

Virus y viroides en Crisantemo, conociendo sus implicaciones y sus formas de detección

Estudiante

Luisa María Murillo Rodríguez

Director

Diego Mauricio Martínez Rivillas

Biólogo, M. Biotecnología. Doctor en Biología

Trabajo de Grado

En la modalidad de *Pasantía*

Programa de Biología

Universidad CES

Medellín

Mayo 2024

Virus y viroides en Crisantemo, conociendo sus implicaciones y sus formas de detección

Luisa María Murillo Rodríguez

Resumen

La floricultura en Colombia es uno de los sectores más importantes para la economía, por tanto, es una de las labores que más empleo genera en el sector agrícola. Es reconocida como una de las actividades más importantes después de la producción del café, el crisantemo es la tercera flor de corte más exportada después de la rosa y el clavel representando un 15% de las exportaciones en Colombia, sin embargo, este cultivo se ha visto afectado por diferentes enfermedades de origen viral, las cuales reducen el tamaño de las flores y genera cambios del color, produciendo en algunos casos la pérdida de aproximadamente el 30% del cultivo. Los virus generalmente se transmiten entre plantas por insectos y los viroides suelen transmitirse por corte con equipo contaminado. En la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad CES se realizan pruebas de diagnóstico fitosanitario para virus y viroides y, micropropagación de material vegetal, es un laboratorio que lidera en Colombia el testeo de viroides para el sector floricultor, además, es un escenario real de aprendizaje para estudiantes, donde se desarrollan diversas competencias para realizar de manera autónoma procesos como: InmunoStrip, RT-PCR, extracción de ácidos nucleicos, además de interpretación de resultados y establecimiento de material vegetal *in vitro*.

Palabras clave: Técnicas moleculares, virus, viroides, crisantemos, CSVd, micropropagación y SGC.

TABLA DE CONTENIDO

1. PRESENTACIÓN	1
2. RESEÑA DE LA INSTITUCIÓN	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	4
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
4. LOGROS ALCANZADOS	4
5. DIFICULTADES	5
6. RESULTADOS	5
6.1 APOYO A LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS PARA DETECCIÓN DE VIRUS Y VIROIDES	5
6.1.1 ACTIVIDADES	5
6.1.1.1 RECEPCIÓN	5
6.1.1.2 PESAJE.....	7
6.1.1.3 EXTRACCIÓN	9
6.1.1.4 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	10
6.1.1.5 REALIZACIÓN DE PRUEBA RT-PCR.....	11
6.1.2 OTRAS PRUEBAS DE DETECCIÓN DE VIRUS Y DESINFECCIÓN DE HERRAMIENTAS	14
6.2 DESARROLLO DE ACTIVIDADES DE PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	17
6.3 REQUERIMIENTOS EN UN LABORATORIO BAJO LOS SISTEMAS DE GESTIÓN DE LA CALIDAD	18
6.3.1 NORMA NTC – ISO/IEC 17025	18
6.3.2 CAPACITACIONES	20
7. CONCLUSIONES.....	21
8. RECOMENDACIONES.....	21
9. BIBLIOGRAFÍA	22

1. Presentación

La floricultura en Colombia posee gran relevancia en el mundo, es la actividad que más empleo genera dentro del sector agrícola (1). Colombia es el segundo exportador de flores en el mundo, cuenta con aproximadamente 520 especies de flores y follajes, y 1.600 variedades de flores de corte generando cerca de 200.000 empleos (2). El país logró exportar 310.000 toneladas de flor cortada en el año 2023 lo que equivale a US\$2.080 millones por lo cual, este sector es el más importante en términos económicos de exportaciones no-minero energéticas precedido del café (3). Las flores más cultivadas en Colombia son: rosa, clavel, crisantemo, hortensia y *Alstroemeria* y los departamentos de mayor producción son Antioquia y Cundinamarca (2).

En Colombia hay cerca de 7000 hectáreas cultivadas con flores para exportación de las cuales Bogotá produce el 71% de flores, Antioquia el 27%, el valle y eje cafetero el 2%, Antioquia se caracteriza por sus cultivos de crisantemo y follajes ubicados en el oriente Antioqueño (4). El crisantemo es la tercera flor en volumen y ventas de exportación, pertenece a la familia Asteraceae y al género *Chrysanthemum*, originaria de Asia, esta planta cuenta con variedad de formas florales y colores por lo cual es producida en gran cantidad con fines comerciales(5). Representa el 15% de las exportaciones en Colombia, siendo Antioquia el departamento con mayor producción (6).

La producción de flores se enfrenta a varios problemas que afectan la calidad y productividad, entre ellos se encuentran agentes patógenos como: hongos, bacterias, virus y viroides. El estudio de virus causales de enfermedades en plantas inició a finales del siglo XIX cuando Adolf Mayer (Alemania), Dimitri Ivanovski (Rusia) y Martinus Beijerinck (Holanda) publicaron postulados acerca del agente que provocaba clorosis foliar y aclaramiento de venas hoy conocida como la enfermedad del mosaico del tabaco (TMV) (7). Pero fue en 1930 cuando se obtuvieron mayores avances acerca de enfermedades causadas por virus lo cual impulsó su estudio para poder caracterizar estos agentes y comenzar con los diagnósticos (8). Solo en plantas se conocen cerca de 1.000 (9).

Los virus son agentes patógenos conformados por ácidos nucleicos y una cubierta o cápside de origen proteico, se replican dentro de células vivas utilizando el sistema celular de organismos vivos e invaden a otras células. Los virus se transmiten de una planta a otra principalmente por vectores, algunos de ellos pertenecientes al orden Hemiptera, también son infectadas mediante propagación vegetativa debido a que las plantas son multiplicadas a través de esquejes, igualmente puede existir transmisión a partir de semillas o polen contaminado (9). Las patologías que puede desarrollar un virus en una planta pueden ser: cambios de coloración en sus tejidos, marchitamiento, anillos concéntricos y grabados, mal formación de los tejidos y disminución del crecimiento (9). Los virus que se han encontrado

que afectan al crisantemo son: el virus de la marchitez moteada del tomate (TSWV) el cual causa manchas necróticas, grabados irregulares en las hojas y en condiciones extremas genera muerte de los brotes; virus de la aspermia del tomate (TAV) cuyos síntomas son: deformación de la inflorescencia, reducción del tamaño y cambio de coloración de las flores (10) y por último, el virus del mosaico del crisantemo (CVB), este influye en la caída de las hojas, reducción del tamaño de la planta, aclaramiento de las venas y manchas en las hojas, a menudo es asintomático (11). Para la detección de estos virus se realizan pruebas como: el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas conocido como ELISA, hibridación de ácidos nucleicos y RT-PCR en tiempo real.

A diferencia de los virus, los viroides son moléculas de RNA de cadena sencilla de 200nt a 400nt que adquiere una estructura secundaria plegada, no codifican para proteínas, no poseen cápside ni envoltura externa y se han encontrado como causantes de enfermedades únicamente en las plantas. Su transmisión se da por medio de propagación vegetativa, contaminación mecánica (cortes, contacto), por polen o por semilla (9). Los viroides producen patologías tales como clorosis, necrosis, deformación de las hojas, estrías y cambio de color. En los crisantemos se encuentra: el viroide de la enfermedad del moteado clorótico del crisantemo (CChMVd) el cual produce manchas de color amarillo verdoso, clorosis, necrosis y retraso del crecimiento de la planta del crisantemo; siendo el más importante por sus afectaciones, el viroide del enanismo del crisantemo (CSVd) (12). En los viroides no se pueden realizar pruebas inmunológicas como ELISA, debido a que no poseen cobertura proteica como los virus, por ello la forma de detección más utilizada es la RT-PCR en tiempo real.

El CSVd pertenece al género *Pospiviroid*, su genoma es monomérico lineal de 354nt, este viroide produce una serie de patologías en el crisantemo dentro de las cuales se encuentran (13):

- Reducción del crecimiento, que puede alcanzar hasta el 85%.
- Floración prematura, desde unos días a 4 semanas.
- Decoloración de pétalos y reducción del tamaño de las flores.
- Los tallos se tornan quebradizos.
- El enraizamiento de los esquejes infectados es reducido.
- Las hojas adquieren un color verde claro.

Las plantas infectadas de dichos patógenos pueden ser desde asintomáticas, es decir, que no presentan signos visibles de enfermedad, hasta sintomáticas, afectando el rendimiento de la planta, disminuyendo la calidad y causando grandes pérdidas económicas.

Los virus son responsables de cerca del 20% de enfermedades en plantas, lo que produce un menor rendimiento y baja calidad de los cultivos limitando el uso de semillas para posteriores siembras, lo que conlleva al aumento de costos de producción y la implementación de cuarentenas para evitar la propagación a otros países (7). Una planta de crisantemo con presencia de virus y viroides puede llevar en algunos casos a la pérdida

de aproximadamente el 30% del cultivo, lo cual genera implicaciones económicas de gran magnitud afectando también los empleos en el sector floricultor, para dar una idea de la capacidad de generación de empleo del sector productivo del crisantemo, solo en el oriente antioqueño se encuentran empleadas más de 15.000 personas de manera directa.

En Colombia existen algunos laboratorios de biotecnología vegetal, entre ellos los que prestan el servicio de detección de virus y viroides son: Laboratorio de diagnóstico fitosanitario – ICA seccional Caldas- Manizales, laboratorio de virología Alliance Bioversity & CIAT y la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad CES (UBi). La Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad CES (UBi), es un laboratorio que impacta positivamente la industria floricultora debido a que participa en cerca del 80% de la producción de crisantemo del país y algunas fincas del Ecuador, a través de la prestación de servicios de diagnóstico y micropropagación. Además, la UBi es el único laboratorio con registro ICA que detecta virus y viroides con fines comerciales para el sector floricultor utilizando RT-PCR en tiempo real.

2. Reseña de la institución

La Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad CES (UBi) es un laboratorio prestador de servicio en el sector agro y floricultor, el cual trabaja en la detección de virus y viroides, utilizando técnicas moleculares como RT-PCR en tiempo real, pruebas inmunológicas como ELISA y pruebas de diagnóstico rápido por InmunoStrip para detectar CSVd, CChMVd, TSWV y TAV. Para esto cuenta con Registro ICA LB0000052022 Expedido el 27 de enero de 2022. Además de servir como laboratorio de diagnóstico fitopatológico, realiza actividades de propagación *in vitro* de plantas maderables, frutales y ornamentales Resolución No. 00029658 (agosto 8 de 2018) y 00014827 (agosto 10 de 2022), propendiendo por la calidad fitosanitaria de los cultivos (14).

El laboratorio esfuerza sus labores en la satisfacción de diferentes necesidades del sector agro como: la oferta de material de siembra libre de patógenos, detección de patógenos de manera precisa, demanda de material genético para exportación de alta calidad fitosanitaria y material de calidad para establecimiento de cultivos, además de apoyar actividades de docencia, investigación, desarrollo e innovación en la universidad CES contribuyendo a la formación de profesionales y sirviendo como un entorno real de aprendizaje para estudiantes de ciencias biológicas, agronómicas o afines.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Adquirir las competencias y habilidades necesarias para el desempeño laboral como biólogo en el área de la biotecnología vegetal.

3.2 Objetivos específicos

- Adquirir destreza en la aplicación de técnicas moleculares para la detección de virus y viroides.
- Obtener destreza en la propagación de material vegetal *in vitro*.
- Afianzar habilidades y competencias de trabajo en un laboratorio bajo los sistemas de gestión de la calidad.
- Experimentar la labor de un profesional en biología en un laboratorio de biotecnología vegetal.

4. Logros alcanzados

- Adquisición de competencias técnicas y prácticas en procedimientos de laboratorio.
- Desarrollo de autonomía en el procesamiento y aplicación de técnicas moleculares como extracción de ácidos nucleicos, RT-PCR y prueba de InmunoStrip.
- Se fortalecieron aptitudes como la adaptabilidad, disciplina y compromiso con las labores.
- La adquisición de buenas prácticas de trabajo bajo los sistemas de gestión de la calidad en un laboratorio y el seguimiento de normas de SST.
- Se logró un acercamiento a uno de los campos laborales del profesional en biología, enfocado en biotecnología vegetal.

5. Dificultades

Ajustarse a la velocidad de desarrollo de las actividades. Desarrollo de algunas actividades debido a la demanda de pruebas moleculares y a algunas actividades fuera del laboratorio (reuniones – capacitaciones).

6. Resultados

Adquisición de destreza y habilidades en el manejo de reactivos, micropipetas, realización de técnicas moleculares, establecimiento *in vitro* de algunas especies y capacidad de trabajo bajo los sistemas de gestión de la calidad en un laboratorio. Para lo cual se realizaron diferentes actividades implicadas en cada área de la UBi.

6.1 Apoyo a la realización de pruebas para detección de virus y viroides

En el área de molecular se realizaron cada uno de los pasos para procesar alrededor de 200 muestras semanales, lo cual implicaba la recepción de la muestra y el ingreso al software (Ubilab), una plataforma donde se almacenan los datos de las empresas a las cuales se les vende el servicio tanto de diagnóstico como de propagación *in vitro*, para esto se debe conocer como llenar cada espacio de la plataforma y reconocer los datos importantes que deben sustraerse de cada muestra para proceder con el pesaje de la muestra. Durante la pasantía se contribuyó al pesaje de más de 1000 muestras, la extracción de ácidos nucleicos se realizó a más de 400 muestras, después se realizaron cuantificaciones de la concentración de ácidos nucleicos y se hicieron pruebas de RT-PCR en tiempo real utilizando sonda Taq-Man para detectar CSVd y SYBR green para la detección de TSWV y CChMVd. Se aportó al procesamiento de más de 10.000 muestras para detección de virus y viroides en el año 2023.

6.1.1 ACTIVIDADES

6.1.1.1 RECEPCIÓN

La recepción de muestras y su codificación es una parte importante dentro de un laboratorio de ensayo, esto evita una manipulación indebida de las muestras registradas en la base de datos, permite corroborar la información enviada por la empresa que requiere el servicio y vigilar el control del número de muestras analizadas con respecto al número de muestras recibidas. En los casos en los que se reciben muestras en mal estado o se encuentran incompletas, esta parte del proceso permite informar a tiempo al encargado de

enviar las muestras para que se reenvíen nuevamente los ejemplares faltantes o las que no tienen la calidad para ser muestreadas. Este proceso se debe hacer inmediatamente priorizando las muestras que presentan signos de degradación más avanzada con el objetivo de mitigar la brecha de errores posteriores a la recepción (Ver figura 1).

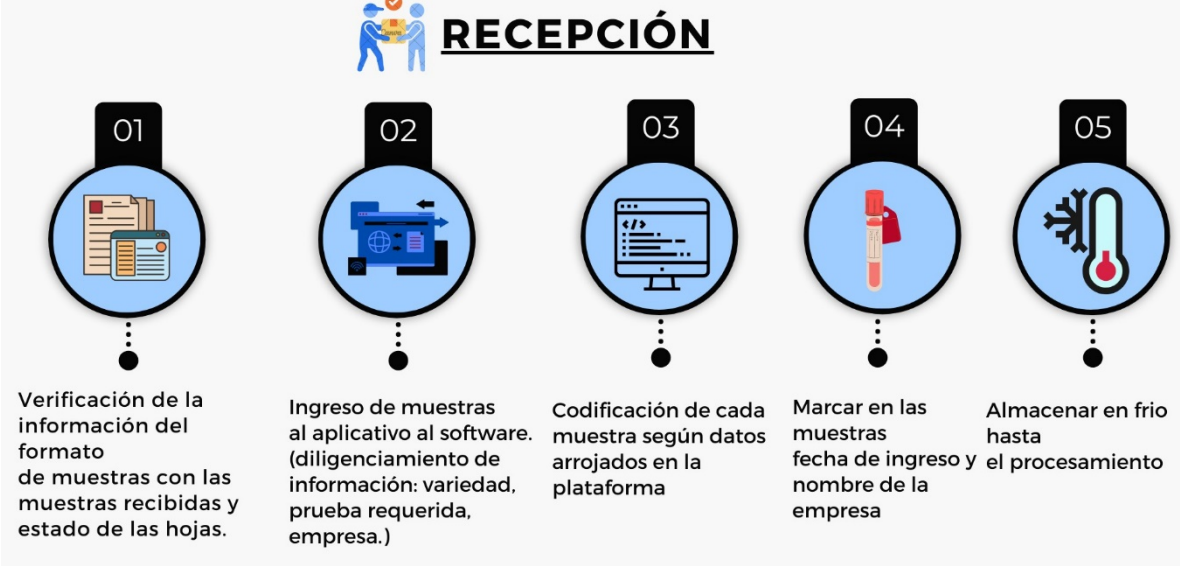


FIGURA 1. Secuencia de actividades de recepción.

Durante la pasantía se realizó la recepción e ingreso de muestras al software específico (Ubilab), provenientes de diferentes zonas geográficas como el oriente Antioqueño, sabana de Bogotá y Ecuador, se verificó el estado de las muestras, si se encontraban degradadas se fotografiaban como evidencias y se enviaban al líder técnico para que informara la situación presentada al cliente (Ver figura 2).

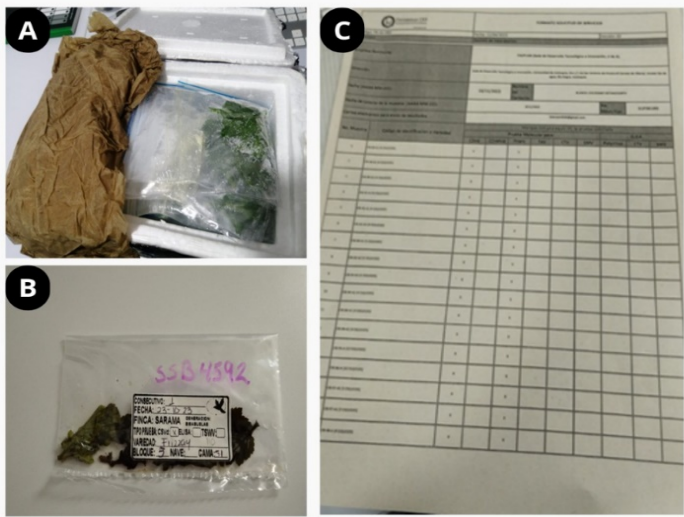


FIGURA 2. Proceso de verificación de información. **A.** Recepción de muestras; **B.** Muestra codificada; **C.** Formato del tipo de prueba requerida.

6.1.1.2 PESAJE

Se ejecutó el proceso de pesaje de más de 3.000 muestras de plantas de crisantemo, este proceso consiste en obtener tejido vegetal de varias hojas de la muestra, para obtener una cantidad de material suficiente para realizar su respectiva prueba, para esto se debía tener listos los insumos y materiales (ver figura 3) para realizar dicha actividad los cuales eran:

- Solución de hipoclorito al 3%.
- Etanol al 95%.
- Agua de osmosis inversa.
- Cuchillas.
- Pinzas.
- Tabla para corte.
- Aluminio cortado.
- Microtubos marcados con el código correspondiente a la muestra.
- Guardian.
- Balanza analítica calibrada.
- Guantes.
- Tapabocas.
- Gradillas.

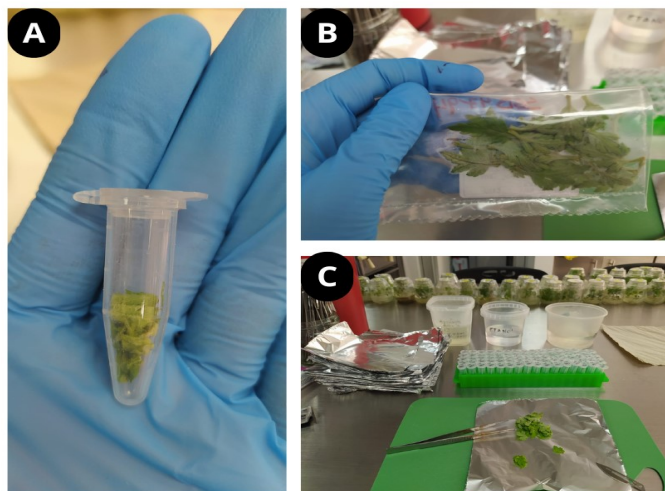


FIGURA 3. Proceso de pesaje. **A.** Cantidad de tejido vegetal obtenido; **B.** Hojas para testear; **C.** Elementos necesarios del proceso.

Esta actividad requiere de gran concentración y experticia para evitar confusión y no generar resultados equivocados, cada cuchilla debe ser desechada y cada pinza desinfectada, pasando primero por hipoclorito durante un tiempo determinado, posteriormente se sumerge en etanol por la misma cantidad de tiempo, luego por agua para lavar los restos del hipoclorito y evitar corrosión de la pinza, esto es muy importante debido a que es la única forma de mantener las herramientas libres de virus y viroides. Se debe registrar el peso de cada muestra en la bitácora respectiva siguiendo las indicaciones del sistema de gestión de la calidad (SGC). El resto de las hojas que quedan en los empaques se almacenan en frío por 3 meses como respaldo. El proceso se muestra en la figura 4.

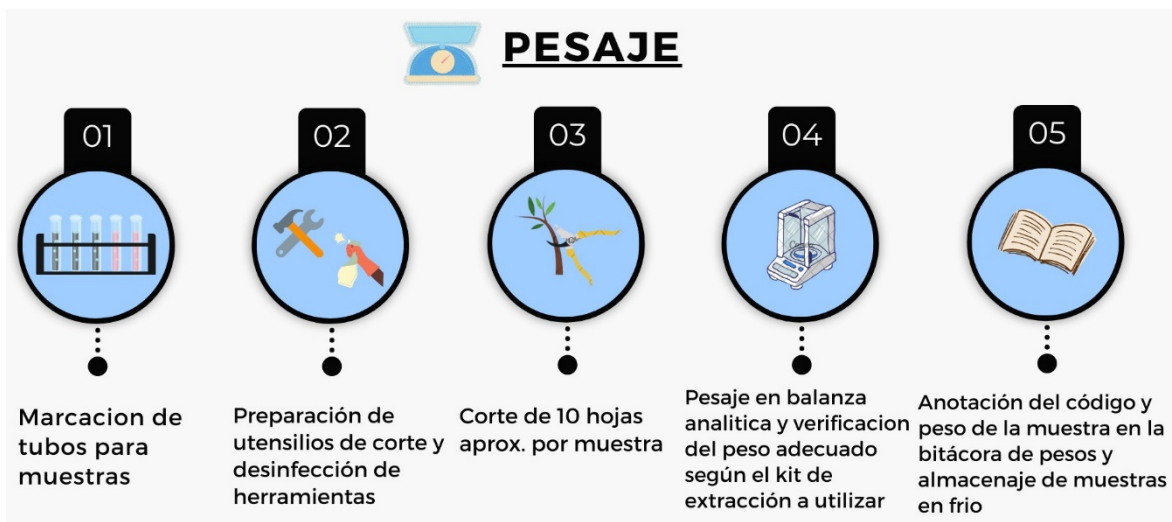


FIGURA 4. Secuencia de actividades para el pesaje.

6.1.1.3 EXTRACCIÓN

La extracción es un paso de especial cuidado ya que en este punto del proceso existe mayor probabilidad de contaminación de las muestras, debido a que se obtiene un extracto a partir de la maceración de los tejidos vegetales exponiendo los componentes celulares, requiere varios pasos de manipulación para limpiar el ARN de los demás elementos presentes en el tejido, es fácil contaminar las muestras si no se descartan las puntas de la micropipeta cada vez que se toma un volumen de los microtubos o en caso de que tengan contacto con ellos, en otras palabras, es un paso de mucha precaución porque se debe manipular cada muestra a evaluar de forma muy rigurosa para evitar falsos positivos. El proceso se muestra en la figura 5.

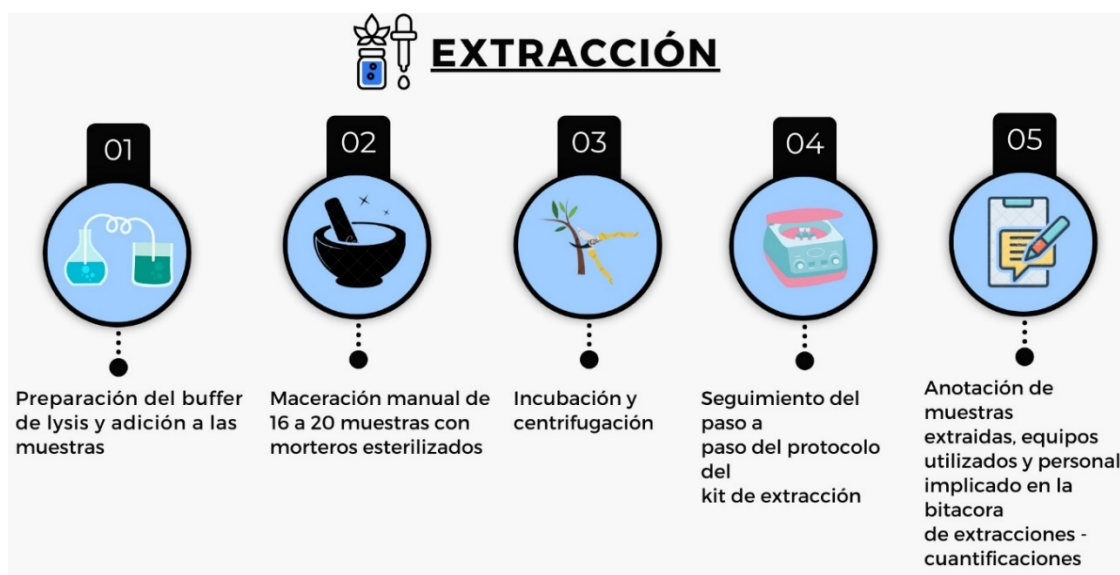


FIGURA 5. Secuencia para las actividades de extracción.

Este paso requiere de técnica y habilidad en el manejo de la micropipeta para conseguir volúmenes finales suficientes. Se realizaron 450 extracciones aproximadamente de manera autónoma, para esto se prepararon buffers de lisis según el kit y se esterilizaron los morteros puesto que eran reutilizables (ver figura 6). Este proceso se aplicó en la realización de casi 3000 muestras de crisantemos. Los insumos y equipos necesarios para la extracción son los siguientes:

- Cabina extractora de gases.
- Reactivos del kit de extracción.
- Morteros.
- Viales de 1.5 marcados.
- Micropipetas calibradas.
- Puntas de 200 y 1000 μ L.
- Etanol.
- Balanza analítica.
- Guantes.
- Tapabocas.
- Recipiente de descarte de líquidos.
- Tubos.
- Centrífuga.
- Agitador vórtex.
- Incubadora.
- Gradilla

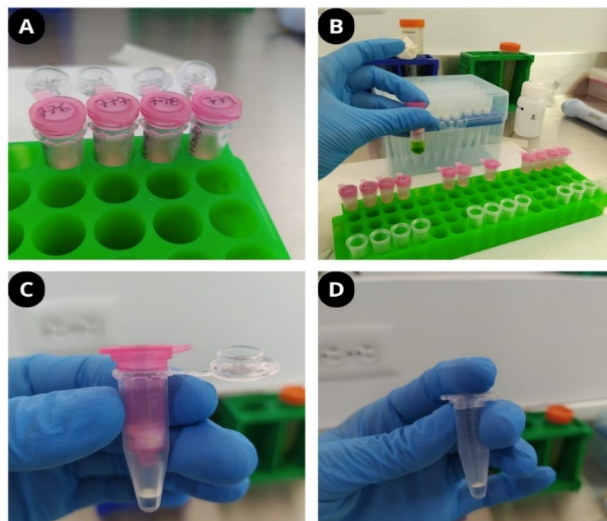


FIGURA 6. Pasos de la extracción. **A.** Filtración; **B.** Descarte de elementos celulares; **C.** Filtración del ARN; **D.** Obtención del ARN.

6.1.1.4 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

En este paso se verifica la concentración de ácidos nucleicos (ver figura 7), debido a que es requerida una cantidad mínima para que se lleve a cabo la reacción enzimática de la polimerasa. También se puede observar el estado de pureza de la muestra. Las muestras extraídas se descongelan, se les hace vórtex y se centrifugan, después se toma un volumen determinado y se deposita en cada pozo de la microplaca. Los insumos requeridos para llevarse a cabo son (ver figura 8):

- Microplaca.
- Espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh de Thermo Scientific.
- Micropipetas.
- Puntas de 100 μ L.
- Agitador Vortex.
- Centrífuga.
- Papel absorbente.
- Guantes.



FIGURA 7. Secuencia de las actividades de cuantificación.

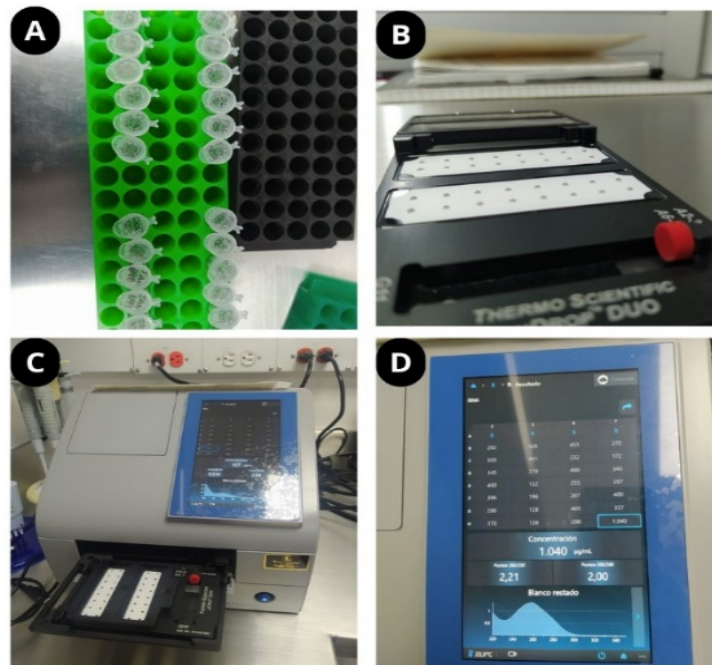


FIGURA 8. Pasos y equipos. **A.** Muestras descongelaadas y gradilla; **B.** Microplaca; **C.** Espectrofotómetro MultiSkán High; **D.** Pantalla digital de resultados.

6.1.1.5 Realización de prueba RT-PCR

En la UBI se realiza RT-PCR en tiempo real en un paso (one step), es decir, que la retro transcripción y la amplificación de la secuencia se realiza en un mismo vial sin necesidad de pasos adicionales. Para esto se utiliza la sonda SYBR green, ésta consiste en la unión de un indicador fluorescente en el extremo 5' de la cadena, después de la región de unión del cebador y la unión en el extremo 3' de un colorante extintor a medida que actúa la ADN Taq polimerasa se corta el indicador fluorescente emitiendo señales y a medida que pasan los ciclos de la PCR aumenta la cantidad del indicador fluorescente escindido indicando presencia del virus. Es utilizada en el laboratorio para el CChMVd y TSWV mientras que la sonda TaqMan es usada únicamente para el CSVd la cual tiene un mecanismo de acción similar, pero es más sensible a la hora de detectar las secuencias virales ya que su unión es más específica y el extintor de la señal no emite ninguna coloración, la sonda SYBR green se une a cada nueva copia de ADN de doble cadena, mientras que la sonda TaqMan requiere de una hibridación específica entre la sonda y el objetivo para generar una señal fluorescente. En el periodo comprendido de la pasantía se realizó el procesamiento de al menos 3000 muestras para los virus de TSWV y viroides de CSVd y CChMVd, la prueba tiene un carácter cualitativo que nos indica la presencia o ausencia del patógeno. El procedimiento que se realizó para la aplicación de esta prueba fue el siguiente (ver figura 9):

- **Reconstitución de los primers para la solución madre:** Se descongelan, luego se llevan a la centrifuga, se siguen las indicaciones del fabricante del kit para agregar el volumen de agua libre de nucleasas necesario para obtener la concentración específica.
- **Preparación de la solución de trabajo de los primers:** Se prepara a parte un vial de la solución madre para obtener una concentración final de trabajo.
- **Preparación del máster mix:** Se prepara el máster mix con el Forward, la sonda TaqMan O SYBR green según el patógeno a detectar y agua libre de nucleasas.
- **Preparación de cada muestra:** A un microtubo se le agrega el Reward, agua y la muestra. Se preparan 2 controles positivos, uno negativo y un tubo de PCR (lleva todos los elementos mencionados anteriormente excepto muestra de ARN y se completa el volumen con agua libre de nucleasas), luego se lleva al termociclador durante un tiempo determinado, posterior a eso se lleva al congelador, el máster mix es descongelado, se le hace vórtex y se centrifuga, se sacan las muestras del congelador, el master mix se agrega a cada muestra y finalmente se lleva al termociclador con el perfil térmico programado y se espera a que se procesen las muestras. Todo el proceso se realiza siguiendo los protocolos según SGC.

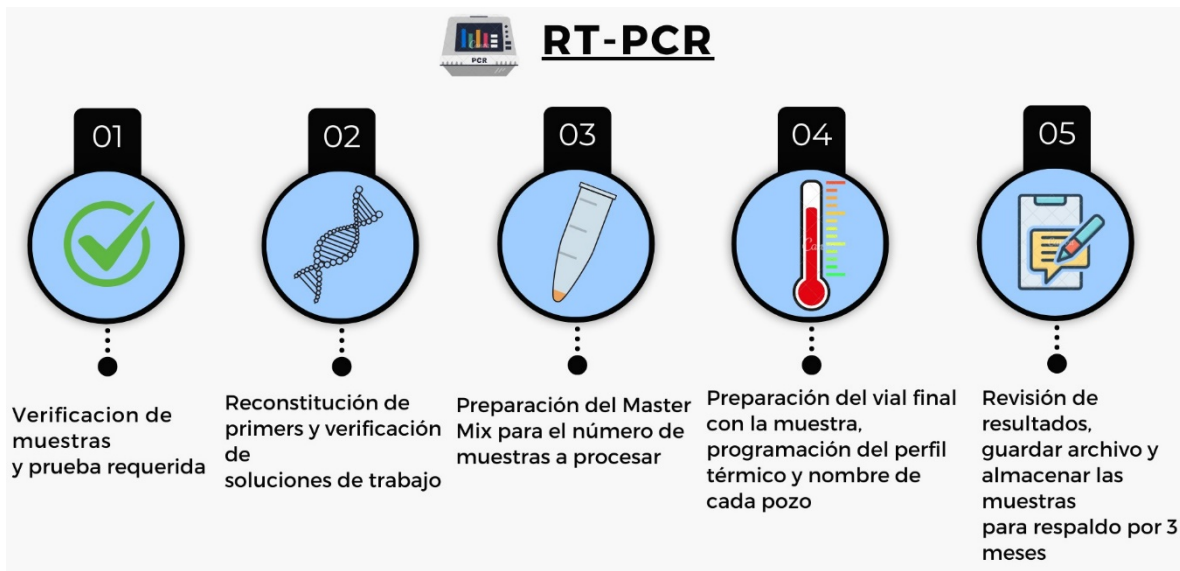


FIGURA 9. Secuencia de actividades para la RT-PCR.

El resultado de la RT-PCR se puede monitorear durante el proceso lo cual representa una ventaja ya que se pueden observar las muestras que se van amplificando (muestras positivas) antes de que el termociclador finalice el proceso, al observar alguna anomalía descartar las muestras y volver a realizar el proceso.

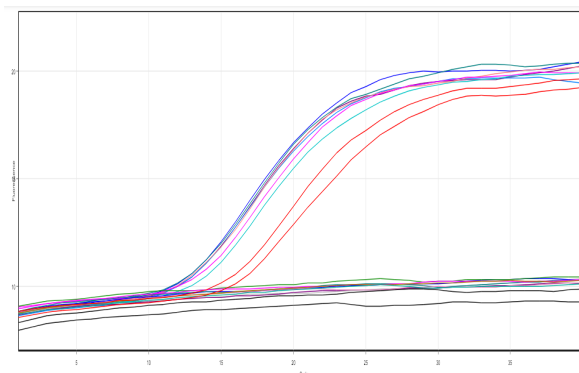


FIGURA 10. Resultado de RT-PCR.

En la figura 10 se observa el resultado de una RT-PCR para CSVd, en la cual se muestran 40 ciclos transcurridos y la expresión de la fluorescencia del indicador de la sonda, las líneas en rojo son los controles positivos de los cuales nos basamos para interpretar la curva de las muestras que deben ser positivas, la línea negra (la primera línea inferior) indica el control negativo y las demás líneas que muestran el mismo comportamiento gráfico se interpretan como muestras negativas.

El CSVd al causar enanismo, aparición temprana del botón floral y cambios de coloración (ver figuras 11 y 12) produce pérdidas económicas debido a que estos síntomas no permiten que la planta del crisantemo cumpla con los criterios de selección y calidad mostrados en la figura 13.

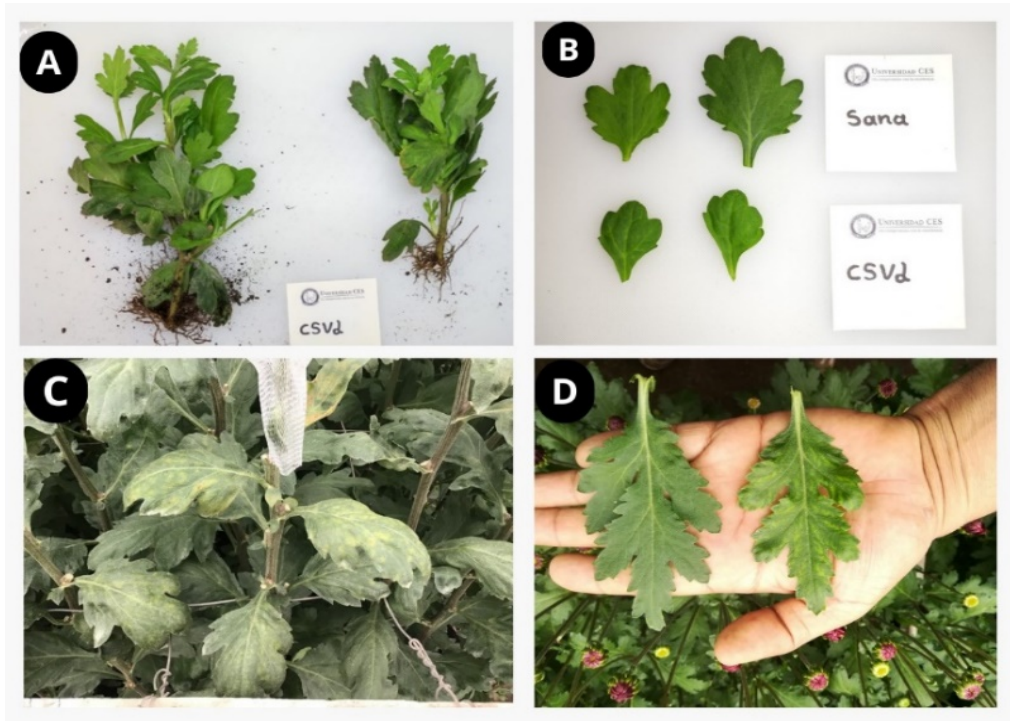


FIGURA 11. A. Planta sana de crecimiento normal vs planta con enanismo; B. Hojas sanas vs hoja con bordes lisos (infectada); C. Manchas cloróticas en hojas; D. Diferencia de tamaños y color en planta sana vs afectada.



FIGURA 12. A. Diferencia de crecimiento y botón floral; B. Crecimiento heterogéneo de una variedad de crisantemo en una cama de siembra.

PARÁMETROS DE CALIDAD DE LOS RAMOS CORTADOS		
PARÁMETRO	ESTÁNDAR	POMPÓN
NO DE TALLOS	10 Tallos	7 - 10 Tallos
LONGITUD DEL TALLO	70 a 80 cm	70 a 80 cm
TAMAÑO DE CABEZAS	Consistente con el grosor del tallo y longitud y deben ser uniformes.	-
PUNTO DE CORTE	Cuando las ligulas forman un ángulo de 90° con el tallo.	La apertura ideal es en copa y debe ser uniforme
COLOCACIÓN DEL CAPUCHON	5 cms por encima de las cabezas florales.	5 cms por encima de las cabezas florales
COLOCACIÓN DEL CAUCHO	8 a 10 cms por encima de las bases de los tallos.	8 a 10 cms por encima de las bases de los tallos
PELADA DE HOJAS	Desde la base inferior del capuchon hacia abajo.	Desde la base inferior del capuchon hacia abajo
ESTADO FLOR	No debe haber ligulas recortadas, deformes, dañadas o maltratadas por la mallita de flor. No clasifican flores pinkiadas, deformes, cabezas pequeñas o sucias, debe estar libre de plagas o enfermedades	Libre de plagas o enfermedades, sin señales de maltrato o sucia
ESTADO FOLLAJE	Follaje completamente verde y sin presencia de plagas y enfermedades, El follaje debe estar completamente túrgido (hidratado) al colocar el ramo vertical las hojas no son flácidas, no debe presentar residuos de pesticidas.	Follaje completamente verde y sin presencia de plagas y enfermedades, El follaje debe estar completamente túrgido (hidratado) al colocar el ramo vertical las hojas no son flácidas, no debe presentar residuos de pesticidas.
ESTADO TALLO	No deben existir tallos leñosos y/o torcidos en el ramo	No deben existir tallos leñosos y/o torcidos en el ramo

FIGURA 13. Tabla de parámetros de calidad. (15)

Caso real del impacto económico por presencia del viroide en la producción de crisantemo.

Una empresa produce 160 millones de plantas de crisantemo de las cuales el 4% se pierde por presencia de CSVd, esto equivale a 6.400.000 plantas. Considerando que cada una se vende a US\$0,10 en total hay una pérdida de US\$640.000 lo que representa en pesos colombianos 2.500.000.000 pesos perdidos al año.

6.1.2 Otras pruebas de detección de virus y desinfección de herramientas.

Para afianzar el manejo de los equipos, micropipetas y técnicas moleculares se realizaron algunas pruebas de detección de virus y viroides, y determinación de presencia de algunos genes.

- Se realizó una prueba de tirilla por InmunoStrip para la detección de TSWV en una variedad de crisantemo (Andrea), para esto se seleccionaron las hojas directamente de una planta cortada que presentaba síntomas visibles de enfermedad en sus hojas, se realizó el pesaje entre 100 y 120 mg, se maceraron con el buffer preparado para posteriormente introducir una tirilla que arroja resultados en 30 minutos. La aparición de una línea indica que no hay presencia de TSWV, en cambio la aparición de 2 líneas indica lo contrario para esto ver figura 14.



FIGURA 14. Resultado de prueba por inmunoStrip para TSWV.

- Se evaluó la eficacia de dos agentes desinfectantes (Hipoclorito de sodio y ácido hipocloroso) en la eliminación de CSVd. Se diseñó un experimento con asesoría del director técnico. Para llevar a cabo el ensayo se extrajo tejido vegetal de una planta positiva, se maceró en agua libre de nucleasas y se adicionó 100 μ L del extracto a cada una de las siguientes soluciones:

- Concentración (μ g/mL).
- Ácido hipocloroso 1000 ppm.
- Ácido hipocloroso 500 ppm.
- Hipoclorito de sodio 1%.
- Hipoclorito de sodio 0,250 %.
- Hipoclorito de sodio 0,125 %.
- Muestra blanco (agua).

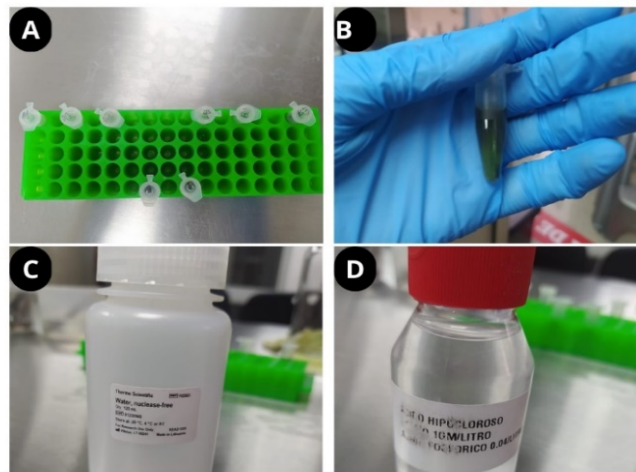


FIGURA 15. Elementos del ensayo. **A.** Viales donde se depositan las soluciones; **B.** Extracto de la planta positiva; **C.** Agua libre de nucleasas; **D.** Ácido hipocloroso.

Se dejaron reposar un día a temperatura ambiente, luego se realizó la extracción de ácidos nucleicos siguiendo las indicaciones del fabricante del kit y el protocolo establecido en la UBi y por último se cuantificaron las muestras para determinar la concentración de ácidos nucleicos. Ver resultados en la figura 16.

Muestra	Concentración (µg/mL)
Ácido hipocloroso 1000 ppm	-1,69
Ácido hipocloroso 500 ppm	-0,51
Hipoclorito de sodio 1%	-2,24
Hipoclorito de sodio 0,250 %	-1,84
Hipoclorito de sodio 0,125 %	-0,67
Muestra blanco	1,16

FIGURA 16. Resultados de la cuantificación.

Con este ensayo se obtuvo que solo el hipoclorito elimina el viroide y se indica una concentración mayor a 0.5% para descontaminar herramientas de corte y manipulación en campo. El ácido hipocloroso no es un agente seguro para eliminar CSVd. los resultados se ven en la figura 17.

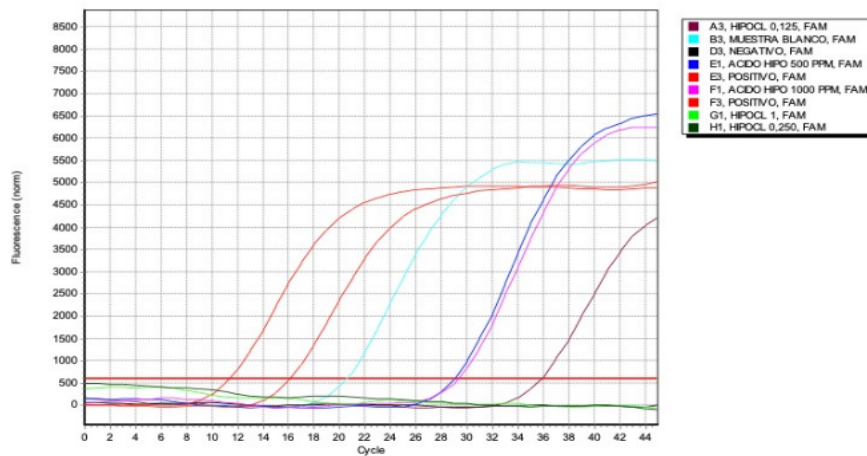


FIGURA 17. Resultado de la RT-PCR.

Se realizó una prueba de RT-PCR en la cual se probaron nuevos primers desarrollados para detectar la presencia de algunos genes de resistencia a roya blanca, una enfermedad causada por el hongo *Puccinia horiana* de interés para el sector floricultor.

Al aplicar cada uno de los procesos a las muestras se aprendió a manejar de manera autónoma los kits, se adquirió mayor confianza y agilidad con la micropipeta, manejo de las

cámaras de flujo, balanza analítica y demás equipos importantes para el procesamiento de una muestra.

Otra prueba que se realiza en la UBi es la prueba ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligada a enzima), para realizarla se utiliza una placa con pozos donde se deposita la muestra macerada con buffers de lysis, se realizan lavados de la placa y se adicionan un anticuerpo el cual se ligará al antígeno viral presente en la muestra, si hay presencia del antígeno la placa cambiará de color. Existen distintas variantes de la prueba, en el laboratorio se realiza DAS-ELISA tipo sándwich inmunométrico de doble anticuerpo y ACP-ELISA (placa recubierta de antígeno) y ELISA compuesta.

6.2 Desarrollo de actividades de propagación *in vitro*

En el área de *in vitro* se realiza recepción de esquejes para establecer material vegetal con el fin de multiplicarlo, este es un proceso vital para las empresas debido a que las plantas multiplicadas por propagación clonal deben tener las mismas características fenotípicas y genotípicas para que la cosecha de las flores tenga variedades iguales en color, tamaño de flor y sin presencia de virus o viroides.

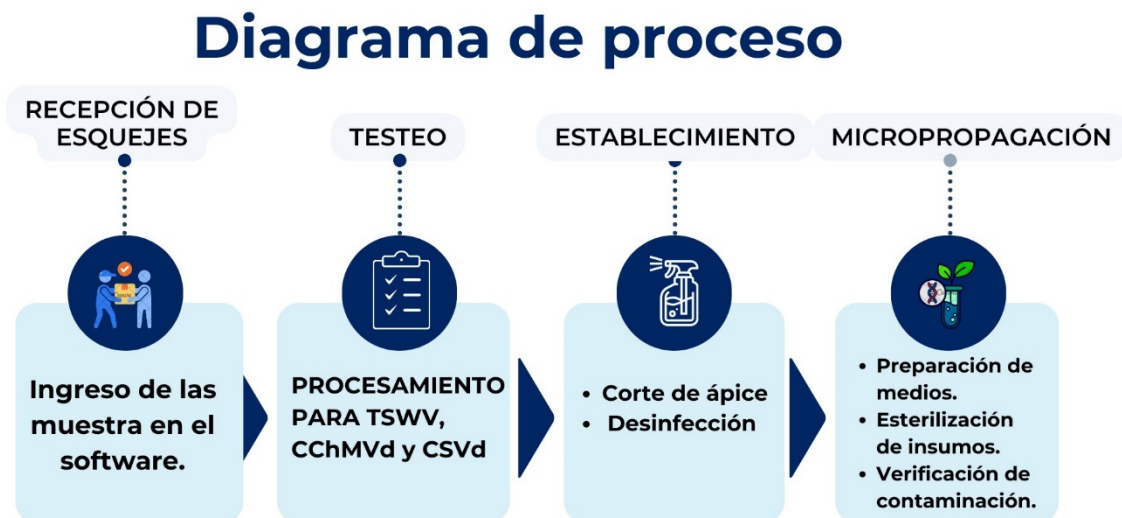


FIGURA 18. Diagrama de flujo de *in vitro*.

El laboratorio recibe los esquejes, los cuales son codificados para el área de *in vitro*, se cortan los ápices con la intención de que su tamaño sea de 4 cm aproximadamente, se cortan las hojas más grandes (estas son usadas para evaluar la presencia de TSWV, CChMVd, y CSVd) y se preparan soluciones con fungicidas y jabones de uso quirúrgico, los esquejes se lavan con agitaciones periódicas por distintos lapsos de tiempo, luego se llevan a la cabina de flujo laminar horizontal donde se desinfectan por última vez con hipoclorito, se enjuagan con agua destilada y se rocían con etanol al 70%, se cambian de recipiente y luego

se corta 0.5 cm aproximadamente y se siembran en medios de cultivo en tubos de ensayo, finalmente se observa el crecimiento de las plantas, la respuesta y se monitorea presencia de contaminación (ver figura 19). Las plantas que no se contaminaron se siembran en recipientes más amplios junto con otras plantas de la misma variedad.

Se participó del establecimiento de crisantemo, orquídea, banano y limonium. Se prepararon medios de cultivo básicos y medios con ppm, además de lavar los implementos utilizados en *in vitro* y esterilizar pinzas, mangos, medios de cultivo, agua y morteros. También se revisó material contaminado, se descartó y desinfectó. Se apoyaron prácticas docentes de laboratorio con algunos procesos de desinfección de esquejes, pesaje de muestras y obtención de meristemas, de igual manera se acompañó el proceso de creación de semillas sintéticas en las prácticas. Se llevaron plantas al invernadero donde se preparó sustrato, se desmalezó y se verificó el estado de las plantas del lugar.

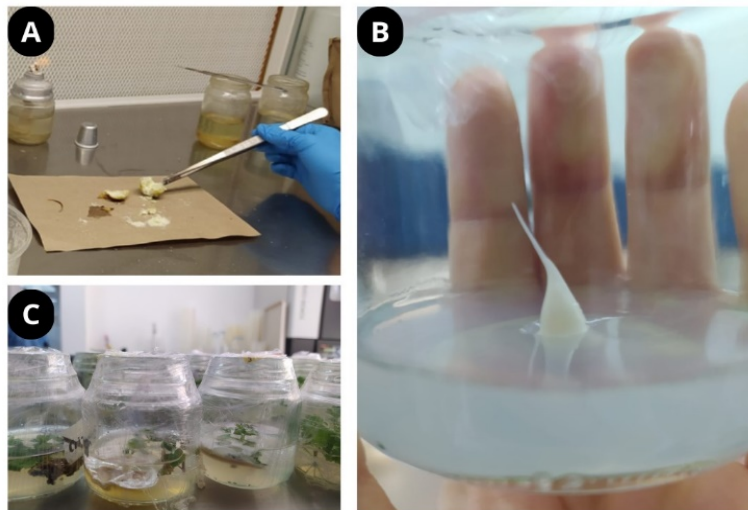


FIGURA 19. Actividades del área de *in vitro*. **A.** Siembra de semillas de orquídea; **B.** Meristemo de banano; **C.** Plantas contaminadas por hongos.

6.3 Requerimientos en un laboratorio bajo los sistemas de gestión de la calidad

Se realizaron capacitaciones de parte del área de calidad para comprender como se aplica la norma NTC-ISO/IEC 17025 en el laboratorio y la importancia de su conocimiento por todo el personal y su continua implementación.

6.3.1 Norma NTC – ISO/IEC 17025

Es una norma que permite a los laboratorios de ensayo y calibración encaminarse en temas de gestión de calidad y requerimientos técnicos para funcionar adecuadamente, ya que certifica la competencia técnica y confiabilidad de los resultados emitidos por un

laboratorio, y abarca también a la norma ISO 9001, utilizada por entidades que quieren demostrar que cuentan con lo necesario para satisfacer al cliente y para garantizar la continua mejoría de cada proceso y peticiones del cliente. Los sistemas de gestión de la calidad brindan herramientas para divulgar el conocimiento al personal, simplificar la incorporación de los empleados, adaptación a los cambios del entorno y detección de problemas previamente para encontrar una solución precisa. Los sistemas de gestión de la calidad son importantes para identificar amenazas que alteren la calidad de los resultados, además, permiten demostrar la competencia de un laboratorio a nivel nacional e internacional (16). Los sistemas de gestión de la calidad son un requerimiento legal por el ICA para poder prestar servicio.

Para trabajar en un laboratorio es necesario conocer desde los protocolos, técnicas, manejo de equipos hasta la manipulación de datos, material para pruebas y propagación de manera correcta, para encontrar errores de manera rápida que podrían provocar alguna situación desfavorable para la producción, calidad de las flores de corte y contaminación de plántulas que lleven a la pérdida de variedades del banco de germoplasma.

Para garantizar la trazabilidad de los procesos en el laboratorio se debe tomar datos de la temperatura y humedad relativa del área de *in vitro* y biología molecular en la mañana y en la tarde, también, diligenciar los formatos de uso de diferentes equipos, codificar las muestras ingresadas según los códigos arrojados por el software (Ubilab), realizar procesos para evaluación y seguimiento de parte de los jefes de cada área, con el fin de conocer el desempeño y habilidades en el manejo de diferentes técnicas para el procesamiento de muestras y, firmar las actas pertenecientes a cada reunión e información dada referente al buen funcionamiento o cambios del laboratorio.

La asimilación de la importancia de la implementación de los sistemas de gestión de la calidad en un laboratorio de ensayo, que presta servicios a terceros y posee gran responsabilidad en generar información verídica sobre la presencia de patógenos virales y productos entregados a empresas es fácil, ya que, se siguió de manera correcta cada uno de los requisitos establecidos para el cumplimiento de la norma.

Todos los procedimientos, actividades y capacitaciones, se cumplieron con todos los requisitos del sistema de gestión de la calidad, los cuales consistían en la verificación de parámetros metrológicos de funcionamiento de cada uno de los equipos utilizados, la verificación de fechas de vencimiento y calidad de los insumos a utilizar, la verificación de las condiciones de esterilidad para evitar temas cruzados, el cumplimiento de los protocolos, el diligenciamiento de las guías, las bitácoras y los formatos requeridos para que haya una trazabilidad de todos los procesos.

6.3.2 Capacitaciones

Las capacitaciones hacían parte de la formación del personal técnico requerido por la norma para asegurar la confiabilidad en los procesos y su replicabilidad. En las capacitaciones se socializaba la revisión de temas asignados por el líder técnico del laboratorio en la cual, se trataban temas relacionados a fitopatología, pruebas diagnósticas, temas de calidad y avances de los proyectos de investigación en desarrollo.

- **Capacitación de la prueba de RT- PCR:** Se explicó su función y luego se procedió a realizar la prueba de manera guiada con muestras que habían sido evaluadas anteriormente, para verificar la calidad del proceso y habilidad de cada uno de los integrantes del equipo de laboratorio, en esta prueba el resultado obtenido con la muestra estuvo acorde al resultado encontrado previamente por el líder del área de molecular.
- **Prueba ELISA:** Se divulgó su fundamento, cómo se realizaba y para qué tipo de patógenos era útil.
- **CSVd y sus formas de eliminación:** Se explicó qué es el CSVd, el mecanismo de propagación de las partículas en las plantas, síntomas y métodos de desinfección de material vegetal y herramientas contaminadas para campo y laboratorio.
- **Sistema de gestión de calidad:** Se informó que es y por qué se debe seguir.

Además de algunas capacitaciones en la que se socializaron investigaciones en proceso como la poliploidía en claveles y la transmisión de enfermedades por *Trips* en crisantemos. Se asistió a las reuniones creadas por bienestar institucional para el personal del laboratorio acerca del manejo de emociones, toma de decisiones y trabajo en equipo. Se visitaron algunas fincas floricultoras en el oriente antioqueño para ver el resultado final de los procesos que se llevan a cabo en la UBi (ver figura 20).



FIGURA 20. Visita a finca floricultora.

7. Conclusiones

Durante la pasantía en la UBI se afianzaron las habilidades y destrezas en el establecimiento *in vitro* de diferentes especies brindando apoyo en el descarte de material, revisión, preparación de medios y esterilización de materiales. Así mismo, se adquirió una consciencia acerca de la importancia de la implementación de los sistemas de gestión de la calidad en un laboratorio ya que estos permiten cumplir con normativas estándar de la calidad, generar confianza a los clientes al prestar servicios seguros y confiables, y le permite extender sus servicios a otros países. La pasantía en el laboratorio UBi, enfocada en la biotecnología vegetal permitió desarrollar un compendio de competencias en el manejo de reactivos y micropipetas por medio de la realización de técnicas moleculares a través del apoyo en pruebas de RT-PCR para la detección de virus y viroides, así mismo, diagnóstico rápido por InmunoStrip para TSWV y extracción de 400 muestras.

Realizar una pasantía en un laboratorio prestador de servicios como la UBi permite complementar la formación de un profesional al fortalecer competencias como la toma de decisiones, planeación de actividades a realizar, adquisición de disciplina, trabajo en equipo, seguridad de la toma de decisiones y dimensión del impacto de la manipulación de plantas y pruebas de diagnóstico para un sector como el floricultor.

8. Recomendaciones

En el laboratorio se debe implementar RT-PCR múltiplex para agilizar el testeo de las muestras, invertir en un equipo de maceración de tejido vegetal para que el proceso sea eficiente, ampliar las instalaciones y la cantidad de personal pues la UBi está creciendo rápidamente al igual que la demanda.

Para realizar esta pasantía se debe tener alto grado de concentración y atención a cada proceso dada la importancia que todos los detalles tienen para la confiabilidad de los resultados derivados. Se debe consultar siempre ante la menor duda en la realización de un procedimiento, preparación de soluciones, medios, manipulación de muestras y material vegetal al jefe del área para que se defina que acción debe tomarse.

Seguir atentamente y cumplir los lineamientos del SGC, a su vez procurar por la actualización permanente sobre los aspectos en los que se desarrollan las actividades del laboratorio y no tener matriculadas otras asignaturas para llevar correctamente el proceso.

9. Bibliografía

1. Sociedad de Agricultores de Colombia (Colombia) & Ministerio del Medio Ambiente (Colombia). Guía ambiental para la floricultura. Repositorio Institucional Agrosavia. Corporación colombiana de investigación agropecuaria. 2002.
2. Instituto Colombiano Agropecuario. Con 700 millones de tallos, Colombia aporta variedad, color y belleza a la celebración de San Valentín [Internet]. Instituto Colombiano Agropecuario - ICA; 2024 [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/noticias/ica-colombia-exporta-flores-san-valentin-2024>
3. Asocolflores. Informe de logros 2023 [Internet]. Dirección de Mercadeo y Comunicaciones & Coordinación Mercadeo Relacional y Comunicaciones – Asocolflores; 2024 [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://drive.google.com/file/d/1Rlj7S4yVqhn9Ka92G9HZlcQSU9sdyL1O/view>
4. Innovacione. Floricultura en Colombia [Internet]. Floricultura en Colombia – Innovacione; 2023 [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://innovacione.eu/2023/02/01/flores/>
5. Koppert. Crisantemo [Internet]. Koppert Colombia; 2024 [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.koppert.com.co/cultivos/plantas-ornamentales/crisantemo/>
6. Holland House. Crisantemos colombianos atraen miradas de compradores de Países Bajos [Internet]. Cámara de Comercio Colombo Holandesa; 2022 [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://hollandhouse-colombia.com/crisantemos-colombianos-atraen-miradas-de-compradores-de-paises-bajos>
7. Montoya Marín M, Gutiérrez Sánchez PA. Principios de virología molecular de plantas tropicales. Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA); 2016. p. 48-51.
8. Fox A, Mumford RA. Plant viruses and viroids in the United Kingdom: An analysis of first detections and novel discoveries from 1980 to 2014. *Virus Res.* 2017 Sep 15; 241: 10-18. Cited in PubMed; PMID 28690070.
9. Rose C. Gergerich. Introducción a los Virus Vegetales, el Enemigo Invisible. Scientific Societies; The Plant Health Instructor [Internet]. 2007 [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/introduction/Pages/PlantVirusesEspañol.aspx#:~:text=Los%20virus%20vegetales%20y%20los,eliminarlos%20sin%20da%C3%B1ar%20al%20hospedante.>
10. Cumes Mantanico SY. ETIOLOGIA, INCIDENCIA, SEVERIDAD Y DISTRIBUCION DEL TIZON DE CRISANTEMO, EN SAN JUAN SACATEPÉQUEZ, GUATEMALA [Tesis]. Guatemala: UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA; 2008.
11. García Prieto ÁL. EVALUACION DE ALGUNAS CONDICIONES DE LA TRANSFORMACION GENETICA DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora*) VARIEDAD WHITE ALBATROSS

UTILIZANDO *Agrobacterium tumefaciens* [Tesis]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.

12. Supakitthanakorn S, Vichitrangoontavorn K, Kunasakdakul K, Ruangwong O. Simultaneous and sensitive detection of CVB, CChMVd and CSVd mixed infections in chrysanthemum using multiplex nested RT-PCR. *International Journal of Agricultural Science and Technology*. 2022; 18: 857-870.
13. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino. Patógenos de plantas descritos en España [Internet]. *Sociedad Española de Fitopatología*; 2006. p. 229. [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/patogenos%20final_tcm30-57872.pdf
14. UBI - Unidad de Biotecnología Vegetal - Universidad CES [Internet]. [citado 22 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.ces.edu.co/investigacion-e-innovacion/unidades-de-negocio-basadas-en-conocimiento/ubi-unidad-de-biotecnologia-vegetal/#presentacion>
15. Pulgarín Navarro JM. MANUAL DE PRODUCCIÓN DE CRISANTEMO. Centro de Innovación de la Floricultura Colombiana – Ceniflores. Bogotá; 2021. p. 90.
16. ESGInnova Group. Norma ISO/IEC 17025:2017 [Internet]. 2023 [citado 9 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.nueva-iso-9001-2015.com/2023/08/norma-iso-iec-17025-2017/>