



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA

“Evaluación del efecto del manitol y el ácido jasmónico sobre la concentración de antocianinas en callo *in vitro* obtenido a partir de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.) ”

Elaborado por: Maila Gutiérrez, Alexis Stalin
Directora: Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph.D.
Sangolquí, 19 de agosto 2022



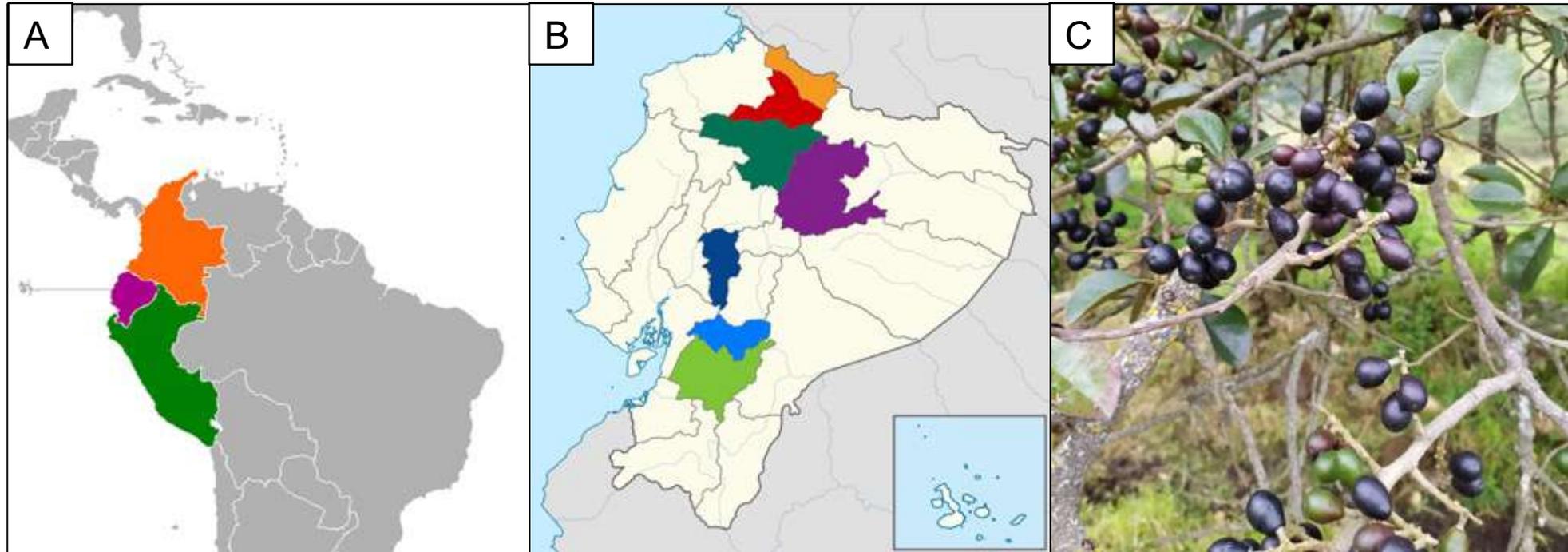
ÍNDICE DE CONTENIDO

Introducción	01		
Objetivos	02		
Metodología	03		
Resultados y Discusión	04		
			05 Conclusiones
			06 Recomendaciones
			07 Agradecimientos



1 INTRODUCCIÓN





A) Zonas de distribución del motilón en América del sur, B) Zonas de distribución del motilón en el Ecuador, C) Frutos del motilón en la comunidad Carbonería

Clasificación taxonómica de Hyeronima Macrocarpa Schltr.

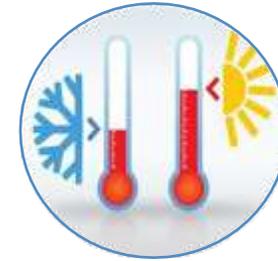
Reino	Plantae
Filo	Angiospermophyta
Orden	Magnoliopsida
Familia	Phyllanthaceae
Género	<i>Hyeronima</i>
Especie	<i>macrocarpa</i>
Nombre común	Motilón
Nombre científico	<i>Hyeronima macrocarpa</i> Schltr.



Árbol del motilón en la provincia de Imbabura, comunidad carbonería

INTRODUCCIÓN

Metabolitos secundarios



Clima



Luz



Situación geográfica

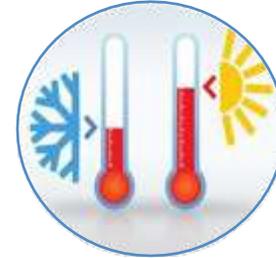
INTRODUCCIÓN

Producción de metabolitos secundarios *in vitro*

Sistemas de regulación para la producción de metabolitos secundarios, mejorando la productividad

Las células cultivadas no se encuentran bajo amenaza por microorganismos o insectos

Pueden generarse independientemente de factores externos (composición del suelo, clima, etc.).



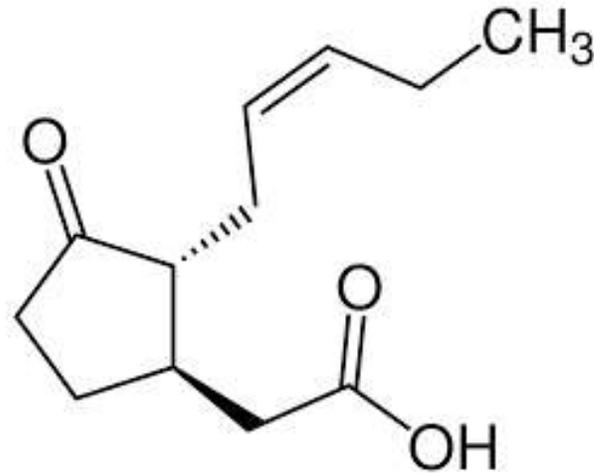
Temperatura,
humedad



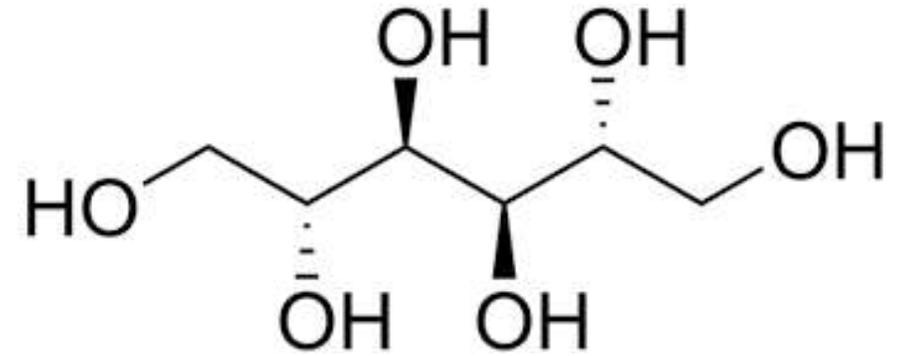
Luz



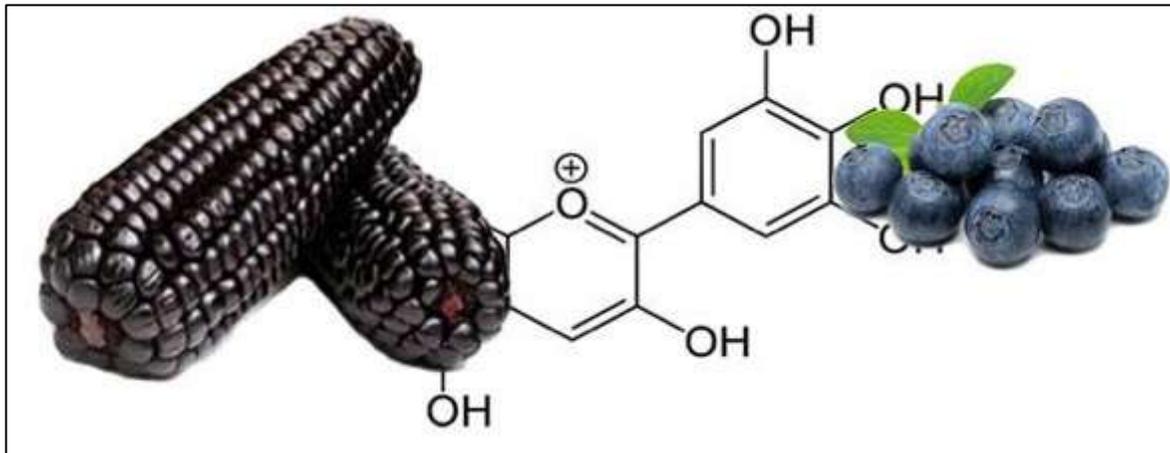
Reguladores de
crecimiento



Ácido jasmónico



Manitol

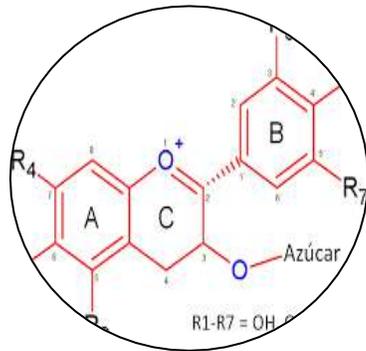
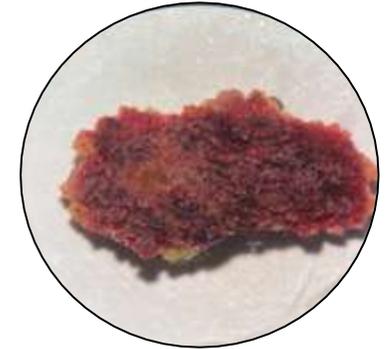
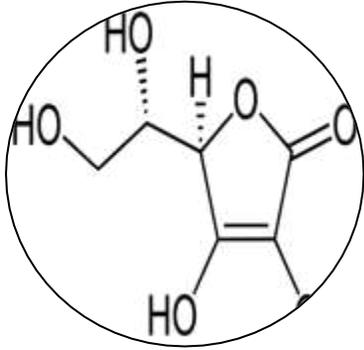


Concentración de antocianinas en algunas frutas de tipo baya

Taxonomía	Nombre común	Concentración (mg/100g de fruta)	Estándar
<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	Arándano alpino	256	Mv-3-glu
<i>Rubus occidentalis</i> L.	Frambuesa negra	627	Cy-3-glu
<i>V. parvifolium</i>	Arándano rojo	34	Cy-3-glu
<i>R. nigrum</i> cv	Grosella negra	411	Cy-3-glu
<i>Sambucus nigra</i>	Cauco negro	200-1000	Cy-3-glu
<i>V. vinifera</i>	Uva de vid	350-750	Cy-3-glu
<i>Citrus sinensis</i>	Naranja dulce	200	Cy-3-glu

INTRODUCCIÓN

Propiedades y beneficios





OBJETIVOS



OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto del manitol y el ácido jasmónico sobre la concentración de antocianinas en callo *in vitro* obtenido a partir del cultivo de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.).

OBJETIVOS

Objetivos Específicos

- Establecer el medio de cultivo para la inducción a callogénesis *in vitro* a partir de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.).
- Cuantificar la concentración de antocianinas presentes en el callo *in vitro* obtenido de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.).
- Cuantificar la concentración de antocianinas presentes en el callo *in vitro* obtenido de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.) al ser expuestos a manitol y ácido jasmónico.



HIPÓTESIS

El manitol y el ácido jasmónico aumentan la concentración de antocianinas en los callos *in vitro* obtenidos a partir de mesocarpio del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.).



3 METODOLOGÍA



METODOLOGÍA

Protocolo de desinfección



Recolección del material vegetal



Selección del material vegetal



Detergente 2% (p/v)



Fungicida-Bactericida 3% (v/v)



Hipoclorito de sodio 10% (v/v)

METODOLOGÍA

Protocolo de inducción a callogénesis



Cámara de flujo laminar



Lavados agua estéril



Siembra en medio de cultivo MS y WPM

Diseño experimental aplicado para la inducción a callogénesis in vitro

Tratamiento	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	
		2,4-D mg/L	6-BAP mg/L
TC0 (control)	WPM	0	0
TC1	WPM	3	0,75
TC2	WPM	4	1
TC3	WPM	5	1,25
TC01 (control)	MS	0	0
TC4	MS	3	0,75
TC5	MS	4	1
TC6	MS	5	1,25

Fase de incubación

- Condiciones ambientales
- 8 días de incubación
- Porcentaje de inducción



3g del mesocarpio del motilón



Maceración de mesocarpio del motilón



Extracción de antocianinas durante 24 horas



Filtrado del extracto del mesocarpio motilón



$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4,5} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Antocianinas (mg/L)} = \frac{A \times PM \times DF \times 1000}{\epsilon \times l} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

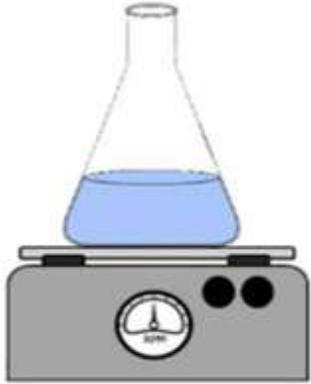
A: Absorbancia

DF: Factor de dilución

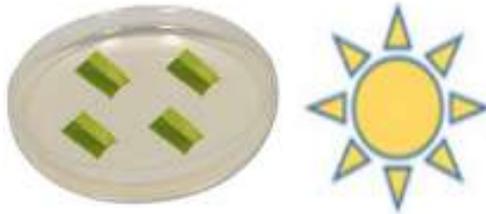
PW: Peso molecular

ϵ : coeficiente de extinción molar





- Medio de cultivo WPM + fitorreguladores + manitol + ácido jasmónico



- Manitol 30 días
- Ácido jasmónico 7 días
- Fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

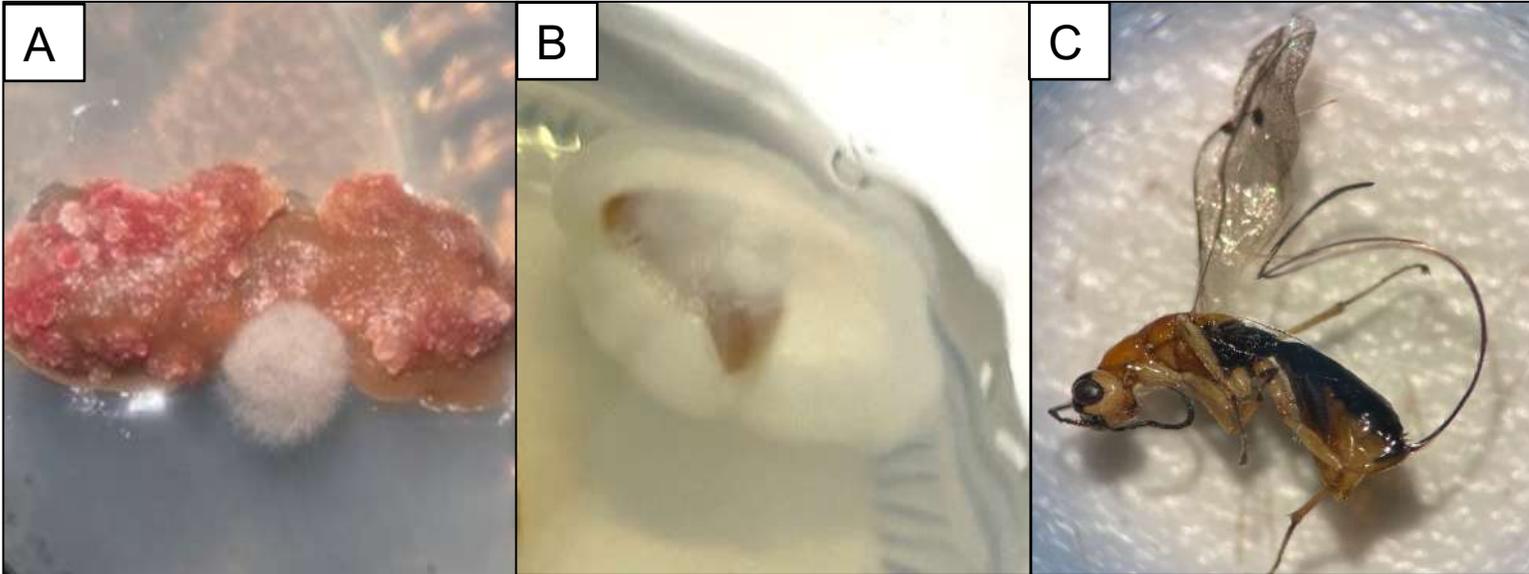
Concentraciones de elicitores para promover la biosíntesis y acumulación de antocianinas

Tratamiento	Medio de cultivo	Elicitores	
		Manitol mM/L	Ácido jasmónico μ M/
TE0: (control)	WPM+2,4-D 4mg/L + 6-BAP 1 mg/L	0	0
TE1	WPM+2,4-D 4mg/L + 6-BAP 1 mg/L	1	20
TE2	WPM+2,4-D 4mg/L + 6-BAP 1 mg/L	2	40
TE3	WPM+2,4-D 4mg/L + 6-BAP 1 mg/L	3	60

4

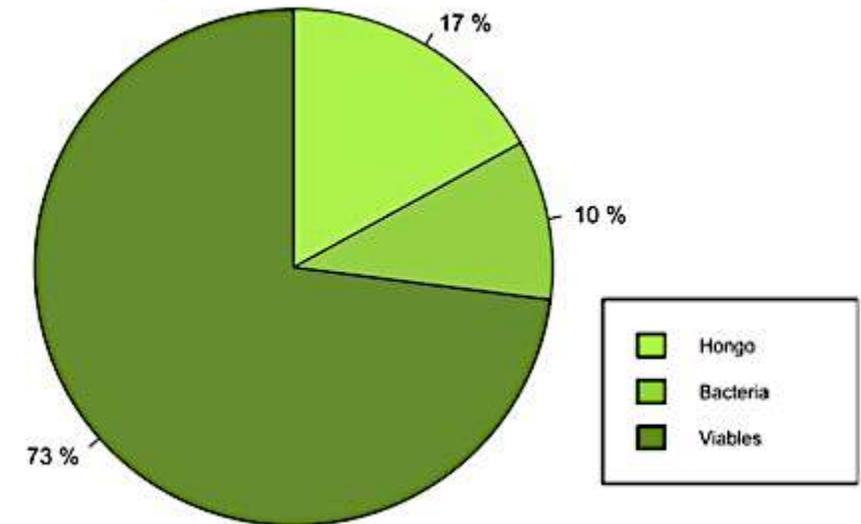
RESULTADOS Y DISCUSIÓN





A) Contaminación fúngica y **B)** Contaminación bacteriana, **C)** insecto del orden Himenóptera.

Porcentaje de contaminación

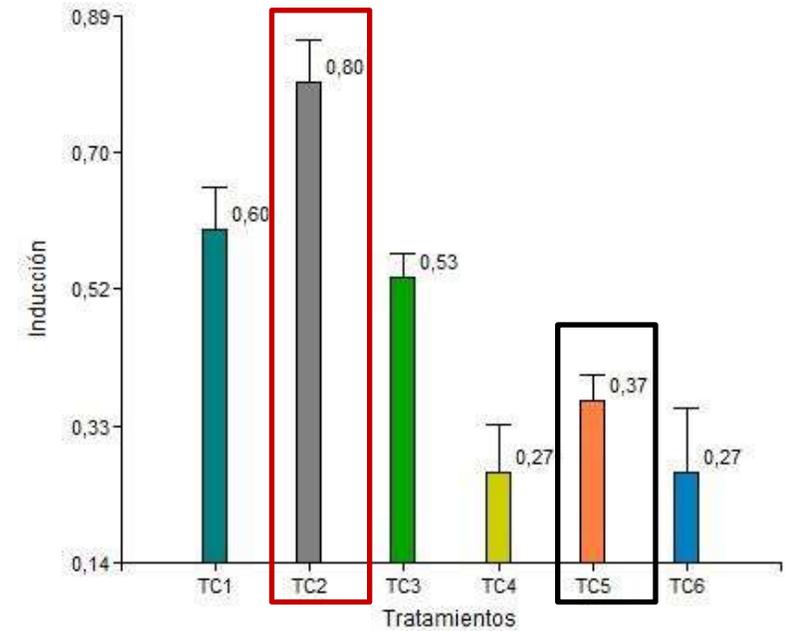


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción a callogénesis *in vitro*



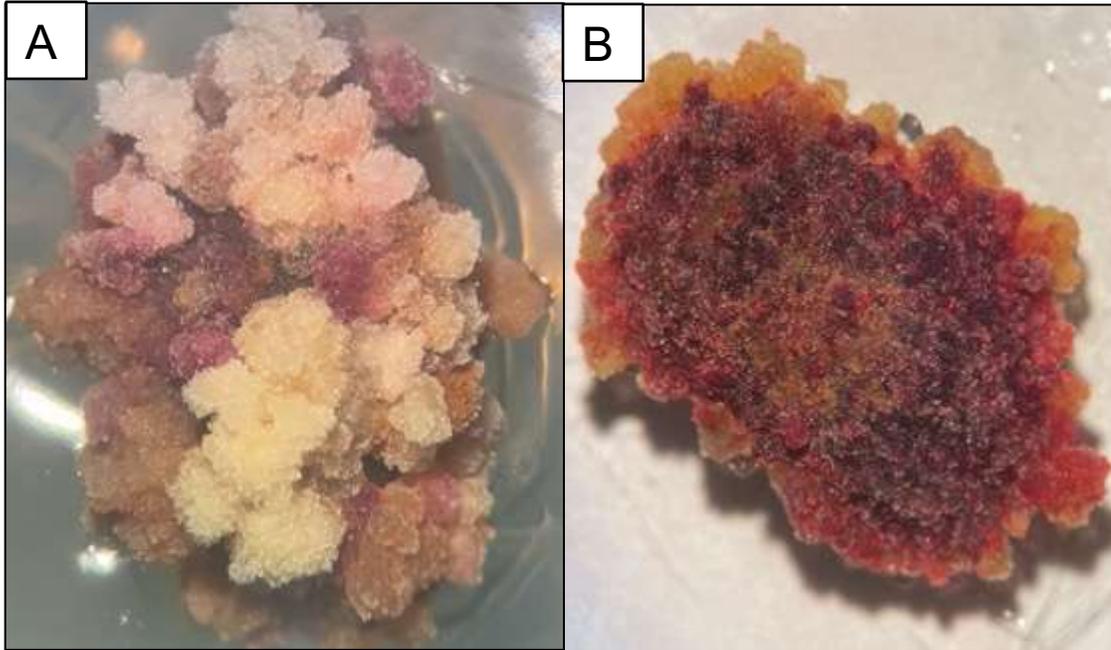
Proceso de formación de callo del motilón (*Hyeronima macrocarpa* Schltr.)



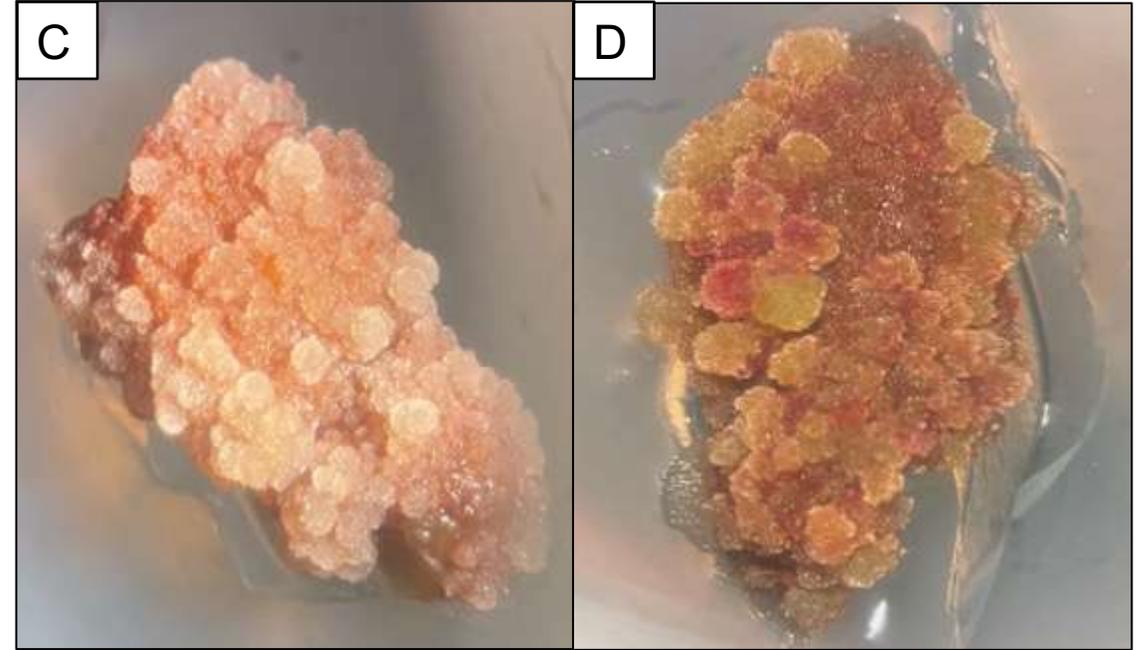
Tratamientos	n	Medias	E.E.	Agrupación	
TC6	3	0,27	0,06	A	
TC4	3	0,27	0,06	A	B
TC5	3	0,37	0,06	A	B
TC3	3	0,53	0,06	C	
TC1	3	0,60	0,06	C	
TC2	3	0,80	0,06	D	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción a callogénesis in vitro



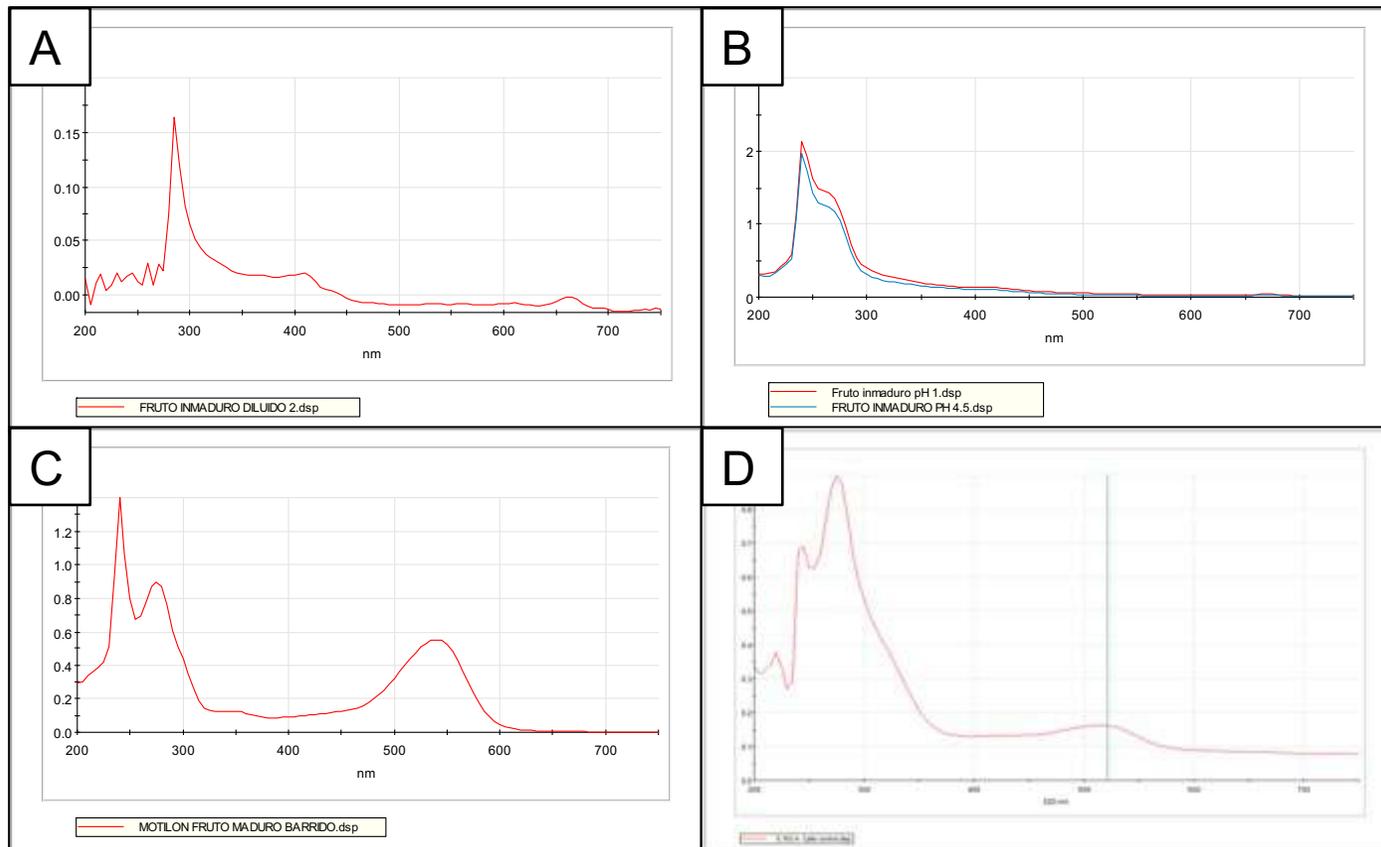
A) Callo de motilón introducido en medio de cultivo MS y **B)** Callo de motilón introducido en medio de cultivo WPM



C) Callo de 28 días incubado en oscuridad. **D)** Callo que ha sido expuesto a luz fluorescente durante ocho días, posterior al periodo de incubación sin luz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de antocianinas



Concentración de antocianinas del fruto inmaduro del motilón y del callo *in vitro*

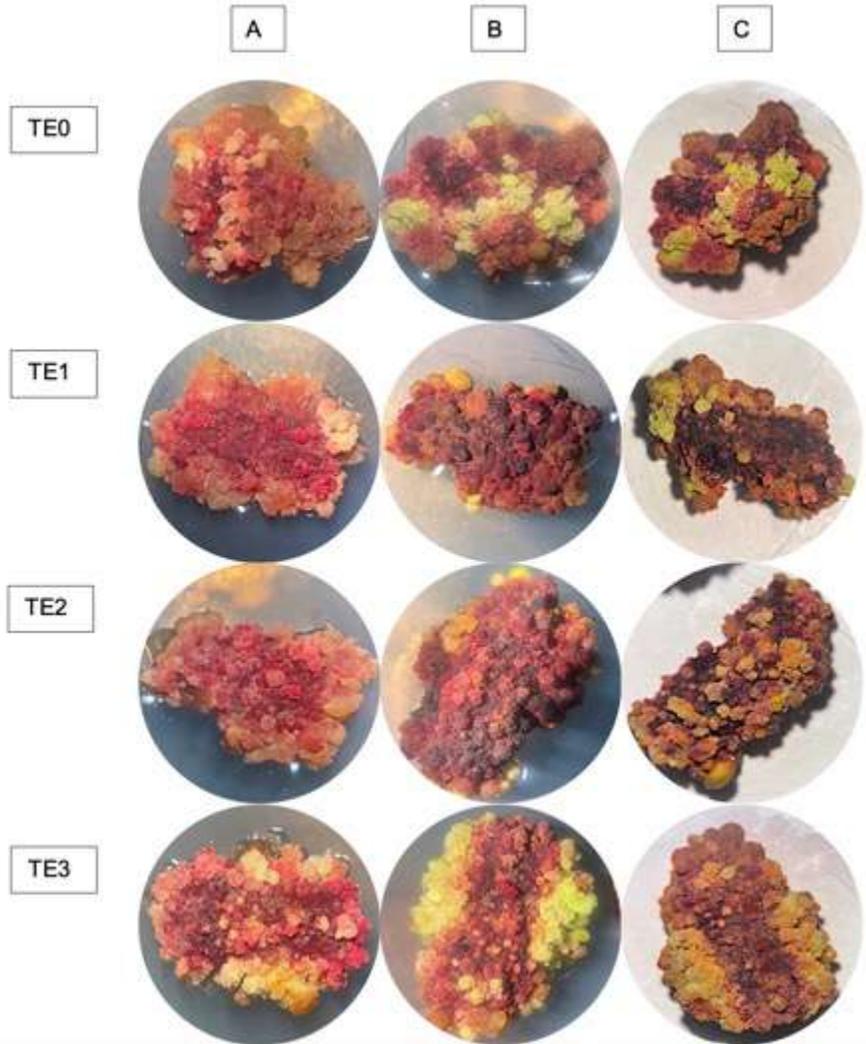
	Concentración Antocianinas mg/L	Concentración Antocianinas mg/g
Fruto inmaduro 1	0,333	0,032
Fruto inmaduro 2	0,500	0,048
Fruto inmaduro 3	0,667	0,067
Callo T1	24,881	2,463
Callo T2	23,712	2,348
Callo T3	25,048	2,422

0,049 ± 0,02 mg/g

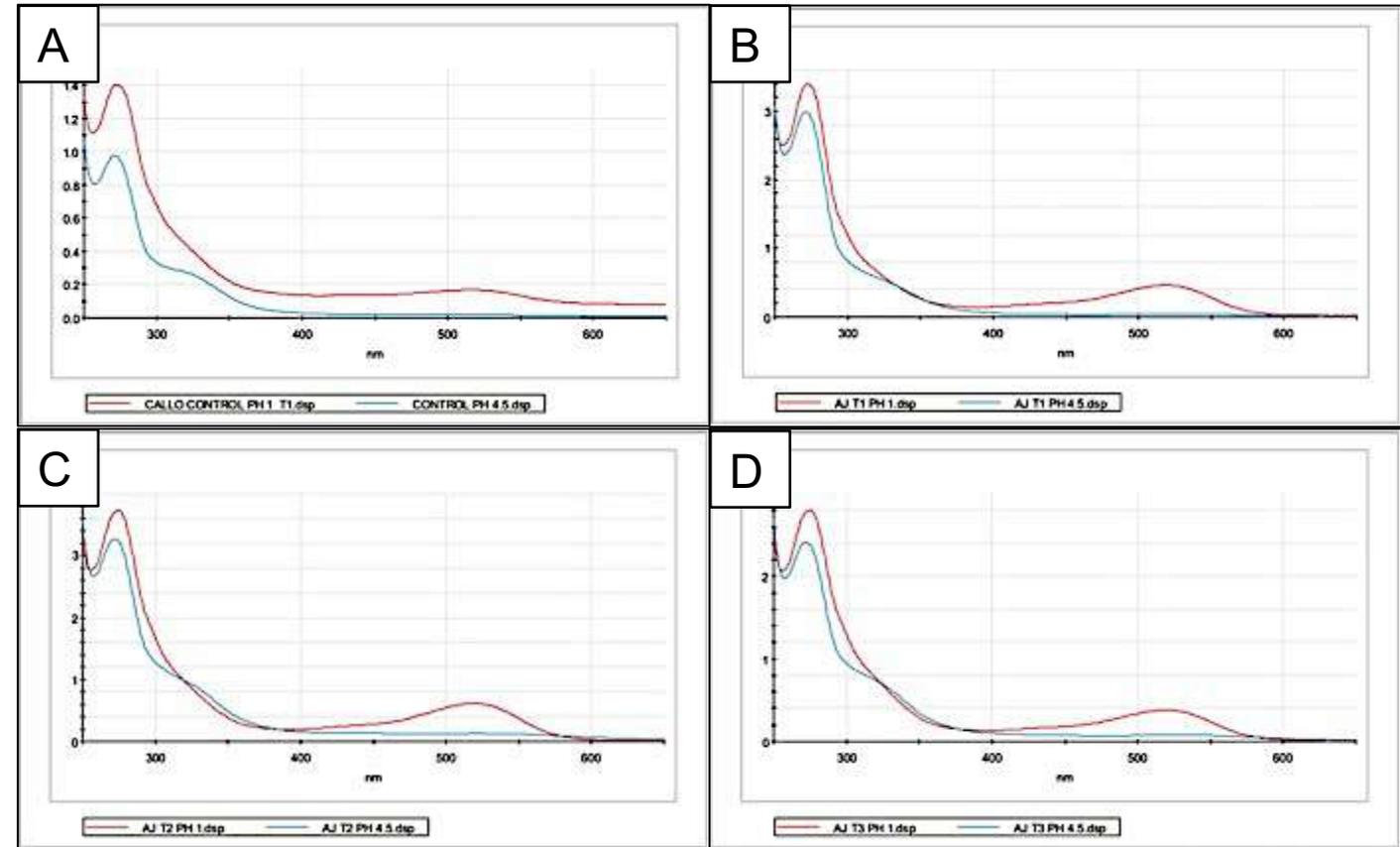
2,411 ± 0,065 mg/g

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del manitol y el ácido jasmónico



Cambios morfológicos del callo de motilón expuestos a diferentes concentraciones de elicitores



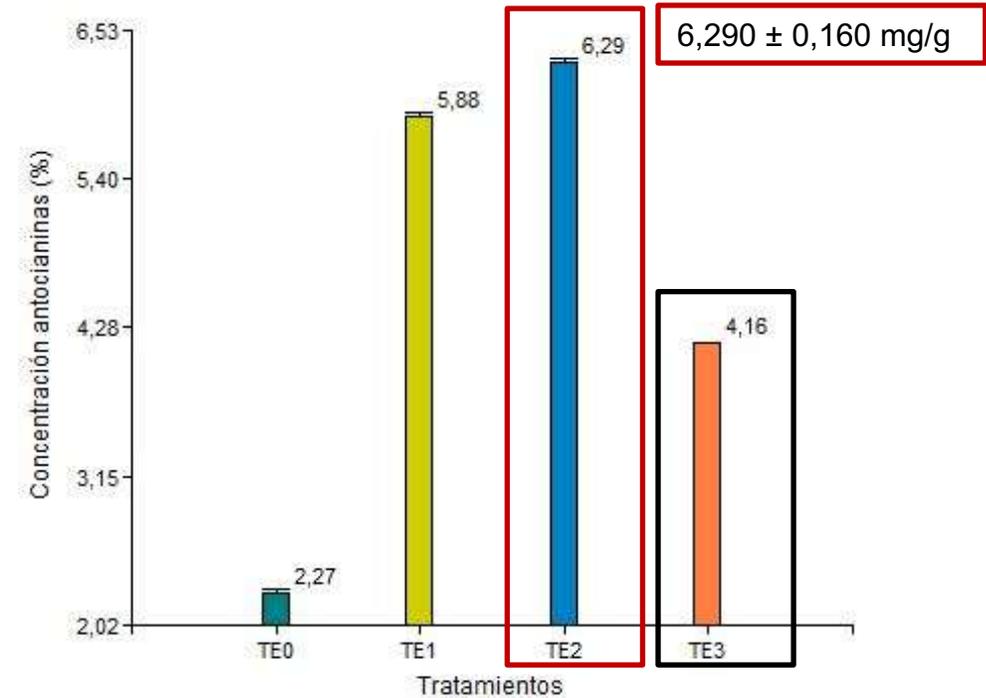
Espectrofotometría UV-Vis de la antocianina presente en callo de motilón a pH 1.0 y pH 4.5. A) TE0, B) TE1, C) TE2 y D) TE3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del manitol y el ácido jasmónico

Concentraciones de antocianinas totales de los diferentes tratamientos de elicitación

Tratamientos	Concentración antocianinas mg/L	Concentración antocianinas mg/g
TE0.1	23,378	2,338
TE0.2	22,377	2,238
TE0.3	22,210	2,221
TE1.1	59,281	5,928
TE1.2	58,947	5,895
TE1.3	58,279	5,828
TE2.1	62,454	6,245
TE2.2	62,621	6,262
TE2.3	63,623	6,362
TE3.1	41,413	4,141
TE3.2	41,580	4,158
TE3.3	41,747	4,175



Tratamientos	n	Medias	E.E.	Agrupación
TE0	3	2,27	0,03	A
TE3	3	4,16	0,03	B
TE1	3	5,88	0,03	C
TE2	3	6,29	0,03	D

5 CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- El **protocolo de desinfección** aplicado a los frutos del motilón (detergente 2%, fungicida-bactericida 3%, e hipoclorito de sodio 10%) permitió que el 73% de los explantes introducidos no presenten contaminación fúngica ni bacteriana, para su posterior inducción a callogénesis.
- Se estableció que el **medio de cultivo WPM** suplementado con **4mg/L de 2,4-D y 1mg/L de BAP** indujo la **mayor** formación de callo (80%) en los explantes introducidos de mesocarpio del motilón, mientras que el **medio de cultivo MS** suplementado con **5mg/L de 2,4-D y 1,25mg/L de BAP** presentó el **menor** porcentaje de inducción de callo (27%).



CONCLUSIONES

- Mediante el **método espectroscópico diferencial de pH** se **cuantificó la concentración de antocianinas** totales presentes el fruto inmaduro y en el callo de *Hyeronima macrocarpa* Schltr., para lo cual se realizó un extracto con el solvente (**metanol:ácido acético 19:1**) donde la concentración del fruto inmaduro es $0,049 \pm 0,02$ mg/g y en el callo del motilón es $2,411 \pm 0,065$ mg de antocianinas por cada gramo de callo. Evidenciando que *el cultivo in vitro* es una técnica que nos permite la **producción de metabolitos secundarios** como es el caso de las antocianinas.
- El sistema de cultivo de dos etapas con un tratamiento combinado de **manitol (2mM) y ácido jasmónico (40µM)** dio lugar a la **acumulación de antocianinas** en la biomasa del callo, obteniendo mediante el método espectroscópico diferencial de pH una **concentración de antocianinas de $6,290 \pm 0,160$ mg** por gramo en comparación a su **control que contiene $2,270 \pm 0,155$ mg/g**, aumentando en 2,77 veces el contenido de antocianinas.





RECOMENDACIONES



RECOMENDACIONES

- Además de las **antocianinas** se debería analizar **otros metabolitos secundarios** en el callo de *Hyeronima macrocarpa* Schltr., ya que en los **espectros** se puede observar que existen otros **picos de absorción** aun no descritos..
- Evaluar **otros elicitores** que **estimulen la biosíntesis** y acumulación de **antocianinas** y de otros **metabolitos secundarios**.
- Establecer **suspensiones celulares** del callo de motilón, ya que según la bibliografía los **metabolitos secundarios se producen en mayor cantidad** por esta técnica de cultivo de tejidos.



RECOMENDACIONES

- Se sabe que las antocianinas son **asimiladas entre el 1 y 2%** en el cuerpo humano, esto se debe a la **inestabilidad** que estas presentan, por lo que se recomienda investigar un **proceso de extracción** de las misma a partir del callo de motilón en donde ya se ha demostrado su presencia. De esta manera se podría usar las antocianinas extraídas para la **producción de tabletas**, jarabes, o soluciones que **aumenten la biodisponibilidad** al momento de ingerirlas.



7

AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS



Mónica Jadán, Ph.D.

Directora del Proyecto de Investigación

Andrea Ortega, Mgtr

Técnica del laboratorio de cultivo de tejidos

Blanca Naranjo, Ph.D.

Docente investigador

Tesistas y pasantes

Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales

Familia

Amigas y Amigos



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador



**¡MUCHAS
GRACIAS!**



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA