

MINISTERIO DE AGRICULTURA



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGRARIA

**CONTROL INTERNO DE
CALIDAD DE LA SEMILLA
DE PAPA**

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGRARIA

DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGRARIA

**PROGRAMA NACIONAL DE INVESTIGACION
EN PAPA Y CAMOTE**

CONTROL INTERNO DE CALIDAD DE LA SEMILLA DE PAPA

Experiencias del Programa de Producción de
Semilla de Papa de Alta Calidad en el Perú

L. Bertschinger & U.C. Scheidegger

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION AGRARIA, INIA

DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGRARIA

DIRECCION GENERAL DE TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA AGRARIA

Revisión:

Comité Central de Edición y Publicaciones

Proyecto de Producción de Medios de Comunicación y Transferencia:

Primera Edición:

Abril, 1998

Tiraje: 500 ejemplares

INDICE

Presentación	5
1. Prólogo	6
2. Organización del control de calidad	9
3. El control interno de calidad con ELISA	11
3.1. Semilla producida en laboratorios e invernaderos.....	11
3.2. Semilleros sospechosos.....	19
3.3. Seguimiento de la infección de lotes de semilla básica	23
3.4. Descarte de lotes de tubérculos como semilla básica	25
3.5. La investigación de problemas virológicos.....	30
4. Criterios estadísticos para la determinación de proporciones	32
4.1. De los muestreos	32
4.2. De la determinación de proporciones y porcentajes.....	34
4.3. De los intervalos de confianza	41
5. Comentarios y recomendaciones finales	43
6. Referencias.....	44
7. Relación de Figuras y Tablas	46

PRESENTACIÓN

El Instituto Nacional de Investigación Agraria a través del Programa Nacional de Investigación en Papa y Camote y el Centro Internacional de la Papa ha desarrollado tecnologías avanzadas de producción de semilla de papa desde el año 1983, gracias al apoyo financiero de la Cooperación Técnica Suiza.

Un componente fundamental del sistema de producción de semilla de papa es el control de calidad del material genético producido, el cual se realiza a través de los análisis físicos, fisiológicos y de sanidad de este cultivo antes de iniciar su proceso productivo.

Esta obra científica, producto mancomunado de los especialistas y técnicos de ambas instituciones, es una contribución más al mejoramiento y desarrollo del cultivo de la papa, especie de mayor importancia alimentaria y nutritiva de la humanidad.

En este sentido, la presente publicación expresa un justo homenaje y reconocimiento a la labor abnegada y tesonera de los investigadores y agricultores que dedican su experiencia y tiempo en mejorar la producción y productividad de este importante cultivo.

*El Instituto Nacional de Investigación Agraria se complace en presentar esta publicación titulada "**Control Interno de Calidad de la Semilla de Papa**" como una contribución técnica que permita mejorar la calidad de la semilla de este cultivo.*

ING. MARIO RODRIGUEZ ROJAS
Jefe del INIA

1. PROLOGO

Los virus de papa son los responsables principales de un fenómeno que se manifiesta en el cultivo de papa llamado “*degeneración*”. Esta es la declinación del potencial productivo del cultivo de papa, en el transcurso de varias campañas, debido al incremento de la proporción de tubérculos infectados con patógenos -especialmente virus- en la semilla utilizada. No existen métodos curativos para combatir los virus (por ejemplo, un virucida). Por ello, una medida preventiva de suma importancia es la utilización de **semilla “sana”**. Muchos programas de producción de semilla de papa en el mundo reconocen este hecho, y tienen como objetivo principal la producción y distribución de semilla “sana”, es decir, libre de patógenos.

Estos programas utilizan diversos métodos para producir en poco tiempo un gran volumen de semilla sana: erradicación de virus por termoterapia y cultivo de meristemas; multiplicación *in-vitro* de material libre de virus (en el laboratorio, utilizando técnicas de cultivo de tejidos); multiplicación rápida, en invernaderos y campos, de plántulas *in-vitro* y esquejes de tallo lateral, de brotes, etc. siempre provenientes de plantas libres de virus.

La sanidad del material producido requiere un control de calidad. Este **control de calidad** es una **actividad de primordial importancia**. Su **objetivo** principal es **garantizar** que la semilla que se ofrece al agricultor merezca la denominación “**de alta calidad**”, en el Perú llamada **básica**, como lo establece la Ley de Semillas del País.

El control de calidad debe efectuarse en todos los niveles de producción: en la multiplicación de tejidos *in-vitro*, en invernaderos y en campos; a fin de detectar las irregularidades lo antes posible y así evitar pérdidas económicas por la descalificación como básica, de la producción.

Para controlar o verificar la sanidad del tejido vegetal producido se utiliza en muchos programas un método serológico llamado ELISA (Ensayo de Inmuno absorción con conjugado enzimático. Siglas en Inglés de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que detecta virus en tejidos foliares, de brotes y tubérculos.

Este método permite chequear gran número de muestras en poco tiempo y con equipos relativamente poco sofisticados. Detecta los 6 virus considerados como importantes por el programa peruano de producción de semilla de alta calidad: PLRV, PVY, PVX, PVS, APMV y APLV (Como se conocen estos virus por sus siglas en Inglés).

En 1983 se inició en el Perú un «Proyecto de Apoyo a la Producción de Semilla e Investigación para Mejorar la Productividad de la Papa en el Perú» (SEINPA), haciendo uso de métodos modernos de multiplicación rápida como se menciona en (7). Este proyecto es parte del Programa de Investigaciones en Papa (PIPA), el cual fue un programa del Instituto Nacional de Investigación Agraria y Agroindustrial (INIAA), institución que es a su vez un ente independiente dentro del Ministerio de Agricultura. La problemática de la prueba de ELISA, en el contexto del control interno de calidad y las experiencias técnicas del PIPA con este método se han presentado en otra publicación (2).

Los costos de operación de laboratorios *in-vitro* e invernaderos, se pueden justificar solamente si se satisfacen dos condiciones: i) La semilla sana **debe rendir considerablemente más** que la semilla común. El PIPA comparó el rendimiento de una semilla sana con aquel de una semilla infectada con virus y se comparó en numerosos estudios la semilla de calidad con la semilla del agricultor, producida por métodos tradicionales. Se encontró que una mejor sanidad de la semilla incrementaría considerablemente la productividad de la papa (> 20%) bajo las condiciones de cultivo en el país (4, 12, 13) y ii) La semilla **debe tener un grado de sanidad significativamente mayor** que la “semilla común” que uno puede producir por otros métodos, tradicionales y más baratos. Investigaciones del proyecto señalaron que la **semilla comúnmente utilizada** en el Perú está **altamente “degenerada” debido a la contaminación por virus** (3, 11).

A la alta sanidad se puede llegar solamente con un riguroso control de calidad durante todo el proceso de producción de la semilla. Este control de calidad por métodos serológicos es una actividad costosa.

Por eso debe aplicarse minimizando costos, reduciendo el número de chequeos en lo posible, pero respetando un nivel de precisión en los resultados que permita determinar la calidad de la semilla con alta seguridad.

Los tubérculos-semillas no solo pueden “degenerarse” por infección virósica, sino también por su contaminación con hongos fitopatógenos, bacterias y otros microorganismos. En esta publicación se trata solamente de virus porque son los agentes causales de degeneración más frecuentes y tal vez más difíciles de controlar por su modo de transmisión y por producir una infección sistémica y en muchos casos latente. **Sin embargo, consideramos nuestro deber enfatizar, que el control interno de calidad para evitar tubérculos infectados por hongos y bacterias o infestados por insectos, tiene gran importancia y merece suma atención.**

Esta publicación presenta cómo y en base a qué criterios técnicos, el programa peruano de producción de semilla libre de virus, trató de implementar un sistema de control de calidad fundada en conocimientos tecnológicos, coherente, eficiente, seguro y de bajo costo.

Se trata de describir las experiencias para aprender de los errores cometidos, y de uniformizar criterios y procedimientos. En la sección 3 se presentan 5 grupos de casos que pueden ocurrir, incluyendo investigaciones simples de problemas virológicos que contribuyen a la producción de una semilla de alta calidad. Estos 5 grupos ilustran los criterios que se tienen que tomar en cuenta, según las experiencias adquiridas en este programa.

Luego, en la sección 4 se presentan criterios científicos de la estadística para explicar más a fondo como hay que planificar los muestreos y pequeños experimentos, en el contexto del control de calidad, si uno quiere obtener resultados concluyentes del chequeo serológico.

Se espera que esto ayude a tomar las decisiones correctas en situaciones y casos similares a los que son descritos aquí.

2. ORGANIZACION DEL CONTROL DE CALIDAD

Determinar la calidad fitosanitaria de una semilla de papa para poder garantizarla, significa en la práctica **comprobar la sanidad de una muestra** de tamaño determinado, **de la semilla respectiva**, con el método señalado. Este método puede ser, por ejemplo, la evaluación visual del follaje de plantas de papa o el chequeo serológico de tejidos foliares, tubérculos o brotes. Las ventajas y la técnica del chequeo serológico, particularmente del método ELISA, están descritos en otra publicación del PIPA (2). Aquí se quiere hablar sobre todo del **aspecto institucional y organizativo del control de calidad**: ¿**Quién** lo hace y **se responsabiliza** de él?. En ciertos países un productor de semilla de papa (que puede ser una institución o un agricultor particular) puede contratar una empresa que ofrece el servicio de chequeos serológicos, para ejecutar el control de calidad.

En el Perú no existe esa posibilidad. La Ley de Semillas define que la **certificación de la semilla** (es decir la garantía de la calidad de una semilla vendida con etiqueta oficial) es responsabilidad del Ministerio de Agricultura. **Esta ley estipula la evaluación visual del follaje y de tubérculos como método de control de sanidad de la semilla.**

Las **limitantes principales** para que ese tipo de certificación sea efectiva, bajo las condiciones actuales, son: el **conocimiento muy limitado de la sintomatología de los virus** bajo condiciones de la Sierra y en las variedades bajo cultivo; los **escasos fondos** para movilidad y viáticos para la inspección de campos; las **escasas posibilidades de control** para asegurar que la semilla ofrecida es realmente aquella que se inspeccionó; y los **numerosos canales de intercambio de semilla** entre productores de diferentes sistemas de producción [generalmente clasificados en sistema formal e informal (10)], que hacen imposible un control efectivo del flujo de la semilla a nivel nacional.

Investigaciones del PIPA comprobaron que la sintomatología visual de los virus de papa es muy variable bajo las condiciones ambientales de la Sierra Peruana, en cuyos campos se multiplica la mayor parte de la semilla de papa. Además, la sintomatología depende mucho de la variedad. Por lo tanto, bajo esas condiciones, la **detección de los virus**

de la papa **por evaluación visual** es muy problemática y no confiable. Por el contrario, los **métodos serológicos** (en particular el método ELISA) resultaron ser **mucho más eficientes** para detectar una infección virótica (9).

En base a estas realidades se decidió en el programa peruano, que lo más apropiado para mejorar la calidad de la semilla a nivel nacional, era el producir un núcleo de semilla de cantidad limitada, pero de calidad excelente (comprobada por chequeos serológicos) y distribuir eficientemente esta semilla por los canales ya existentes.

Los agricultores, tanto pequeños productores como semilleros, mostraron gran interés en la semilla producida y distribuida por el INIAA desde 1983, para la renovación periódica de sus propios stocks de semilla. Para **garantizar la calidad de la semilla** distribuida por el INIAA, de tal manera que en ningún momento se distribuyera semilla de inferior calidad bajo la denominación de básica, el mismo INIAA tenía que **establecer un sistema de control de calidad** de la semilla que producía; tal como lo hace una empresa privada que depende de la confianza de sus clientes en la calidad del producto ofrecido.

Teniendo esas necesidades en mente se implementaron laboratorios de virología en el INIAA y se capacitaron especialistas para que ellos puedan controlar la sanidad de la semilla que producían. A la garantía de calidad obtenida por este medio se le llamó «**control interno de calidad**», diferenciándolo así de «**certificación**» que es un término utilizado para la actividad que debe efectuar el Ministerio de Agricultura, según la ley.

3. EL CONTROL INTERNO DE CALIDAD CON ELISA

En la mayoría de los casos el método ELISA es de suma utilidad para la producción de semilla de alta calidad. Esos casos se pueden categorizar en los 5 siguientes grupos:

1. Semilla producida en laboratorios e invernaderos.
2. Semilleros sospechosos.
3. Seguimiento de la infección de lotes de semilla básica.
4. Descarte de lotes de semilla, como semilla básica.
5. Investigación de problemas virológicos.

3.1 SEMILLA PRODUCIDA EN LABORATORIOS E INVERNADEROS

Propósito del chequeo:

El propósito de los chequeos es el de **detectar** una eventual infección **al instante** y de **apoyar la erradicación** de la misma con las menores pérdidas posibles.

Para evitar malentendidos es necesario **definir** claramente los siguientes **términos**:

Planta madre: Son plantas procedentes de plántulas *in-vitro* o tubérculos, sembrados en macetas en invernaderos, que sirven para obtener tubérculos y/o esquejes que serán *sembrados en invernaderos*.

Mantenimiento de tejido vegetal: Es el almacenamiento de plántulas *in-vitro*, a largo plazo, para *finés de conservación* del material libre de virus.

Multiplificación de tejido vegetal: Es la *propagación in-vitro* de tejido vegetal para *finés de siembra* en invernaderos.

Es obvio que en los invernaderos y laboratorios de tejidos **no podemos tolerar ni una sola planta infectada**, pues cualquier infección se diseminaría rápidamente debido a los múltiples manipuleos que sufren las plantas.

También en el caso de las plantas madres se requiere la seguridad absoluta de que **ninguna planta está infectada** lo que justifica que se chequeen la totalidad de las plantas. Además, ello elimina la posibilidad de una diseminación muy rápida de la infección, en el caso de que una planta esta infectada.

Metodología:

Un muestreo de cualquier tipo de material es responsabilidad del virólogo; no se le puede encargar al personal de laboratorio *in-vitro* o invernadero.

El tejido vegetal se chequea para PVX, PVS, APMV, APLV, PVY y PLRV.

La producción de semilla básica en el programa peruano, por métodos innovativos, requiere diferentes etapas y pasos de producción y multiplicación del tejido vegetal, libre de virus (Figura 1). A continuación se explica el esquema de chequeo adoptado para cada paso de producción:

1. Al pasar *plántulas in-vitro* en el laboratorio de «mantenimiento» a «propagación» **se chequean los residuos** (hojas e internudos) **de cada tubo** de ensayo.
2. Los residuos de *plántulas cortadas para fines de propagación* **no se chequean**, salvo en el caso de que se este procediendo a un saneamiento.
3. Se debe **chequear el 100% de las plantas madres**. El chequeo se hace cuando estas plantas tienen de 15 a 20 cm de altura.

4. **Se chequea el 5%** de las plantas sembradas en invernadero como plántulas *in-vitro* en camas o macetas, si sirven para producir tubérculos o esquejes de tallo lateral, destinados al campo.

Se les chequea cuando tienen 20 cm de altura. Se muestrea cada vigésima planta. Esto se justifica por lo siguiente: En caso de detección de la infección virósica de una plántula, uno puede asumir que por lo menos todas las plántulas provenientes de una magenta están contaminadas. Por lo tanto es suficiente chequear 1 plántula por magenta para poder identificar el origen de una infección. Normalmente hay 20 plántulas en una magenta y en caso de que se siembre **una** plántula *in-vitro* por golpe en cama o maceta, y las 20 plantas por magenta una a continuación de la otra, cada planta del total de 20, significa el 5%.

En caso de no sembrar 20 plántulas por magenta o sembrar más de una plántula por golpe, se debe **modificar la metodología del muestreo** pero siempre de tal manera que se chequee 1 plántula por magenta y que cada planta se pueda identificar como correspondiente a una magenta determinada.

Para que se pueda **identificar** de que **magenta** proviene la **infección**, en caso de que una muestra resulte infectada, es necesario que el número de plantas por magenta y/o el número de plantas por golpe sea uniforme y que las magentas así como el material de cada magenta se siembre en posiciones consecutivas (macetas o posición en cama), sembrando cada magenta y las plántulas pertenecientes a ellas, una tras otra. Las plántulas que se muestrean se identifican con estacas de plástico numeradas del 1 al 90 (se tienen 96 pocillos para muestras en una placa de ELISA, seis pocillos son usados por los controles sanos, infectados y buffer) de manera que el número en la estaca coincida con el número de la bolsa en que

se guardó la muestra y del hoyo en la placa de ELISA. Una vez que se dispone de los resultados y que estos indican que todas las muestras son negativas, se pueden retirar las estacas para usarlas de nuevo, sin borrar los números, en un próximo chequeo. En caso de que se encuentre una planta positiva (o una reacción dudosa) se chequea una nueva muestra de la misma planta para tener seguridad absoluta en el resultado.

5. Si se siembran en el invernadero *tubérculos* (tuberculillos o tubérculos de cualquier tamaño) o *esquejes* (de tallo lateral, brote, etc.) en camas con la finalidad de que su *cosecha sea sembrada en el campo*, se procede de la misma manera que en el caso anterior, es decir **se chequea** también el **5% de las plantas**. También en este caso es necesario identificar las plantas chequeadas para por lo menos poder muestrear nuevamente las mismas plantas si se han presentado reacciones dudosas. Sin embargo, una reacción positiva significa que todo el lote de siembra está afectado y no solamente, como en el caso de las magentas, 20 plántulas. A continuación se explica que consecuencias tienen reacciones positivas en ELISA en los diferentes posibles casos.

Que hacer en caso de reacciones positivas en ELISA:

Las *siguientes acciones* se toman en el caso que se presenten *reacciones positivas* en ELISA:

Antes de iniciar **acciones** es necesario que el virólogo tenga la **seguridad absoluta** de que se trata de una reacción positiva.

En casos dudosos se deben tomar nuevas muestras y repetir *inmediatamente* el chequeo, o utilizar la misma muestra macerada en el tampón de extracción de ELISA y almacenada a 4°C por no más de 1 día (caso de plántulas *in-vitro*).

Una vez **comprobada la infección** (cualquiera que sea) se debe informar **inmediatamente** al jefe del programa en su centro de producción y también al director del programa a nivel nacional. Esto debe hacerse incluso si se trata solamente de una planta.

Conjuntamente con los responsables del laboratorio *in-vitro* e invernadero, el virólogo debe enseguida:

- poner en marcha un **plan de acciones** con el fin de delimitar el grado de infección,
- **sanear** completamente las **instalaciones** (eliminar material enfermo y desinfectar) y
- **planificar el abastecimiento futuro** de los invernaderos.

En el programa peruano, el **saneamiento** de un laboratorio *in-vitro* se hizo necesario en tres casos, entre 1983 y 1989. Como resultado se produjo un desfase de 4 meses en la producción de semilla pre-básica de la variedad correspondiente. Por eso se recomienda almacenar un stock de tuberculillos producidos en invernaderos, provenientes de plantas chequeadas al 100%, aptos para su siembra en invernaderos; ello permitiría superar por lo menos parcialmente desfases de esta naturaleza.

Las **medidas específicas** que uno debe tomar en caso de que se **detecte una infección** en uno de los diferentes niveles de producción de tejidos libres de virus, representados por los 5 pasos de producción indicados en la Figura 1, se describen a continuación:

Paso 1: Una o más plántulas in-vitro que pasan de “mantenimiento” a “multiplicación” están infectadas:

Se debe identificar el tubo o tubos de donde provienen la plántula o plántulas que dieron reacción positiva y chequear los residuos de las plántulas hermanas y madres respectivas. Debe mantenerse solamente el material procedente de tubos chequeados que resulten sanos. **Es necesario eliminar la totalidad del material procedente de tubos positivos.** En caso de que sea necesario eliminar todo el material disponible, se debe pedir 3 tubos de la misma variedad a otro laboratorio del programa, que mantiene la misma variedad para estas situaciones de emergencia, según plan establecido.

Paso 2: Una o más plántulas in-vitro que están en «multiplicación» están infectadas:

Se procede como en el paso 1.

Una vez eliminado todo el material infectado se chequean, por un período de dos meses, los residuos de cada paso de la propagación *in-vitro*.

Paso 3: Una(s) planta(s) madre(s) está(n) infectada(s):

El muestreo debe haberse hecho de tal forma que permita relacionar una reacción positiva con la maceta respectiva. Se elimina la planta de esta maceta y también las plantas vecinas. Como se chequearon el 100 por ciento de estas plantas madres, es casi seguro que las demás no están infectadas; sin embargo, pudieron contaminarse de la planta enferma. Además, es necesario hacer llegar la voz de alarma al laboratorio *in-vitro e invernadero*, porque la infección debe haber venido de algún sitio y por lo tanto es necesario que los responsables correspondientes (de invernadero y laboratorio *in-vitro*) traten de identificar las posibles maneras como se pueda haber producido la infección.

Pasos 4 y 5 : Se detecta(n) una(s) planta(s) infectada(s) con el muestreo de plantas en cama o macetas:

A fin de explicar los criterios a considerar para la toma de acciones a este respecto se presentarán los siguientes casos como ejemplos:

Camas sembradas con esquejes o tuberculillos: En una cama de 1000 plantas, sembradas como esquejes, se chequearon 50 plantas (5% del total, muestreando cada vigésima planta) y se encontraron 8 positivas. Como no se habían identificado las plantas chequeadas como se debería, se tomó, para comprobar la infección, 100 muestras más al azar. Se encontraron 12 positivas. Había entonces 13% de las plantas con una infección. El encargado del invernadero eliminó inmediatamente estas 12 plantas positivas más las plantas que rodeaban a éstas.

¿Era suficiente esto? No. Primero, porque las primeras 8 plantas no identificadas pero determinadas como infectadas, muy probablemente no se eliminaron y segundo, porque de las 850 plantas que no se chequearon (se chequearon 50 + 100), también aproximadamente el 13% deben estar infectadas. **Por lo tanto es necesario descartar toda la cama**, porque la única alternativa segura para evitar la presencia de plantas infectadas en el invernadero hubiera sido el chequeo completo de todas las plantas restantes, proceso que iba a costar mucho tiempo y materiales caros (antisuecos etc.), para salvar unas pocas plantas.

Camas sembradas con plántulas *in-vitro*: Existen 2 posibilidades: La *infección proviene de magentas con plántulas infectadas*, o la *infección se produjo recién en la cama*. Si la infección proviene de magentas, es posible identificar la magenta productora de las plántulas infectadas, si se identificaron las plantas muestreadas con una etiqueta como se

indica arriba (3.1, 4). Luego es posible investigar si las magentas hermanas o madres de la magenta con plántula infectada también están infectadas. En todo caso será necesario chequear y sanear el laboratorio *in-vitro* (ver “Que hacer en caso de reacciones positivas en ELISA”, pag.9). **En las camas deben eliminarse todas las plantas** procedentes de magentas que produjeron una o más plántulas infectadas (magentas contaminadas), y también de magentas con plántulas provenientes de magentas contaminadas. Si quedan todavía plantas en las camas, es necesario muestrear de nuevo el 5% de este material y chequearlo para tener la seguridad de que está libre de virus, antes de sembrar nuevo material al costado de las plantas restantes.

Es necesario entonces que en todo caso, en primer lugar se **identifique todo el material hermano y procedente** de la(s) planta(s) positiva(s). Esto puede incluir una cama o varias camas o todo un grupo de macetas etc. En este material **se chequea el 20%** de las plantas (en caso de plántulas *in-vitro* trasplantadas, producidas en grupos de 20 por magenta, serían 4 plántulas por magenta), **para determinar el grado de infección** y después *se elimina todo este material*, descartando el sustrato y desinfectando las camas o macetas.

Se enfatiza que es **indispensable descartar el conjunto de material que forma una unidad de producción** y dentro del cual se detecta(n) infección(es). El material que forma una unidad de producción puede ser: i) el material de una sola magenta, ii) todo el material producido a partir de una magenta, iii) material proveniente de un tubo contaminado, iv) toda una cama sembrada con esquejes de plantas madres infectadas, v) toda una cama sembrada con tuberculillos de la misma procedencia, vi) toda una cama si las plantas se contaminaron por el mal manejo del invernadero.

3.2 SEMILLEROS SOSPECHOSOS

Propósito del Chequeo:

El control o chequeo de un semillero en la parte foliar se justifica cuando por su apariencia se teme que la semilla de este semillero ya no tenga la calidad que le hace merecer el calificativo

El control o chequeo de un semillero en la parte foliar se justifica cuando por su apariencia se teme que la semilla de este semillero ya no tenga la calidad que le hace merecer el calificativo de básica. Por ejemplo: En un semillero básico se observan síntomas de virus en un porcentaje alarmante (más del 6%). Se quiere investigar si realmente son infecciones virósicas las que causan los síntomas, ya que síntomas similares a los virósicos pueden ser causados por otros factores bajo condiciones ambientales de la Sierra (9). De confirmarse la infección se necesita entonces saber qué virus es y en lo posible como ocurrió que se infectó tanto la semilla (¿tal vez se cambió la semilla?). Se espera además obtener información para realizar el “roguing” (descarte de plantas viróticas) y para determinar si hay que descartar el lote como semillero básico.

Metodología:

Antes de muestrear gran cantidad de plantas para comprobar infecciones virósicas, deben descartarse los casos en los cuales es evidente que los síntomas no pueden ser virósicos. Por ejemplo: Síntomas de enrollamiento de las hojas en todos los niveles del follaje, se presentan solamente en un sector bien delimitado de un campo que ha sido sembrado en su totalidad con exactamente la misma semilla, en la Sierra Peruana. En este caso es improbable que sean síntomas virósicos procedentes de la semilla, porque aquellos tendrían que estar distribuidos al azar en el campo. Al mismo tiempo es improbable que sean síntomas primarios, porque en investigaciones del PIPA se comprobó que síntomas primarios normalmente no se presentan bajo condiciones de la Sierra Peruana.

El conocimiento de la sintomatología y ecología de cada virus es entonces importante, pues facilita la definición sobre si los síntomas pueden ser causados por una infección virósica o no.

En caso de que no se pueda excluir de antemano el origen virósico de los síntomas, se pueden distinguir **2 estrategias de muestreo**:

1. Cuando se presentan **síntomas de un solo tipo**.

Se muestrean 10 plantas que presentan *los mismos síntomas*, describiendo lo más exacto posible esa sintomatología, y 10 plantas que no presentan síntomas, se chequean esas 20 muestras por ELISA. Los chequeos por ELISA se deben realizar para todos los 6 virus.

Se determina en el semillero el porcentaje de plantas que presentan esos síntomas. Para determinar este porcentaje se divide el campo en 2 mitades, en la dirección de los surcos. Se camina luego en una mitad a lo largo de un surco.

Se recorren diez pasos (los dos últimos con los ojos cerrados) y se evalúa luego la planta que queda en el surco al costado del pie derecho. Se sigue tomando muestras cada 10 pasos y al llegar al borde del campo se regresa evaluando de la misma manera en un surco de la otra mitad del campo. Se prosigue así hasta totalizar por lo menos 100 plantas evaluadas y se calcula el porcentaje respectivo.

Al final se establece la relación entre las plantas con síntomas y los resultados de la prueba de ELISA para determinar el porcentaje de plantas afectadas por los virus identificados.

2. Cuando se presentan **diferentes tipos de síntomas**. Este es el caso en que se necesita **conocer el nivel aproximado de la infección total de un semillero** en el cual se presentan diferentes tipos de síntomas, pero existen dudas justificadas sobre si son síntomas virósicos o si son causados por otras razones.

Se muestrean 100 plantas distribuidas por todo el campo al azar. El muestreo se hace de la misma manera como la evaluación visual de los síntomas, descrita para la estrategia 1), es decir sin dejarse influir por la apariencia de las plantas.

Tres ejemplos ilustrarán como deben aplicarse las dos estrategias de muestreo:

Ejemplo 1:

En un semillero básico de la variedad Yungay (*Solanum tuberosum ssp. tuberosum x ssp. andígena*), se observan síntomas de amarillamiento en aproximadamente 10% de las plantas. El responsable del semillero envió muestras de 10 plantas escogidas al azar al laboratorio y 2 muestras resultaron positivas para PVX. ¿Qué significa este resultado?. Que el 20% de las muestras están infectadas, pero el intervalo de confianza ($P \geq 95\%$) va desde 3 hasta el 56% (Figura 2).

Por lo tanto, **se tiene que descartar el semillero como básico**, pues 3% de PVX sería una infección tolerable pero 56% no. Además, no se puede sacar ninguna conclusión para realizar el descarte, porque no se había registrado la sintomatología de cada muestra. Por otro lado no se sabe si el síntoma de amarillamiento está relacionado con la presencia del virus.

Ejemplo 2:

El responsable de un semillero básico de la variedad Yungay reportó 30% de plantas con «mosaico severo». Se chequearon 10 plantas con síntomas y 10 plantas sin síntomas. Mientras que las 10 plantas sin síntomas resultaron negativas en ELISA, de las 10 con síntomas 3 resultaron ser infectadas con PVX y PMV y 3 con APMV. Revisando la descripción de la sintomatología de PVX y APMV en las referencias pertinentes, se encontró que la infección combinada de estos dos virus puede producir un mosaico rugoso y una reducción del tamaño de los folíolos. Se decidió entonces hacer un segundo

muestreo, evaluando los síntomas más cuidadosamente, distinguiendo entre **mosaico rugoso**, **mosaico pronunciado** pero sin reducción de tamaño de los folíolos, y **mosaico suave o leve**.

Se buscaron 10 plantas con mosaico rugoso, 10 con mosaico pronunciado y 10 con mosaico suave. Por medio de ELISA se comprobó que el primer síntoma estaba ligado a infecciones con el complejo PVX más APMV y el segundo a la presencia de APMV. Los mosaicos suaves no eran causados por los virus para los cuales se chequeó.

Bajo el liderazgo del virólogo se descartaron las plantas que pertenecían a las 2 primeras categorías de síntomas (aproximadamente 5%) y se logró salvar el semillero.

Ejemplo 3:

En un semillero sembrado con semilla básica de la variedad Tomasa Condemayta (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum* x ssp. *andígena*) se encontró hasta un 20% de plantas con diversos síntomas parecidos a los causados por virus. También se detectaron otras enfermedades. Las plantas con síntomas se concentraban en la parte baja del semillero. Además, en un semillero sembrado en otra localidad con semilla del mismo lote (semilla hermana) no se percibió más que 2% de plantas con síntomas. En base a estos hechos el virólogo propuso que los síntomas son causados por desorden fisiológico y no por enfermedades transmitidas por semilla. Para convencer al comprador y a las autoridades de certificación, se analizó una muestra de 100 plantas escogidas al azar en todo el semillero. Resultó que el semillero tenía 2% de PVX, 1% de PVS y 1% de APLV, es decir que la semilla sembrada en este semillero era de buena calidad y que la cosecha de este campo todavía merecía ser sometida al chequeo del control interno de calidad.

3.3 SEGUIMIENTO DE LA INFECCION DE LOTES DE SEMILLA BASICA

Las decisiones y acciones tomadas en el programa peruano con respecto al tema de esta sección, y presentadas a continuación, servirán como ejemplo para explicar el propósito y la metodología del seguimiento.

Propósito del Chequeo:

El actual programa de semilla básica del Perú se empezó en 1983 con la hipótesis de que se puede producir una «buena» semilla, si se multiplica semilla inicial totalmente libre de virus, por dos campañas consecutivas por encima de los 3200 msnm y si se realiza durante estas dos multiplicaciones un “**roguing**” estricto (descarte de plantas en base a la sintomatología visual del follaje). No se fijaron metas cuantitativas referentes al nivel de infección virótica de esta «buena» semilla. Se decidió denominarla «*básica*» lo que significa que debería cumplir por lo menos con los criterios establecidos por la ley (7% de mosaicos suaves ó 3% de mosaicos severos o de enrollamiento virósico de hojas en la segunda evaluación del semillero, por sintomatología visual de la parte foliar).

Se acordó que durante los primeros años del programa se iba a medir el nivel de infección que se iba acumulando durante la multiplicación de la misma semilla año tras año para luego **fijar**, en base a esta experiencia y a investigaciones de la merma en producción por efecto de los diferentes virus, los **límites de infección para semilla básica** producida por el programa. Era además indispensable conocer el nivel de infección de cada lote producido bajo la dirección del programa antes y después de cada campaña para que con esta información se pudiera mejorar la eficiencia técnica de la producción.

Metodología:

El seguimiento se realizó hasta 1988, chequeando *muestras de la parte foliar* de las plantas de algunos semilleros. Para determinar el nivel de infección de un lote de semilla se muestreaba el semillero que se sembró con esta semilla, en la campaña siguiente. **Se chequearon por ELISA 300 plantas**, escogidas al azar, cuando éstas tenían aproximadamente 15 cm de altura, (es decir, antes de que pueda haber ocurrido una infección primaria, pero no en un estado demasiado joven cuando podrían presentarse reacciones específicas en la prueba de ELISA).

No era posible realizar este seguimiento con todos los lotes de semilla básica del programa, por limitaciones de las facilidades disponibles y el volumen de trabajo, pero lo hecho permitió por lo menos verificar la hipótesis basada en la cual se empezó a producir semilla encima de 3200 msnm en 1983 (ver arriba: propósito del chequeo).

Con este seguimiento se obtuvieron las **siguientes informaciones:**

La semilla «básica» de la variedad Mariva (*S. tuberosum ssp. tuberosum x ssp. andígena*) alcanzaba en 1984, después de la primera multiplicación en campo un nivel de infección de 1.8% (entre los 6 virus). En 1985 la semilla alcanzaba 1.5% y en 1986 la siguiente generación alcanzaba 1.0% (estos porcentajes tienen sus *límites de confianza* que incluyen todos estos valores: Alcanzan de 0.01 hasta 2.3% para un tamaño de muestra de 300; ver sección 4). Por lo tanto se puede concluir que los porcentajes obtenidos no se diferencian significativamente.

Todos los chequeos se realizaron en hojas, durante los meses de Noviembre/Diciembre del año respectivo, cuando la semilla a ser chequeada ya estaba sembrada y emergida. Se comprobó que no se había incrementado la infección virótica, más allá de lo permitido, en los 3 primeros años de multiplicación; se concluyó

que es posible realizar tres multiplicaciones en campo sin comprometer al producto final, siempre y cuando el manejo de los semilleros sea adecuado (aislamiento, descarte, etc.). El hecho de que no se incrementó el nivel de infección en el transcurso de las tres generaciones refleja la utilidad y la eficiencia del descarte. Aquel es alto sobre todo para variedades como Mariva, una variedad que expresa bien los síntomas visuales de la infección virótica. **Desde entonces se realizan en el programa 3 multiplicaciones antes de vender o distribuir la semilla.**

El seguimiento de la infección de lotes de semilla se puede hacer también por el chequeo con ELISA de una muestra de tubérculos tomados al azar de la cosecha. Los resultados así están disponibles entre 4 y 8 semanas después de la cosecha. Sus ventajas técnicas y desventajas se discuten en la siguiente sección.

3.4 DESCARTE DE LOTES DE TUBERCULOS COMO SEMILLA BASICA

Propósito del chequeo:

En la sección anterior se explicó como se llegó a la conclusión de que la multiplicación en campo por 3 años es posible (con el manejo apropiado), sin perder calidad. Por lo tanto en los primeros años del programa (entre 1983 y 1988) la semilla proveniente de tejidos libres de virus se multiplicó 2 y hasta 3 veces en el campo. Se manejó esta semilla lo mejor que era posible y se vendió la semilla resultante como básica.

Todos los especialistas del INIAA se esforzaron en producir la mejor calidad y los resultados del seguimiento de la infección en los lotes de semilla básica señalaron que es perfectamente posible, bajo las condiciones de la Sierra Central del Perú, producir así una semilla que cumpla con los requisitos de una semilla básica.

Sin embargo, en muchos casos, la producción se tiene que realizar más y más en convenio con agricultores u otras instituciones (p.e. si la estación del INIAA no tiene suficiente terreno para producir la cantidad necesaria de semilla). Esto disminuye el grado de supervisión de los trabajos por los especialistas del INIAA. También hay que considerar el interés económico de los agricultores. Los precios superiores que alcanza la semilla de calidad son un incentivo para que los productores deseen producirla, pero no garantizan que los agricultores aplicarán todas las medidas necesarias para mantener la calidad. Por lo tanto se tenía que pensar en un procedimiento que permita juzgar el producto final dentro de poco tiempo (es decir, lo más pronto posible después de la cosecha). Era necesario **garantizar la calidad de toda la semilla básica producida** y se buscaba un **método que permitiera descartar todos los lotes que no cumplieran con ciertos requisitos de calidad**; por ello se procedió según la metodología que se describe a continuación.

Metodología:

Todos los servicios de certificación y control se vieron confrontados en el pasado con un problema crucial: no pueden garantizar que la semilla que recibe el certificado provenga del semillero que han inspeccionado. Para superar este problema, muchos servicios de certificación en diferentes países están aprovechando ahora de la posibilidad de **chequear los tubérculos** por ELISA. Este método permite obtener resultados dentro de 4 a 8 semanas después de la cosecha. Es decir, no se espera la compañía consecutiva a aquella en la cual se produjo la semilla para chequear el follaje de las plantas. Se chequean directamente los tubérculos de la misma semilla a juzgar.

Durante 1988 se investigó en un laboratorio del programa, en el departamento de Junín, la posibilidad de determinar el nivel de infección por chequeo de los tubérculos por medio de ELISA. Este tipo de chequeo tiene dos ventajas principales: 1) En el caso de venta de la semilla básica, se pueden descartar lotes que no merecen la denominación de básica y de esta manera **garantizar la**

*calidad de toda **semilla básica vendida**. II) Nadie se perjudica por desconocimiento del nivel exacto de infección de la semilla que recibe. No el programa del PIPA en caso de que la semilla este prevista para una multiplicación más dentro del programa, porque se evita que se siembre semilla de mala calidad en un terreno que se había reservado para la producción de semilla básica. Tampoco se perjudica el agricultor, en caso que la multiplicación se realiza en convenio con un agricultor, porque él no recibe una semilla que tiene un nivel alto de infección y de lo cual él no es responsable.*

La *organización del control interno de calidad por chequeos de tubérculos* se realiza de la siguiente manera:

El agricultor productor de semilla básica selecciona y envasa la semilla y avisa al responsable del INIAA. Este toma una muestra de 300 tubérculos al azar (algunos tubérculos de los costales seleccionados) e inmediatamente pone un sello en todos los costales (el agricultor cose los costales recién en este momento). Ver procedimiento específico de “muestreo de tubérculos ensacados” en 4.1

Los tubérculos de la muestra, identificada solo con un código, se entregan al laboratorio de virología para su chequeo virológico. Se almacenan todos los tubérculos durante 5 semanas bajo las mismas condiciones. Al final de las 5 semanas se empieza con el procedimiento del chequeo por ELISA para PVX y PLRV, ya sea directamente con un extractor de jugo de plantas o mediante pruebas para jugo de brotes [las instrucciones técnicas que se deben adoptar estrictamente para este tipo de chequeo han sido presentadas en otra publicación; (2)]. Cien tubérculos están destinados a un primer chequeo, otros 100 a un eventual segundo chequeo y 100 se guardan como reserva.

En consideración a la calidad de la semilla se distinguen los **3 casos** siguientes:

Primero: Si la muestra tiene hasta 2 tubérculos infectados con PLRV (igual a 2% de infección) y hasta 4 tubérculos con PVX (igual a 4% de infección), el laboratorio emite un informe al responsable del INIAA, indicando los porcentajes recomendando la aceptación de este lote como semilla básica, y se le acepta como tal.

Segundo: Si la muestra tiene 5 o más tubérculos con PLRV y/o 9 o más tubérculos con PVX, el laboratorio emite un informe recomendando el descarte, como semilla básica, de este lote. El representante autorizado del INIAA informa al productor y destruye inmediatamente todos los sellos de ese lote.

Tercero: Si el análisis de la muestra no resulta como en el primer o segundo caso, se chequea una segunda muestra de 100 tubérculos y se suman los resultados de la primera y segunda muestra. Si esta suma resulta en hasta 4 tubérculos, inclusive, con PLRV (2%) y hasta 8 tubérculos con PVX (4%), se recomienda la aceptación del lote como semilla básica, si no, se procede al descarte (ver segundo caso).

Durante todo ese tiempo (5-8 semanas), el lote de semilla bajo chequeo no se puede distribuir. Si el **informe** del laboratorio **recomienda el rechazo**, el responsable del INIAA informa al productor (y le entrega copia del informe) y **destruye los sellos**. Si se **recomienda la aceptación**, el responsable **entrega el informe** de laboratorio al productor y deja los sellos en su lugar. El **PIPA garantiza la calidad** de la semilla solamente si esta tiene el **informe** del laboratorio que recomienda la aceptación **y los sellos** colocados por el representante autorizado del INIAA.

¿**Por qué** se procede así en el programa peruano, cuales son las bases teóricas de estos criterios de rechazo o aceptación de un lote como semilla básica?

La prioridad la tiene el garantizar la calidad de la semilla, pero también es necesario considerar aspectos económicos. Se buscó entonces la forma de reducir los costos del chequeo ahorrando insumos (antisuecos etc.) y trabajo (hay un gran volumen de muestras a procesar en, relativamente, poco tiempo).

En vez de chequear para los seis virus se decidió chequear solamente para PVX y PLRV en la Sierra Central del Perú. PVX, siendo representante de los virus transmitidos por contacto, se consideró para el chequeo porque es el virus más frecuente en este ambiente (3, 11). PLRV, siendo representante de los virus transmitidos por áfidos, se consideró porque es el virus que causa más pérdida de rendimiento (4, 13).

Se fijaron los siguientes límites provisionales de infección: 2% para PLRV y 4% para PVX. Si una semilla supera uno de estos límites se chequean 100 tubérculos adicionales y se basa la decisión referente al descarte o aceptación del lote, en el resultado del total de los 200 tubérculos chequeados.

¿**Por qué** se basa esta decisión en el chequeo de 100 ó 200 tubérculos?

Si se encuentran por ejemplo 3 tubérculos infectados en 100 chequeados (3%) el intervalo de confianza respectivo de la distribución binomial alcanza desde 0.62 hasta 8.52%. Si se chequean 200 tubérculos y se encuentran 6 infectados (3%), el intervalo alcanza desde 1.09 hasta 6.46% (incluye entonces todavía el límite tolerable de 2%). Para tener la seguridad absoluta que el lote no tiene más que 2% de infección, se necesitarían chequear más de 1000 tubérculos: El intervalo de confianza para 3% de infección es en este caso 2.03 hasta 4.26%. El tamaño de muestra de 100 y 200 tubérculos respectivamente es un **óptimo**

entre la probabilidad de detección de una infección, la precisión del resultado en que se debe basar la decisión de rechazo o aceptación **y el costo del chequeo**. En otros programas de certificación, como por ejemplo el de Suiza se estudió esta problemática, encontrándose que a pesar de que un tamaño de muestra de 100 y 200 tubérculos, según los límites de confianza, no puede dar una garantía absoluta para el criterio de descarte, en la práctica el resultado satisface las necesidades del control.

La evaluación de la calidad de una semilla por chequeo de los tubérculos, según los lineamientos indicados, permite hacer la producción de las estaciones experimentales más eficientes. Sin embargo, existe **una desventaja** de esta metodología **si es el agricultor** el que vende la cosecha (producida en convenio o bajo supervisión de la estación): Bajo ciertas condiciones económicas (como necesidad de pago de un préstamo) el agricultor preferiría vender inmediatamente la semilla que ha producido, pero tiene que esperar las 5 hasta 8 semanas que se requieren para obtener los resultados del chequeo de los tubérculos. Por esto se requiere un acuerdo entre el INIAA, el agricultor y la entidad financiera involucrada, para postergar la devolución de los préstamos hasta que la semilla haya sido calificada como básica.

3.5 LA INVESTIGACION DE PROBLEMAS VIROLOGICOS

Propósito del Chequeo:

En la producción de semilla básica, dentro del control de calidad, surgen preguntas que pueden ser contestadas a través de un simple estudio, por ejemplo: un muestreo de tubérculos o plantas.

El propósito de estos experimentos es el de incrementar la eficiencia en la producción, fortaleciendo el control de calidad, es decir, la conservación de la calidad de la semilla básica.

Metodología:

En la mayoría de los casos se trata de determinar el nivel de infección en base a una muestra, tomada del total de tubérculos o plantas disponibles. El resultado del chequeo de esta muestra se toma como representativo del nivel de infección del total de los tubérculos o plantas de un lote de semilla. Este resultado obedece a las leyes de la estadística: Tiene un intervalo de confianza determinado.

En general se puede decir: Si el **número** de tubérculos o plantas chequeadas es **alto**, el **intervalo de confianza** es **pequeño**, es decir: Cuanto mayor sea el número de chequeos que se hacen, mayor será la precisión del resultado. Si el número es bajo, el intervalo de confianza es grande (Figura 2).

Es sumamente importante determinar exactamente el **objetivo de una investigación** antes de hacer el muestreo. En base a este objetivo se determina la **metodología**, el **tamaño de la muestra** y el **costo económico**.

Puede ser que, en un primer intento de armar un plan de investigación para un problema determinado, encontremos que un experimento no es factible porque, para obtener un resultado concluyente, el número de muestras (tubérculos o plantas) tendría que ser tan alto que el costo económico superaría los recursos disponibles (ejemplo en la sección 4.3.). En este caso habrá que buscar una modificación de la metodología hasta que resulte posible cumplir con los objetivos de la investigación con los recursos disponibles.

Los criterios estadísticos para analizar este tipo de problema se presentan en la sección 4.

4. CRITERIOS ESTADISTICOS PARA LA DETERMINACION DE PROPORCIONES

En esta sección se trata de explicar e ilustrar los criterios estadísticos principales que se deben tomar en cuenta, en los casos más comunes que se presentan cuando se efectúa el control interno de calidad, y la investigación virológica de primera necesidad, en un programa nacional. No se trata de un compendio de estadística, más bien de una ilustración y un ejemplo de los criterios a considerar, con la idea de ayudar a tomar las decisiones correctas, en casos que no están específicamente comentados en esta publicación.

4.1 DE LOS MUESTREOS

Si uno hace un muestreo de plantas en un campo para determinar la incidencia de virus en la semilla sembrada (por ejemplo muestreando 45 plantas escogidas al azar por lote de semilla del mismo origen), se trata de obtener una **muestra representativa** de todas las plantas presentes en ese campo. De la incidencia determinada en base a esta muestra uno quiere obtener información concluyente sobre la incidencia verdadera en la totalidad de las plantas.

El **muestreo** es entonces la metodología mediante la cual uno quiere obtener información que permita hacer inferencias acerca del total de individuos de donde se extrajo la muestra (de la población en estudio).

Una condición de suma importancia para obtener resultados verídicos y concluyentes es que el muestreo tiene que ser verdaderamente **al azar**.

A continuación se explica como se muestrea en el programa peruano:

Muestreo en el campo:

Se debe distribuir el muestreo de modo que cubra toda la parcela.

Si se propone muestrear 100 plantas en un campo de 0.5 ha. Se estima las medidas de este campo y se decide sobre el procedimiento del muestreo, por ejemplo: Se escoge cada decimo surco y se muestrea cada 10 pasos.

Hay que ser muy rígido: Si una planta es muy bonita u otra con síntomas virósicos muy pronunciados, uno definitivamente se deja influir por lo que percibe y no muestrea realmente al azar. Por lo tanto es necesario cerrar los ojos los 2 últimos pasos y muestrear la planta más cercana delante del pie derecho.

Una **muestra de hojas** se compone de un foliolo de la parte superior, media e inferior de la planta (2). Para las **muestras de tubérculos** en el campo se procede de la misma manera que para ubicar las plantas a las que se les va a tomar la muestra de follaje (foliolos) y se escoge un tubérculo central, sin problemas fitopatológicos evidentes (pudrición por hongos, bacterias, etc.), por mata seleccionada al azar.

Muestreo de tubérculos ensacados:

Acá nos referimos solamente al muestreo de tubérculos para fines del control de calidad, no para otros casos, como por ejemplo el muestreo de tubérculos para fines de investigación de la incidencia de virus en la semilla común.

La semilla producida bajo las directivas de la Estación Experimental, por un agricultor, debe estar envasada en sacos al momento de hacer el muestreo. Se deben muestrear 300 tubérculos de cada lote de semilla (sección 3.4.) y los tubérculos se deben tomar por lo menos de cada quinto saco. El número de tubérculos por saco se calcula en base a la cantidad de sacos presentes. Por ejemplo si hay 80 sacos, se deben muestrear de 16 sacos y resultan $300/16=19$ tubérculos por saco considerado. Para muestrear los tubérculos se deben vaciar el saco y escoger después al azar los 19 tubérculos. Inmediatamente después del muestreo se cosen y sellan los sacos.

Muestreo de tubérculos amontonados:

Para la semilla producida por y en terrenos de la misma Estación Experimental, no existe normalmente la posibilidad de un intercambio o una mezcla con una semilla de menor calidad, después del muestreo. La misma Estación tiene un gran interés en que la reputación de su semilla no se perjudique posteriormente por informes y observaciones desfavorables referentes a su calidad. En este caso, y también para la investigación de ciertos problemas virológicos, (por ejemplo la incidencia de virus en semillas comunes, que están amontonadas en algún lugar) se presenta la necesidad de muestrear los tubérculos amontonados y no ensacados. Hay que tomar la precaución de escoger, siempre al azar, tubérculos que están dentro del montón y no solamente los que están en la superficie.

4.2 DE LA DETERMINACION DE PROPORCIONES Y PORCENTAJES

Es posible de agrupar en **tres categorías** los casos más comunes y frecuentes que se presentan en un programa nacional que utiliza ELISA para detectar virus. La precisión de un porcentaje determinado en cada una de estas categorías se juzga diferentemente. A continuación se explican estas tres categorías:

Primera: *Determinar un porcentaje por muestreo de una población*

Existen casos en los que un solo muestreo del material de propagación bajo estudio (pueden ser plántulas in-vitro, esquejes o tubérculos), es suficiente para determinar porcentajes de infección y obtener resultados concluyentes. Ejemplo: Resultados del chequeo de plantas madres no tienen ninguna probabilidad de error, porque se basan en el chequeo de la totalidad de plantas madres y no de una muestra representativa de estas plantas.

En caso de que se hubiera sembrado una cama con tubérculos pre-básicos y que su cosecha está destinada a un campo afuera del invernadero, se chequea una muestra de determinado número de plantas (ver capítulo 3.1.). Por ejemplo: En una cama se siembran 2000 tubérculos sanos. Se muestrean 100 plantas al azar (5% de 2000), cuando tienen aproximadamente 15 cm de altura. Ninguna de las muestras resulta infectada. Este resultado tiene un intervalo de confianza según la distribución binomial que alcanza desde 0.00 a 3.62%, ($P=0.05$), porque se trata de un resultado basado en una muestra con tamaño determinado (100), de la totalidad de las plantas (2000). Significa que no es absolutamente seguro que no haya ninguna planta infectada dentro de las 2000.

Para evitar un resultado con cierta probabilidad de error existe solamente la alternativa de chequear las 2000 plantas.

Por razones económicas esta no es una alternativa factible. Chequear 2000 muestras para 6 virus representaría 10 hasta 20 días de trabajo de un virólogo y un costo de aproximadamente US \$618 para reactivos, antisueros y materiales, calculando con los costos reales del programa peruano. El chequeo de 100 plantas cuesta aproximadamente US \$31.

También existe una razón técnica por la que no es razonable el chequeo de todas las plantas: La cosecha de estas plantas se sembrará en el campo. Se puede tolerar cierta probabilidad de que ésta semilla esté infectada con virus con un porcentaje bajo. Vale enfatizar que lo que se tolera es una **baja probabilidad** de que pocas plantas de una totalidad estén infectadas, a pesar de que se muestreó y la muestra resultó totalmente sana. **De ninguna manera** se pueden **tolerar** que plantas de la muestra resulten infectadas; es decir, que existan en el invernadero **plantas infectadas**, que fueron **identificadas** por chequeo serológico.

Si esto sucediera hay que seguir estrictamente todas las medidas recomendadas y descritas en el capítulo 3.1. Se trata de evitar la posibilidad de que por el manipuleo constante de las plantas en el invernadero, el virus se disemine rápidamente.

Tanto los **criterios económicos como técnicos** deben tomarse en cuenta para decidir sobre la estrategia de muestreo.

Existen tablas con los intervalos de confianza (6). Cada planta o tubérculo muestreado es considerado como una repetición en este caso. En la Tabla 1 se presenta una de las tablas en mención.

Normalmente se publican tablas para el 95% de probabilidades; es decir, existe el 95% de seguridad de que el valor determinado esté dentro del intervalo señalado (o, lo que es lo mismo: La probabilidad de error es de 5%; $p=0.05$).

Estas tablas dan los intervalos de confianza en función de:

N = número de unidades examinadas (tubérculos, plantas),

x = número de unidades determinadas como infectadas,

Los porcentajes correspondientes a los valores **x** respectivos

Los límites de confianza correspondientes a los valores **x** respectivos.

Ejemplo: Se examinaron 200 tubérculos (**N**) y 11 (**x**) estaban infectados (5.5%): Los límites de confianza (con $p=0.05$) son 2.77 y 9.66%. Significa que existe 5% de probabilidades de que haya menos del 2.77% o más de 9.66% de tubérculos infectados.

Segunda: La comparación de promedios de porcentajes

En la **segunda categoría** se consideran los casos en los que se hacen muestreos múltiples para estimar un porcentaje de infección.

Ejemplo: Se desea determinar la incidencia de virus, en diferentes variedades, en semillas comunes de agricultores.

De cada variedad se incluye como mínimo 3 campos. De cada campo se muestrean 45 plantas al azar. No es necesario muestrear más plantas por campo para obtener un dato más preciso de cada campo (es decir; para disminuir el intervalo de confianza del dato del campo respectivo) porque lo que interesa es tener una idea de la incidencia promedio de todos los campos y no tener un valor preciso para cada campo. La variabilidad dentro de una variedad se manifiesta entre los diferentes campos tomados en cuenta.

Lo que se quiere saber es, si las diferencias determinadas entre los promedios para diferentes variedades se deben al efecto de las variedades (tratamientos) o si estas diferencias están dentro de la variabilidad causada por diferencias entre semillas y error experimental.

También en este caso se trata de tomar en cuenta **criterios económicos y técnicos** antes de decidir sobre la metodología a seguir. Se debe saber primero que cantidad de antiseros y reactivos están disponibles para esta investigación, cuales son las variedades más importantes y que zonas se deben incluir en el estudio. En base a todos estos factores se decide sobre el plan detallado de investigación.

En esta categoría se hacen entonces muestreos en diferentes poblaciones. Una población sería, en el ejemplo citado, la totalidad de las plantas de un campo. Para cada una de las diferentes poblaciones se determina (por muestreo) el porcentaje de plantas

infectadas. Se calcula el promedio de los porcentajes obtenidos para cada variedad. Después es posible **comparar promedios correspondientes a diferentes tratamientos** (variedades) por métodos estadísticos (descripción más adelante) que permiten decidir si una diferencia entre estos promedios se debe al **error experimental** o al **efecto de algún tratamiento**. En este caso no se trata entonces de datos discretos (número de muestras infectadas de la totalidad de muestras tomadas), sino de **datos continuos** entre 0 y 100 %.

Transformación de datos y análisis: Es posible comparar promedios de porcentajes con un análisis de variancia, pero es necesario transformar los porcentajes (arcoseno, raíz cuadrada, (8)) antes de su análisis. Con porcentajes sucede en muchos casos que no constituyen una población de distribución normal, además también sucede que las desviaciones estándares de promedios de aquellos datos que incluyen porcentajes altos o muy bajos, están muy altas también, es decir que existe una correlación directa entre promedio y desviación estándar. Por ejemplo: Cuanto mayor sea el promedio, mayor será su desviación estándar. Por lo tanto, es necesario primero “homogeneizar” los datos de porcentajes y darles las características de una población con distribución normal, con la transformación respectiva.

El análisis de variancia consiste en primer lugar en la **prueba de F** [ver una de las numerosas referencias al respecto (5), (8)]. La prueba de F se puede calcular para diferentes **diseños experimentales**, atribuyendo la variabilidad de los datos a diferentes factores (tratamientos, repeticiones) según el diseño escogido. El diseño del ejemplo presentado, de la comparación de la incidencia de virus en diferentes variedades, se puede considerar para el análisis con la prueba de F como diseño completamente al azar (DCA) por la siguiente razón: Se han escogido los campos de una variedad determinada completamente al azar. El campo «1» (repetición 1) de una variedad determinada

no esta relacionada con el campo «1» de otra variedad. Por el contrario, en un diseño de bloques completos al azar (DBCA) todas las repeticiones «1» están relacionados entre ellas por ejemplo por estar sembrados en el mismo bloque o corresponder al mismo tratamiento en diferentes bloques.

Si hay más de dos tratamientos es posible comparar los promedios individuales de los valores transformados con la **prueba de DLS** (Diferencia Límite de Significación), o en caso de numerosos tratamientos con la **prueba de Duncan**, pero solamente si primero la prueba de F resultó significativa.

Los siguientes criterios sirven para aplicar la transformación adecuada de los porcentajes (8):

Si los valores individuales son entre 30 y 70%: Ninguna transformación es necesaria.

Si los valores individuales son entre 0 y 30%: Transformación de raíz cuadrada [$\sqrt{x+0.5}$].

Si los valores individuales son entre 70 y 100%: Transformación de raíz cuadrada [$\sqrt{x+0.5}$].

Todos los otros casos (valores dispersos entre 0 y 100%): Transformación de arcoseno.

En caso que el valor es 0% ó 100% se lo reemplaza antes de transformarlo por $1/(4n)$ y $100- [1/(4n)]$ respectivamente (n = número de plantas o tubérculos considerados para calcular el porcentaje).

La problemática de la determinación de porcentajes por muestreo de una población, pero también por la determinación de promedios de porcentajes correspondiendo a diferentes muestreos es, que **pequeñas diferencias no se pueden detectar**. El tamaño de

muestra con límites de confianza que son suficientemente pequeños sería tan alto que por razones económicas ya no sería posible realizar la investigación. Se discute este problema en la sección 4.3.

Tercera: La comparación de frecuencias con la prueba de Chi-cuadrado

En una **tercera categoría** se pueden agrupar casos, que no caen en los 2 anteriores. Son casos, en los cuales se trata de investigar un problema, que consiste en la comparación de diferentes tratamientos, pero no es posible por diferentes razones calcular para ellos, promedios que sean apropiados para su evaluación por la prueba de F. Con la **prueba de chi-cuadrado** (5) se compara frecuencias de hechos determinados dentro de una población, para diferentes tratamientos, en base de muestreos con tamaño desuniforme de muestra. No se requiere una transformación de los datos. Sin embargo, también esta prueba tiene sus *límites para detectar pequeñas diferencias*.

Ejemplo: Se quería determinar la correlación entre síntoma virósico en el follaje de la papa y la infección virósica, en la Sierra Peruana. En un campo de la variedad Yungay (*S. tuberosum ssp. tuberosum x ssp. andígena*; semilla del agricultor) se observaron 270 plantas (escogidas al azar). Para cada planta se registró si tenía «síntomas típicamente virósicos» y después se analizó una muestra del follaje por medio de ELISA. Los resultados están presentados en la Tabla 2. Había 3 plantas que no reaccionaron con ningún antisuero aun cuando mostraban «síntomas de virus» (igual a 5% del total de muestras que no reaccionaron con ningún antisuero). Es decir plantas que resultaron sanas mostraron síntomas «virósicos», tal vez porque estaban infectadas por otras enfermedades o más probablemente porque la fisiología alterada por las condiciones ambientales produjo esta sintomatología. Otros estudios comprobaron que esta variedad muestra fácilmente

síntomas «virósicos» (mosaicos) bajo condiciones de la Sierra, a pesar que la planta está sana. Con la prueba de chi-cuadrado (tabla 3) se puede determinar, si la expresión de síntomas por un virus determinado se distingue significativamente de ese 5%, es decir: si plantas infectadas con un virus o una combinación de virus mostraban significativamente más síntomas que plantas sanas. Por ejemplo: Son 11% para PVX realmente mayor que 5% para «ningún virus» (Tabla 2). Resultó que plantas de esta variedad, infectadas solamente con PVX o infectadas solamente con PVS no tenían más síntomas que plantas sanas. Sin embargo, plantas infectadas con los dos virus conjuntamente mostraron síntomas más frecuentemente (aunque no todas, solamente 30%).

4.3 DE LOS INTERVALOS DE CONFIANZA

Si se calculan los intervalos de confianza para un porcentaje, frecuentemente se encuentra con que son muy grandes para el tamaño de muestra que se escogió, lo que significa que el porcentaje determinado no es muy preciso. Sin embargo, el grado de precisión necesario y por lo tanto el tamaño de la muestra depende de la **finalidad del chequeo**: Si se quiere conocer el nivel de infección de un semillero básico se espera un nivel de infección entre 2 y 4%. Se necesita un dato lo más exacto posible porque para semilla básica 1 ó 2% más o menos de infección puede significar mucho (sección 3.4). Se toma entonces un tamaño de muestra de 100 ó 200 tubérculos.

En otros casos, tal como el ejemplo presentado arriba sobre la incidencia de virus en diferentes variedades de semilla común (segunda categoría), un valor individual no necesita ser muy exacto; lo que quiere decir que en el ejemplo citado, el valor determinado para un campo no interesa tanto como el promedio para una variedad. Por lo tanto es más importante incluir muchos campos en el estudio para obtener un promedio representativo para cada variedad en vez de muestrear muchas plantas por campo.

Puede haber casos cuando aún **con muestras muy grandes no se logra la precisión** necesaria para llegar a conclusiones:

Ejemplo: Se quiere determinar si es necesario controlar los áfidos durante el almacenamiento de la semilla básica. Se sabe que alrededor del 1% de los tubérculos de semilla básica al momento de la cosecha tienen una infección con virus transmitidos por áfidos. Un aumento de esta infección durante el almacenamiento, hasta más del 2%, no se puede tolerar porque la semilla ya no merecería la denominación de básica. En un experimento se compararon el almacenamiento con y sin protección de insecticidas, con y sin mallas antiáfidos, y la combinación de ambos. Tratamientos que resultan en una infección final de más del 2% se deben rechazar. Pero, para detectar una diferencia significativa entre la semilla cosechada (con 1% de infección) y la semilla almacenada, con una infección final que sobrepasa el 2% será necesario chequear por lo menos 1000 tubérculos (límites de confianza de la distribución binomial para $N=1000$ y $x=30$ (3% de infección) con $p=0.05$: 2.03 y 4.26%). Normalmente este número de chequeos es prohibitivo por los costos, capacidad de trabajo del laboratorio, etc.

¿Cómo solucionar este problema? Algunas explicaciones se presentan en la sección 4.2; una solución metodológica se presenta en (1), donde se reporta una investigación, similar a la descrita arriba, realizada por el PIPA.

5. COMENTARIOS Y RECOMENDACIONES FINALES

Este manual tiene como finalidad presentar las experiencias del Programa Peruano de producción de tubérculos-semillas de papa, de alta calidad, con respecto a la metodología usada para verificar y garantizar esa calidad, sobre todo con relación a la detección y prevención de infecciones virósicas.

La experiencia del Programa Peruano constituye un ensayo de control de calidad, el que debe definirse bien. Es de suma importancia considerar aspectos biológicos (por ejemplo la expresión de síntomas bajo condiciones agroecológicas determinadas); aspectos estadísticos (cuales son los límites de confianza del resultado esperado) y aspectos económicos (de cuantos recursos dispongo para el ensayo, cuales son los costos de las operaciones para el control de calidad, cual es un uso eficiente de los recursos). Los resultados de estas consideraciones pueden ser en muchos casos contradictorios, por ejemplo: Para alcanzar un alto nivel de precisión se necesita un tamaño de muestra que requiere recursos económicos que sobrepasan las posibilidades actuales. Se trata entonces de buscar un compromiso entre los diferentes criterios mencionados para satisfacer los objetivos del control de calidad.

Otro aspecto de importancia crucial para un control exitoso de la calidad de la semilla es identificar bien los puntos estratégicos en los que debe efectuarse el control de calidad, dentro del esquema de producción y multiplicación de semilla de alta calidad, y las frecuencias adecuadas del control (figura 1). Cuanto menor sea la frecuencia de control dentro de dicho esquema, mayor será la cantidad de plántulas y/o tubérculos a eliminarse en caso de que se detectara una infección virótica que sobrepasa los límites de tolerancia.

Con la presente publicación se espera prestar un apoyo a especialistas en producción de semilla, que deban implementar un sistema de control de calidad de la semilla. Es evidente que no todos los detalles presentados pueden aplicarse a cada programa, sin su modificación

adecuada a las condiciones particulares de cada caso. Sin embargo, tomando en cuenta los criterios científicos básicos presentados en este manual dentro de la descripción del caso del Programa Peruano, se puede inferir que cada problema de control de calidad de tubérculo-semilla de papa tiene su solución, la que dará el resultado que se espera de dicho control: ofrecer una semilla de alta calidad al agricultor, para mejorar el potencial productivo y la sostenibilidad de la producción de papa.

6. REFERENCIAS

- Bertschinger, L., O. Cuyubamba, J. Carhuamaca T. y R. Aldana M. 1989. Transmisión de virus del enrollamiento de las hojas de papa y de virus Y de la papa en almacenes de productores de semilla básica en el Valle del Mantaro, Perú. *Fitopatología* 24 (2): 48-54.
- Bertschinger, L. y D. López H. 1990. El método ELISA: Posibilidades, problemas, soluciones: El caso del programa peruano. Programa de investigaciones en papa (PIPA), Proyecto SEINPA. INIAA. Ministerio de Agricultura. Lima. Perú.
- Bertschinger, L.; Scheidegger, U. C.; K. Luther; O. Pinillos y A. Hidalgo. 1990. Efecto de diferentes de virus sobre el rendimiento potencial de la papa y su interacción con el estado de brotamiento de la semilla en la Sierra Central del Perú. *Revista Latinoamericana de la Papa*, Vol. 7/8, pp.25.35.
- Bertschinger, L.; Scheidegger, U. C.; Muñoz, J. y A. Hidalgo. 1990. Efecto de diferentes virus sobre el rendimiento potencial de la papa y su interacción con el estado de brotamiento de tubérculos-semilla en la Costa del Perú. *Revista Latinoamericana de la Papa*, Vol. 7/8, pp.36-54.

- Calzada Benza J. 1970. Métodos estadísticos para la investigación. Ed. Jurídica S.A. Lima, Perú. pp. 594-612.
- Documenta Geigy. 1982. Tablas científicas. J.R. Geigy S.A., Basilea (ed.6). SADAG. Barcelona. España. pp. 85-103.
- Ezeta, F.N. y U.C. Scheidegger. 1985. Semilla básica: Un nuevo programa de producción y distribución para el Perú. CIP. Circular 13 (2): 1-5.
- Gómez, K.A. and A.A. Gómez. 1976. Statistical procedures for agricultural research with emphasis on rice. IRRI. Los Baños, Manila, Philippines. pp. 197.
- INIPA-CIP-COTESU. 1987. Informe anual 1986/87. Proyecto «Manejo y Producción de semilla para incrementar la productividad de la papa en el Perú». Convenio INIPA-CIP-COTESU. Lima. p. 16-A.
- Prain, G. and U. Scheidegger. 1988. User-friendly seed programs. Report of the Third Social Science Planning Conference. CIP. Lima. pp.1.
- Scheidegger, U. and K. Luther. 1987. Importance of potato viruses in the Peruvian Highlands. Abstract of paper presented at the 71st. Annual Meeting; The Potato Association of America, St. Paul, Minn. Aug. 2-6, 1987. In: A. Potato J. 64:456.
- Scheidegger, U. C. 1989. Experimentos de semilla de papa en campos de agricultores y su aporte al desarrollo de un programa de semilla. *En*: Ramakrishna, B. (ed.) Métodos y experiencias de investigación agrícola en campos de agricultores. VIII Seminario IICA-BID-PROCIANDINO. Quito, Ecuador. p. 132-143

Scheidegger, U. C.; L. Bertschinger; K. Luther; O. Pinillos; J. Muñoz y A. Hidalgo. 1994/95. El efecto de diferentes virus sobre el rendimiento potencial de la papa en la Sierra Central del Perú. Revista Latinoamericana de la Papa. Imprenta.

7. RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Pasos de la multiplicación de tejidos de papa libre de virus en el Programa de Investigación en Papa (PIPA/INIAA, Perú).

Figura 2. La relación entre el tamaño de muestra para chequeos virológicos y el intervalo de confianza en el caso de una muestra con 20% de infección.

Tabla 1. Límites de confianza de la distribución binomial con $p=0.05$ y $N=45$.

Tabla 2. Correlación entre la infección virótica detectada por ELISA en muestras del follaje y la expresión de síntomas en el follaje, de plantas de la variedad Yungay (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum* x ssp. *andígena*) en la Sierra Central del Perú.

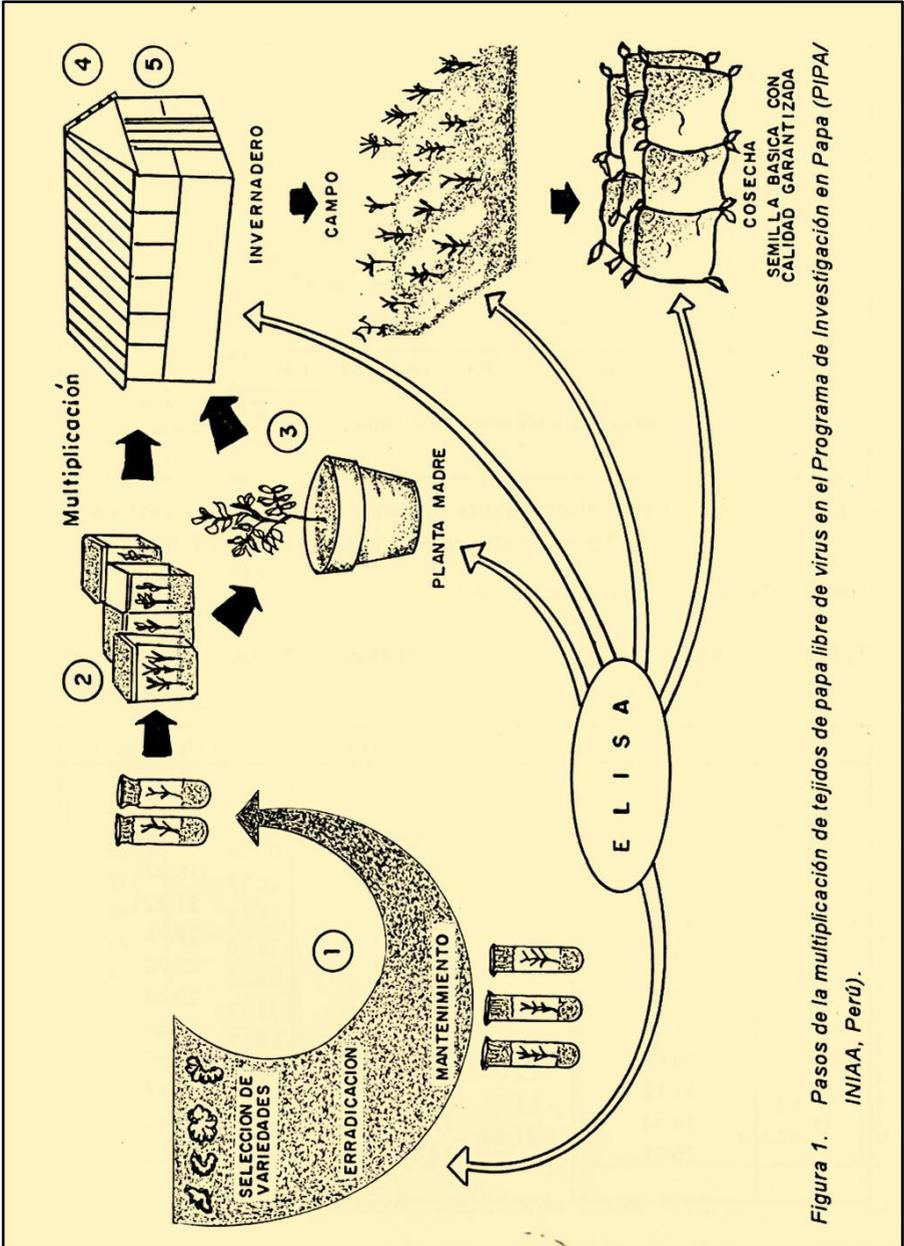


Figura 1. Pasos de la multiplicación de tejidos de papa libre de virus en el Programa de Investigación en Papa (PIPA/ INIAA, Perú).

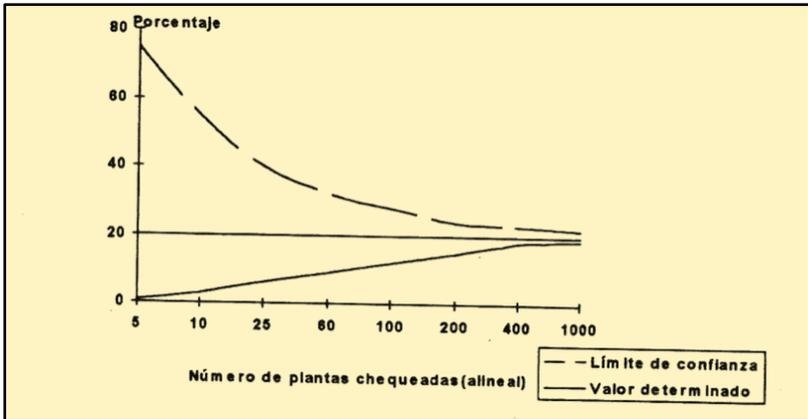


Figura 2: La relación entre el intervalo de confianza y el tamaño de muestra para chequeos virológicos en el caso de una muestra con 20% de infección.

Fuentes: Calzada, 1970; Ciba Geigy, 1982.

Tabla 1: Límites de confianza de la distribución binomial con $p=0.05$ y $N=45$

x	%	Límite izquierdo	Límite derecho
0	0.00	0.00	7.87
1	2.22	0.06	11.77
2	4.44	0.54	15.15
3	6.67	1.40	18.27
4	8.89	2.48	21.22
5	11.11	3.71	24.05
6	13.33	5.05	26.79
7	15.56	6.49	29.46
8	17.78	8.00	32.05
9	20.00	9.58	34.60
10	22.22	11.20	37.09
11	24.44	12.88	39.54
12	26.67	14.60	41.94
13	28.89	16.37	44.31
14	31.11	18.17	46.65
15	33.33	20.00	48.95

x	%	Límite izquierdo	Límite derecho
16	35.56	21.87	51.22
17	37.78	23.77	53.46
18	40.00	25.70	55.67
19	42.44	27.66	57.85
20	44.44	29.64	60.00
21	46.67	31.66	62.13
22	48.89	33.70	64.23
23	51.11	35.77	66.30
24	53.33	37.87	68.34
25	55.56	40.00	70.36
26	57.78	42.15	72.34
27	60.00	44.33	74.30
28	62.22	45.54	76.23
29	64.44	48.78	78.13
30	66.67	51.05	80.00
31	68.89	53.35	81.83
32	71.11	55.69	83.63
33	73.33	58.06	85.40
34	75.56	60.46	87.12
35	77.78	62.91	88.80
36	80.00	65.40	90.42
37	82.22	67.95	92.00
38	84.44	70.90	93.51
39	86.67	73.21	94.95
40	88.89	75.95	96.29
41	91.11	78.78	97.52
42	93.33	81.73	98.60
43	95.56	84.85	99.46
44	97.78	88.23	99.94
45	100.00	92.13	100.00

Fuente: Calzada Benza, 1970; Documenta Geigy, 1982.

Tabla 2: Relación entre infección virótica detectada por ELISA en muestras del follaje y la expresión de síntomas en el follaje, de plantas de la variedad Yungay (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum* x ssp. *andígena*) en la Sierra Central del Perú

Resultado de ELISA	Número de Plantas evaluadas			Porcentaje Con síntomas
	Total	Con síntomas	Sin síntomas	
Ningún virus	62	3	59	5
PVX solo	76	8	68	11
PVS solo	22	2	20	9
PVX + PVS	30	9	21	30
Otros virus o Combinaciones	80	-	-	-

Casos selectos de un estudio, realizado en el Valle del Mantaro, 1985/86 (9).

Tabla 3: Comparación de la expresión de síntomas típicamente virósicos entre plantas negativas en ELISA para 6 virus y plantas positivas para PVX mediante la prueba de Chi-cuadrado (ejemplo escogido de la Tabla 2).

Reacción en ELISA para	Síntomas		Total	Chi-cuadrado
	si	no		
Ninguno	3	59	62	0.46
PVX	8	68	76	0.37
Total	11	127	138	
Chi-cuadrado	0,76	0,07		0.83 n.s.

Calculo del Chi-cuadrado: Con la corrección de Yates