.151	0.15	0.119	0.119	0.12	0.104	0.103	0.10	0.103	0.103	0.10			
<b>B</b>	0.148	0.137	0.14	0.109	0.111	0.11	0.118	0.113	0.12	0.136	0.14	0.14						
<b>C</b>	0.115	0.112	0.11	0.138	0.142	0.14	0.142	0.169	0.16	0.117	0.117	0.12						
<b>D</b>	0.129	0.122	0.13	0.115	0.113	0.11	0.111	0.116	0.11	0.125	0.125	0.13						
<b>E</b>	0.108	0.102	0.11	0.109	0.106	0.11	0.126	0.133	0.13	0.105	0.106	0.11						
<b>F</b>	0.11	0.105	0.11	0.108	0.109	0.11	0.112	0.11	0.11	0.108	0.113	0.11				0.097	0.098	0.10
<b>G</b>	0.125	0.122	0.12	0.147	0.145	0.15	0.107	0.107	0.11	0.171	0.178	0.17				0.094	0.099	0.10
<b>H</b>	0.163	0.162	0.16	0.115	0.113	0.11	0.118	0.121	0.12	0.124	0.121	0.12				4.493	4.097	<b>4.30</b>

G11 G12  $\bar{X} * 2$

0.09 0.10 **0.19** Umbral de absorbancia

Experimento: **WSMV - TM4%**

Anticuerpo: **1:200**

Fecha: **2013-09-26**

Dilución de la muestra: **1:10**

No. de Placa: **1**

Conjugado: **1:200**

Operador: **A.M.M**

Substrato: **1:1 mg/ml**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blanco		8	8	16	16	24	24	32	32		
<b>B</b>	1	1	9	9	17	17	25	25				
<b>C</b>	2	2	10	10	18	18	26	26				
<b>D</b>	3	3	11	11	19	19	27	27				
<b>E</b>	4	4	12	12	20	20	28	28				
<b>F</b>	5	5	13	13	21	21	29	29			Búfer	
<b>G</b>	6	6	14	14	22	22	30	30			Control negativo	
<b>H</b>	7	7	15	15	23	23	31	31			Control positivo	

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA - TRES NIVELES DE INFECCIÓN BSMV**

**Protocolo:** TRIGO BSMV NI 15, 10 y 5%  
**Formato placa:** 96 pocillos  
**Absorbancias:** Filtro 1:405 nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$
A	0.086	0.086	0.09	2.675	2.604	<b>2.64</b>	3.562	3.46	<b>3.51</b>	0.17	0.184	0.18	3.331	3.366	<b>3.35</b>			
B	3.169	3.03	<b>3.10</b>	3.497	3.454	<b>3.48</b>	3.606	3.544	<b>3.58</b>	2.827	2.886	<b>2.86</b>						
C	3.476	3.51	<b>3.49</b>	2.209	2.241	<b>2.23</b>	3.502	3.318	<b>3.41</b>	0.268	0.254	<b>0.26</b>						
D	3.376	3.199	<b>3.29</b>	0.657	0.622	<b>0.64</b>	3.468	3.413	<b>3.44</b>	0.164	0.168	0.17						
E	3.141	3.013	<b>3.08</b>	2.963	2.974	<b>2.97</b>	0.631	0.644	<b>0.64</b>	0.169	0.173	0.17						
F	3.527	3.279	<b>3.40</b>	3.196	3.218	<b>3.21</b>	3.419	3.371	<b>3.40</b>	0.215	0.225	<b>0.22</b>				0.096	0.1	0.10
G	2.852	2.692	<b>2.77</b>	2.825	2.757	<b>2.79</b>	2.411	2.32	<b>2.37</b>	2.584	2.677	<b>2.63</b>				0.099	0.098	0.10
H	3.287	3.187	<b>3.24</b>	0.122	0.119	0.12	0.278	0.247	<b>0.26</b>	0.127	0.125	0.13				3.364	3.469	<b>3.42</b>

G11    G12     $\bar{X} * 2$   
 0.10    0.10    **0.20**    Umbral de absorbancia

**EXPERIMENTO:** TRIGO BSMV - NI 15, 10 y 5%

**ANTICUERPO:** 1:200

**FECHA:** 2013-10-24

**DILUCIÓN DE LA MUESTRA:** 1:10

**NO. DE PLACA:** 1

**CONJUGACIÓN:** 1:200

**OPERADOR:** A.M.M.

**SUBSTRATO:** 1:1 mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANCO		08	08	06	06	04	04	MI	MI		
B	NI 15 - 01		09	09	07	07	05	05				
C	02	02	NI 15 - 10		08	08	06	06				
D	03	03	NI 10 - 01		09	09	07	07				
E	04	04	02	02	NI 10 - 10		08	08				
F	05	05	03	03	NI 5 - 01		09	09			BUFER	
G	06	06	04	04	02	02	NI 5 - 10				NEGATIVO	
H	07	07	05	05	03	03	MS	MS			POSITIVO	

MS: Muestra sana

MI: Muestra infectada

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA - MS QUE GENERAN LA MC DE 25 MS CON 15% NIBSMV**

**Protocolo:** TRIGO BSMV. MC10; MS de MC25-15% NI (1-23)

**Formato placa:** 1 - 96 pocillos

**Absorbancias:** Filtro 1:405 nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$	
<b>A</b>	0.091	0.089	0.09	1.276	1.128	<b>1.20</b>	0.262	0.249	<b>0.26</b>	1.205	1.388	<b>1.30</b>	1.297	1.592	<b>1.44</b>	1.221	1.169	<b>1.20</b>	
<b>B</b>	0.879	0.839	<b>0.86</b>	0.15	0.14	0.15	0.154	0.152	0.15	0.151	0.157	0.15	1.01	0.973	<b>0.99</b>	0.972	1.009	<b>0.99</b>	
<b>C</b>	0.513	0.412	<b>0.46</b>	1.627	1.423	<b>1.53</b>	0.128	0.13	0.13	0.666	0.734	<b>0.70</b>	0.991	1.156	<b>1.07</b>	0.82	0.863	<b>0.84</b>	
<b>D</b>	0.244	0.216	<b>0.23</b>	1.283	1.198	<b>1.24</b>	0.126	0.126	0.13	1.318	1.489	<b>1.40</b>	1.387	1.515	<b>1.45</b>	0.14	0.153	0.15	
<b>E</b>	0.737	0.804	<b>0.77</b>	1.596	1.469	<b>1.53</b>	1.482	1.092	<b>1.29</b>	1.17	1.223	<b>1.20</b>	1.07	1.028	<b>1.05</b>	1.095	0.823	<b>0.96</b>	
<b>F</b>	0.965	0.886	<b>0.93</b>	1.407	1.232	<b>1.32</b>	0.329	0.3	<b>0.31</b>	1.409	1.451	<b>1.43</b>	0.587	0.623	<b>0.61</b>	0.095	0.093	0.09	
<b>G</b>	0.291	0.29	<b>0.29</b>	1.468	1.39	<b>1.43</b>	1.153	1.138	<b>1.15</b>	1.426	1.37	<b>1.40</b>	0.13	0.135	<b>0.13</b>	0.098	0.096	0.10	
<b>H</b>	0.883	0.932	<b>0.91</b>	1.229	1.201	<b>1.22</b>	1.271	1.246	<b>1.26</b>	1.432	1.436	<b>1.43</b>	0.128	0.13	0.13	1.5	0.892	<b>1.20</b>	
<b>G11</b>	<b>G12</b>	$\bar{X} * 2$																	
0.098	0.096	<b>0.19</b>	Umbral de absorbancia																

**EXPERIMENTO:** TRIGO BSMV. MC10; MS de MC25-15% NI (1-23)

**ANTICUERPO:** 1:200

**FECHA:** 2013-12-18

**DILUCIÓN DE LA MUESTRA:** 1:10

**NO. DE PLACA:** 1

**CONJUGACIÓN:** 1:200

**OPERADOR:** A.M.M.

**SUBSTRATO:** 1:1 mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	BLANCO		2	2	MC10-5-10		3	3	11	11	19	19
<b>B</b>	MC10-15-5		3	3	2	2	4	4	12	12	20	20
<b>C</b>	2	2	MC-10-10-5		3	3	5	5	13	13	21	21
<b>D</b>	3	3	2	2	MC10-5-5		6	6	14	14	22	22
<b>E</b>	MC10-10-15		3	3	2	2	7	7	15	15	23	23
<b>F</b>	2	2	MC-10-5-15		3	3	8	8	16	16	<b>BUFER</b>	
<b>G</b>	3	3	2	2	<b>MS 1 d MC25-15</b>		9	9	17	17	<b>NEGATIVO</b>	
<b>H</b>	MC-10-10-10		3	3	2	2	10	10	18	18	<b>POSITIVO</b>	

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA - MS QUE GENERAN LA MC DE 25 MS CON 15, 10 Y 5 % NIBSMV**

**Protocolo:** TRIGO BSMV. MS de MC25 CON 15% NI (24-25), 10% NI (1-25) y 5% NI (1-17).

**Formato placa:** 2 - 96 pocillos

**Absorbancias:** Filtro 1:405 nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$
<b>A</b>	0.092	0.097	0.09	1.018	1.031	<b>1.02</b>	0.984	0.945	<b>0.96</b>	0.871	0.94	<b>0.91</b>	0.117	0.121	0.12	0.897	0.931	<b>0.91</b>
<b>B</b>	0.978	0.859	<b>0.92</b>	0.763	0.829	<b>0.80</b>	0.187	0.182	0.18	0.192	0.202	0.20	0.108	0.107	0.11	0.703	0.832	<b>0.77</b>
<b>C</b>	0.897	0.915	<b>0.91</b>	0.141	0.135	0.14	0.119	0.119	0.12	0.851	0.884	<b>0.87</b>	0.1	0.099	0.10	0.125	0.141	0.13
<b>D</b>	1.008	0.987	<b>1.00</b>	0.313	0.342	<b>0.33</b>	0.906	0.909	<b>0.91</b>	0.946	0.937	<b>0.94</b>	0.898	0.816	<b>0.86</b>	0.115	0.123	0.12
<b>E</b>	0.799	0.785	<b>0.79</b>	0.903	0.975	<b>0.94</b>	0.802	0.858	<b>0.83</b>	0.175	0.187	0.18	0.115	0.112	0.11	0.806	0.828	<b>0.82</b>
<b>F</b>	0.988	0.988	<b>0.99</b>	0.994	1.009	<b>1.00</b>	0.767	0.782	<b>0.77</b>	0.123	0.122	0.12	0.795	0.722	<b>0.76</b>	0.092	0.099	0.10
<b>G</b>	1.001	0.891	<b>0.95</b>	0.201	0.204	0.20	0.815	0.779	<b>0.80</b>	0.623	0.674	<b>0.65</b>	0.838	0.839	<b>0.84</b>	0.096	0.116	0.11
<b>H</b>	0.204	0.188	0.20	0.706	0.724	<b>0.72</b>	1.025	0.917	<b>0.97</b>	0.716	0.742	<b>0.73</b>	0.848	0.788	<b>0.82</b>	0.906	1.004	<b>0.96</b>

G11 G12  $\bar{X} * 2$

0.096 0.116 **0.21** Umbral de absorbancia

**EXPERIMENTO:** TRIGO BSMV. MS de MC25 CON 15% NI (24-25), 10% NI (1-25) y 5% NI (1-17).

**FECHA:** 2013-12-18

**NO. DE PLACA:** 2

**OPERADOR:** A.M.M.

**ANTICUERPO:** 1:200

**DILUCIÓN DE LA MUESTRA:** 1:10

**CONJUGACIÓN:** 1:200

**SUBSTRATO:** 1:1 mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>BLANCO</b>		6	6	14	14	22	22	5	5	13	13
<b>B</b>	<b>MS 24 d MC25-15</b>		7	7	15	15	23	23	6	6	14	14
<b>C</b>	25	25	8	8	16	16	24	24	7	7	15	15
<b>D</b>	<b>MS 1 d MC25-10</b>		9	9	17	17	25	25	8	8	16	16
<b>E</b>	2	2	10	10	18	18	<b>MS 1 d MC25-5</b>		9	9	17	17
<b>F</b>	3	3	11	11	19	19	2	2	10	10	<b>BUFER</b>	
<b>G</b>	4	4	12	12	20	20	3	3	11	11	<b>NEGATIVO</b>	
<b>H</b>	5	5	13	13	21	21	4	4	12	12	<b>POSITIVO</b>	

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA - MS QUE GENERAN LA MC DE 25 MS 5% NI Y MS DEMC DE 20 CON 15 Y 10% NIBSMV**

**Protocolo:** TRIGO BSMV. MS de MC25-5% NI (18-25); MS de MC20 CON 15 (1-20) y 10% NI (1-16)

**Formato placa:** 3 - 96 pocillos

**Absorbancias:** Filtro 1:405 nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$
<b>A</b>	0.092	0.088	0.09	0.179	0.181	0.18	0.918	0.837	<b>0.88</b>	0.189	0.207	0.20	0.132	0.139	0.14	0.243	0.256	<b>0.25</b>
<b>B</b>	0.923	1.133	<b>1.03</b>	1.198	1.106	<b>1.15</b>	1.007	1.051	<b>1.03</b>	0.957	0.982	<b>0.97</b>	0.123	0.124	0.12	0.762	0.763	<b>0.76</b>
<b>C</b>	0.142	0.157	0.15	0.319	0.308	<b>0.31</b>	0.897	0.847	<b>0.87</b>	0.794	0.808	<b>0.80</b>	0.765	0.787	<b>0.78</b>	0.733	0.782	<b>0.76</b>
<b>D</b>	0.882	0.873	<b>0.88</b>	0.866	0.856	<b>0.86</b>	1.06	1.042	<b>1.05</b>	0.94	0.886	<b>0.91</b>	0.13	0.128	0.13	0.719	0.782	<b>0.75</b>
<b>E</b>	0.917	0.854	<b>0.89</b>	1.081	1.134	<b>1.11</b>	1.008	1.005	<b>1.01</b>	0.817	0.833	<b>0.83</b>	0.467	0.484	<b>0.48</b>	0.131	0.131	0.13
<b>F</b>	0.141	0.126	0.13	0.717	0.781	<b>0.75</b>	0.995	0.964	<b>0.98</b>	0.239	0.243	<b>0.24</b>	0.734	0.77	<b>0.75</b>	0.094	0.097	0.10
<b>G</b>	0.951	0.861	<b>0.91</b>	1.041	0.936	<b>0.99</b>	0.949	0.944	<b>0.95</b>	0.15	0.148	0.15	0.682	0.839	<b>0.76</b>	0.103	0.099	0.10
<b>H</b>	1.173	1.137	<b>1.16</b>	1.126	0.929	<b>1.03</b>	1.055	1.029	<b>1.04</b>	0.871	0.87	<b>0.87</b>	0.925	0.987	<b>0.96</b>	0.879	1.015	<b>0.95</b>
<b>G11</b>	<b>G12</b>	$\bar{X} * 2$																
	0.103	0.099	<b>0.20</b>															

**EXPERIMENTO:** TRIGO BSMV. MS de MC25-5% NI (18-25); MS de MC20 CON 15 (1-20) y 10% NI (1-16)

**FECHA:** 2013-12-18

**NO. DE PLACA:** 3

**OPERADOR:** A.M.M.

**ANTICUERPO:** 1:200

**DILUCIÓN DE LA MUESTRA:** 1:10

**CONJUGACIÓN:** 1:200

**SUBSTRATO:** 1:1 mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>BLANCO</b>		25	25	8	8	16	16	4	4	12	12
<b>B</b>	<b>MS 18 d MC25-5</b>	<b>MS 1 d MC20-15</b>			9	9	17	17	5	5	13	13
<b>C</b>	19	19	2	2	10	10	18	18	6	6	14	14
<b>D</b>	20	20	3	3	11	11	19	19	7	7	15	15
<b>E</b>	21	21	4	4	12	12	20	20	8	8	16	16
<b>F</b>	22	22	5	5	13	13	<b>MS 1 d MC20-10</b>		9	9	<b>BUFER</b>	
<b>G</b>	23	23	6	6	14	14	2	2	10	10	<b>NEGATIVO</b>	
<b>H</b>	24	24	7	7	15	15	3	3	11	11	<b>POSITIVO</b>	

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA - MS QUE GENERAN LA MC DE 20 MS CON 10 y 5% NI Y MS DE MC DE 15 CON 15 Y 10% NIBSMV**

**Protocolo:** TRIGO BSMV. MS de MC20 con 10 (17-20) y 5 % NI; MS de MC15 con 15 y 10% de NI (1-5).

**Formato placa:** 4 - 96 pocillos

**Absorbancias:** Filtro 1:405 nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$	
<b>A</b>	0.096	0.092	0.09	1.478	1.279	<b>1.38</b>	1.356	1.228	<b>1.29</b>	0.12	0.112	0.12	1.216	1.28	<b>1.25</b>	1.092	0.826	<b>0.96</b>	
<b>B</b>	0.141	0.138	0.14	0.136	0.142	0.14	1.059	1.061	<b>1.06</b>	1.029	0.97	<b>1.00</b>	0.261	0.273	<b>0.27</b>	0.695	0.768	<b>0.73</b>	
<b>C</b>	1.039	1.206	<b>1.12</b>	1.246	1.175	<b>1.21</b>	0.149	0.15	0.15	0.977	0.915	<b>0.95</b>	0.908	0.943	<b>0.93</b>	0.806	0.976	<b>0.89</b>	
<b>D</b>	1.065	1.087	<b>1.08</b>	0.132	0.135	0.13	0.915	0.851	<b>0.88</b>	1.002	1.043	<b>1.02</b>	0.936	0.98	<b>0.96</b>	0.761	0.915	<b>0.84</b>	
<b>E</b>	1.015	0.957	<b>0.99</b>	1.163	1.291	<b>1.23</b>	0.883	0.886	<b>0.88</b>	1.072	0.956	<b>1.01</b>	0.972	1.001	<b>0.99</b>	0.958	0.854	<b>0.91</b>	
<b>F</b>	0.17	0.161	0.17	1.293	1.339	<b>1.32</b>	0.134	0.133	0.13	1.092	1.061	<b>1.08</b>	0.959	0.849	<b>0.90</b>	0.097	0.095	0.10	
<b>G</b>	1.017	1.213	<b>1.12</b>	0.987	0.958	<b>0.97</b>	0.125	0.123	0.12	1.013	0.971	<b>0.99</b>	1.025	1.049	<b>1.04</b>	0.102	0.098	0.10	
<b>H</b>	0.661	0.664	<b>0.66</b>	1.081	1.06	<b>1.07</b>	0.127	0.126	0.13	1.076	1.1	<b>1.09</b>	0.198	0.201	0.20	0.831	0.85	<b>0.84</b>	
	G11	G12	$\bar{X} * 2$																
	0.102	0.098	<b>0.2</b>	Umbral de absorbancia															

**EXPERIMENTO:** TRIGO BSMV. MS de MC20 con 10 (17-20) y 5 % NI; MS de MC15 con 15 y 10% de NI (1-5).

**FECHA:** 2013-12-18

**NO. DE PLACA:** 4

**OPERADOR:** A.M.M.

**ANTICUERPO:** 1:200

**DILUCIÓN DE LA MUESTRA:** 1:10

**CONJUGACIÓN:** 1:200

**SUBSTRATO:** 1:1 mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>BLANCO</b>		4	4	12	12	20	20	8	8	<b>MS 1 d MC15-10</b>	
<b>B</b>	<b>MS17 d MC20-10</b>		5	5	13	13	<b>MS 1 d MC15-15</b>		9	9	2	2
<b>C</b>	18	18	6	6	14	14	2	2	10	10	3	3
<b>D</b>	19	19	7	7	15	15	3	3	11	11	4	4
<b>E</b>	20	20	8	8	16	16	4	4	12	12	5	5
<b>F</b>	<b>MS 1 d MC20-5</b>		9	9	17	17	5	5	13	13	<b>BUFER</b>	
<b>G</b>	2	2	10	10	18	18	6	6	14	14	<b>NEGATIVO</b>	
<b>H</b>	3	3	11	11	19	19	7	7	15	15	<b>POSITIVO</b>	

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA - MS QUE GENERAN LA MC DE 15 MS CON 10 Y 5% NI Y MS DE MC DE 10 CON 15 Y 10% NIBSMV**

**Protocolo:** TRIGO BSMV. MS de MC15 con 10 (6-15) y 5% NI; MS de MC10 con 15 y 10% NI (1-9).

**Formato placa:** 5 - 96 pocillos

**Absorbancias:** Filtro 1:405 nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$	
A	0.091	0.092	0.09	1.61	1.513	<b>1.56</b>	0.515	0.505	<b>0.51</b>	0.15	0.166	0.16	0.93	1.272	<b>1.10</b>	0.898	0.937	<b>0.92</b>	
B	0.998	0.977	<b>0.99</b>	1.392	1.234	<b>1.31</b>	0.952	0.926	<b>0.94</b>	1.072	1.178	<b>1.13</b>	1.002	1.047	<b>1.02</b>	0.686	0.682	<b>0.68</b>	
C	0.969	1.055	<b>1.01</b>	0.45	0.408	<b>0.43</b>	0.227	0.206	0.22	0.935	0.901	<b>0.92</b>	0.644	0.815	<b>0.73</b>	0.192	0.192	0.19	
D	1.161	1.14	<b>1.15</b>	0.227	0.244	<b>0.24</b>	0.94	0.992	<b>0.97</b>	0.957	0.941	<b>0.95</b>	0.648	0.846	<b>0.75</b>	0.16	0.158	0.16	
E	1.176	1.211	<b>1.19</b>	0.181	0.183	0.18	0.238	0.286	<b>0.26</b>	1.035	0.916	<b>0.98</b>	0.968	0.794	<b>0.88</b>	0.357	0.34	<b>0.35</b>	
F	1.183	1.345	<b>1.26</b>	1.029	0.908	<b>0.97</b>	0.169	0.166	0.17	1.059	0.736	<b>0.90</b>	0.979	0.987	<b>0.98</b>	0.094	0.096	0.10	
G	1.186	1.374	<b>1.28</b>	0.543	0.526	<b>0.53</b>	1.175	1.096	<b>1.14</b>	0.998	0.91	<b>0.95</b>	0.265	0.262	<b>0.26</b>	0.105	0.112	0.11	
H	1.304	1.206	<b>1.26</b>	1.237	1.207	<b>1.22</b>	0.506	0.25	<b>0.38</b>	0.379	0.359	<b>0.37</b>	0.716	0.699	<b>0.71</b>	0.766	0.873	<b>0.82</b>	
	G11	G12	$\bar{X} * 2$																
	0.105	0.112	<b>0.22</b>	Umbral de absorbancia															

**EXPERIMENTO:** TRIGO BSMV. MS de MC15 con 10 (6-15) y 5% NI; MS de MC10 con 15 y 10% NI (1-9).

**FECHA:** 2013-12-18

**NO. DE PLACA:** 5

**OPERADOR:** A.M.M.

**ANTICUERPO:** 1:200

**DILUCIÓN DE LA MUESTRA:** 1:10

**CONJUGACIÓN:** 1:200

**SUBSTRATO:** 1:1 mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>BLANCO</b>		13	13	6	6	14	14	7	7	5	5
B	<b>MS 6 d MC15-10</b>		14	14	7	7	15	15	8	8	6	6
C	7	7	15	15	8	8	<b>MS 1 d MC10-15</b>		9	9	7	7
D	8	8	<b>MS 1 d MC15-5</b>		9	9	2	2	10	10	8	8
E	9	9	2	2	10	10	3	3	<b>MS 1 d MC10-10</b>		9	9
F	10	10	3	3	11	11	4	4	2	2	<b>BUFER</b>	
G	11	11	4	4	12	12	5	5	3	3	<b>NEGATIVO</b>	
H	12	12	5	5	13	13	6	6	4	4	<b>POSITIVO</b>	

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA - MS QUE GENERAN LA MC DE 10 MS CON 10 y 5 % DENI**

**Protocolo:** TRIGO BSMV. MS de MC10 con 10 (10) y 5 % de NI.

**Formato placa:** 6 - 96 pocillos

**Absorbancias:** Filtro 1:405 nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$
A	0.087	0.088	0.09	0.371	0.408	<b>0.39</b>												
B	1.046	1.299	<b>1.17</b>	0.258	0.278	0.27												
C	0.341	0.365	<b>0.35</b>	0.192	0.206	0.20												
D	0.193	0.191	0.19	1.1	1.031	<b>1.07</b>												
E	0.977	1.164	<b>1.07</b>															
F	1.227	1.286	<b>1.26</b>													0.094	0.101	0.10
G	1.332	1.216	<b>1.27</b>													0.211	0.132	0.17
H	1.162	1.039	<b>1.10</b>													0.787	0.923	<b>0.86</b>
	G11	G12	$\bar{X} * 2$															
	0.211	0.132	<b>0.34</b>															

**EXPERIMENTO:** TRIGO BSMV. MS de MC10 con 10 (10) y 5 % de NI.

**FECHA:** 2013-12-18

**NO. DE PLACA:** 6

**OPERADOR:** A.M.M.

**ANTICUERPO:** 1:200

**DILUCIÓN DE LA MUESTRA:** 1:10

**CONJUGACIÓN:** 1:200

**SUBSTRATO:** 1:1 mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>BLANCO</b>		7	7								
B	<b>MS10 dMC10-10</b>		8	8								
C	<b>MS 1 dMC10-5</b>		9	9								
D	2	2	10	10								
E	3	3										
F	4	4										
G	5	5										
H	6	6										

**BUFER  
NEGATIVO  
POSITIVO**

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA - MC DE 25 Y 20 MS CON 15, 10 Y 5 % DE NIVEL DE INFECCIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA**

**Protocolo:** TRIGO BSMV. MC de 25 y 20 MS con, 15, 10 y 5 % de NI y TM.

**Formato placa:** I. 96 pocillos

**Absorbancias:** Filtro 1:405 nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$
<b>A</b>	0.091	0.091	0.09	3.191	3.049	<b>3.12</b>	0.335	0.325	<b>0.33</b>	2.195	2.472	<b>2.33</b>	2.829	3.158	<b>2.99</b>	1.032	0.98	<b>1.01</b>
<b>B</b>	2.62	3.313	<b>2.97</b>	3.894	3.85	<b>3.87</b>	3.464	3.326	<b>3.40</b>	2.657	2.87	<b>2.76</b>	3.379	3.336	<b>3.36</b>	0.417	0.418	<b>0.42</b>
<b>C</b>	3.27	3.153	<b>3.21</b>	0.947	0.984	<b>0.97</b>	2.897	2.787	<b>2.84</b>	2.863	2.528	<b>2.70</b>	3.092	3.154	<b>3.12</b>	0.274	0.332	<b>0.30</b>
<b>D</b>	3.428	3.621	<b>3.52</b>	0.386	0.386	<b>0.39</b>	0.455	0.444	<b>0.45</b>	2.919	2.938	<b>2.93</b>	0.561	0.584	<b>0.57</b>	2.387	2.507	<b>2.45</b>
<b>E</b>	3.003	3.681	<b>3.34</b>	2.799	2.765	<b>2.78</b>	3.229	3.307	<b>3.27</b>	2.713	2.665	<b>2.69</b>	3.239	3.341	<b>3.29</b>	2.348	2.541	<b>2.44</b>
<b>F</b>	3.064	3.077	<b>3.07</b>	0.284	0.279	<b>0.28</b>	3.459	3.426	<b>3.44</b>	3.047	2.968	<b>3.01</b>	3.033	2.993	<b>3.01</b>	0.117	0.123	0.12
<b>G</b>	1.754	2.299	<b>2.03</b>	3.522	3.415	<b>3.47</b>	2.911	2.948	<b>2.93</b>	3.22	3.112	<b>3.17</b>	3.337	3.534	<b>3.44</b>	0.118	0.115	0.12
<b>H</b>	2.768	1.724	<b>2.25</b>	0.881	0.855	<b>0.87</b>	2.888	2.906	<b>2.90</b>	3.694	3.744	<b>3.72</b>	3.314	3.261	<b>3.29</b>	3.069	2.367	<b>2.72</b>

G11 G12  $\bar{X} * 2$

0.118 0.115 **0.23** Umbral de absorbancia

**EXPERIMENTO:** TRIGO BSMV. MC de 25 y 20 MS con, 15, 10 y 5 % de NI y TM.

**FECHA:** 2013-12-06

**NO. DE PLACA:** 1

**OPERADOR:** A.M.M.

**ANTICUERPO:** 1:200

**DILUCIÓN DE LA MUESTRA:** 1:10

**CONJUGACIÓN:** 1:200

**SUBSTRATO:** 1:1 mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	BLANCO		2	2	MC25-10-5		3	3	2	2	MC20-10-10	
<b>B</b>	MC25-15-15		3	3	2	2	MC25-5-5		3	3	2	2
<b>C</b>	2	2	MC25-10-15		3	3	2	2	MC20-15-5		3	3
<b>D</b>	3	3	2	2	MC25-5-15		3	3	2	2	MC20-10-5	
<b>E</b>	MC25-15-10		3	3	2	2	MC20-15-15		3	3	2	2
<b>F</b>	2	2	MC25-10-10		3	3	2	2	MC20-10-15		BUFER	
<b>G</b>	3	3	2	2	MC25-5-10		3	3	2	2	NEGATIVO	
<b>H</b>	MC25-15-5		3	3	2	2	MC20-15-10		3	3	POSITIVO	

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA - MC DE 20, 15 y 10 MS CON 15, 10 Y 5 % DE NIVEL DE INFECCIÓN Y TMAÑO DE MUESTRA**

**Protocolo:** TRIGO BSMV. MC de 20, 15 y 10 MS con 15, 10 y 5% de NI y TM.

**Formato placa:** II. 96 pocillos

**Absorbancias:** Filtro 1:405 nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$
<b>A</b>	0.1	0.092	0.10	0.97	1.775	<b>1.37</b>	2.354	1.403	<b>1.88</b>	1.61	1.816	<b>1.71</b>	0.255	0.302	<b>0.28</b>	0.189	0.154	0.17
<b>B</b>	1.735	2.596	<b>2.17</b>	3.235	3.18	<b>3.21</b>	2.343	1.757	<b>2.05</b>	1.652	1.807	<b>1.73</b>	1.344	1.198	<b>1.27</b>	1.439	0.826	<b>1.13</b>
<b>C</b>	1.524	2.211	<b>1.87</b>	0.664	0.678	<b>0.67</b>	2.088	1.649	<b>1.87</b>	1.465	1.474	<b>1.47</b>	1.224	1.397	<b>1.31</b>	0.34	0.247	<b>0.29</b>
<b>D</b>	1.318	2.837	<b>2.08</b>	3.051	2.715	<b>2.88</b>	2.773	2.914	<b>2.84</b>	2.618	2.384	<b>2.50</b>	0.25	0.261	<b>0.26</b>	1.453	1.273	<b>1.36</b>
<b>E</b>	0.349	0.672	<b>0.51</b>	0.513	0.517	<b>0.52</b>	2.71	2.948	<b>2.83</b>	2.574	2.274	<b>2.42</b>	0.513	0.47	<b>0.49</b>	0.178	0.143	0.16
<b>F</b>	0.202	0.28	<b>0.24</b>	2.182	2.047	<b>2.11</b>	3.022	3.174	<b>3.10</b>	1.342	1.079	<b>1.21</b>	1.842	1.726	<b>1.78</b>	0.11	0.097	0.10
<b>G</b>	1.538	2.232	<b>1.89</b>	2.833	2.692	<b>2.76</b>	1.82	1.978	<b>1.90</b>	0.956	0.733	<b>0.84</b>	0.963	1.04	<b>1.00</b>	0.103	0.09	0.10
<b>H</b>	0.606	0.629	<b>0.62</b>	1.396	2.062	<b>1.73</b>	1.654	1.643	<b>1.65</b>	1.382	0.9	<b>1.14</b>	0.739	1.189	<b>0.96</b>	1.026	0.588	<b>0.81</b>

G11 G12  $\bar{X} * 2$   
 0.103 0.09 **0.19** Umbra de absorbancia

**EXPERIMENTO:** TRIGO BSMV. MC de 20, 15 y 10 MS con 15, 10 y 5% de NI y TM.

**FECHA:** 2013-12-06

**NO. DE PLACA:** 2

**OPERADOR:** A.M.M.

**ANTICUERPO:** 1:200

**DILUCIÓN DE LA MUESTRA:** 1:10

**CONJUGACIÓN:** 1:200

**SUBSTRATO:** 1:1 mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<b>BLANCO</b>		MC20-5-5		3	3	2	2	MC15-5-10		3	3
<b>B</b>	MC20-10-5		2	2	MC15-15-5		3	3	2	2	MC10-15-10	
<b>C</b>	MC20-5-15		3	3	2	2	MC15-10-5		3	3	3	3
<b>D</b>	2	2	MC15-15-15		3	3	2	2	MC15-5-5		2	2
<b>E</b>	3	3	2	2	MC15-10-15		3	3	2	2	Semilla Sana	
<b>F</b>	MC20-5-10		3	3	2	2	MC15-5-15		3	3	BUFER	
<b>G</b>	2	2	MC15-15-10		3	3	2	2	MC10-15-15		NEGATIVO	
<b>H</b>	3	3	2	2	MC15-10-10		3	3	2	2	<b>POSITIVO</b>	

**RESULTADOS DE PRUEBA DE ELISA - MC DE 10 MS CON 15, 10 Y 5% DE NIVEL DE INFECCIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA**

**Protocolo:** TRIGO BSMV. MC de 10 MS con 15, 10 y 5% de NI y TM.

**Formato placa:** 1 - 96 pocillos

**Absorbancias:** Filtro 1:405 nm

	1	2	$\bar{X}$	3	4	$\bar{X}$	5	6	$\bar{X}$	7	8	$\bar{X}$	9	10	$\bar{X}$	11	12	$\bar{X}$	
<b>A</b>	0.091	0.089	0.09	1.276	1.128	<b>1.20</b>	0.262	0.249	<b>0.26</b>										
<b>B</b>	0.879	0.839	<b>0.86</b>	0.15	0.14	0.15	0.154	0.152	0.15										
<b>C</b>	0.513	0.412	<b>0.46</b>	1.627	1.423	<b>1.53</b>	0.128	0.13	0.13										
<b>D</b>	0.244	0.216	<b>0.23</b>	1.283	1.198	<b>1.24</b>	0.126	0.126	0.13										
<b>E</b>	0.737	0.804	<b>0.77</b>	1.596	1.469	<b>1.53</b>	1.482	1.092	<b>1.29</b>										
<b>F</b>	0.965	0.886	<b>0.93</b>	1.407	1.232	<b>1.32</b>	0.329	0.3	<b>0.31</b>							0.095	0.093	0.09	
<b>G</b>	0.291	0.29	<b>0.29</b>	1.468	1.39	<b>1.43</b>										0.098	0.096	0.10	
<b>H</b>	0.883	0.932	<b>0.91</b>	1.229	1.201	<b>1.22</b>										1.5	0.892	<b>1.20</b>	
<b>G11</b>	<b>G12</b>	$\bar{X} * 2$																	
0.098	0.096	<b>0.19</b>	Umbral de absorbancia																

**EXPERIMENTO:** TRIGO BSMV. MC de 10 MS con 15, 10 y 5% de NI y TM.

**FECHA:** 2013-12-18

**NO. DE PLACA:** 1

**OPERADOR:** A.M.M.

**ANTICUERPO:** 1:200

**DILUCIÓN DE LA MUESTRA:** 1:10

**CONJUGACIÓN:** 1:200

**SUBSTRATO:** 1:1 mg/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	BLANCO		2	2	MC10-5-10							
<b>B</b>	MC10-15-5		3	3	2	2						
<b>C</b>	2	2	MC-10-10-5		3	3						
<b>D</b>	3	3	2	2	MC10-5-5							
<b>E</b>	MC10-10-15		3	3	2	2						
<b>F</b>	2	2	MC-10-5-15		3	3						
<b>G</b>	3	3	2	2								
<b>H</b>	MC-10-10-10		3	3								

**BUFER  
NEGATIVO  
POSITIVO**