

Capacidad predictiva de DAS-ELISA al virus mosaico estriado de la cebada en trigo*

Predictive capability of DAS-ELISA to barley stripe mosaic virus in wheat

Arturo Martínez-Mirafuentes¹, Noemí Valencia-Torres², Mónica Mezzalama², Mateo Vargas-Hernández² y Ana María Hernández-Anguiano^{1§}

¹Colegio de Postgraduados-Fitopatología Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco. C. P. 56230. Estado de México. Tel: 01 595 95 20200. Ext. 1606. (armami1276@hotmail.com; n.valencia@cgiar.org; m.mezzalama@cgiar.org; vargas_mateo@hotmail.com). ²Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), Carretera México-Veracruz, km 45, El Batán, Texcoco. C. P. 56237. Estado de México. Tel: 01 595 95 21900. Ext. 1242. [§]Autora para correspondencia: ahernandez@colpos.mx.

Resumen

La detección de patógenos asociados a semilla requiere contar con muestras representativas y homogéneas para obtener resultados confiables. Esta investigación tuvo como objetivos evaluar si: 1) el nivel de infección (5, 10 y 15 %); 2) el incremento del número de muestra simples (10, 15, 20 y 25), utilizadas para formar muestras compuestas; y 3) el incremento y la reducción del tamaño de muestra usual de 10% (establecido en el CIMMYT para el diagnóstico de plagas y enfermedades) a 15 y 5%, afectan la capacidad predictiva de la prueba DAS-ELISA al virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV, por sus siglas en inglés). A partir de lotes de semilla de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.), uno naturalmente infectado y otro sano, se formaron 210 muestras simples (MS), de 20 g cada una, divididas en grupos iguales de 70 muestras MS con 5, 10 y 15% de nivel de infección (NI) para formar tamaños de muestra (TM) de 15, 10 y 5%, y muestras compuestas (MC) con 10, 15, 20 y 25 muestras MS por NI y TM. Los resultados indicaron que al reducir el nivel NI en muestras MS de 15% a 10 y 5% decreció significativamente ($\alpha=0.05$) en 21 y 31.5%, respectivamente, la sensibilidad de la prueba al virus BSMV. Similarmente, la reducción del número de muestras MS para

Abstract

Detection of pathogens associated with seed requires to count with representative and homogeneous samples to obtain reliable results. This research objective was to evaluate whether: 1) the level of infection (5, 10 and 15%); 2) the increase in the number of single sample (10, 15, 20 and 25) used to form composite samples; and 3) increasing and reducing the usual sample size from 10% (established at CIMMYT for diagnosis of pests and diseases) to 15 and 5%, affect the predictive capability of DAS-ELISA test to barley stripe mosaic virus (BSMV). From seed lots of bread wheat (*Triticum aestivum* L.), one naturally infected and another healthy, 210 single samples (MS), 20 g each, divided into equal groups of 70 MS samples with 5, 10 and 15% level of infection (NI) to form sample sizes (TM) of 15, 10 and 5%, and composite samples (MC) with 10, 15, 20 and 25 MS samples by NI and TM were formed. The results indicated that reducing the level of NI in MS samples from 15% to 10 and 5% decreased significantly ($\alpha=0.05$) in 21 and 31.5% respectively, the sensitivity of the test to BSMV virus. Similarly, reducing the number of MS samples to form MC samples significantly affected ($\alpha=0.05$) the sensitivity of the test to the virus and increased

* Recibido: marzo de 2016
Aceptado: junio de 2016

formar muestras MC afectó significativamente ($\alpha=0.05$) la sensibilidad de la prueba al virus e incrementó la probabilidad de registrar falsos negativos. Aunque el incremento y la reducción del TM de 10% a 15 y 5% afectó significativamente ($\alpha=0.05$) la sensibilidad de la prueba al virus no se encontró una relación lineal entre el TM de la muestra MC con el valor de absorbancia. Este estudio evidencia la importancia del nivel de infección del virus BSMV en la semilla, del TM y del número de MS en muestras MC para la obtención de resultados confiables por la prueba DAS-ELISA.

Palabras clave: BSMV, muestreo, semilla.

Introducción

El virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV) por sus siglas en inglés, es un virus que ataca principalmente cebada, trigo y avena en la mayoría de las áreas productoras de norte y sur América, Asia, África, Europa y Australia (Mathre, 1997; Bockus, *et al.*, 2010). Las pérdidas en producción y rendimiento total de grano, ocasionadas por la enfermedad, pueden ser considerables, dependiendo del tipo de cultivar, nivel de infección, virulencia del virus y medio ambiente (Mckinney y Greeley, 1965; Carroll, 1986). 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 enfermas con el virus BSMV producen significativamente menos espigas y semillas que las sanas, con decremento en el peso y rendimiento total de grano (hasta 35%).

El virus BSMV se transmite por semilla, polen, óvulo y savia pero no por insectos vectores como áfidos (Carroll, 1972; Carroll, 1974; Carroll y Mayhew, 1976). En cebada la transmisión es por semilla vía óvulo pero en trigo es por polen y las infecciones naturales, en este cultivo, resultan de la transferencia de savia por el contacto entre plantas. En hospederos distintos la transmisión por semilla es relativamente ineficiente.

Debido a que el virus puede permanecer viable por varios años en la semilla esta se constituye como la fuente de inoculo primario y la principal vía de transmisión del virus (Carroll, 1986). Se menciona que en infecciones tempranas algunas razas del virus pueden tener 100% de transmisión por semilla, pero lo más común es de 50 a 60% de transmisión. La transmisión por semilla se puede determinar directamente

the likelihood of false negative record. Although the increase and reduction of TM from 10% to 15 and 5% significantly affected ($\alpha=0.05$) the sensitivity of the test to the virus, not finding a linear relationship between TM from the MC sample with the absorbance value. This study demonstrates the importance of the level of infection from the BSMV virus in the seed, of TM and MS number in MS in MC samples to obtain reliable results by DAS-ELISA.

Keywords: BSMV, sampling, seed.

Introduction

The Barley stripe mosaic virus (BSMV), is a virus that mainly attacks barley, wheat and oat in most producing areas of North and South America, Asia, Africa, Europe and Australia (Mathre 1997; Bockus *et al.*, 2010). Production losses and total yield of grain, caused by the disease, can be considerable, depending on the cultivar, level of infection, virulence of the virus and environment (Mckinney and Greeley, 1965; Carroll, 1986). Production losses are mainly due to decreased photosynthesis (Brakke *et al.*, 1988) and induction of ovule and pollen sterility. Diseased plants with BSMV produce significantly less spikes and seeds than healthy, with decrease in weight and total grain yield (up to 35%).

BSMV is spread by seed, pollen, ovule and sap but not by vector insects such as aphids (Carroll, 1972; Carroll, 1974; Carroll and Mayhew, 1976). In barley transmission is by seed via ovule but in wheat is by pollen and natural infections, in this crop, resulting from the transfer of sap by contact between plants. In different hosts seed transmission is relatively inefficient.

Because the virus can remain viable for several years in the seed this is constituted as the source of primary inoculum and the main route of transmission (Carroll, 1986). It is mentioned that in early infections some virus races may have 100% transmission by seed, but the most common is 50 to 60% transmission. Seed transmission can be determined directly by the search of symptoms development in seedlings grown in greenhouses because in general infected seeds with BSMV are asymptomatic (Carroll, 1980; Mathre, 1997; Bockus *et al.*, 2010).

por la búsqueda del desarrollo de síntomas en plántulas crecidas en invernadero ya que en general las semillas infectadas con el virus BSMV son asintomáticas (Carroll, 1980; Mathre, 1997; Bockus *et al.*, 2010).

Para la detección e identificación del virus BSMV se utilizan diferentes métodos. En campo, la inspección de plantas 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 reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por sus siglas en inglés con iniciadores específicos (Jackson *et al.*, 1991).

La detección y la identificación oportuna 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 se establecieron los objetivos de determinar si: 1) el nivel de infección (de 5, 10 y 15%); 2) el incremento del número de muestra simples (10, 15, 20 y 25), utilizadas para formar muestras compuestas; y 3) el aumento o la reducción del tamaño de muestra usual de 10% a 15 y 5%, afectan la sensibilidad de la prueba DAS-ELISA para la detección del virus BSMV. Las hipótesis planteadas fueron: a) los niveles de infección de 5, 10 y 15%; b) el incremento en el número de muestras simples utilizadas para formar muestras compuestas; y c) el aumento o la reducción actual del tamaño de muestra de trigo de 10% a 15 y 5% no afectan la sensibilidad de la prueba DAS-ELISA.

Material y métodos

Establecimiento de prueba DAS- ELISA

La prueba DAS (Double-antibody sándwich)- ELISA es una variante de la prueba directa ELISA por sus siglas en inglés, desarrollada para la detección de virus de plantas con un conjugado específico de enzima-anticuerpo para cada virus en particular. En este caso la prueba se estableció con muestras de semilla molida (provenientes de 2 g de semilla) en placas de poliestireno de 96 pozos. Los reactivos empleados así como el protocolo fueron de Agdia®, DAS- Elisa (2013) para el virus BSMV.

For the detection and identification of BSMV different methods are used. Field, plant inspection to check for characteristic symptoms of the disease; in suspect plants, observation of leaf preparations in electron microscope for the presence of viral particles characteristics; and in leaf and seed, by serological tests such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with specific antibodies, or with the polymerase chain reaction (PCR) test with specific primers (Jackson *et al.*, 1991).

Detection and timely identification of BSMV are essential for disease control of barley stripe mosaic and important for its regulation and control through phytosanitary certification and quarantine programs in domestic and international seed trade (Morrison, 1999). As indicated above objectives were established to determine whether: 1) the level of infection (from 5, 10 and 15%); 2) the increase in the number of single sample (10, 15, 20 and 25) used to form composite samples; and 3) increasing or reducing the size of the usual sample 10% to 15 to 5%, affects the sensitivity of DAS-ELISA for detection of BSMV. The hypotheses were: a) levels of infection from 5, 10 and 15%; b) the increase in the number of single samples used to form composite samples; and c) increase or reduction of current sample size of wheat from 10% to 15 and 5% do not affect the sensitivity of DAS-ELISA.

Materials and methods

DAS ELISA test establishment

DAS (double-antibody sandwich) - ELISA test is a variant of direct ELISA test, developed for the detection of plant viruses with a specific enzyme-antibody conjugate for each particular virus. In this case the test was established with samples of ground seed (2 g of seed) in 96-well polystyrene plates. The reagents used thus the protocol were from Agdia®, DAS Elisa (2013) for BSMV.

Sensitization and plate washing

The antibody coverage was diluted 1: 200 for this where mixed 10 000 µl of the coverage buffer (1X), pH 9.6, with 50 µl of antibody coverage concentrated; except for blank wells, in each well 100 µl of antibody dilution coverage were added and incubated for 4 h at room temperature or overnight at 4 °C, in humid chamber. After incubation, the content of

Sensibilización y lavado de placas

El anticuerpo de cobertura se diluyó 1:200, para esto se mezclaron 10 000 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 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 piceta multicanal. Este proceso se repitió tres veces y entre cada lavado la placa se sacudió con fuerza, 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 semilla molida 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 toda la noche 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 la placa se sacudió con fuerza, 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 la enzima (fosfatasa alcalina) conjugada se diluyó a una relación 1:200. Para esto se mezclaron 10 000 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 la placa se sacudió con fuerza, 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 (p-nitrofenil fosfato) a 1 mg por ml con dos tabletas PNP (sustrato) disueltas en 10 ml de búfer PNP (1X) en un agitador

the plate was emptied and washed with PBST (1X) buffer wash with a multichannel wash bottle. This process was repeated three times and between each wash the plate was strongly shaken down on a folded paper towel to remove excess liquid and bubbles.

Loading samples

To each of the tubes with ground seed samples were added 20 ml of extraction buffer (1X) 1:10 ratio (sample weight in g: buffer volume in ml). Except blank wells, added 100 µl per well of each sample per duplicate, thus positive control, negative control and the buffer according to the preset load diagram. The plate was incubated for 2 h at room temperature or overnight at 4 °C, in humid chamber. Upon completion of the incubation the plate was emptied and washed eight times with wash buffer, in order to remove any residue from the sample. Between each wash the plate was shaken, down on a folded paper towel to remove excess liquid and bubbles.

Addition of enzyme conjugate

Shortly before using the enzyme conjugate (alkaline phosphatase) it was diluted to a ratio 1: 200. For this 10 000 µl of ECI buffer (1X) with 50 µl of enzyme conjugate concentrate were mixed; except blank wells, in each well 100 µl of enzyme dilution were added. After 2 h incubation in a moist chamber, the plate was emptied and washed eight times with wash buffer, in order to remove any residual sample. Between each wash the plate shaken, down on a folded paper towel to remove excess liquid and bubbles.

Reveal plate

For revealed a PNP (p-nitrophenyl phosphate) solution at 1 mg per ml with two PNP tablets (substrate) dissolved in 10 ml PNP buffer (1X) in a shaker Vortex Scientific Industries G-560 was prepared. It avoided touching the tablets and expose the PNP solution to intense light to avoid contamination and false positive development by color development in the wells of negative samples. Immediately after preparation, 100 µl of the PNP solution were added in each plate well and incubated in the dark at room temperature for 60 min. Elapsed time of incubation, 70 µl of sodium hydroxide (NaOH) 3 molar per well were placed to stop the reaction in the plate. Reading the plate was performed in a BioTek ELx808 spectrophotometer at 405 nm.

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 de la solución 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.

Preparación de muestras simples

A partir de dos lotes de semilla de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.), uno de semilla naturalmente infectada (SI) con el virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV, por sus siglas en inglés) y otro de semilla sana (SS), se formaron muestras simples (MS) de 20 g de semilla. Cada muestra MS se preparó de acuerdo al nivel de infección (NI) correspondiente: NI 15%, 3 g de SI con 17 g de SS; NI 10%, 2 g de SI con 18 g de SS; y, NI 5%, 1 g de SI con 19 g de SS. Una vez formadas las muestras MS estas se depositaron por separado en sobres de papel debidamente identificados. En total se prepararon 210 muestras MS (70 muestras MS por NI) de las cuales se tomaron 2 g de semilla de cada una para molerse y analizarse por separado por DAS-ELISA de acuerdo al protocolo descrito arriba.

Preparación de tamaño de muestra y muestras compuestas

De cada una de las 210 muestras MS se tomaron por separado, 1.0, 1.9 y 2.56, g de semilla para formar tamaños de muestra (TM) de 5, 10 y 15% respectivamente (Figura 1). Para esto a partir de un lote inicial de 20 g se tomó 1 g para formar el TM de 5%; de los 19.0 g restantes se tomaron 1.90 g para formar el TM de 10%; y de los 17.1 g finales se pesaron 2.56 g para el TM de 15%.

Las muestra compuestas (MC) se formaron con diferente número de muestras MS (25, 20, 15 y 10 NMS). En total se formaron 36 muestras MC, cada muestra MC con tres NI y tres TM y un peso total de acuerdo al TM (Figura 1). Con fines prácticos de manejo, las MC anteriores se etiquetaron considerando primero la clave para el número de muestras MS, 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 muestra MC con 25 muestras MS, con

Preparation of single samples

From two seed batches of bread wheat (*Triticum aestivum* L.), one naturally infected seed (SI) with barley stripe mosaic virus (BSMV) and healthy seed (SS), single samples (MS) 20 g of seed were formed. Each MS sample was prepared according to the level of infection (NI): NI 15%, 3 g of SI with 17 g of SS; NI 10%, 2 g of SI with 18 g of SS; and NI 5%, 1 g of SI with 19 g of SS. Once MS samples are formed these were deposited separately in paper envelopes properly identified. In total 210 MS samples (70 MS samples per NI) were prepared of which 2 g of seed each were taken to be ground and analyzed separately by DAS-ELISA according to the protocol described above.

Preparation of sample size and composite samples

Of each of the 210 MS samples were taken separately, 1.0, 1.9 and 2.56, g of seed to form sample sizes (TM) of 5, 10 and 15% respectively (Figure 1). For this from an initial batch of 20 g, 1 g was taken to form TM of 5%; the remaining 19.0 g, 1.90 g were taken to form TM 10%; and from the remaining 17.1 g, 2.56 g were weighted to form TM 15%.

The composite samples (MC) were formed with different numbers of samples MS (25, 20, 15 and 10 NMS). In total 36 MC samples, each MC sample with three NI and three TM and a total weight according to TM (Figure 1) were formed. For practical management purposes, the above MC were labeled considering first the code to number of MS samples, then the code for TM and last NI. For example, the sample labeled MC25-15-15 indicates that is about a MC sample with 25 MS samples with TM 15% and NI 15%. While the MC25-10-15 indicates that is a MC sample of 25 MS samples with TM 10% and NI 15%. While MC25-5-15 indicates that is a MC sample with 25 MS samples, with TM 5-% and NI 15%. This methodology was applied to the remaining 33 samples.

Figure 1 and Table 1 illustrates the formation scheme MS and MC samples.

Evaluation of the number of MS, TM and NI on composite samples

To determine whether NMS, the increase or reduction in the size TM and NI level that make MC samples affects the sensitivity of DAS-ELISA test to BSMV, these were analyzed separately each of the 36 MC samples. Of each

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

En la Figura 1 y Cuadro 1 siguientes se ilustra el esquema de formación de muestras MS y MC.

MC sample, three replications of 2 g of seed each (108 subsamples in total) were taken, which were deposited in falcon tubes type of 50 ml properly identified to be ground separately in a mill Peter Instruments. Ground seed was recovered in the same tube. Between each grinding the mill was cleaned with compressed air and seed fragments stuck in the mill discs were removed with a dissecting needle to prevent contamination between samples. The procedure for analysis of the subsamples was made as described in

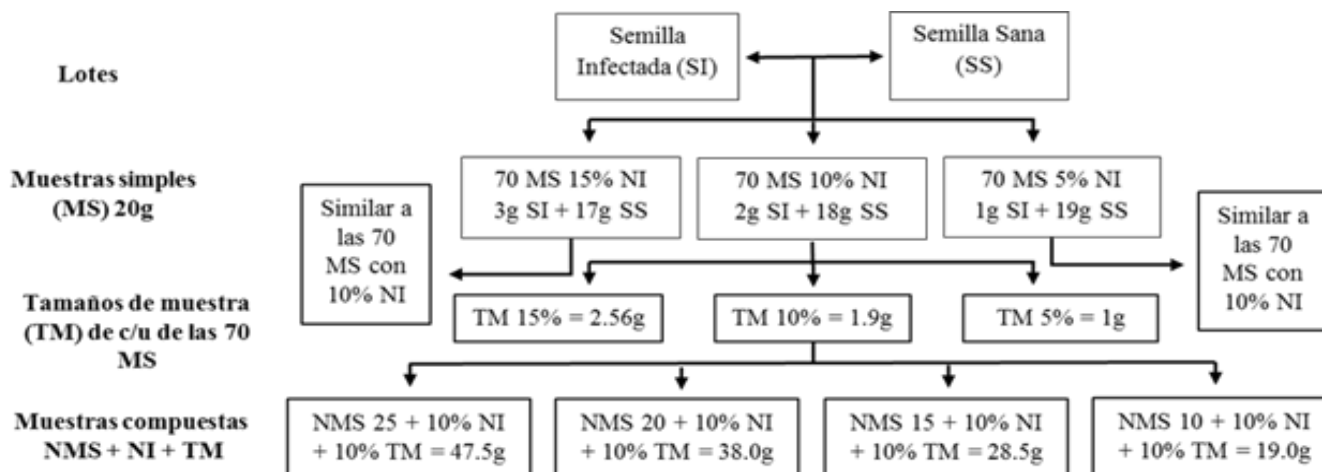


Figura 1. Diagrama para la composición de las muestras simples (MS) con su nivel de infección y la estructuración de las muestras compuestas (MC= NMS + TM + NI).

Figure 1. Diagram for composition of single samples (MS) with their level of infection and structuring of composite samples (MC= NMS + TM + NI).

Cuadro 1. Formación de muestras compuestas (MC) con diferente nivel de infección (NI) y tamaño de muestra (TM).
Table 1. Formation of composite samples (MC) with different levels of infection (NI) and sample size (TM).

Muestra MC	Núm. muestras MS	NI 5, 10 y 15%	TM 5, 10 y 15%	Total muestras MC*
MC25	25	3	3	9
MC20	20	3	3	9
MC15	15	3	3	9
MC10	10	3	3	9

*cada muestra MC con tres repeticiones.

Evaluación del número de MS, TM y NI en muestras compuestas

Para determinar si el NMS, el incremento o reducción del tamaño TM y el nivel NI que conforman la muestra MC afectan la sensibilidad de la prueba DAS-ELISA al virus BSMV, se analizaron por separado cada una de las 36 muestras MC. De cada muestra MC se tomaron tres repeticiones de 2 g de semilla cada una (108 sub muestras en total), las cuales se depositaron en tubos tipo falcón

the establishment of DAS-ELISA test for sensitization and plate washing, adding samples, addition of the enzyme conjugate and plate reveal, Agdia protocol, Das Elisa (2103) for BSMV.

Statistical analysis

Absorbance data obtained from the evaluation of MS and MC samples were analyzed with the statistical program SAS system for Windows 9.4, using the analysis of variance the

de 50 ml debidamente identificados para ser molidas por separado en un molino Peter Instruments. La semilla molida 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 sub muestras se hizo como se describió en el establecimiento de prueba DAS-ELISA para sensibilización y lavado de placas, adición de muestras, adición del conjugado enzimático y revelado de placas, del protocolo de Agdia, Das Elisa (2103) para el virus BSMV.

Análisis estadístico

Los datos de absorbancia obtenidos de la evaluación de las muestras 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 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 de 5% ($\alpha=0.05$).

Resultados y discusión

Efecto del NMS y NI en la sensibilidad de la prueba DAS-ELISA

En el Cuadro 2 se muestran los valores promedio y comparación de medias de absorbancia en diferente NMS usadas para formar las muestras MC, con diferente NI del virus BSMV, utilizando la diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey con nivel de significancia al 5% ($\alpha=0.05$). Con los niveles 15, 10 y 5% de 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 general (0.92) 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 (0.73 y 0.63, respectivamente). Esto indica que al reducir el nivel NI de 15% a 10 y 5% se detectó un porcentaje de disminución de 20 y 34%, respectivamente, de la sensibilidad de la prueba DAS-ELISA al virus BSMV. Estos resultados confirman los resultados encontrados por Scott y

lineal model corresponding to a randomized complete block design (RCBD) with sub - sampling, with the procedure of general linear model (GLM) and multiple comparisons test using mean honest significant difference (HSD) from Tukey, with a significance level of 5% ($\alpha=0.05$).

Results and discussion

NMS and NI effect on sensitivity of DAS ELISA test

Table 2 shows the average values and mean comparison of absorbance in different NMS used to form MC samples with different NI from BSMV, using honest significant difference (HSD) of Tukey with a significance level of 5% ($\alpha=0.05$). With levels 15, 10 and 5% NI recording samples with values above the threshold value (0.22). Similarly, the mean values per group and general means were also higher than the threshold. However, when analyzing the results by level and between levels differences were found.

The overall average value (0.92) recorded with NI level 15% was significantly different ($\alpha=0.05$) by to that registered with NI 10 and 5%, which showed statistically similar values (0.73 and 0.63, respectively). This indicates that by reducing the NI level from 15% to 10 and 5% was detected a percentage of decrease of 20 and 34%, respectively, of the sensitivity of DAS-ELISA test to BSMV. These results confirm the results found by Scott and Zummo (1995) who report that as the level of natural incidence of a pathogen is reduced in the seed the likelihood of not detecting it increases.

By analyzing the comparison of means of absorbance at different NMS, it was found that in NMS of 25, 20 and 10 forming the MC samples have no statistically significant differences ($\alpha=0.05$) except for NMS 15 (0.85) that showed differences with the previous. When comparing the NMS with lower absorbance value to the threshold (0.22), samples with NI 10 and 5% recorded the highest number of negative MS samples (14 and 24 samples, respectively) compared to samples with NI 15% (6 samples). That is, as NI decreased from 15% to 10 and 5% the number of negative samples to BSMV increases (data not shown). In short with a level of infection of 15% a percentage of 91.5% probability of detecting BSMV by DAS-ELISA test was detected; that is, from the 70 MS samples with NI 15%, 64 of them were positive to the virus; instead with NI 10% detected a percentage of 80% and with NI 5% detected a percentage of 66% probability of detecting BSMV.

Zummo (1995) quienes mencionan que conforme se reduce el nivel de incidencia natural de un patógeno en la semilla la probabilidad de no detectarlo se incrementa.

The level of infection of a seed or incidence of the pathogen in the crop is key for its detection (Scott and Zummo, 1995) also determines the sample size or composite sample, as found

Cuadro 2. Valores promedio y comparación de medias de absorbancia en diferente NMS usado para formar muestras MC, con diferente NI del virus BSMV.

Table 2. Mean values and comparison of mean absorbance in different NMS used to form MC samples with different NI from BSMV.

NMS ^x	NI (%)			NMS		NI (%)	
	15	10	5			25	15
25	0.97	0.7	0.54	20	0.74 b ^y	15	0.92 a ^y
20	0.89	0.57	0.71	15	0.72 b	10	0.73 b
15	0.91	1.05	0.6	10	0.85 a	5	0.63 b
10	0.87	0.63	0.72	DSH	0.74 b	DSH	0.107
				DSH	0.032	DSH	0.107

^x= número muestras simples usadas para formar la MC. Umbral de absorbancia promedio = 0.22 nm.

Al analizar la comparación de medias de absorbancia en los diferentes NMS, se encontró que en el NMS de 25, 20 y 10 que forman las muestras MC no tienen diferencias significativas estadísticamente ($\alpha=0.05$) a excepción de NMS de 15 (0.85) que sí mostró diferencias con las anteriores. Al comparar el NMS con valor de absorbancia menor al del umbral (0.22), las muestras con NI de 10 y 5% registraron el mayor número de muestras MS negativas (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 (datos no mostrados). En síntesis con un nivel de infección de 15% se detectó un porcentaje de 91.5% de probabilidad de detectar al virus BSMV por la prueba DAS-ELISA; esto es, que de las 70 muestras MS con 15% de NI, 64 de ellas fueron positivas al virus; en cambio con el NI de 10% se detectó un porcentaje de 80% y con 5% de NI se detectó un porcentaje de 66% de probabilidad de detectar al virus BSMV.

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 determina el tamaño de muestra o muestra compuesta, como lo encontrado por Priou *et al.* (2001), que la reducción del tamaño de muestra compuesta de tubérculos de papa están en función del nivel de incidencia de *Ralstonia solanacearum* en los cultivos.

Efecto del NMS, TM y NI en muestras compuestas

El Cuadro 3 muestra los resultados promedio de absorbancia de 36 MC con la prueba DAS-ELISA. En general los valores promedio de absorbancia de las muestras MC resultaron

by Priou *et al.* (2001), that reducing the composite sample size of potato tubers are based on the level of incidence of *Ralstonia solanacearum* in crops.

Effect of NMS, TM and NI on composite sample

Table 3 shows the absorbance average results of 36 MC with DAS-ELISA test. Overall average absorbance values of MC samples were above the threshold value of absorbance (0.21) only in the sample MC10-10-5 the absorbance value (0.18) remained below the threshold, as in 4 of 6 individual observations (replications) obtained a lower absorbance than threshold. Although MC10-15-15, MC10-10-10 and MC10-5-5 recorded two replications below the threshold, by averaging the six replications this exceeded the absorbance threshold, marking it as positive to BSMV. This indicates that when MC samples are formed with a NMS lower to 15 or equal to 10 decreases the sensitivity of DAS-ELISA test to BSMV and the probability of recording false negatives increases.

Because when comparing the 36 values showed in Table 3, obtained from the combination of the three factors, as if they were individual treatments does not make much sense, an analysis of variance was performed considering the factorial structure of the treatments, 3 factors: i) number of single samples (NMS) with 4 levels (25, 20, 15 and 10); ii) Sample size (TM) with three levels (15, 10 and 5); and iii) level of infection (NI) with three levels (15, 10 and 5). Table 4 shows the results of multiple comparisons of means using honest significant difference (HSD) Tukey significance level of

por arriba del valor umbral de absorbancia (0.21), tan solo en la muestra MC10-10-5 el valor de absorbancia (0.18) se mantuvo por debajo del umbral, ya que en cuatro de 6 observaciones individuales (repeticiones) obtuvieron una absorbancia menor al umbral. Aunque en las MC10-15-15, MC10-10-10 y MC10-5-5 registraron dos repeticiones por debajo del umbral, al promediar las 6 repeticiones este supero el umbral de absorbancia, marcándose como positivos al virus BSMV. Esto indica que cuando las muestras MC se forman con un NMS inferior a 15 o igual a 10 decrece la sensibilidad de la prueba DAS-ELISA al virus BSMV y la probabilidad de registrar falsos negativos se incrementa.

5% ($\alpha = 0.05$), for each of the principal effects. Now the averages presented come from a higher number of individual values (N).

The results from analysis of the comparison of means for the overall principal effect of absorbance between MC samples with different NMS, TM and NI indicate statistical differences ($\alpha = 0.05$) between samples. Specifically highlights differences between the averages recorded by MC samples with NMS 25 (2.46a) and NMS 20 (2.11a) with MC samples with NMS 15 (1.72b) and NMS 10 (0.79c) and differences between the latter. This indicates that as

Cuadro 3. Valores promedio de absorbancia obtenidos con la prueba DAS-ELISA de muestras MC de semilla de trigo.
Table 3. Average absorbance values obtained with DAS-ELISA test of MC samples of wheat seed.

TM	NI	NMS (Valor promedio de absorbancia)			
		25	20	15	10
15	15	3.23	2.95	1.84	0.71
10	15	2.81	3.36	2.12	0.93
5	15	3.08	2.33	2.25	0.52
15	10	1.38	3.25	2.61	0.66
10	10	1.54	0.58	1.7	0.75
5	10	2.19	2.35	2.13	1.43
15	5	2.39	1.48	1.07	1.32
10	5	2.72	0.91	0.95	0.18
5	5	2.8	1.75	0.84	0.58

Umbral de absorbancia promedio= 0.21 nm. Los valores en cada celda provienen de 6 observaciones individuales.

Debido a que al comparar los 36 valores presentados en el Cuadro 3, obtenidos de la combinación de los tres factores, como si fuesen tratamientos individuales no hace mucho sentido, se realizó un análisis de varianza considerando la estructura factorial de los tratamientos, 3 factores: i) número de muestras simples (NMS) con 4 niveles (25, 20, 15 y 10); ii) tamaño de muestra (TM) con tres niveles (15, 10 y 5); y iii) nivel de infección (NI) con tres niveles (15, 10 y 5). En el Cuadro 4 se presentan los resultados de las comparaciones múltiples de medias utilizando la diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey con nivel de significancia al 5% ($\alpha = 0.05$), para cada uno de los efectos principales. Ahora las medias presentadas provienen de mayor número de valores individuales (N).

Los resultados del análisis de la comparación de las medias para los efectos principales generales de absorbancia entre las muestras MC con diferente NMS, TM y NI indican diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) entre muestras. Específicamente señala diferencias entre las medias

NMS decreases in the MC sample, statistically decreases the absorbance value, confirming the findings by Fernández (2007) mentioning that large sample sizes recorded higher confidence level and degree of accuracy in contrast to what was presented by small samples.

When comparing the mean absorbance between MC samples with different TM statistical differences ($\alpha = 0.05$) between samples were found. It is noteworthy that these differences occurred only between MC samples with TM 15 (1.9a) and 5 (1.8a) with MC with TM 10 (1.5b). That is, between the sizes of 15 and 5% are no statistical differences but between these and the size 10% are significant differences. This may be related to the fact that MC10-10-5 sample had two samples (replications) with value (0.15 and 0.13) below the threshold (0.21).

In this case a linear relationship between TM from MC sample with the absorbance value was not found; that is, there is no tendency between means from composite samples

registradas por las muestras MC con un NMS de 25 (2.46a) y NMS de 20 (2.11a) con las muestras MC con un NMS de 15 (1.72b) y NMS de 10 (0.79c) y diferencias entre estas últimas. Lo anterior indica, que conforme disminuye el NMS en la muestra MC, decrece estadísticamente el valor de absorbancia confirmando lo encontrado por Fernández (2007) que menciona que los tamaños de muestra grandes registran mayor nivel de confianza y grado de precisión en contraste a lo presentado por las muestras pequeñas.

according to sample size. These results agree with those found by Moreno and Castillo (1978) for classification of coffee trees, who indicate that a sample of 250 g used for grain size can be reduced to 100 or 50 g without causing any alteration. As well as those reported by Thomas *et al.* (2005) who mentioned that there is no difference in the infection rate between 40 and 80 composite samples obtained from wheat batches of 200 and 500 t, respectively, infected with *Microdochium nivale*.

Cuadro 4. Comparaciones múltiples de medias de absorbancia para los efectos principales de los factores número de muestras simples (NMS), tamaño de muestra (TM), y nivel de infección (NI) utilizados para la formación de las muestras compuestas (MC).

Table 4. Multiple comparisons of mean of absorbance for the principal effects of the factors number of single samples (NMS), sample size (TM), and level of infection (NI) used for the formation of composite samples (MC).

MC	NMS		TM	NI	
	Media	(%)		Media	(%)
25	2.46 a ^x	15	1.91 a	15	2.18 a
20	2.11 a	10	1.55 b	10	1.71 b
15	1.72 b	5	1.85 a	5	1.42 c
10	0.79 c				
DSH	0.365	DSH	0.288	DSH	0.288
N	54	N	72	N	72

^x= valores dentro de cada columna con letras iguales no fueron estadísticamente diferentes. DSH= diferencia significativa honesta de Tukey, con nivel de significancia al 5%, N= número de valores individuales de los cuales proviene cada media.

Al comparar las medias de absorbancia entre muestras MC con diferente TM se encontraron diferencias estadísticas ($\alpha=0.05$) entre muestras. Es de notar que estas diferencias se presentaron solamente entre las muestras MC con TM de 15 (1.9a) y 5 (1.8a) con la MC con TM de 10 (1.5b). Esto es, entre los tamaños de 15 y 5% no existen diferencias estadísticas 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 (0.15 y 0.13) por debajo del umbral (0.21).

En este caso no se encontró una relación lineal entre el TM de la muestra MC con el valor de absorbancia; es decir, no hay una tendencia entre las medias de las muestras compuestas de acuerdo al tamaño de muestra. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Moreno y Castillo (1978) para la clasificación de árboles cafetaleros, quienes indican que una muestra de 250 g usada para tamaño de grano se puede reducir a 100 o 50 g sin causar alguna alteración. Así como por los reportados por Thomas *et al.* (2005) quienes mencionan que no existen diferencias en el porcentaje de infección entre muestras compuestas de 40 y 80 muestras obtenidas de lotes de trigo de 200 y 500 t, respectivamente, infectados con *Microdochium nivale*.

Several researchers point out that the analysis of small sample sizes results in lower confidence level and degree of accuracy in contrast with those registered with larger sample sizes which record better results (Lawrence *et al.*, 1995; Fernández, 2007; Miyamoto *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2010). However, Thomas *et al.* (2005) indicate that infected seed batches with *Tilletia tritici* is the level of infection and not the NMS from MC samples which determines the capability of a test to detect the fungus.

According Nyrop *et al.* (1999) when sampling plans are developed it should start by checking what is known about the distribution of sampling and perform a sensitivity analysis to determine whether a refinement of this information is justified, and that the sample size should be based on information from the representative sample, as this is a good indicator of the incidence of pest management unit.

By analyzing the means for the principal effects of absorbance between MC samples with different NI statistical differences ($\alpha=0.05$) between the samples were found. In this case means of 2.18a, 1.71b and 1.42c for MC samples with NI 15, 10 and 5%, respectively (Table 4) were recorded.

Varios investigadores señalan que el análisis de tamaños de muestra pequeños da como resultado menor nivel de confianza, y grado de precisión en contraste con lo registrado con los tamaños de muestra mayores los cuales registran mejores resultados (Lawrence *et al.*, 1995; Fernández, 2007; Miyamoto *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2010). Sin embargo, Thomas *et al.* (2005) indican que en lotes de semilla infectada con *Tilletia tritici* es el nivel de infección y no el NMS de la muestra MC el que determina la capacidad de una prueba de detectar al hongo.

Según Nyrop *et al.* (1999) cuando se desarrollan planes de muestreo 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 esta es un buen indicador de la incidencia de plagas en la unidad de manejo.

Al analizar las medias para los efectos principales generales de absorbancia entre las muestras MC con diferente NI se encontraron diferencias estadísticas ($\alpha= 0.05$) entre las muestras. En este caso se registraron medias de 2.18a, 1.71b y 1.42c para las muestras MC de NI de 15, 10 y 5%, respectivamente (Cuadro 4). Conforme se redujo el NI, decreció significativamente el valor de absorbancia de la muestra MC. La Figura 2 muestra la tendencia lineal de los valores promedio de absorbancia de las muestras MC de acuerdo al NMS, TM y NI con solo el valor de la MC10-10-5 por debajo de la línea del umbral.

Priou *et al.* (2001) encontraron que conforme el nivel de incidencia de la enfermedad por *Ralstonia solanacearum* disminuye en el cultivo, se reduce la detección del hongo en el tubérculo. Por lo anterior, estos autores sugieren analizar muestras compuestas grandes cuando los niveles de enfermedad son bajos en el cultivo. Similarmente, Scott y Zummo (1995) observaron que cuando el nivel de infección natural por *Aspergillus flavus* es alto (3%) el tamaño de muestra a analizar se reduce pero que cuando el nivel de infección es muy bajo ni con tamaños de muestra mayores se detecta al hongo.

Los resultados descritos anteriormente son evidencia de la importancia que se debe dar al muestreo como actividad fundamental en un programa de análisis de semillas (Morrison, 1999). El ISTA (2013) señala que un lote puede estar compuesto de semillas cosechadas de un solo campo o

As NI decreased, the absorbance value from MC sample significantly decreases. Figure 2 shows the linear trend of the average absorbance values of MC samples according to NMS, TM and NI with only the MC10-10-5 value below the threshold line.

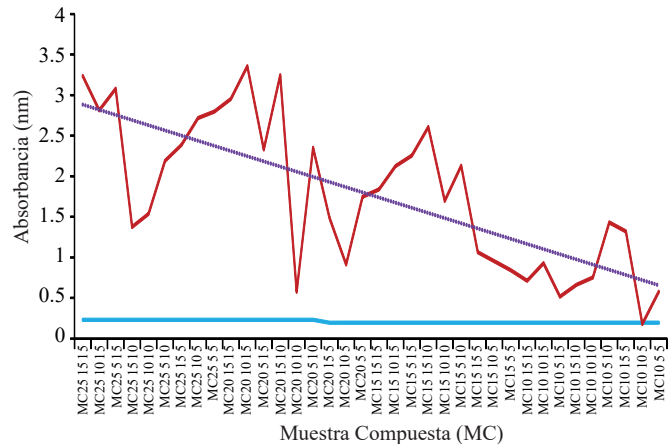


Figura 2. Tendencia de valores promedio de absorbancia de muestras compuestas (MC) de semilla de trigo. Cada muestra MC se formó con diferente número de muestras simples (NMS, 25, 20, 15 y 10), tamaño de muestra (TM, 15, 10 y 5%) y nivel de infección (NI, 15, 10 y 5%) del virus BSMV. Los valores de la línea marrón indican el promedio de tres muestras MC, los de la punteada morada, la tendencia lineal de los valores y los de la azul, el promedio del umbral de absorbancia (0.21).

Figure 2. Trend of average absorbance values of composite samples (MC) of wheat seed. Each MC sample was formed with different number of single samples (NMS, 25, 20, 15 and 10), sample size (TM, 15, 10 and 5%) and level of infection (NI, 15, 10 and 5%) from BSMV. The values from the brown line indicate the average of three MC samples; dotted purple, the linear trend of values; and blue, the average absorbance threshold (0.21).

Priou *et al.* (2001) found that as the level of disease incidence by *Ralstonia solanacearum* decreases in culture, fungus detection decreases in tuber. Therefore these authors suggest to analyze large composite samples when disease levels are low in the crop. Similarly, Scott and Zummo (1995) observed that when the level of natural infection with *Aspergillus flavus* is high (3%) the size of sample to be analyzed is reduced but when the level of infection is very low not even with larger sample sizes detects the fungus.

The results described above are evidence of the importance that should be given to sampling as a fundamental activity in a seed testing program (Morrison, 1999). ISTA (2013)

de varias secciones de terreno y, que el objetivo del muestreo de semilla será obtener una muestra representativa, de tamaño adecuado, para que los resultados de los análisis en laboratorio reflejen la calidad del lote de semilla. El conocimiento de la importancia que tienen los parámetros de tamaño de muestra, y nivel de infección en los muestreos de lotes de semillas es fundamental para determinar la probabilidad de seleccionar muestras positivas o negativas al patógeno de interés lo cual se traducirá en confiabilidad de los resultados, y en la toma de decisiones acertadas sobre el destino final del lote evaluado.

Conclusiones

El nivel de infección (NI de 15, 10 y 5%) y el incremento del número de muestra simples (NMS 10, 15, 20 y 25), utilizadas para formar muestras compuestas; y el incremento y la reducción del tamaño de muestra (TM) usual de 10% a 15 y 5%, respectivamente, afectaron la sensibilidad de la prueba DAS-ELISA para la detección del virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV), por sus siglas en inglés en semilla de trigo.

Al reducir el NI en muestras simples (MS) de 15% a 10 y 5% decreció significativamente ($\alpha = 0.05$) en 21 y 31.5%, respectivamente, la sensibilidad de la prueba al virus. Similarmente, la reducción del NMS para formar muestras compuestas (MC) afectó significativamente ($\alpha = 0.05$) la sensibilidad de la prueba al virus e incremento la probabilidad de registrar falsos negativos. El incremento y la reducción del TM de 10% a 15 y 5% afectó significativamente ($\alpha = 0.05$) la sensibilidad de la prueba al virus pero no se encontró una relación lineal entre el TM de la muestra MC con el valor de absorbancia. Entre los tamaños de 15 (1.91a) y 5% (1.85a) no se encontraron diferencias estadísticas ($\alpha = 0.05$) pero si entre estos y el tamaño de 10% (1.55b), indicando que no hay una tendencia entre las medias de las muestras MC de acuerdo al tamaño de muestra.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca 286210 de postgrado otorgada al primer autor. A la M. C. Gabriela Juárez López por la asesoría en la técnica DAS-ELISA.

points out that a batch can be composed of harvested seeds from a single field or several sections of land and the objective of sampling from seed will be to obtain a representative sample of adequate size so that the results of the laboratory analysis reflect the quality of the seed batch. Knowing the importance that parameters of sample size and level of infection in samplings of seed batches is essential to determine the probability of selecting positive or negative samples to the pathogen of interest which will result in reliability of results and in making decisions about the final destination of the batch assessed.

Conclusions

The level of infection (NI 15, 10 and 5%) and increased number of single sample (NMS 10, 15, 20 and 25) used to form composite samples; and increasing and reducing the usual sample size (TM) from 10% to 15 and 5% respectively, affected the sensitivity of DAS-ELISA test for detection of barley stripe mosaic virus (BSMV) in wheat seed.

By reducing NI in single samples (MS) from 15% to 10 and 5% it decreased significantly ($\alpha = 0.05$) in 21 and 31.5%, respectively, the sensitivity of the test to virus. Similarly, reducing NMS to form composite samples (MC) significantly ($\alpha = 0.05$) affected the sensitivity of the test to the virus and increase the likelihood of recording false negative. The increase and reduction of TM from 10% to 15 and 5% significantly ($\alpha = 0.05$) affected the sensitivity of the test to the virus but no linear relationship was found between TM of MC sample with the absorbance value. Among the sizes 15 (1.91a) and 5% (1.85a) no statistical differences ($\alpha = 0.05$) were found but between them and size of 10% (1.55b) there are, indicating that there is a tendency between means of MC samples according to sample size.

End of the English version



Literatura citada

- Agdia, D. E. 2013. Reagent set, Das Elisa, Alkaline phosphatase label. <https://orders.agdia.com/documents/m16.pdf>.
- Bockus, W. W.; Bowden, R. L.; Hunger, R. M.; Morrill, W. L.; Murray, T. D. and Smiley, R. W. 2010. Compendium of wheat diseases and pests. Third edition. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. 171 p.

- Brakke, M. K.; White, J. L.; Samson, R. G. and Joshi, J. 1988. Chlorophyll, chloroplastribosomal RNA, and DNA are reduced by *Barley stripe mosaic virus* systemic infection. *Phytopathology*. 78:570-574.
- 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. *In: the plant viruses*. Van Regenmortel, M. H. V. and H. Fraenkel-Conrat, Eds. Plenum, N. Y. 373-395 p.
- 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. *Can. J. Bot.* 54:1604-1621.
- 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.
- 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. *Can. J. Plant Pathol.* 13:163-177.
- Lawrence, M. J.; Marshall, D. E. and Davies P. 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.
- Mathre, D. E. 1997. Compendium of barley diseases. Second Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. 78 p.
- 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.
- Miyamoto, N.; Fernández, M. J. F.; Morand, P. M. E.; Bertolino P. and Frascaria, L. N. 2008. What sampling is needed for reliable estimations of genetic diversity in *Fraxinus excelsior* L. (Oleaceae)? *Ann For. Sci.* 65:403. INRA, EDP Sciences.
- Montesinos, L. O. A.; Montesinos, L. A.; Crossa, J.; Eskridge, K.; Hernández, S. C. M. 2010. Sample size for detecting and estimating the proportion of transgenic plants with narrow confidence intervals. *Seed Science Res.* 20:123-136.
- Moreno, R. G. y Castillo, Z. 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.
- 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.; Torres R.; Villar, A.; Gutarra, L. and de Mediburu, F. 2001. Optimization of simple size for the detection of latent infection by *Ralstonia solanacearum* in potato seed tubers in the highlands of Peru. *Potato Res.* 44:349-358.
- Scott, G. E., and Zummo N. 1995. Size of maize simple needed to determine Percent Kernel Infection by *Aspergillus flavus*. *Plant Dis.* 79:861-864.
- Thomas, J. E.; Kenyon, D. M.; Cockerell V. and Thompson P. 2005. Distribution of *Tilletia tritici* and *Microdochium nivale* in wheat seed bulks, and significance for seed sampling strategies. *Seed Testing International*. No. 129.