

**Pasantía en procesos de propagación *in vitro* en la unidad
de biotecnología vegetal de la universidad CES**

Estudiante
Cesar Augusto Sabogal Rubio

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
Agosto 2022

Noviembre 21 de 2022.

Se informa que el estudiante **Cesar Augusto Sabogal Rubio** identificado con cédula: No. 1005814871 ha concluido de manera satisfactoria su trabajo de grado titulado “**Pasantía en procesos de propagación in vitro en la unidad de biotecnología vegetal de la universidad CES**” en la modalidad de *Pasantía*.

En calidad de **director(es)** del trabajo de grado en mención, y luego de haber revisado con detalle y alto rigor científico y académico el presente documento final, se aprueba este Trabajo de Grado como requisito parcial para optar al título de **Biólogo**.



Diego Mauricio Martínez Rivillas
Cédula: 98565978
Universidad CES

Pasantía en procesos de propagación *in vitro* en la unidad de biotecnología vegetal de la universidad CES

Cesar Augusto Sabogal Rubio

Resumen

La micropropagación vegetal es una herramienta de la biotecnología vegetal que nos permite dar solución a problemas que se presentan en el sector agrónomo y forestal, garantizando así una mejora en la producción y eficiencia de los cultivos de interés económico. Una unidad de biotecnología vegetal tiene la capacidad de generar productos vegetales con características específicas según las necesidades del cliente, como puede ser la eliminación de patógenos, plantas con un genotipo específico, entre otros, garantizando así que la producción de un cultivo se pueda dar en óptimas condiciones. A modo general, los objetivos para este trabajo de grado en modalidad de pasantía se basan principalmente en la adquisición de habilidades que permiten desarrollar las distintas actividades que se llevan a cabo en una unidad de biotecnología vegetal, cumpliendo con los estándares de calidad, salubridad y aspectos normativos que garantizan la eficiencia en la ejecución de las actividades afines a la micropropagación de plantas de interés económico. Para cumplir con los objetivos planteados para este trabajo de grado, se llevó a cabo una participación en las actividades que involucran la propagación *in vitro* de plantas, acompañado de una constante capacitación en las medidas de aseguramiento que ofrece la unidad de biotecnología vegetal, atención de procesos administrativos y normativos, realización de los informes correspondientes y el uso de herramientas estadísticas que permiten validar los procesos que se llevan a cabo.

Palabras clave: Micropropagación, pruebas moleculares, protocolo, normativas.

TABLA DE CONTENIDO

1. PRESENTACIÓN.....	4
2. RESEÑA DE LA INSTITUCIÓN.....	5
3. OBJETIVOS.....	6
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	6
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
4. LOGROS ALCANZADOS.....	7
5. DIFICULTADES.....	7
6. RESULTADOS.....	7
6.1 DETECCIÓN DE VIRUS Y VIROIDES EN PLANTAS.....	8
6.2 PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS.....	13
6.3 APLICACIÓN LINEAMIENTOS TECNOLOGICOS, BIOSEGURIDAD Y CONDICIONES ASÉPTICAS.....	17
7. CONCLUSIONES.....	19
8. RECOMENDACIONES.....	20
9. BIBLIOGRAFÍA.....	20
10. AGRADECIMIENTOS.....	21

1. Presentación

En el desarrollo de la pasantía se participó de todas las actividades que se llevan a cabo en la Unidad de Biotecnología Vegetal – UBi de la Universidad CES, entre las cuales de manera general hacen parte, la propagación *in vitro* de plantas, la realización de pruebas moleculares para la detección de virus y viroides, entre otros. La importancia de esta labor consiste en servir como apoyo al sector agrícola y productivo del país, con el fin de proveer un material vegetal libre de patógenos, que tenga un mejor desempeño en el campo en aspectos como calidad y sanidad y a su vez de la productividad. La biotecnología vegetal es una herramienta que tiene buenas perspectivas a futuro, pues cada vez es mayor la

incidencia de nuevas plagas y enfermedades que llegan a los cultivos por diferentes variables, sumado a eso el cambio climático que genera condiciones específicas para que un patógeno se pueda establecer en un cultivo productivo. En este contexto la biotecnología vegetal brinda herramientas que contribuyen al desarrollo de acciones para enfrentar diferentes condiciones que afectan los cultivos.

Para un estudiante en formación en el área de biología es importante la realización de una práctica, pues de esta manera permite que el estudiante tenga un acercamiento al sector práctico de la biotecnología vegetal, de modo que adquiera las habilidades prácticas necesarias que le permitan desenvolverse en un entorno laboral que involucra la prestación de servicios y el buen manejo y aplicabilidad de las prácticas de laboratorio. Con esto se espera que a partir de la formación en habilidades que hacen parte del quehacer en el área de la biotecnología vegetal, el profesional en biología pueda ser capaz de aplicar sus conocimientos y habilidades prácticas, con el fin de llevar a cabo la resolución de distintos problemas presentes en el entorno real y laboral que involucran las áreas mencionadas.

La realización de la práctica contribuye a que en su formación, el estudiante adquiera no solamente las habilidades prácticas, sino también principios como la responsabilidad y el compromiso que implica hacer parte de una unidad de biotecnología vegetal, teniendo en cuenta que las labores que se llevan a cabo en la unidad de biotecnología representan y soportan el trabajo de miles de familias campesinas que dependen de que sus producciones de cultivos agrícolas puedan salir adelante por medio del apoyo que se ofrece a través de las herramientas que brinda la biotecnología vegetal, como lo son proveer un material vegetal libre de patógenos apto para cultivos, o la selección de una variedad deseada con ciertas características y estándares de calidad que permiten que una producción de un cultivo pueda prosperar y generar ganancias y rentabilidad al mercado agricultor.

2. Reseña de la institución

La Unidad de Biotecnología Vegetal (UBi), es un laboratorio que propende por impactar la producción vegetal en los sectores atendidos bajo un respaldo académico y científico. La unidad se encuentra adscrita a la facultad de Ciencias y Biotecnología de la Universidad CES,

la cual ofrece servicios e investigación en el sector agrícola, forestal, entre otros. En esta unidad se llevan a cabo labores como detección de virus y viroides, investigación, producción de metabolitos secundarios y propagación *in vitro* de plantas por medio de técnicas biotecnológicas que cumple con los estándares de calidad y sanidad vegetal necesarios para llevar a cabo las actividades mencionadas Universidad CES (s.f). La UBi ha centrado sus esfuerzos en los últimos años a la prestación de servicios para el sector agro y para el desarrollo colaborativo con el sector floricultor con un alcance a nivel de Suramérica. La unidad de Biotecnología vegetal-UBi se encuentra ubicada en la Sede El Poblado de la Universidad CES en la calle 10ª No. 22 – 04 de Medellín – Antioquia. La UBi conserva las líneas de los estatutos de la Universidad, entre los que se destaca ser una universidad autónoma, de carácter privado no confesional, sin ánimo de lucro, que busca la formación en todas las áreas del conocimiento, con las más altas cualidades humanas, éticas y científicas. Desde su fundación en el año 1977, la meta de la Universidad ha sido siempre la excelencia, gozando del reconocimiento tanto de los académicos como de la sociedad en general.

En su misión la UBi comprende que sus servicios estén direccionados a impactar la producción vegetal en los sectores atendidos con el respaldo académico y científico de la Universidad CES.

Adicionalmente su visión plantea que para el año 2025 la UBi será unos de los tres laboratorios nacionales de mayor impacto y capacidad para contribuir a la calidad fitosanitaria de cultivos vegetales mediante un amplio portafolio de servicios basados en técnicas biotecnológicas

Adicionalmente la UBi, se ha favorecido en el fortalecimiento de sus capacidades a través de las diversas convocatorias del estado promovidas por MINCIENCIAS en alianza con el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, el Ministerio de Comercio, el Instituto Nacional de Metrología y el Sistema General de Regalías.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Desarrollar habilidades prácticas y competencias para el desempeño en un laboratorio de Biotecnología Vegetal.

3.2 Objetivos específicos

- Llevar a cabo procesos de micropropagación de plantas de interés económico.
- Desarrollar habilidades en aplicación de pruebas moleculares con el fin de llevar a cabo la detección de virus y viroides en plantas.
- Reconocer aspectos normativos relacionados con las actividades de la Unidad de Biotecnología vegetal.

4 Logros alcanzados

- Acercamiento al sector laboral en el ámbito de la biotecnología vegetal.
- Desarrollo de labores de rutina que permiten la adquisición de disciplina y procesos operativos de un laboratorio.
- Reconocimiento de normas de seguridad y competencias requeridas para el desempeño laboral.

5 Dificultades

Incrementar el nivel de proactividad en las actividades involucradas en la unidad de biotecnología vegetal, tales como; la ejecución de pruebas de detección de virus y viroides en plantas y la propagación in vitro de plantas.

Asimilación de las funciones y responsabilidades requeridas para el trabajo productivo e independiente de las labores asignadas.

6 Resultados

6.1 Adquisición de habilidades en la ejecución de pruebas moleculares para llevar a cabo la detección de virus y viroides en plantas; estas pruebas consistieron en la aplicación de técnicas basadas en principios técnicos de biología molecular, tales como las pruebas PCR en tiempo real, pruebas ELISA para la detección de virus empleando kits específicos y protocolos implementados en la UBi.

6.2 Adquisición de habilidades en la propagación *in vitro* de plantas; para lo cual se afianza la competencia para preparación de medios de cultivo, establecimiento de plantas en condiciones *in vitro*, procesos de micropropagación de plantas, seguimiento y control de factores que afectan el cultivo *in vitro* y la propagación.

6.3 Adquisición de disciplina tecnológica para la realización de las actividades de laboratorio bajo condiciones asépticas.

Actividades

Llevar a cabo procesos de micropropagación de plantas de interés económico; recepción del material, limpieza de material, introducción y propagación.

Desarrollar habilidades en aplicación de pruebas moleculares con el fin de llevar a cabo la detección de virus y viroides en plantas; recepción del material, codificación del material, aplicación técnicas de biología molecular para llevar a cabo la detección de virus y viroides, interpretación de resultados y envío de los mismos.

Reconocer aspectos normativos relacionados con las actividades de la Unidad de Biotecnología vegetal; asistencia a capacitaciones de manejo y buenas prácticas de laboratorio.

6.1 Detección de virus y viroides en plantas

Algunos de los virus más conocidos en el área de la fitopatología y a los cuales la UBi ofrece servicios de detección son: TSWV y el grupo de los *potyvirus*, conocidos por afectar distintos cultivos agrícolas frutales y florales, presentando síntomas graves en las plantas, impidiendo así su crecimiento normal, algunos síntomas presentados en plantas son: clorosis y deformación en las hojas. Por otra parte en el área de los viroides a los cuales la UBi ofrece servicios de detección encontramos los siguientes: CChMVd y CSVd, los cuales también causan irregularidades en la formación de las hojas. Estos patógenos mencionados afectan, entre otros, a cultivos de flores de crisantemo, importantes para el sector floricultor del oriente Antioqueño y Colombia.

Patógeno	Clasificación	Técnica detección implementada
TSWV	Virus	RT-PCR / Test ImmunoStrip
CChMVd	Viroide	RT-PCR
CSVd	Viroide	RT-PCR
<i>Potyvirus</i>	Virus	ELISA

Tabla 1. Algunos Patógenos a los cuales la UBi ofrece servicios de detección

Para las empresas que solicitan los servicios de detección de estos grupos de virus y viroides es fundamental que las pruebas cuenten con un soporte que garantice su validez y veracidad, por ende es importante que un laboratorio que ofrece estos servicios cuente con aprobación de alguna entidad regulatoria como lo es el ICA, el cual vela por que las actividades que se llevan a cabo en la UBi cumplan con todos los lineamientos y normativas pertinentes regidos bajo la norma NTC ISO17025.

La detección de los diferentes tipos de virus y viroides a los cuales la UBi ofrece servicios de detección se da por medio de la realización de pruebas RT-PCR (PCR en tiempo real) (Song et al, 2013), los cuales se realizan por un diseño previo de primers específicos para cada tipo de virus y viroides que se pudiesen detectar en las plantas testeadas. La fundamentación de esta técnica consiste en generar secuencias virales a partir de un primer específico y emitir fluorescencia por medio de elementos que se unen a las secuencias virales replicadas a medida que avanzan los ciclos de replicación, lo cual indica la presencia o ausencia de material viral insertado en el genoma de la planta, a mayor fluorescencia mayor material genético viral replicado. Sin embargo para realizar esta técnica, primero se debe ejecutar un proceso previo, el cual se compone de las siguientes partes: ingreso del material vegetal; se reciben las muestras, estas son debidamente marcadas y codificadas en una base de datos, posteriormente se pesa el material vegetal al cual se le realizará la prueba de detección; se seleccionan alrededor de 10 hojas a las cuales se les toma muestras realizando cortes cuadrados de aproximadamente 2 mm de lado, posteriormente las muestras (recortes de hojas) son pesadas en la balanza hasta alcanzar entre 80 y 100 miligramos, seguido a esto se procede a realizar la extracción del material genético; las muestras

pesadas previamente son maceradas con ayuda de un mortero y una solución que permite la lisis celular, las muestras son centrifugadas y se extrae el sobrenadante al cual se le hacen varios lavados con etanol, dos tipos de soluciones buffer diferentes y con ayuda de la centrifuga, finalmente gracias a los filtros especiales que tienen los viales, los ácidos Nucleicos son retenidos en este y finalmente se añade agua ultra pura para almacenar las muestras con el material genético obtenido.



Ilustración 1. Ingreso y marcación de muestras

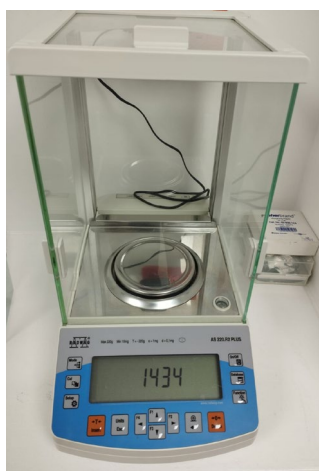


Ilustración 2. Balanza pesaje material vegetal



Ilustración 3. Cabina extracción ácidos nucleicos

En la siguiente etapa del proceso se hace una cuantificación del material genético obtenido en donde se observa y analiza su concentración y pureza; en esta etapa se toma una muestra del material genético extraído en la primera etapa de extracción de ácidos nucleídos, las muestras son puestas en una placa que es ingresada al equipo MultiSkan que permite cuantificar el material genético en donde los parámetros de pureza y concentración son medidos. Finalmente se procede con la realización de la prueba RT-PCR que permite identificar la presencia del virus o viroide en el material vegetal; este consiste en tomar las muestras de material genético obtenidas y determinar si hay presencia de secuencias virales insertadas, para ello se implementa un primer específico para replicar posibles secuencias virales presentes, se prepara un master mix el cual tiene el primer (Forward y Reverse) y la sonda TaqMan, este conjunto de elementos permite replicar posibles secuencias virales y la sonda permite generar fluorescencia uniéndose a las secuencias

virales, dicha señal es detectada por el termociclador que arroja los resultados pertinentes de fluorescencia a medida que avanzan los ciclos de replicación. Finalmente se hace una interpretación de los resultados obtenidos y se realiza el respectivo informe, el cual es enviado a la empresa correspondiente. La interpretación de los resultados consiste en medir la cantidad de fluorescencia emitida por cada uno de las muestras testeadas a medida

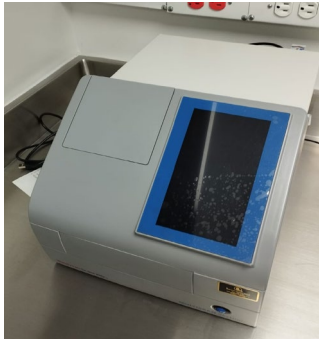


Ilustración 4. Equipo Multiskan ThermoScientific, permite cuantificar ácidos nucleicos



Ilustración 5. Placa Multiskan ThermoScientific para soporte de muestras

que avanzan los ciclos de replicación de secuencias programados para la RT-PCR, si hay aumento en la fluorescencia en alguna de las muestras testeadas significa que hubo material genético viral que se replicó y por ende está insertado en el material genético de la planta, por ende la prueba arroja un resultado positivo para el virus testeado.

Otra de las técnicas moleculares utilizadas para llevar a cabo la detección de virus (TSWV) fue la prueba ImmunoStrip, la cual comprende de unas tirillas reactivas, los cuales al contacto con la muestra vegetal macerada y tras la ruptura celular mediada por soluciones buffer, permite que la tirilla entre en contacto con material viral en caso de que este esté presente en la planta y este genere una reacción que indique la presencia del virus en la muestra. De igual modo, para llevar a cabo este proceso primero debe haber un ingreso y registro del material, seguidamente este debe ser pesado como se describió anteriormente con un valor entre 100 y 120 mg, posteriormente la muestra es macerada por medio de la ayuda de soluciones buffer que permiten la lisis celular es allí el momento en que la tirilla reactiva entra en contacto con la muestra y revela si la muestra es positiva o no para el virus testeado en esta caso (TSWV), para determinar esto la tirilla refleja una línea roja de control

en las muestras, y si en la misma aparece una segunda línea roja significa que hay presencia del material viral, finalmente se hace el informe del resultado y se envía a la empresa a la cual se le ofrece el servicio.

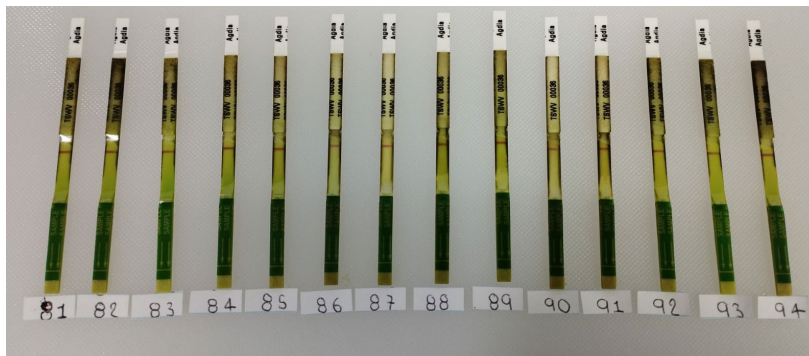


Imagen 6. Resultado final test immunoStrip en detección de TSWV

Adicionalmente, en la UBi recientemente se implementó una técnica molecular conocida como ELISA (Álvarez et al, 2018), por medio de una capacitación por parte de la docente Yuliana Gallo de la Universidad CES. Esta técnica es útil para detectar virus de la familia de virus *Potyvirus* en plantas frutales como lo son el tomate de árbol, uchuva, entre otros. Este proceso consiste en implementar diferentes reactivos químicos para llevar a cabo la detección de los mismos, esta detección se da por indicadores a partir de cambios de color en las muestras. Esta prueba de detección de virus comprende de las siguientes etapas: ingreso y etiquetado de las muestras que se van a testear, seguido a esto se hace el pesaje correspondiente del material vegetal seleccionado y se macera la muestra con ayuda de soluciones buffer. El mecanismo por el cual se fundamenta esta técnica consiste en que en una placa de varios pozos se adiciona una muestra vegetal el cual posiblemente tenga un antígeno viral, posterior a varios lavados con soluciones específicas se adiciona el anticuerpo que se une al antígeno y por medio de un indicador colorimétrico genera un cambio en la tonalidad de la muestra y sirve de indicativo de presencia o ausencia viral, cabe resaltar que hay distintas variables de este procedimiento que se pueden ajustar según su necesidad.

 UNIVERSIDAD CES <small>la universidad con la experiencia</small> <small>AGROPECUARIO</small>		Reporte de Resultados			
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO, NUMERO DE REGISTRO LB0000052022 Expedido el 27 de Enero de 2022 con vigencia hasta el 27 de Enero de 2032 Se expide el registro conforme al artículo 9 de la Resolución ICA no. 093558 del 26 de marzo del 2021					
Nº de solicitud: CES22061500002			Nº de reporte: CES22061500002-1		
Fecha de recepción: 2022-06-15		Fecha del análisis: 2022-06-15		Fecha de emisión del resultado: 2022-06-15	
Solicitante (Responsable): -			Dirección: Calle 10a #22-04		
Propietario: Universidad Ces			Predio: -		
Municipio: Medellín			Departamento: Antioquia		
Objeto del análisis: Diagnóstico					
PRUEBA MOLECULAR - PCR.					
Identificación		Resultados			
		Viroide CSVd	Viroide CChMVd	TSWV	
-		Positivo	Negativo	Indeterminado	
--		Negativo	Positivo	Negativo	
MÉTODO					
<ul style="list-style-type: none"> • Viroide CSVd mediante la técnica RT-PCR en tiempo real • Viroide CChMVd mediante la técnica RT-PCR en tiempo real • TSWV mediante la técnica RT-PCR en tiempo real 					
ESPECIFICACIONES					
Negativo: El procedimiento No detectó amplificación de la secuencia del virus o viroide en la muestra evaluada. Positivo: El procedimiento Si detectó amplificación de la secuencia del virus o viroide en la muestra evaluada. Indeterminada: El procedimiento detectó una amplificación de ácidos nucleicos en la muestra evaluada, su comportamiento no permite esclarecer plenamente la presencia virus o viroide en la muestra evaluada.					
OBSERVACIONES					
NOTA: Este informe no se puede reproducir parcialmente. Los resultados de este informe solo son aplicables a la(s) muestra(s) analizada(s)					
COPIAS: Archivo laboratorio de diagnóstico fitosanitario UBI - Unidad de Biotecnología Vegetal- Universidad CES - Medellín					

Con atención,

Imagen 7. Ejemplo entrega de informe de resultados a las empresas correspondientes

6.2 Propagación *in vitro* de plantas

Se ejecutaron las actividades correspondientes a la propagación *in vitro* de plantas, las cuales comprenden de: preparación de medios de cultivo; a partir de la adición de una fuente de carbono, hormonas, vitaminas y agar, con un pH adecuado, gracias a una fuente de calentamiento permite que el agar al volver a bajar su temperatura se pueda compactar, también el establecimiento de plantas en condiciones *in vitro*; manipulando de manera adecuada las herramientas necesarias para la actividad: uso de pinzas, recipientes y cuchillas previamente esterilizadas, seguimiento y control de factores que afectan el cultivo *in vitro* y la propagación; vigilar el nivel de humedad en la zona, iluminación correspondiente y temperatura.

Se realizó un acompañamiento y apoyo a estudiantes de maestría y pregrado de la Universidad CES, sirviendo de ayuda para emplear los diferentes procesos de investigación

y docencia que se llevan a cabo en la unidad de biotecnología vegetal de la Universidad CES. Para ello se trabaja con distintas especies vegetales que hacen parte de los procesos que se desarrollan en el laboratorio desde el área académica y de extensión, en la cual se ofrecen servicios a empresas del sector agroindustrial del país y Sudamérica, a continuación se muestran algunas de las especies que se trabajan en el laboratorio. Como dato adicional destacar que el crisantemo es una de las principales plantas que hacen parte de los procesos llevados a cabo en la UBi, pues se estima que son alrededor de 200 las variedades de crisantemo que se trabajan allí, por ende también es importante mencionar la importancia del banco de germoplasma, el cual es el lugar en el que se almacenan distintas variedades de plantas, en especial de crisantemo, con el fin de que los clientes puedan tener una reserva de variedades en caso tal de que esta sufra afectaciones en campo y sea muy afectada por algún patógeno o entorno natural de manera abrupta.

Nombre	Familia/Grupo
Banano	<i>Musaceae</i>
Orquidea	<i>Orchidaceae</i>
Crisantemo	<i>Asteraceae</i>
<i>Syngonium sp</i>	<i>Araceae</i>
Alstroemeria	<i>Alstroemeriaceae</i>

Tabla 2. Algunas especies que se trabajan en la UBi

En el marco de acompañamiento en el entorno académico y de prestación de servicios se apoyó en el proyecto de rescate de embriones de alstroemeria, proyecto el cual estaba vinculado a una empresa cuya principal actividad es el cultivo de alstroemeria y un estudiante de posgrado de la Universidad CES, la importancia de este proyecto radica en que por medio del rescate de embriones de alstroemeria se pueden rescatar y diseñar variedades específicas de interés económico que sin ayuda de las herramientas que brinda la biotecnología vegetal no sería posible. Por otro lado en el campo de prestación de servicios hubo atención a los diferentes procesos que están involucrados con la propagación in vitro de crisantemos, apoyando en las labores de preparación de medios de cultivo,

micropropagación de plántulas, preparación y embalaje del material y supervisión de las condiciones del material.



Ilustración 8. Cabina flujo laminar



ilustración 9. Repisa cultivos vegetales

Para el cultivo de segmentos apicales a partir del establecimiento de condiciones in vitro primero hay una etapa de recepción del material proveniente de las empresas, este es marcado y codificado en una base de datos, a estos se les realiza la prueba de detección de virus (RT-PCR) descrita anteriormente, una vez los resultados arrojan negativos se procede a la etapa de introducción. Esta etapa parte del lavado de los explantes seleccionados para introducir, este se hace con ayuda de sustancias especiales para remover cualquier patógeno presente en el material por medio de la agitación del recipiente con los explantes en contacto con las sustancias que eliminan los posibles patógenos presentes, una vez lavado se lleva al área de introducción donde se le hacen unos últimos lavados con hipoclorito al 1-2% y agitación, una vez lavados, se toman segmentos apicales de un tamaño de hasta 0,5 cm, y son establecidos en el medio de cultivo preparado previamente según las necesidades de la planta, es decir las vitaminas y hormonas de crecimiento que requiera la especie la fuente de carbón y el agar. El tiempo de establecimiento se presenta con un promedio de 5 semanas a partir de las cuales se procede a micropropagar según la cantidad de plántulas requeridas.

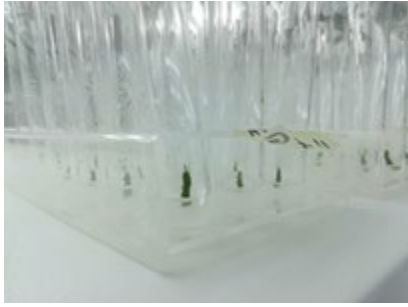


Ilustración 10 .establecimiento de condiciones cultivo in vitro



Ilustración 11. Segmentos apicales de crisantemo

Por otra parte, para el cultivo de meristemos se realizan los mismos pasos descritos para cultivo de segmentos apicales, pero aquí se establecen segmentos meristemáticos de un tamaño de hasta 0,3 mm, procedentes de los explantes previamente evaluados para la presencia de virus y/o viroides según el requerimiento. El tiempo de establecimiento se presenta con un promedio de 3 a 5 meses a partir de los cuales se procede a micropropagar para alcanzar las cantidades de plántulas que sean requeridas.



Ilustración 12 .establecimiento de meristemos día cero

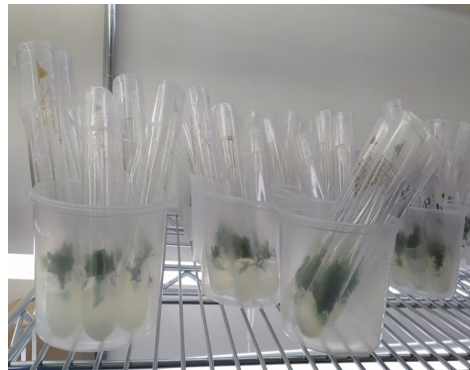


Ilustración 13 .establecimiento de meristemos tiempo después

Una vez las plántulas alcancen el tamaño adecuado y se induzca la raíz, estará lista para ser entregadas, en recipientes plásticos en condiciones asépticas. Sin embargo según la solicitud de unidades requeridas por la empresa también hay una etapa de propagación del material, el cual consiste en que a partir de un cultivo de un segmento apical o de meristema se replican las unidades que sean necesarias, esto se logra haciendo nuevos cortes apicales de las plantas cultivadas previamente y sembrándolas en nuevos recipientes bajo las mismas condiciones de medio de cultivo e iluminación.



Ilustración 14. Recipientes para envío de material



Ilustración 15. Ensamblaje recipientes para entrega y preservación del material



Ilustración 16. Rotulación y empacado final del material

6.3 Aplicación Lineamientos tecnológicos, bioseguridad y condiciones asépticas

Realización de un seguimiento del protocolo para el establecimiento de condiciones estériles para llevar a cabo las labores diarias que se llevan a cabo en la unidad de biotecnología vegetal de la Universidad CES.

Apoyo en las actividades de esterilización de material utilizado en el laboratorio mediante un equipo de autoclave que garantiza las condiciones aptas para la manipulación del material vegetal, el equipo de autoclave sirve no solo para esterilizar los medio de cultivos en los cuales se realiza la micropropagación de explantes, sino que también allí se pueden esterilizar todos los utensilios que tienen que ver con la manipulación del material, tales como; pinzas, papel, porta cuchillas, entre otros. Uno de los aspectos claves a resaltar en cuanto a condiciones estériles y asépticas se refiere es el cuidado que debe tener el personal que manipula el material vegetal, pues debe seguir ciertos lineamientos que mitiguen la

probabilidad de contaminación de un medio de cultivo, estos parámetros son: Limpieza en profundidad y conciencia de las manos y uñas, uso constante de alcohol al 70% para desinfectar las superficies en las cuales se trabaja, movimientos adecuados que eviten tocar superficies no estériles con las manos y utensilios, entre otros, estos son principios y fundamentos que hacen parte del funcionamiento de un laboratorio basado en buenas prácticas de laboratorio.



Ilustración 17. Equipo autoclave



Ilustración 18. Recipientes cultivos

En el margen de entendimiento de las normas y aplicación de buenas prácticas de laboratorio, es importante mencionar la asistencia a las distintas capacitaciones y cursos brindados por la UBi con el fin de tener claras las normas de manejo y cuidado de los equipos de laboratorio, instalaciones y elementos de seguridad, estas fueron brindadas por el personal de la UBi durante los primeros días de asistencia a la pasantía, de igual modo se participó de una capacitación en primeros auxilios dictada por el personal de primeros auxilios de la universidad CES, esta consistió en dos sesiones de clases teóricas y una práctica para tener presente el protocolo que se debe seguir ante una emergencia en el laboratorio.

Entendiendo el contexto globalizado y cambiante en el cual nos encontramos es clave resaltar la labor crucial que resulta en la aplicación de nuevas tecnologías, en especial en aquellas que comprenden de una de las actividades fundamentales de la UBi como lo son

la detección de virus y viroides, pues en el transcurso de la pasantía hubo capacitación en implementación de nuevas técnicas de detección de virus como lo son las pruebas ELISA (Álvarez et al, 2018), técnica que se explicó anteriormente, la cual antes no había sido probada en el laboratorio, dicha capacitación arrojó resultados positivos, pues se pudo realizar pruebas en muestras de plantas de uchuva y tomate de árbol en las cuales la técnica fue efectiva en la detección de los virus de la familia de los *potyvirus*. La interpretación de los resultados de esta técnica se dió siguiendo los instructivos que hacen parte del kit de detección para pruebas ELISA dada por el fabricante, en donde se plantea que a partir del cambio del gradiente de color presente en las placas ELISA se establece la presencia de virus en la muestra y según la tonalidad observada se puede estimar la cantidad de virus que se puede encontrar en las muestras vegetales testeadas. Esta técnica implica un avance significativo en cuanto a la certificación de la UBi, pues hace parte de uno de los requisitos para que la entidad regulatoria que es el ICA pueda avalar al laboratorio como una unidad apta para la prestación de este tipo de servicios de detección de virus y viroides en plantas. De igual modo es importante destacar el apoyo que hubo en la aplicación de técnicas bajo los lineamientos de la norma NTC ISO17025 como parte del proyecto “Fortalecimiento de las capacidades de un laboratorio para la detección de virus y viroides en cultivos de frutales tropicales para su registro en el ICA”. Puesto que gracias a la aplicación de esta norma la UBi puede contar con un respaldo que garantiza que las actividades que se llevan en el laboratorio cumplan con los estándares de calidad pertinentes para ofrecer los distintos servicios que ofrece en pro del sector agroindustrial de la región y el país.

7 Conclusiones

La propagación *in vitro* de plantas permitió desarrollar habilidades prácticas que permiten el desempeño del quehacer de un biólogo en un entorno laboral aplicado a la biotecnología vegetal.

La pasantía en la UBi permitió desarrollar la capacidad de resolución de problemas que debe tener un profesional a la hora de enfrentarse a la vida real y los distintos problemas que se deben afrontar en un entorno moderno y en constante cambio.

La proactividad es uno de los pilares bases que sustentan el progreso y el buen desempeño de un profesional en el área de biología, pues este es el modo en que el trabajo en equipo se ve reflejado en los resultados.

La disciplina y la responsabilidad son aspectos fundamentales a la hora de ejecutar una pasantía, ya que de este modo las actividades que se realizan en el laboratorio dan resultados positivos que permiten brindar soluciones en el gremio de la agricultura y la biotecnología vegetal.

La formación en normas de calidad y seguridad es crucial a la hora de ejecutar las labores que se llevan a cabo en una unidad de biotecnología vegetal y proveen al profesional argumentos que validen sus actividades y sean avalados por el cumplimiento de la normativa implementada.

8 Recomendaciones

Para la realización de esta pasantía se recomienda contar con un espacio disponible que permita vincular un horario de tiempo completo, por ende se recomienda que el pasante haya concluido en su mayoría con los cursos de pregrado, con el fin de evitar enfrentarse ante una posible incompatibilidad horaria.

La disposición y el compromiso son los pilares bases que garantizan la efectividad en la realización de las diferentes actividades que se llevan a cabo en una unidad de biotecnología vegetal.

9 Bibliografía

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 22(5), 299-305.

Álvarez, N., Jaramillo, H., Gallo, Y., Gutiérrez, P. A., & Marín, M. (2018). Molecular characterization of Potato virus Y (PVY) and Potato virus V (PVV) isolates naturally infecting cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Antioquia, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 36(1), 13-23.

Song, A., You, Y., Chen, F., Li, P., Jiang, J., & Chen, S. (2013). A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of viruses and viroids in chrysanthemum. *Letters in Applied Microbiology*, 56(1), 8-13.

10 Agradecimientos

Quiero agradecer a todo el equipo de la UBi cuyos miembros son: Mónica Orozco, Alejandra Vargas (analistas de laboratorio) y a mi tutor Diego Martínez por el acompañamiento brindado durante el periodo de la pasantía, su sentido de pertenencia y dedicación por lo que hacen son el pilar base para que la UBi esté en el lugar que está y siga creciendo año tras año.