



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE FRUCTANOS EN *MUSA*

Tesis que presenta

CARLOS IVÁN CRUZ CÁRDENAS

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2015

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Estudio de fructanos en *Musa*" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Rosa Maria Escobedo Gracia Medrano, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martinez Estevez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, octubre 2015.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:



Nombre: I.B.T. Carlos Iván Cruz Cárdenas

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “PROGRAMA INTEGRAL PARA EL MANEJO DEL CULTIVO DE PLATANO, IMPULSANDO LAS BUENAS PRACTICAS DE CAMPO E INOCUIDAD BASADOS EN LA INVESTIGACION Y APLICACION DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLOGICAS” con el apoyo del proyecto CONACYT No. 116886, bajo la dirección de la Dra. Rosa Maria Escobedo Gracia Medrano.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, la Dra. Rosa Ma. Escobedo Gracia-Medrano, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y la dirección durante el desarrollo de este trabajo de investigación; así como por los consejos para mi desarrollo académico y personal.

A mi comité tutorial Dra. Rosa Ma. Escobedo Gracia-Medrano, Dra. Ma. de Lourdes Miranda Ham y el Dr. Leobardo Iracheta Donjuan por guiarme durante todos estos semestres y darme las herramientas para que este trabajo culminara con éxito.

A la Dra Ma. de Lourdes Miranda Ham por todo el apoyo, asesoría brindada y por proporcionarme el espacio-tiempo, reactivos y materiales cuando fueron necesitados.

Al Dr. Leobardo Iracheta por seguir transmitiendo sus enseñanzas a mi persona y seguir asesorándome en este proyecto.

Al comité revisor de tesis conformado por Dra. Rosa María Escobedo Gracia Medrano, Dra. Ma. De Lourdes Miranda Ham, Dra. Virginia Herrera Valencia, Dr. Manuel Martínez Estévez, Dr. Sergio Peraza Sánchez, Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez y el Dr. Leobardo Iracheta Donjuán, por tan acertadas correcciones en mi documento de tesis.

A la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), principalmente al laboratorio 22 por las instalaciones, material y equipo sin el cual no podría haber culminado mi trabajo.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por prestar sus recursos humanos y materiales para llevar a cabo mis estudios de posgrado y desarrollo de trabajo de investigación en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico mediante la beca otorgada No. **50323** y el apoyo de la Dra. Blondy Canto Canche mediante el proyecto No. **116886** "PROGRAMA INTEGRAL PARA EL MANEJO DEL CULTIVO DE PLATANO, IMPULSANDO LAS BUENAS PRACTICAS DE CAMPO E

INOCUIDAD BASADOS EN LA INVESTIGACION Y APLICACION DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLOGICAS” del cual se obtuvo recursos para poder realizar esta investigación.

A la MC. Lizbeth Castro Concha por el apoyo técnico en las metodologías de determinación de carbohidratos y fructanos.

Al MC. Fco. Javier Garcia Villalobos por el apoyo técnico brindado en el uso adecuado del equipo HPLC.

Al MC. Jose Roberto Ku Cauich por el apoyo técnico brindado durante las colectas del material en el banco de germoplasma de *Musa* del CICY.

DEDICATORIAS

A mi amada esposa por acompañarme en cada momento por este proceso tan importante en mí vida, ser mi motor de vida, mi soporte cuando me cansé, la luz en mis días sombríos, por “ser todo” para mí en todo momento.

A mis padres que están presentes cada día en mis pensamientos, y que a pesar de que algunas veces no entienden lo que hago, siempre están interesados y preguntan porque saben que es importante para mí.

A mi hermana que aunque no lo crea es una gran inspiración para mí, por enseñarme a no darme por vencido y luchar por lo que quiero.

A mi hermano porque siempre me ha acompañado, y de muchas maneras veo en él parte de mí.

A mis abuelos, tíos, tías, primos, que siempre han estado ahí, recordándome el porque debemos seguir avanzando.

A todos mis amigos, que hicieron esta travesía muchísimo más agradable, con las alegrías y reuniones que tuvimos.

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1. FRUCTANOS	3
1.1. ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES.....	3
1.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA	8
1.3 USOS Y APLICACIONES	10
1.4 MUSÁCEAS.....	11
1.4.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE <i>MUSA</i>	13
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
JUSTIFICACIÓN.	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	20
CAPÍTULO II	25

2.1 INTRODUCTION	25
2.2 MATERIALS AND METHODS	27
2.2.1 PLANT MATERIAL	27
2.2.2 CARBOHYDRATES EXTRACTION, HPLC-RID AND HPAEC-IPAD ANALYSES	29
2.3 RESULTS	30
2.3.1 ANALYSIS OF TYPE AND CONTENT OF WATER-SOLUBLE CARBOHYDRATES BY HPLC-RID AND HPAEC-IPAD IN THREE ORGANS OF DIFFERENT MUSA ACCESSIONS	30
2.3.2 PCA REVEALS BANANA GROUPS IN TERMS OF BIOCHEMICAL DIVERSITY IN CARBOHYDRATE METABOLITES	38
2.4 DISCUSSION	40
2.4.1 BIOCHEMICAL DIVERSITY OF WSC IN DIFFERENT ORGANS FROM ELEVEN ACCESSIONS OF BANANA ..	40
2.4.2 RELATIONSHIPS BETWEEN ACCESSIONS BASED ON THE PROFILES OF THEIR WSC METABOLITES	43
REFERENCES	45
CAPÍTULO III	49
3.1 INTRODUCTION	49
3.2. MATERIALS AND METHODS	51
3.2.1 PLANT MATERIALS	51
3.2.2 MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION	52
3.2.3 MORPHOLOGICAL DATA ANALYSIS	53
3.2.4 DNA EXTRACTION AND QUANTIFICATION	53
3.2.5 SRAP AND AFLP-PCR AMPLIFICATION	53
3.2.6 MOLECULAR DATA ANALYSIS.....	55

ÍNDICE

3.3 RESULTS	55
3.3.1 MORPHOLOGICAL EVALUATION	56
3.3.2 MOLECULAR ANALYSIS	59
3.4 DISCUSSION	63
3.4.1 MORPHOLOGICAL EVALUATION	63
3.4.2 MOLECULAR ANALYSIS	64
3.4.3 COMPARISON OF MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS	64
REFERENCES	66
CAPÍTULO IV	71
4.1 INTRODUCCIÓN	71
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	73
4.2.1 ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS EN NÉCTAR POR HPLC-RID	73
4.2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
4.3 RESULTADOS	73
4.4. DISCUSIÓN	81
BIBLIOGRAFÍA	83
CAPÍTULO VI	91
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	91
6.1 CONCLUSIONES GENERALES	91
6.2 PERSPECTIVAS	92

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructuras químicas de las diferentes clases de fructanos en plantas.	5
Figura 1.2 Modelo de biosíntesis de FOS en plantas.	6
Figura 1.3 Morfología de <i>Musa</i>	14
Cuadro 1.1 Material vegetal del género <i>Musa</i>	18
Figura 1.4 Estrategia experimental.....	19
Figura 4.1 Morfología de flores masculinas de diferentes variedades de <i>Musa</i>	75
Cuadro 4.1. Contenido de fructanos y carbohidratos en diferentes tejidos de variedades del género <i>Musa</i>	76
Figura 4.2 Variación en la proporción de sacarosa/glucosa + fructosa del néctar de plantas maduras de once accesiones de <i>Musáceas</i>	77
Figura 4.3 Diagrama ternario de composición de sacarosa, glucosa y fructosa del néctar de flores masculinas de once accesiones de <i>Musa</i>	78
Figura 4.4 Análisis de componentes principales en néctar de once accesiones de <i>Musa</i>	79
Figura 4.5 Dendograma basado en análisis de conglomerados en néctar de once accesiones de <i>Musa</i>	80

ABREVIATURAS

1-FEH	Fructano 1-exohidrolasa
1-FFT	Fructano:fructano 1-fructosiltransferasa
1-SST	Sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa
6-FEH	Fructano 6-exohidrolasa
6G-FFT	Fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa
6-SFT	Sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa
ADNc	Ácido desoxiribonucléico complementario
ANOVA	Análisis de Varianza
FEH	Fructano exohidrolasa
FOS	Fructooligosacaridos
GH32	Glicosil hidrolasas familia 32
GP	Grado de polimerización
GPmax	Grado de polimerización máximo
GPprom	Grado de polimerización promedio
HPLC	High performance liquid chromatography
IOS	Inulobiosacaridos
<i>m.a.</i>	<i>Musa acumunata</i>
<i>m.b.</i>	<i>Musa balbisiana</i>

mg g⁻¹ PS Miligramos por cada gramo de peso seco

SAS Statistical Analysis Software

VI Invertasa vacuolar

RESUMEN

Los carbohidratos solubles en agua (WSC) glucosa, fructosa y sacarosa son bien conocidos por todo el mundo, pero los fructanos representan otro tipo de WSC que merece más atención debido sus propiedades prebióticas e inmunomoduladores en el contexto de los alimentos. Aunque se ha propuesto la presencia de fructo-oligosacáridos (FOS) de tipo inulina en el fruto de algunas accesiones de banano, poca o ninguna información está disponible sobre la identidad exacta de la especie de fructanos, el contenido de fructanos en diferentes partes de las plantas de banano y entre una gama más amplia de cultivares de banano. En este trabajo, se determinó la composición de WSC en hojas, pulpa de frutos maduros y rizomas de plantas de banano de once accesiones (I a XI), incluyendo variedades cultivadas y especies silvestres de *Musa*. La cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada integrada (HPAEC-IPAD) mostró la presencia de 1-kestotriose [GF2], inulobiosa [F2], inulotriose [F3], 6-kestotriose y 6G-kestotriose (neokestosa) especies de fructanos en la pulpa de frutos maduros de diferentes accesiones, pero la ausencia de 1,1-nistosa y 1,1,1 kestopentaose y fructanos de mayor grado de polimerización (DP) de tipo inulina. Estos puntos de la huella metabólica de fructanos indican la presencia de una o más invertasas que son capaces de utilizar fructosa y sacarosa como sustratos aceptores alternativos. La cuantificación de la glucosa, fructosa, sacarosa y 1-kestotriosa, y el análisis de componentes principales (PCA) identificaron grupos de banano relacionados, en base a sus perfiles específicos de WSC. Estos datos proporcionan nuevo conocimiento sobre la diversidad bioquímica de bananos silvestres y cultivados, y arrojan información sobre el posible papel que los fructanos pueden cumplir entre estas especies, durante el desarrollo de la planta y la adaptación a entornos cambiantes. Por otra parte, el descubrimiento de posibles invertasas promiscuas en fruto de bananos (sacarosa y fructosa como sustratos aceptores además de agua) ofrece una nueva vía para impulsar la labor futura sobre las relaciones estructura-función de estas enzimas, que puede conducir al desarrollo de fructosiltransferasas de banano genuinas que son capaces de aumentar el contenido de fructanos en los frutos de banano.

ABSTRACT

The water-soluble carbohydrates (WSC) glucose, fructose and sucrose are well-known to the great public, but fructan represents another type of WSC that deserves more attention given their prebiotic and immunomodulatory properties in the food context. Although the occurrence of inulin-type fructo-oligosaccharides (FOS) was proposed in the fruit of some banana accessions, little or no information is available neither on the exact identity of the fructan species, nor on the fructan content in different parts of banana plants and among a broader array of banana cultivars. Here, we investigated the WSC composition in leaves, pulp of ripe fruits and rhizomes from mature banana plants of eleven accessions (I to XI), including both cultivated varieties and wild *Musa* species. High performance anion exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection (HPAEC-IPAD) showed the presence of 1-kestotriose [GF2], inulobiose [F2], inulotriose [F3], 6-kestotriose and 6G-kestotriose (neokestose) fructan species in the pulp of mature fruits of different accessions, but the absence of 1,1-nystose and 1,1,1 kestopentaose and higher degree of polymerization (DP) inulin-type fructans. This fructan fingerprint points at the presence of one or more invertases that are able to use fructose and sucrose as alternative acceptor substrates. Quantification of glucose, fructose, sucrose and 1-kestotriose and principal component analysis (PCA) identified related banana groups, based on their specific WSC profiles. These data provide new insights in the biochemical diversity of wild and cultivated bananas, and shed light on potential roles that fructans may fulfil across species, during plant development and adaptation to changing environments. Furthermore, the promiscuous behavior of banana fruit invertases (sucrose and fructose as acceptor substrates besides water) provides a new avenue to boost future work on structure-function relationships on these enzymes, potentially leading to the development of genuine banana fructosyltransferases that are able to increase fructan content in banana fruits.

INTRODUCCIÓN

Fructanos es el término empleado para nombrar a los polímeros de fructosa, los cuales están compuestos por unidades de fructosa unidas por enlaces $\beta(2-1)$ y/o $\beta(2-6)$ a una unidad básica de glucosa. Se agrupan en tres familias principales: las inulinas, los levanos y los graminanos.

Si bien el papel de estos polímeros en las plantas no se ha esclarecido del todo, su función como carbohidratos de reserva es la más aceptada hasta el momento. No obstante, se sugiere que estos compuestos también intervienen en la modulación del contenido de sacarosa en los tejidos fotosintéticos, en la regulación de la hidrólisis de la sacarosa durante la descarga del floema, y en la osmóregulación celular, entre otras funciones. Así mismo, el papel de los fructanos en la tolerancia y adaptación de las plantas a las bajas temperaturas y la sequía ha sido señalado en varias ocasiones (Pilon-Smits *et al.*, 1995; Hendry, 1993). La liberación de monómeros de fructosa a partir de los polímeros conduce a la disminución del punto de congelación del agua (Vijn y Smeekens, 1999; Nelson y Spollen, 1987), lo que es importante para la estabilización del proceso fotosintético durante la adaptación a bajas temperaturas.

El uso de los fructanos, especialmente la inulina, en los alimentos conlleva un interés real, dados los beneficios que aportan a la salud. La inulina no se hidroliza ni en el estómago, ni en el intestino delgado del ser humano, lo que evita la formación de monosacáridos, manteniendo así un nivel bajo de glucemia en personas que padecen diabetes. En el intestino grueso, la microflora bacteriana la fermenta, lo que es de utilidad en el caso del desarrollo de matrices de liberación controlada para fármacos.

Debido a los beneficios que aportan los FOS a la salud humana, surge la necesidad de encontrar nuevas plantas que funcionen como fuente de obtención de estos compuestos que permitan a la población acceder a los beneficios que pueden ofrecer los FOS. Las plantas que presentan la mayor cantidad de FOS son la alcachofa, agave, jengibre y la principal es la achicoria, además de algunas gramíneas. Existen evidencias de la presencia de FOS en banano, aunque el estudio debería ampliarse a más accesiones debido al gran número con el que cuenta el género *Musa*.

INTRODUCCIÓN

El género *Musa* (Musáceas, Zingiberales) a menudo se divide en cinco secciones: *Eumusa*, *Rhodochlamys*, *Callimusa*, *Australimusa* y *Ingentimusa*. La sección *Eumusa* es la más extensa, y contiene dos especies principales: *M. a. Colla* y *m. b. Colla*, que constituyen la base genética de la gran mayoría de progenitores de los bananos y plátanos comestibles actuales (Roux *et al.*, 2008). Su centro de diversidad primario se ubica en el sudeste asiático, mientras que el secundario, en el oeste y este de África (INIBAP, 2006). Los bananos y plátanos se cultivan en más de 120 países en áreas tropicales y subtropicales de los cinco continentes.

El plátano ocupa el cuarto lugar entre los productos agrícolas producidos a nivel mundial. Se consume prioritariamente en las zonas cálidas del mundo durante todo el año. En México, el consumo de bananos y plátanos ocupa el segundo lugar, sólo después del maíz. El cultivo de banano en México ocupa una superficie de 79,375.14 ha, produciéndose 2,150,800.84 millones de toneladas, de las cuales el 95% se destina para el consumo nacional y el 5% restante para exportación (SIAP, 2011).

Según datos de SIAP, durante el 2011, las regiones sur-sureste y la centro-occidente contribuyeron con el 99.5% del volumen total de la producción de plátano. La región con mayor producción de plátano es la región sur-sureste, la cual comprende los estados de Chiapas, Tabasco, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Quintana Roo y Campeche. El género *Musa* representa una importante fuente de nutrimentos esenciales, y tiene un importante papel tanto a nivel socio-económico, como ecológico (Bakry *et al.*, 2009). También podría constituir una fuente potencial de ingesta de fructanos; sin embargo, los estudios encaminados a determinar el tipo y la cantidad de fructanos presentes en su gran diversidad de especies y variedades son muy limitados, por lo que el potencial de utilizarlas en los esfuerzos hacia el mejoramiento genético del cultivo también se ve reducido.

Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo la identificación y cuantificación de los fructanos presentes en diferentes especies y variedades del género *Musa*, así como en diferentes tejidos de la planta de genotipos contrastantes. Además, se cuantificó la cantidad de fructanos presentes en néctar y su posible papel en las interacciones con sus polinizadores.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Fructanos

Durante la fotosíntesis, las plantas fijan el dióxido de carbono (CO_2) del ambiente y lo emplean en la síntesis de una gran diversidad de carbohidratos, ya sean estructurales, como la celulosa o la pectina, principales constituyentes de las paredes celulares de las plantas, o de reserva como la sacarosa, el almidón y los fructanos.

Los glucanos (polímeros de glucosa) constituyen la mayor fuente de reserva de carbohidratos no estructurales.

Existe otro tipo de carbohidratos de reserva, los fructanos, que son polímeros de fructosa unidos a un residuo de glucosa como grupo terminal. Son también conocidos como fructosanos y se encuentran en algunas especies de algas, plantas con flores y bacterias. Aunque se les atribuye un papel importante como carbohidratos de reserva, hoy en día su distribución y actividad fisiológica en los diferentes tejidos de la planta aún son objeto de cuidadoso estudio.

Dependiendo de su origen, los fructanos pueden ser lineales, ramificados o cíclicos, y suelen definirse en términos de su grado de polimerización promedio (GPprom) o del grado de polimerización máxima (GPmáx). En los de origen vegetal, el GPmáx no excede de las 200 unidades; no obstante, puede llegar a ser tan alto como 100,000 en los de origen bacteriano (Biedrzycka y Bielecka, 2004).

El almidón está formado por dos tipos de polímeros de glucosa: la amilosa y la amilopectina. En muchos casos, el almidón se encuentra presente en aquellas especies vegetales que también almacenan fructanos, demostrando que el almacenamiento de fructanos y almidón no son mutuamente excluyentes (Pollock, 1986).

1.1. Estructura química y propiedades

Los fructanos son polímeros de fructosa derivados de la sacarosa, por ejemplo inulina, nistosa, kestosa, inulobiosa e inulotriosa (Figura 1.1.). Los fructanos se diferencian entre

CAPÍTULO I

sí por su longitud (grado de polimerización, GP), la bifurcación en las cadenas, el tipo de unión entre la fructosa adyacente y la posición del residuo de glucosa. Los fructanos se encuentran en aproximadamente el 15% de las especies de plantas con flores.

Tanto la inulina, como la oligofructosa y los FOS presentan una estructura polimérica predominantemente lineal. La diferencia radica en el GP, siendo la inulina el compuesto con el mayor GP, los FOS y la oligofructosa son muy similares, pero con diferencias estructurales asociadas a sus diferentes orígenes (hidrólisis enzimática de la inulina para la oligofructosa, y la transfructosilación de sacarosa para los FOS). Las cadenas de las moléculas de oligofructosa son más largas que aquéllas producidas por transfructosilación de la sacarosa. No todas las cadenas tienen una glucosa terminal en la oligofructosa, más sí en los FOS (Crittenden y Playne, 1996).

De acuerdo a su estructura química, los fructanos de plantas superiores suelen dividirse en 5 grupos. El primer grupo lo representan las inulinas, polímeros lineales de fructosa unidas por enlaces $\beta(2-1)$, que están presentes en plantas dicotiledóneas y en algunas monocotiledóneas. El segundo grupo se denomina levanos, presentes en muchas monocotiledóneas y que también son lineales, pero las uniones entre sus residuos de fructosa son del tipo $\beta(2-6)$. El tercer grupo lo constituyen los graminanos, que son ramificados, presentando tanto enlaces $\beta(2-1)$ como $\beta(2-6)$. Éstos están presentes en pastos y cereales.

Otro grupo lo representan las neoserias de inulina, en las cuales se observa un residuo de fructosa en los carbonos 6 y 1 de la glucosa que produce un polímero con residuos unidos con enlaces $\beta(2-1)$ por ambos lados de la molécula de glucosa, estos se encuentran en especies como *Allium cepa* L. y *Asparagus officinalis* L.

En el último grupo están los neolevanos, que se caracterizan por ser polímeros con residuos enlazados, ya sea $\beta(2-1)$ o $\beta(2-6)$, en ambos extremos de la molécula de glucosa.

A diferencia del almidón, que es insoluble en agua y se acumula en los plástidos (principalmente en los cloroplastos), los fructanos son totalmente solubles en agua, y se sintetizan y almacenan en la vacuola, donde se encuentran las enzimas responsables de

su biosíntesis y degradación.

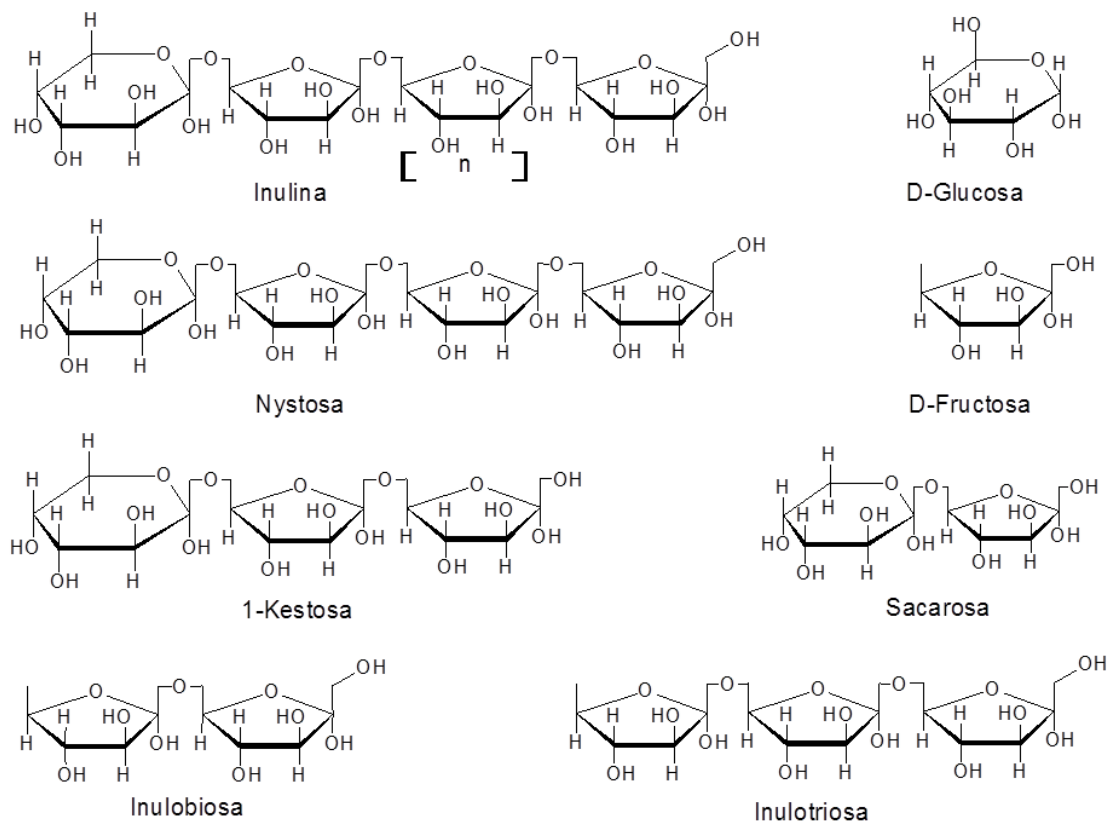


Figura 1.1 Estructuras químicas de las diferentes clases de fructanos en plantas.

En las plantas, la síntesis de los fructanos se lleva a cabo por la acción de dos o más fructosiltransferasas localizadas en la vacuola (Figura 1.2). La primera enzima inicia la formación del trisacárido 1-kestosa, por acción de la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST, EC 2.4.1.99), encargada de catalizar la transferencia de un residuo de fructosa de una molécula de sacarosa a otra. La segunda enzima en el proceso, la fructano:fructano 1-fructosiltransferasa (1-FFT, EC 2.4.1.100) transfiere un residuo terminal de fructosa de una molécula de fructano con un grado de polimerización mayor o igual a 3 a otra molécula de fructano o sacarosa. La acción conjunta de las dos enzimas da lugar a la formación de una mezcla de fructanos con grados de polimerización diferentes. Se han determinado las actividades de otras enzimas involucradas en la síntesis de fructanos con enlaces mixtos, como la sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT, EC 2.4.10), que cataliza la formación de la molécula de bifrucosa, a partir de

CAPÍTULO I

sacarosa y 1-kestosa, la cual puede ser elongada por acción de la 1-FFT o 6-SFT, dando resultado a levanos ramificados o con enlaces mixtos.

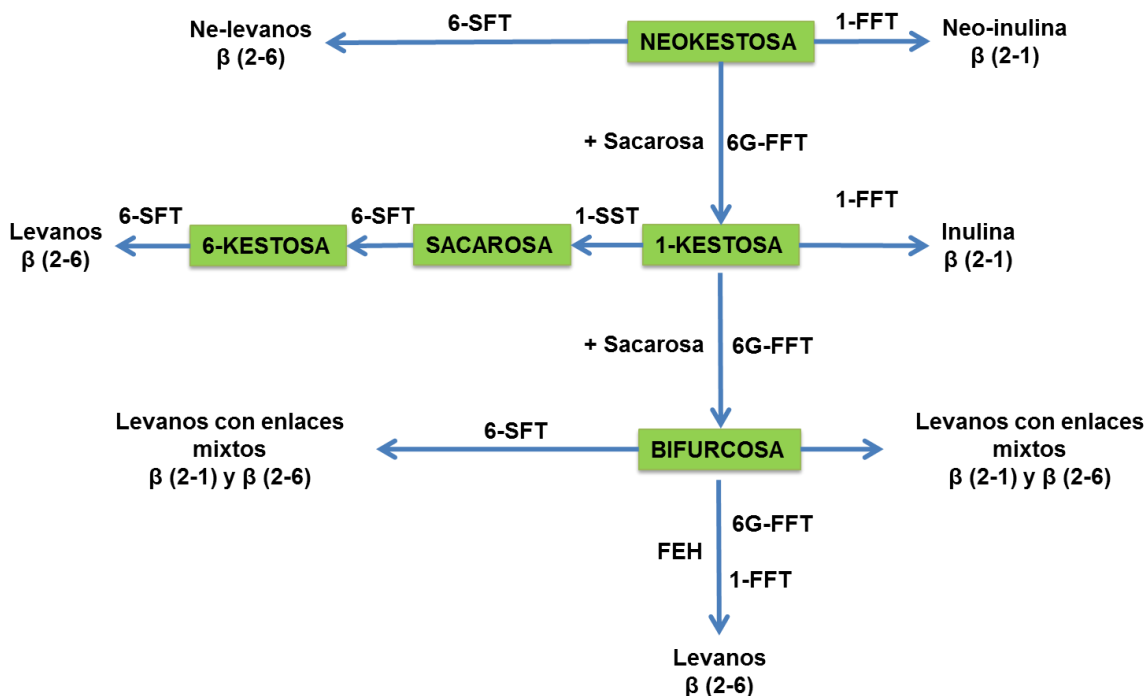


Figura 1.2 Modelo de biosíntesis de FOS en plantas.

La incubación de la 6-SFT con sacarosa, como único sustrato, da lugar a la 6-kestosa. La fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT) produce neokestosa a partir de sacarosa y 1-kestosa, la cual también puede ser elongada por acción de la 1-FFT o 6-SFT, resultando en la formación de neo-inulinas y neo-levanos.

En 1996, varios grupos de investigación publicaron la purificación de estas enzimas (Van den Ende *et al.*, 1996). Ambas, la 1-SST y la 1-FFT, son enzimas poco comunes, pues no siguen una cinética clásica del tipo Michaelis-Menten, por lo que sus actividades dependen tanto del sustrato, como de la concentración de las enzimas y son esencialmente no saturables (Koops y Jonker, 1996).

Se han aislado los ADNc que codifican para la 1-SST y la 1-FFT de varias especies vegetales. La 1-SST se ha clonado en patata, chicoria, alcachofa y cebolla. La 1-FFT ha

sido clonada de la pataca y la alcachofa. La transformación de la remolacha con el ADNc de la 1-SST demostró que esta enzima es capaz de convertir el 90% de la sacarosa de la vacuola en 1-kestosa y nystosa (Sévenier *et al.*, 1998; Hellwege *et al.*, 1997).

La regulación de la síntesis de los fructanos está controlada a nivel de la enzima 1-SST, y por la cantidad de sacarosa presente. Una alta concentración de sacarosa induce un incremento en la actividad de la enzima 1-SST en hojas de cebada. La actividad de la 1-SST de hojas de cebada disminuye en las noches, o en el día cuando la cantidad de sacarosa es menor. Esto es consistente con el hecho de que el metabolismo de los fructanos es una extensión del metabolismo de la sacarosa, y que son necesarios al menos niveles umbrales de sacarosa para inducir la síntesis de fructanos (Labhardt *et al.*, 1983).

Existen dudas sobre el control de la longitud de la cadena de fructanos en las plantas, ya que se han observado marcadas diferencias dependiendo de la especie que se trate. Se sugiere que el tamaño de los polímeros depende básicamente de la actividad enzimática de las fructosiltransferasas, pero también hay que tomar en cuenta la acción de la exohidrolasa fructosílica (FEH), una enzima involucrada en su degradación, la cual elimina residuos de fructosa reduciendo su longitud de la cadena. En la hidrólisis de los fructanos catalizada por esta enzima se transfiere un residuo de fructosa a una molécula de agua que funciona como aceptora (Van den Ende *et al.*, 2001).

Se conocen dos tipos de fructanohidrolasas: las exohidrolasas, que remueven las fructosas terminales, y las endohidrolasas, que realizan cortes al azar en los enlaces internos de la cadena de los fructanos. Las plantas contienen únicamente FEH (EC 3.2.1.80). Este tipo de enzimas son incapaces de degradar sacarosa, en contraste con las encontradas en bacterias. Las FEH se dividen en dos tipos dependiendo del enlace que atacan: la fructano 1-exohidrolasa (1-FEH, inulinasa) hidroliza enlaces $\beta(2-1)$ y la fructano 6-exohidrolasa (6-FEH, levanasa), los enlaces $\beta(2-6)$.

Las FEH tienen diversas funciones en las plantas: hidrolizan la reserva de fructanos cuando los suministros de energía bajan sus niveles; aumentan rápidamente la presión osmótica, e incrementan las concentraciones de fructanos bajo condiciones de estrés, contribuyendo a la tolerancia a la sequía y las bajas temperaturas, a través de la

estabilización de las membranas.

Se ha observado que la actividad de la 1-FEH aumenta en las raíces de chicoria madura después de someterlas a temperaturas bajas en el suelo o al trasladarlas a cuartos fríos (Van den Ende *et al.*, 1996). La presencia de sacarosa inhibe la actividad de las FEH en los tubérculos de papa, sustentando la hipótesis de la regulación del metabolismo de los fructanos a partir de la presencia de sacarosa (Labhardt *et al.*, 1983). No obstante, esta respuesta a la sacarosa no ocurre en todas las especies.

En la mayoría de los casos, los fructanos se acumulan donde el suministro de sacarosa excede la demanda. Éstos se pueden acumular hasta constituir el 35% del peso seco en hojas, y hasta un 50% del peso seco en la base del tallo de los pastos (Smith, 1972). Los fructanos representan el 60% del peso seco de los tubérculos de la papa durante el invierno. Durante el ciclo diario, las hojas maduras acumulan fructanos durante el día y los mueven durante la noche para mantener el proceso de translocación de las hojas (Pollock, 1986).

La razón por la que los fructanos se localizan en vacuola, así como las enzimas involucradas en su metabolismo, no se comprende aún plenamente. A pesar de existir gran cantidad de estudios con respecto a las plantas almacenadoras de fructanos, no existe un común denominador que especifique la condición ambiental, factor externo o tipo de estrés que induce el metabolismo y la acumulación de estas moléculas. De esta misma manera, tiene que recalarse que aquellas plantas que acumulan fructanos, muchas veces comparten hábitats con especies que no los acumulan. Por lo tanto, su metabolismo puede ser visto como un mecanismo de adaptación de determinado número de especies (Pollock, 1986).

1.2 Actividad biológica

Además de su papel como carbohidratos de reserva, los fructanos están involucrados en mecanismos que permiten que la planta sobreviva en condiciones desfavorables (Kerepesi, 2000; Kerepesi *et al.*, 1996). Los fructanos protegen a las plantas contra las presiones abióticas (Hisano *et al.*, 2008; Kawakami *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2008) al estabilizar las membranas celulares (Hincha *et al.*, 2007). Esto permite que la planta presente cierta tolerancia al estrés, ya que los factores ambientales tienen una influencia

significativa sobre la acumulación de fructanos (Livingston *et al.* 2009).

A pesar de que el almidón es el carbohidrato de almacenaje a largo plazo más significativo en las plantas vasculares, existen cierto número de especies que poseen un bajo contenido de éste almacenado en las hojas, y en su lugar, presentan una gran reserva de carbohidratos solubles fuera del cloroplasto. La sacarosa es el principal carbohidrato de traslocación, y en ciertas especies, cuya síntesis y movilización de carbohidratos se realiza en ciclos diarios, se observa una acumulación de fructanos que coincide con los incrementos en la concentración de sacarosa. Estos fructanos se hidrolizan cuando lo requiere la planta (Pollock, 1986).

Cuando el contenido de sacarosa es elevado en los tejidos fotosintéticos, se promueve la formación de fructanos; por ejemplo, en las hojas de las gramíneas, la reducción de la demanda de sacarosa da como resultado un incremento en la cantidad de carbohidratos solubles, y se inicia la síntesis de fructanos. En estas plantas, existe una correlación estrecha entre la inhibición de la síntesis de sacarosa y una disminución en la movilización de la misma (Pollock, 1984).

Los fructanos facilitan la descarga de la sacarosa de un lugar a otro, permitiéndole ser polimerizada para mantener su gradiente de concentración entre los diferentes tejidos (Nelson y Spollen, 1987).

La polimerización o la hidrólisis de los fructanos alteran el potencial osmótico vacuolar, y por lo tanto, alteran la presión de turgencia. El desdoblamiento de los fructanos se ha relacionado como un mecanismo de regulación del movimiento de las células guarda en *Allium cepa*, donde no existe almidón (Darbyshire y Allaway, 1981). El incremento en la toma de agua en los discos del tejido de almacenamiento de *Helianthus tuberosus* y *Cichorium intybus*, provocado por la adición de reguladores del crecimiento, ocurre al mismo tiempo que se observa un incremento en la actividad hidrolítica de fructanos.

Un exceso en la acumulación de almidón en los cloroplastos, especialmente cuando hay bajas temperaturas, puede provocar la pérdida de la actividad fotosintética. Sin embargo, las especies que acumulan fructanos pueden mantener la fijación fotosintética de carbón en las hojas y el crecimiento aún a bajas temperaturas (Pollock, 1986), lo que apunta a su

papel como criopreservadores.

Existe evidencia que indica que los fructanos están involucrados en la tolerancia a sequia, tanto directa como indirectamente a través de su despolimerización a sacarosa y hexosas, que son compuestos osmóticamente más activos que los fructanos, modificando así la turgencia celular (Dias-Tagliacozzo *et al.*, 2004). Una disminución en los niveles de fructanos en hojas ocurre al mismo tiempo que una acumulación significativa en las raíces (Kerepesi *et al.*, 2002).

1.3 Usos y aplicaciones

Entre las especies de plantas que producen fructanos están las de las familias Liliaceae (ajo, cebolla, espárrago, ajo, puerro) y Compositae (achicoria, patata o tupinambo y yacón). Las especies con mayor contenido de inulina lo almacenan en la parte subterránea de la planta. Otras especies, por ejemplo en la familia Gramineae, presentan altos contenidos de fructanos en sus partes aéreas, pero con bajo rendimiento de extracción a nivel industrial (Van Loo *et al.*, 1995). Son pocas las especies apropiadas para obtener fructanos a este nivel. A principios de la presente década, la inulina se obtenía a partir de dos especies solamente: la patata (*Helianthus tuberosus*) y la achicoria (*Cichorium intybus*), siendo ésta última la fuente más común (Van Waes *et al.*, 1998).

El interés en los fructanos se basa, en principio, en su utilización como materia prima en la producción de jarabe fructosado. Algunos de estos fructanos, como la inulina, se hidrolizan ineficientemente en el estómago y en el intestino delgado, sin la formación de monosacáridos, manteniendo bajo el nivel de glucemia. Esto permite su utilización como ingrediente en la comida para diabéticos, y además, en alimentos bajos en calorías.

Existen bacterias de la flora del intestino grueso, como *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus* y *Enterococcus faecium*, que pueden aprovechar los fructanos, y proliferar, impidiendo el aumento en el número de bacterias potencialmente dañinas como *Escherichia coli* o *Clostridium perfringens*. Por esto, una dieta rica en fructanos puede mejorar la función intestinal y la salud en general (Gibson, 1999).

Son varios los factores por los que los fructanos están siendo bien aceptados. Primero, su

producción en masa es factible y está llevándose a cabo en diversos países a partir de diversos tejidos vegetales. Segundo, el sabor de estos compuestos es similar al de la sacarosa, el edulcorante por excelencia. El tercer factor se centra en el hecho de que los fructanos pueden emplearse en la industria alimenticia como sustituto de grasas, así como su uso potencial en la farmacéutica como matriz de liberación controlada (Cole y Eastoe, 1988).

Los fructanos también refuerzan las funciones inmunológicas (ante cáncer o tumores), aumentan la biodisponibilidad de minerales, la mejora del metabolismo de las grasas y de la respuesta glicémica (Pietro *et al.*, 2002).

Los fructanos de cadena corta tienen un sabor dulce y suave, y al no ser degradados por ciertas bacterias, pueden ser utilizados como edulcorantes naturales. Los fructanos de cadena más larga tienen propiedades espesantes, formando emulsiones que presentan un comportamiento similar a las grasas, pero con un sabor neutro, por lo que se utilizan en la fabricación de helados (Fuchs, 1993).

1.4 MUSÁCEAS

La familia de las Musáceas se compone de tres géneros: *Ensete*, *Musa* y *Musella* (Christelova *et al.*, 2011). El género *Musa* comprende alrededor de 80 especies seminíferas silvestres y a todos los bananos poliploides comestibles. Linnaeus fue el primero en asignarle el nombre científico al banano al describir a *Musa paradisiaca*. Estudios filogenéticos recientes del género demostraron que ninguno de los grupos de las cinco secciones de *Musa*, previamente definidos por características morfológicas, son monofiléticos, por lo que, sólo dos clados infragenéricos fueron recuperados como monofiléticos, los cuales corresponden al número básico de cromosomas de $n=x=11$ y $n=x=10/9/7$, respectivamente. Un clado comprende a las especies de *Musa* sección *Musa* y *Rhodochlamys*, mientras que las otras contienen especies de *Musa* sección *Callimusa*, *Australimusa* e *Ingentimusa*. Con base en lo anterior, las especies de *Musa* caen dentro de dos secciones: *Musa* y *Callimusa*, basado en un análisis de ADN (Hakkinen, 2013).

La clasificación taxonómica del género *Musa* es la siguiente (Hakkinen, 2013).

Reino: Vegetal

CAPÍTULO I

Clase: Angiospermae

Subclase: Monocotyledonae

Orden: Zingiberales

Familia: Musaceae

Género: *Musa*

Secciones: *Musa* y *Callimusa*

Los estudios de filogenia molecular sustentan la asignación de la familia *Musaceae* del orden Zingiberales, al clado de las Commelídas (Christelová *et al.*, 2011).

El centro de origen es el Sur-Este de Asia, donde pasaron de la India a Polinesia (Simmonds, 1962), mientras que el centro de diversificación ha sido localizado en Malasia e Indonesia (Daniells *et al.*, 2001), aunque una amplia diversidad se ha ubicado en todas partes. Las plantas se encuentran distribuidas principalmente en los márgenes de selvas tropicales (Wong *et al.*, 2002).

La distribución del género *Musa* comprende la India y las islas del Océano Pacífico, Nepal, extendiéndose hasta el norte de Australia (INIBAP, 2006). La primera clasificación formal del género la estableció Baker en 1893.

Los bananos, también denominados plátanos, pertenecen a la sección *Musa*. Ésta contiene ~75 especies (Hakkinen, 2013). Los grupos genómicos propuestos por Simmonds y Shepherd, para clasificar los clones comestibles, según el aporte de genomas al nivel de ploidía, son AA, BB, AB, BBB, AAA, AAB, ABB, AAAA y AB BB (Arvanitoyannis *et al.*, 2008; Simmonds y Shepherd, 1955). La mayoría de los cultivares actuales derivaron de dos especies silvestres diploides, *M. a. colla* (genoma A) y *M. b. colla* (genoma B). Los clones comestibles se clasifican dependiendo de la contribución genética de *m. a.* y *m. b.* Cambios estructurales en los cromosomas, de manera espontánea o por eventos de recombinación, resultaron en el desarrollo de barreras reproductivas naturales dentro de las especies, la divergencia en subespecies y la diversidad genética en especies como un todo. Este proceso y la formación de gametos $2n$ mediante restitución nuclear común en variedades partenocárpicas es uno de los mecanismos de incremento cromosómico y formación de autoploiploides e híbridos homogénicos, los cuales están representados por los bananos de postre (AAA), y aloploides

e híbridos hetero-genómicos que comprenden los plátanos tipo macho (AAB) y otros bananos de cocción (ABB) (Ortiz, 1997).

Los cultivares triploides (AAA) surgieron de los diploides, posiblemente a partir de cruzamientos entre diploides partenocárpicos comestibles y subespecies de *m. a.* silvestre. Los cultivares diploides y triploides de *m. a.* estuvieron en contacto en zonas donde *m. b.* era nativa, y la hibridación natural favoreció la formación de individuos con genomas AB, AAB y ABB. Se considera a *m. b.* como resistente a enfermedades y tolerante a estrés abiótico. Tales características a menudo están presentes en cultivares que contienen un genoma B. La hibridación pudo haber dado lugar a un amplio rango de cultivares comestibles de bananos, lo cuales sobrevivieron y fueron multiplicados durante su domesticación (Ortiz, 1995).

Los bananos y plátanos se cultivan en más de 120 países en áreas tropicales y subtropicales de los cinco continentes. Sus frutos son una fuente de nutrimentos esenciales para la dieta humana en casi todos los países del mundo, y tienen importantes papeles tanto a nivel socio-económico, como ecológico (Bakry *et al.* 2009). El nombre de banano se deriva de “*Arabic banan*”, el cual quiere decir “dedo”, y se cree que fue usado en principio en Guinea, y desde entonces, se diseminó por todo el mundo.

1.4.1 Descripción botánica de *Musa*

Las plantas de banano son herbáceas perennes gigantes, con pseudotallos aéreos, comúnmente con una altura de más de 3 m, sin lignificación o engrosamiento secundario de tallos, el cual es característico en árboles leñosos. Éstas se originan de cormos subterráneos, de los cuales desarrollan hijuelos (Figura 1.2). Las hojas tienen una distribución helicoidal, y las bases foliares que circundan el tallo conforman el pseudotallo (Soto, 1992). El sistema radical presenta raíces superficiales que se distribuyen en una capa de 30 a 40 cm de profundidad. Las raíces emergen de color blanco, y luego se tornan amarillas, con un diámetro aproximado entre 5 y 8 mm (Ortiz *et al.*, 2001).

Las principales funciones del sistema radical son: el anclaje, la absorción de agua y el almacenamiento de nutrimentos. El sistema foliar se origina en el punto central de crecimiento, el cual se encuentra situado en la parte superior del bulbo, de donde se observa la formación de peciolo y la nervadura central. La hoja recién emergida presenta

CAPÍTULO I

forma de cigarro dentro del pseudotallo. Una vez fuera se distingue la coloración verde de la hoja. Al madurar, la hoja está constituida por lámina foliar, peciolo, nervadura central y apéndice (Figura 1.3).

La inflorescencia surge a partir del meristemo apical de la base del pseudotallo, deteniendo la producción de las hojas (Soto, 1992). Los bananos son plantas monoicas que tienen flores masculinas en la punta de la inflorescencia y flores femeninas por detrás. Las flores femeninas, cuyo número va de 10 a 20, se encuentran agrupadas en filas, y se les da el nombre de mano. El conjunto de flores femeninas agrupadas en manos (entre 6-15) se le conoce como racimo (Ortiz *et al.*, 2001). En plantaciones comerciales generalmente el brote terminal y brácteas son removidos para dirigir los azúcares al desarrollo de los frutos (Daniells *et al.*, 2001).

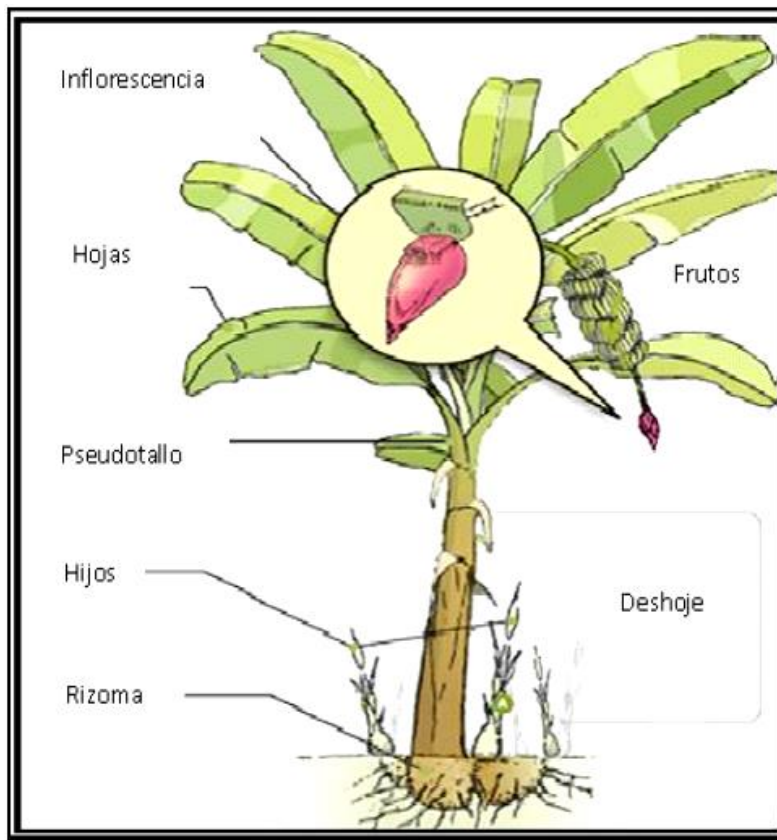


Figura 1.3 Morfología de Musa (Ortiz *et al.*, 2001).

El fruto de banano o plátano es producto de la partenocarpia y se caracteriza por ser una baya de piel gruesa que contiene abundante colénquima. Los frutos se desarrollan dentro de los ovarios de las flores pistiladas, que muestran un aumento considerable de

volumen. La parte comestible del fruto es el resultado del engrosamiento de las paredes del ovario, el cual resulta en una masa parenquimatosa que contiene una gran cantidad de azúcares, almidón, potasio, calcio, vitamina A, etc. (Ortiz *et al.*, 2001).

El banano podría ser una buena fuente de fructanos debido a que se ha detectado la presencia de kestosa en el fruto de algunos cultivares (Agopian *et al.*, 2008) aunque se conoce que podría haber diferencias significativas en los niveles de estos polímeros de acuerdo al estado de maduración y al genotipo del mismo; en este estudio previo se cuantificaron los niveles de FOS en frutos maduros los cuales fueron comprados en el supermercado y madurados con etileno, lo que se sabe que afecta el metabolismo de carbohidratos, por ende es probable que se deba ahondar en el estudio de FOS en diversas accesiones de banano. Estas diferencias también pueden deberse a las metodologías aplicadas en los análisis ya que las estructuras químicas de estos compuestos son muy parecidas y a la hora de la cuantificación hay que ser muy cuidadosos para no tener falsos positivos (Agopian *et al.*, 2008, 2009).

Las especies del género *Musa* representan una fuente potencial de obtención de fructanos, ya que dentro de la gran diversidad de especies que este género posee no se ha estudiado detalladamente ni el tipo, ni la cantidad de fructanos que poseen cada una. Estos datos, junto con la gran diversidad genética existente, permitirían encaminar los esfuerzos hacia el mejoramiento genético del cultivo.

CAPÍTULO I

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la composición de fructanos y otros carbohidratos solubles en los tejidos de diferentes órganos de plantas de diferentes genotipos del género *Musa*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los tipos de fructanos y carbohidratos presentes en cormo, hoja, fruto y néctar en variedades seleccionadas del género *Musa*.
2. Determinar si esta variación está relacionada con el genotipo y/o tejido del órgano evaluado.

JUSTIFICACIÓN.

Poco se conoce sobre los tipos y contenidos de carbohidratos que contienen los frutos de banano. Dado que algunas de las variedades y/o especies constituyen la principal fuente de alimento en regiones extensas de los trópicos, el estudio de estos metabolitos podría establecer una base científica para la selección de aquellos individuos con valores nutricionales sobresalientes, en la que se fundamentaran programas de mejoramiento genético, para la obtención de nuevos cultivares con elevados valores nutricionales que beneficien a la población.

Por otra parte, este estudio sustentaría las bases para el estudio de la red enzimática y metabólica responsable de la biosíntesis de fructanos presentes en *Musa*, permitiendo ahondar en el entendimiento de las funciones de dichos compuestos en la planta, ya que aún no se conoce del todo.

CAPÍTULO I

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos planteados, la estrategia experimental que se seguirá será evaluar el contenido de azúcares totales y de fructosa en tejidos muestreados en plantas y frutos de las diferentes especies del género *Musa* (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1 Material vegetal del género *Musa*.

NÚMERO	ESPECIE/TIPO	SUBGRUPO	GENOTIPO	NOMBRE DE LA ACCESIÓN	ITC
1	<i>M. schizocarpa</i>	<i>schizocarpa</i>	SS	Schizocarpa	0613
2	<i>M. acuminata</i>	<i>malaccensis</i>	AA	Malaccensis CICY	0399
3	<i>M. acuminata</i>	*	AA	IND 110	0413
4	<i>M. balbisiana</i>	*	BB	BB-CICY	*-----
5	<i>Dessert bananas</i>	Ibota	AAA	Yangambi KM5	1123
6	<i>Dessert bananas</i>	Cavendish	AAA	Grand Naine	*-----
7	<i>Dessert bananas</i>	Pome	AAB	Prata ana	0962
8	<i>Cooking bananas</i>	Plantain	AAB	Dominico Hartón	0644
9	Dual purpose	Bluggoe	ABB	Barbaro	**-----
10	Dual purpose	Pisang Awak	ABB	Kluai Namwa Khom	0526
11	Dual purpose	Lep chang kut	BBB	Lep chang kut	0647

ITC=International Transit Centre; *Colecta Teapa, Tabasco; ** Akil, Yucatán.

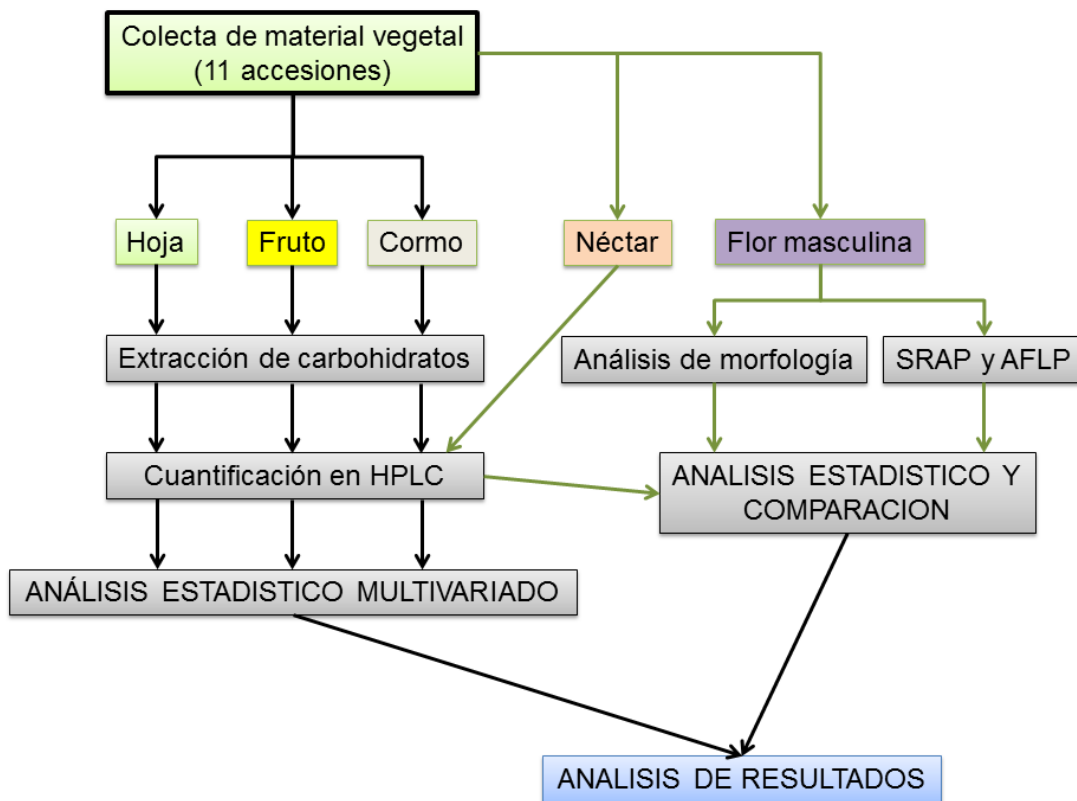


Figura 1.4 Estrategia experimental

BIBLIOGRAFÍA

- Agopian, R. G. D.; Soares, C. A.; Purgatto, E.; Cordenunsi, B. R.; Lajolo, F. M. (2008). Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 56:3305–3310.
- Agopian, R. G. D.; Purgatto, E.; Cordenunsi, B. R.; Lajolo, F. M. (2009). Synthesis of fructooligosaccharides in banana 'prata' and its relation to invertase activity and sucrose accumulation. *J. Agric. Food Chem.* 56:3305–3310.
- Baker, J. G. (1893). A synopsis of the genera and species of Museae. *Ann. Bot.* 7 : 189-229.
- Bakry, F., Careel, F., Jenny, C., & Horry, J. P. (2009). Genetic improvement of banana. In S. M. Jain & P. M. Priyadarshan (Eds.), *Breeding plantation tree crops: tropical species* (pp. 3–50). New York: Springer Science and Business Media.
- Biedrzycka E, Bielecka M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructanos of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci Technol.* 15: 170-175.
- Cole AS, Eastoe JF. (1988). *Biology and oral biology* 2nd edition. London.
- Christelova P, Valarik M, Hribova E, De Langhe E, Dolezel J. (2011) A multi gene sequence-based phylogeny of the Musaceae (banana) family. *BMC Evolutionay Biology* 11: 103.
- Crittenden R, Playne M. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol.* 7: 353-361.
- Daniells, J., Jenny, C., Karamura, D., y Tomekpe, K. (2001). *Musalogue: a catalogue of musa germplasm: diversity in the genus Musa*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 213 p.
- Darbyshire B., Allaway WG. (1981). Soluble carbohydrates in leaf epidermis of *Allium cepa*: a potential role in stomatal function? *Plant Sci. Lett.* 22:141-145.
- Dias-Tagliacozzo G, Itaya N, Machado M, Figueiredo-Ribeiro C, Dietrich S. (2004).

-
- Fructans and water suppression on intact and fragmented rhizophores of vernonia herbaceae. Brazilian Archives of Biology and Technology. 40(3): 363-373.
- Fuchs A. (1993). Inulin and inulin containing crops: studies in plant science. Elsevier, Amsterdam.
- Gibson G. (1999). Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. J Nutr. 129: 1438-1441.
- Hakkinen, M. (2013). Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). Taxon, 62, 809-813.
- Hendry G. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biographic and mechanistic appraisal. New Phytol. 123: 3-14.
- Hellwege EM, Gritscher D, Willmitzer L, Heyer AG. (1997). Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. Plant J. 12:1057-1065.
- Hincha DK, Livingston DP, Premakumar R, Zuther E, Obel N, Cacula C, Heyer AG. (2007). Fructans from oat and rye: composition and effects on membrane stability during drying. Biochim Biophys Acta 1768: 1611–1619
- Hisano H, Kanazawa A, Kawakami A, YoshidaM, Shimamoto Y, Yamada T. (2004). Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. Plant Sci 167: 861–868
- Hisano H, Kanazawa A, YoshidaM, HumphreysMO, IizukaM, Kitamura K, Yamada T. (2008). Coordinated expression of functionally diverse fructosyltransferase genes is associated with fructan accumulation in response to low temperature in perennial ryegrass. New Phytol 178: 766–780
- INIBAP. (2006). Banana food and wealth. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.

CAPÍTULO I

- Kawakami A, Sato Y, Yoshida M. (2008). Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *J Exp Bot* 59: 793–802
- Kerepesi I, Toth M, Boros L. (1996). Water-soluble carbohydrates in dried plant. *J. Agric. Food Chem.* 10:3235-3239.
- Kerepesi I. (2000). Osmotic and salt stress induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science.* 40:482-487.
- Kerepesi I, Bányai-Stefanovits E, Galiba G. (2002). Fructans in wheat under stress conditions. *Act. Biol. Szegediensis.* 46(3-4):101-102.
- Labhardt Ch, Nosberger J, Nelson CJ. (1983). Photosynthesis and degree of polymerization of fructan during reproductive growth of meadow fescue at two temperatures and two photon fluxes. *J Expr Bot.* 34:1037-1046.
- Livingston DP, Hinch DK, Heyer AG. (2009). Fructans and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:2007-2023.
- Nelson C.J., Spollen W.G. (1987). Fructans. *Physiol. Plantarum.* 71: 512-516. Genomics of tropical crop plants. *Plant genetics and genomics, crops and models* (Vol. 1, pp. 83–111). New York: Springer.
- Ortiz, R. (1995). *Musa* genetics, *en: Bananas and plantains* (S. Gowen, ed.), Chapman & Hall, London. pp. 84-109.
- Ortiz, R. (1997). Morphological variation in *Musa* germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44, 393-404.
- Ortiz R, López A, Poncher S. (2001). *El cultivo del banano*. EUNED. 186.
- Pietro A, Luceri C, Dolara P, Giannini A, Biggeri A, Salvadori M, Clune Y, Collins K, Paglienari M, Caderni G. (2002). Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* 23: 1953-1960.

-
- Pilon-Smits E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.J., Jeuken M.J.W., Weisbeek P.J., Smeekens S.C.M. (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107: 125-130.
- Pollock C.J. (1984). *Physiology and metabolism of sucrosyl-fructans. Storage carbohydrates in vascular plants.* Cambridge University Press, 97-113.
- Pollock C.J. (1986). Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytol.* 104:1-24.
- Roux, N., Baurens, F. C., Dolez ěel, J., Hribova ´, E., Heslop-Harrison, J. S., Town, C., et al. (2008). Genomics of banana and plantain (*Musa* spp.), major staple crops in the tropics. In P. Moore & R. Ming (Eds.).
- Sévenier R, Hall RD, Van der Meer IM, Hakkert HJC, Van tunen AJ, Koops AJ. (1998). High level fructan accumulation in a transgenic sugarbeet. *Nat Biotechnol.* 16:843-846.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2008. Producción nacional en México. <http://www.siap.gob.mx/>
- Simmonds, N. W. (1962). The evolution of the bananas. pp. 101-131. Longman Scientific and Technical, London UK.
- Simmonds, N. W., y Shepherd, K. (1955). The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 55, 302-312.
- Smith D. (1972). Carbohydrate reserves in grasses. In: *The Biology and Utilization of Grasses.* Academic press. 318-333.
- Soto M. (1992). *Banano, cultivo y comercialización.* 2da ed. Litografía e imprenta Lil. Tibas. 627.
- Van den Ende W, De Roover J, Van Laere A. (1996). In vitro synthesis of fructanosyl-only oligosaccharides from inulin and fructose by purified chicory root fructan:fructan fructosyltransferase. *Physiol Plantarum.* 97:346-352.

CAPÍTULO I

- Van den Ende W, Michiels A, Van Wonterghem D, Clerens SP, De Roover J. (2001). Defoliation induces fructan 1-exohidrolase II in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohidrolase IIa y fructan 1-exohidrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1exohidrolase II enzymes. *Plant Physiol.* 126:1186-1195.
- Van Loo J, Coussement P, De Leenheer L, Hoebregs H, Smiths G. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit. Rev Food Sci Nutr.* 35: 525-552.
- Van Waes C, Baert J, Carlier L, Van Bockstaele E. (1998). A rapid determination of the total sugar content and the average inulin chain length in roots of chicory (*Cichorium intybus* L). *J Sci Food Agric.* 76: 107-110.
- Vijn I., Smeekens S. (1999). Fructans: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.* 120: 351-359.
- Wong C, Kiew R, Argent G, Ohn S, LEE K S, Gan Y. (2002) Assessment of the validity of the section in musa (musaceae) using AFLP. *Annals of Botany* 90:231-238.
- Xue GP, McIntyre CL, Jenkins CLD, Glassop D, van Herwaarden AF, Shorter R. (2008). Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water-soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat. *Plant Physiol* 146: 441–454.

CAPÍTULO II

¹FRUCTANS AND OTHER WATER SOLUBLE CARBOHYDRATES IN VEGETATIVE ORGANS AND FRUITS OF DIFFERENT MUSA SPP. ACCESSION

2.1 INTRODUCTION

One of the most widespread alternatives to starch or sucrose as reserve carbohydrates are fructans, which are produced by about 15% of flowering plant species (Hendry, 1993). Fructans are fructose-based oligo- and polysaccharides derived from sucrose by the action of fructosyltransferases, which evolved from vacuolar invertases (VIs) (Van den Ende et al., 2011). When challenged with high sucrose, plant VIs are able to synthesize the fructan trisaccharides 1-kestotriose, 6-kestotriose and 6G-kestotriose with a typical 1-kestotriose > 6G-kestotriose > 6-kestotriose ratio (De Coninck et al., 2005). Fructo-oligosaccharides with a low degree of polymerization (DP) of the inulin-type ($\beta(2,1)$ linkages only) are usually termed “FOS” in the context of food applications, although theoretically this term could also be used to refer to low DP fructans with other linkages (Di Bartolomeo et al., 2013). Plant inulin-type fructans are produced by the combined action of sucrose: sucrose 1-fructosyl transferase (1-SST) and fructan: fructan 1-fructosyl transferase (1-FFT) (Van den Ende, 2013). All these enzymes belong to family GH32, in which structure-function relationships have been thoroughly investigated (Van den Ende et al., 2009).

In addition to their function as reserve carbohydrates, fructans might fulfill other, perhaps more specific, roles in plant adaptation to environmental stresses (drought resistance, frost tolerance) and in osmoregulation (Asega and de Carvalho, 2004). Fructan remobilization in the stem of wheat plants under drought stress is an important contributor to grain filling (Joudi et al., 2012), but fructans also accumulate in kernels at the milky stages (Peukert et al., 2014). Antioxidant and signaling functions have been recently suggested for fructans (Van den Ende, 2013; Matros et al., 2015).

¹ Cruz Cardenas C, Miranda_Ham M, Castro-Concha L, Ku-Cauich J, Vergauwen R, Reijnders T, Van den Ende W and Escobedo Gracia-Medrano RM (2015). Fructans and other water soluble carbohydrates in vegetative organs and fruits of different *Musa* spp. accessions. *Front. Plant Sci.* 6:395. doi: 10.3389/fpls.2015.00395

CAPÍTULO II

Banana is also a fructan accumulator (Agopian et al., 2009), but the link between fructan metabolism and stress responses has not been explored in banana. Typically, biotic and abiotic stresses stand as major constraints in banana production. Interestingly, bananas are quite sensitive to drought. However, genotypes with the B genome seem to be more tolerant than those solely based on the A genome (Ravi et al., 2013).

Inulin-type fructans, like FOS, are known to confer benefits to human health by selectively promoting the growth of bifidobacteria in the colon, which has been associated with increased mineral absorption, modification of lipid metabolism, enhancement of the systemic defense function, and prevention of colon cancer and inflammatory bowel disease (Sangeetha et al., 2005). In particular, $\beta(2,1)$ -fructans with low DP possess direct signaling capacity on human immune cells (Di Bartolomeo and Van den Ende, 2015; Peshev and Van den Ende, 2014; Vogt et al., 2013).

Fructan-containing plant species are found in a limited number of families, such as Liliaceae, Poaceae and Asteraceae (Van den Ende, 2013). Despite the high fructan content in the aerial parts of some species (up to 70% DW), grasses and cereals are not used for the industrial extraction and processing of fructans. Instead, fructans can be easily extracted and processed from bulbs, tubers and tuberous roots of plants with higher harvest indexes (Sims, 2003).

The edible bananas originated from natural inter-(sub)specific- and inter-specific crosses between *M. acuminata* and *M. balbisiana*, and to a lesser extent, *M. schizocarpa* and *M. textilis* species also contributed to the gene pools of domesticated bananas (D'Hont et al., 2000). Within cultivated banana, *Musa* spp., there are four known genomes, A, B, S, and T. These correspond to the genetic constitutions of wild *Musa* species *M. acuminata* Colla ($2n = 2x = 22$), *M. balbisiana* Colla ($2n = 2x = 22$), *M. schizocarpa* N. W. Simmonds ($2n = 2x = 22$) and *M. textilis* ($2n = 2x = 20$) (D'Hont et al., 2000). Bananas are one of the most consumed fruits worldwide and represent an important source of revenue for tropical countries, where they are also one of their main staple foods (Moshfegh et al., 1999). As such, they constitute a fundamental source of energy, vitamins and minerals for tropical countries (Wall, 2006). Different cultivars are available worldwide, with well-known agronomic characteristics and organoleptic properties, such as color, size, texture, sweetness and flavor (Aurore et al., 2009).

Although it has been reported that banana fruits contain small fructans, with significant differences in their concentrations due to cultivar identity, stage of ripening and processing (Agopian et al., 2009; L'Homme et al., 2001), no studies have been conducted to study their levels and types in the different organs of the plant. The aim of this study was to characterize the variation of type and content of small water soluble carbohydrates (sucrose, glucose and fructose) and fructans present in different vegetative organs and fruits of 11 accessions of *Musa* with different genomic constitution. Such insights may boost future work to enhance fructan content in banana plants, which could be useful for the plants' stress responses as well as to increase the nutritional properties of banana fruit.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Plant Material

In this study eleven banana accessions (I to XI) comprising eight cultivars and three fertile wild species [*M. acuminata* (A genome), *M. balbisiana* (B genome) and *M. schizocarpa* (S genome)], were utilized (Table 2.1). All plants were grown in the same type of soil (Cambisol, CMX) at the Uxmal Experimental Site of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Yucatán, México (20° 24' 27.72" Lat. N, and 89° 45' 06.66" Long. W, elevation 44.0 meters above sea level), and tropical wet dry climate (AW0).

Leaves, fruits and rhizomes were harvested from healthy plants between 7:30 to 11:00 am during the warmest dry season from March to May 2012. The highest and the lowest temperatures over this period were 40°C and 12°C, respectively with an average of 25°C. There was a 1.0 mm rain precipitation. Leaf samples were harvested from the last expanded leaf from physiologically mature plants. Leaf samples were transported to the lab in coolers, and once there, frozen with liquid nitrogen. Fruits were harvested at maturation stage 6 (Dadzie and Orchard, 1997). Ripe fruits were peeled, and the pulp was sliced and frozen in liquid nitrogen. Rhizomes were cut in halves; portions of the central cylinder were extracted and frozen in liquid nitrogen. All frozen samples were kept at -80 °C until analysis. All frozen samples were lyophilized prior to extraction.

CAPÍTULO II

Table 2.1 List of *Musa* accessions used in the present study.

Accession identifier	Species/ hybrid	Subspecies/ subgroup	Putative genomic constitution	Accession name	ITC number
I	<i>M. schizocarpa</i>	<i>schizocarpa</i>	SSw	Schizocarpa no. 1	0613
II	<i>M. acuminata</i>	<i>malaccensis</i>	AAw	Malaccensis	+
III	<i>M. acuminata</i>		AAcv	No. 110	0413
IV	<i>M. balbisiana</i>		BBw	BB-CICY	*
V	<i>Dessert bananas</i>	Ibota	AAA	Yangambi KM5	1123
VI	<i>Dessert bananas</i>	Cavendish	AAA	Grand Naine	*
VII	<i>Dessert bananas</i>	Pome	AAB	Prata Ana	0962
VIII	<i>Cooking bananas</i>	Plantain	AAB	Dominico Harton	+
IX	Dual purpose	Bluggoe	ABB	Barbaro	**
X	Dual purpose	Pisang Awak	ABB	Kluai Namwa Khom	0526
XI	Dual purpose	Lep Chang Kut	BBB	Lep Chang Kut	0647

w = wild species; cv = cultivated accession; ITC= International Transit Center accession number (Musa Germplasm Information System (MGIS), Bioversity International. Accessed on January 17, 2015, at <http://www.crop-diversity.org/banana/>). + ITC under investigation, * collected at Teapa, Tabasco, and **collected at Akil, Yucatan, see accession information in Valdez-Ojeda et al., 2014.

2.2.2 Carbohydrates extraction, HPLC-RID and HPAEC-IPAD analyses

Carbohydrate extraction was conducted from two plants per accession with three replicates each. Lyophilized samples (0.25 g) were pulverized in liquid nitrogen and the powder extracted three times, first with 80% ethanol (two times), and finally with HPLC-grade water. Extracts were pooled and then lyophilized again. Dried samples were then resuspended in 1 mL HPLC-grade water, filtered through a 0.45 μm membrane and stored at 4°C before analysis.

Carbohydrate analysis by HPLC-RID: Filtered samples were injected into a Bio-Rad (Richmond, CA) Aminex HPX 42C (300 x 7.8 mm) HPLC column. Chromatographic analysis was performed on a liquid chromatographer Agilent 1100 (Hercules, CA, USA) equipped with a refractive index detector (HPLC-RID). Elution was obtained with HPLC-grade water at 70°C and a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Standard curves (0 to 10 mg mL⁻¹) were prepared for sucrose (Fluka®), D-glucose (Sigma-Aldrich®), D-fructose (Sigma-Aldrich®), 1-kestotriose (GF₂; Fluka®), 1,1-nystose (GF₃; Fluka®) and inulin from *Dahlia variabilis* (Sigma-Aldrich®).

High performance anion exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection (HPAEC-IPAD) was used to analyze the soluble carbohydrate composition in extracts from lyophilized samples of leaf, rhizome and fruit pulp of the three wild diploid species (*M. acuminata* ssp. *malaccensis*, *M. balbisiana* and *M. schizocarpa*) (Table 2.1). Sample preparation and HPAEC-IPAD analysis were performed as described (Zhang et al., 2015) with D-glucose, D-fructose, sucrose, 1-kestotriose, 6-kestotriose, 6G-kestotriose, raffinose, stachyose, maltose, maltotriose, and a chicory root extract also typically containing inulobiose, inulotriose, 1,1-nystose and 1,1,1-kestopentaose (Van den Ende, et al., 1996). Mild acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis of $\beta(2,1)$ -fructans with heterologous chicory 1-FEH IIa occurred as described in Vergauwen et al. (2003) and Van den Ende et al. (2011), respectively. Next to its sensitivity to 1-FEH IIa and co-elution with inulobiose from chicory, the reducing character and inulobiose nature of a peak eluting between 1-kestotriose and 6-kestotriose was further confirmed by its sensitivity to hot alkaline treatment (90 mM NaOH, pH 11, 90°C for 0, 1 and 3 h).

2.2.3 Statistical analysis

A randomized complete block design (RCBD) was used with 6 replicates of each organ for each accession, and the data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison (SAS 9.0 institute Inc., Cary, NC, USA[®]). Means evaluated were considered significantly different at $p \leq 0.01$.

Principal component analysis (PCA) was performed for glucose, fructose, sucrose and 1-kestotriose present in the three organs (leaf, rhizomes and fruits) of the 11 accessions (12 x 11 matrix was constructed with data). The PCA was performed by using PRIMCOMP command (SAS 9.0 institute Inc., Cary, NC, USA[®]).

2.3 RESULTS

2.3.1 Analysis of type and content of water-soluble carbohydrates by HPLC-RID and HPAEC-IPAD in three organs of different *Musa* accessions

The WSC profiles of eleven different *Musa* accessions were first analyzed with HPLC-RID allowing a separation of polymerized and non-polymerized WSC (Tables 2.2 and 2.3). Soluble extracts of leaves, pulp from ripe fruits and rhizomes of the different genotypes contained "putative" inulin (>DP4, peak #1, co-eluting with a *Dahlia variabilis* inulin standard), 1,1-nystose (peak #2) and 1-kestotriose (peak #3) fractions, in addition to the disaccharide sucrose (peak #4), the monosaccharides glucose (peak #5) and fructose (peak #6) and two unknown peaks. Interestingly, significant variations in the contents of these WSC were detected (Tables 2.2 and 2.3).

The leaf content of the "putative" inulin fraction (peak # 1) varied from 1.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight (DW) to 30.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, depending on the studied genotype (Table 2.2). The highest value was registered for accession III, while the lowest was found in accession VII, about ~14-fold less than the mean content. In the pulp of ripe fruits, this fraction fluctuated even stronger, from 0 to 157.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW. The highest content was registered for accession IV, followed by accessions VI and VII. Overall, the rhizomes contained much less of this fraction (Table 2.2).

The presumed 1,1-nystose accumulated mainly in the rhizomes, with contents varying

between $135.0 \mu\text{g g}^{-1}$ DW in the triploid accession IX and $427.8 \mu\text{g g}^{-1}$ DW in accession VIII. On the contrary, the content of 1-kestotriose was higher in the pulp of ripe fruits as compared to leaves and rhizomes, with the lowest content ($27.6 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) in accession IV and the highest ($80.9 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) in the triploid accession VI. Intriguingly, 1-kestotriose only accumulated in the rhizome of five of the eleven accessions, at varying concentrations (Table 2.2).

When the levels of the small WSC sucrose, glucose and fructose are compared, a clear genotypic variation is detected (Table 2.3). The lowest sucrose content ($6.4 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) was found in leaves of accession VIII and the highest ($\sim 25.0 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) in accessions IV and XI. The lowest glucose content was detected in accession VI ($2.0 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) and the highest ($7.5 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) in accession II, whereas the lowest fructose ($0.9 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) was determined in accession IX and the highest ($15.6 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) in accession VIII. Rhizomes showed lower levels and even greater variation in the di- and monosaccharides, sucrose (11.6 to $181.2 \mu\text{g g}^{-1}$ DW), glucose (0.0 to $85.6 \mu\text{g g}^{-1}$ DW) and fructose (1.6 to $40.3 \mu\text{g g}^{-1}$ DW), respectively. In the pulp of ripe fruits, sucrose varied from 26.3 to $1205.4 \mu\text{g g}^{-1}$ DW, glucose from 13.2 to $932.9 \mu\text{g g}^{-1}$ DW, and fructose from 7.4 to $886.9 \mu\text{g g}^{-1}$ DW, depending on the accession (Table 2.3).

To examine the variations in ripe fruit of glucose, fructose and sucrose levels among accessions in more detail, a ternary diagram was employed (Figure 2.1), where their location revealed the organ's pattern, given by the contribution (percentages) of each sugar. Three distinct groups can be discriminated: Group 1, with four accessions (I, VI, VII and VIII) showing low glucose (30-40%), fructose (25-40%) and sucrose (20-45%) contents; group 2, consisting of accessions III, IV and V, with intermediate sucrose (50-60%), and low fructose (25-30%) and glucose (20-30%) concentrations. In addition, group 3 is represented by accessions X and XI showing high sucrose (>80%) and low values of glucose and fructose (10-20%). Given the WSC concentrations found in accession IX [low sucrose ($\sim 10\%$), intermediate fructose (40-50%) and glucose (45-55%)] and in accession II [high concentrations of sucrose (> 90%) and low glucose and fructose (<10%)], they could not be included in the above-mentioned groups (Figure 2.1).

The analysis of banana WSC by HPAEC-IPAD provided highly valuable qualitative information on the precise type of fructans present in pulp of mature fruit, leaf and rhizome

samples of three selected wild *Musa* species. Figure 2.2 shows the carbohydrate patterns for *M. schizocarpa*. Very similar patterns were obtained for *M. acuminata* ssp. *malaccensis* and for *M. balbisiana*. In addition to glucose, fructose and sucrose, a comparison with a chicory fructan profile showed that banana fruit also contained 1-kestotriose, inulobiose and inulotriose. Surprisingly, no 1,1-nystose, 1,1,1-kestopentaose and higher DP inulin-type fructans were detected (Figure 2.2). Rhizomes and leaves contained lower amounts of WSC (Figure 2.2), and showed even more complex patterns. To unravel the identities of the peaks sequentially eluting after 1-kestotriose in banana fruit, we compared the patterns to references containing malto-oligosaccharides (MOS, maltose and maltotriose, breakdown products of starch, being very abundant in fruits), raffinose family oligosaccharides (the RFOs raffinose and stachyose) and the three kestoses: 1-kestotriose, 6-kestotriose and 6G-kestotriose (neokestose). While the banana fruit shows peaks that elute at the same retention time as the three kestoses, no MOS and RFOs could be detected in banana fruit. The peak eluting after 16 min, that was first thought to represent maltose, is not co-eluting with maltose. The presence of the three kestoses in banana fruit was further confirmed by mild acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis and co-elution experiments. The identity of inulobiose, a major peak in banana fruit, was further confirmed by its sensitivity to hot alkaline treatment. The identity of 4 peaks remains unknown (see red arrows in Figure 2.3).

In conclusion, both non-reducing (GF_n) and reducing (F_n) types of short DP fructans are present in the mature fruit of the three species analyzed, *M. acuminata* ssp. *malaccensis*, *M. schizocarpa* and *M. balbisiana*. The absence of any 1,1-nystose and 1,1,1-kestopentaose with HPAEC-IPAD suggests that the abundant presumed “1,1-nystose” peaks, detected with HPLC-RID, may correspond to 6G-kestotriose instead. Therefore, data of the presumptive 1,1-nystose and higher molecular weight inulins were left out from the principal component analysis (PCA).

Table 2.2 Levels ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) of (putative) fructan species in three organs from eleven *Musa* accessions as quantified by HPLC-RID. Means sharing the same letter within a column are not significantly different (Tukey's test, $P < 0.001$).

Accession identifier	"Putative" Inulin (Peak # 1)			"Putative" 1,1-nystose (Peak # 2)			1-kestotriose (Peak # 3)		
	Leaf	Fruit	Rhizome	Leaf	Fruit	Rhizome	Leaf	Fruit	Rhizome
I	25.34 b	20.85 d	0.00 f	0.87 d	15.20 fg	254.32 e	1.16 d	48.87 ef	0.00 f
II	13.73 e	8.09 f	4.37 d	0.97 cd	71.00 d	198.36 g	2.67 b	67.44 bcd	202.59 a
III	30.64 a	1.85 g	1.63 e	1.50 b	75.67 cd	333.11 c	0.97 d	61.61 d	0.00 f
IV	19.36 c	157.21 a	9.42 b	1.54 b	78.75 c	184.24 h	0.08 e	27.63 g	0.00 f
V	18.26 d	1.73 g	0.00 f	0.98 cd	100.60 a	233.03 f	0.00 e	74.35 ab	13.89 e
VI	11.86 d	36.25 b	6.14 c	1.02 cd	28.68 e	306.08 d	0.00 e	80.92 a	0.00 f
VII	1.13 h	33.22 b	11.49 a	1.03 cd	7.32 h	162.98 i	2.03 c	45.77 f	153.45 b
VIII	6.70 g	0.00 g	12.04 a	0.93 d	10.49 gh	427.77 a	3.27 a	53.93 e	32.69 d
IX	11.21 f	2.56 g	4.33 d	0.86 d	87.89 b	135.03 j	2.11 c	61.25 d	0.00 f
X	19.84 c	27.02 c	6.97 c	3.87 a	19.32 f	347.30 b	0.00 e	69.14 bc	124.09 c
XI	18.42 d	13.54 e	9.45 b	1.32 bc	29.17 e	225.73 f	0.00 e	64.38 cd	0.00 f

CAPÍTULO II

Table 2.3 Contents of small WSC ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) in the three organs of eleven different *Musa* accessions. Means sharing the same letter within a column are not significantly different (Tukey's test, $P < 0.001$).

Accession identifier	Sucrose			Glucose			Fructose		
	Leaf	Fruit	Rhizome	Leaf	Fruit	Rhizome	Leaf	Fruit	Rhizome
I	22.35 b	464.51 e	38.98 j	3.81 d	513.39 e	7.73 fg	3.31 b	560.51 d	3.36 h
II	16.90 d	26.30 g	65.38 f	7.51 a	13.25 k	0.00 j	2.02 cd	7.45 k	3.64 h
III	20.81 c	849.84 bc	69.47 d	4.31 cd	351.56 g	12.75 d	1.92 cd	331.44 g	9.46 f
IV	24.31 a	550.41 de	102.13 c	4.96 bc	276.98 h	75.85 b	3.00 b	165.42 i	25.31 c
V	13.33 e	825.40 bc	55.33 h	3.94 d	364.43 f	6.53 gh	1.26 de	348.28 f	11.90 e
VI	8.59 g	759.90 cd	67.58 e	2.01 e	692.93 b	3.04 i	1.59 cde	657.01 b	1.61 i
VII	9.28 g	802.99 bc	61.61 g	2.72 e	557.03 d	5.48 h	3.63 b	513.46 e	4.36 h
VIII	6.45 h	347.91 ef	69.48 d	2.23 e	575.63 c	11.19 de	15.58 a	577.05 c	15.58 d
IX	11.68 f	112.09 fg	44.79 i	2.58 e	932.94 a	9.49 ef	0.90 e	886.91 a	7.95 g
X	17.36 d	1205.43 a	181.23 a	7.32 a	244.77 i	63.45 c	2.15 c	254.29 h	40.32 a
XI	24.98 a	1037.81 ab	110.56 b	5.65 b	125.87 j	85.65 a	2.19 c	141.34 j	37.27 b

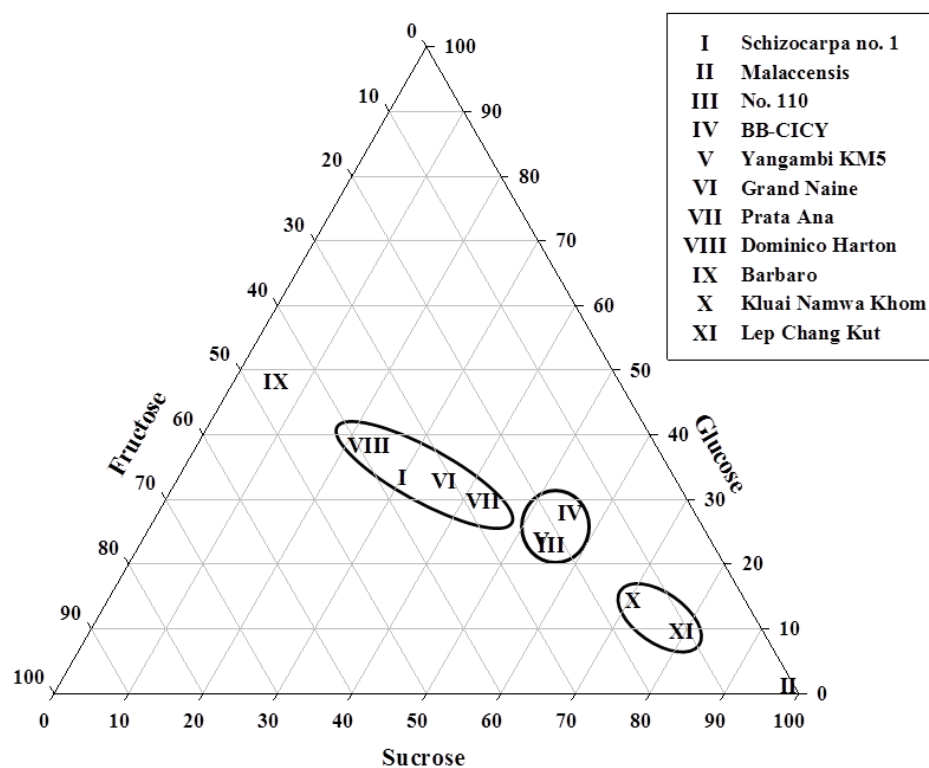


Figure 2.1 Ternary diagram illustrating variations in sucrose, glucose and fructose contents in fruits collected from mature plants of eleven *Musa* accessions. Letters of different accessions correspond to those in Table 1. Each point represents the proportional composition of carbohydrates in each individual accession. The distance from a point to the side of the triangle is proportional to the relative importance of the carbohydrate in the sample.

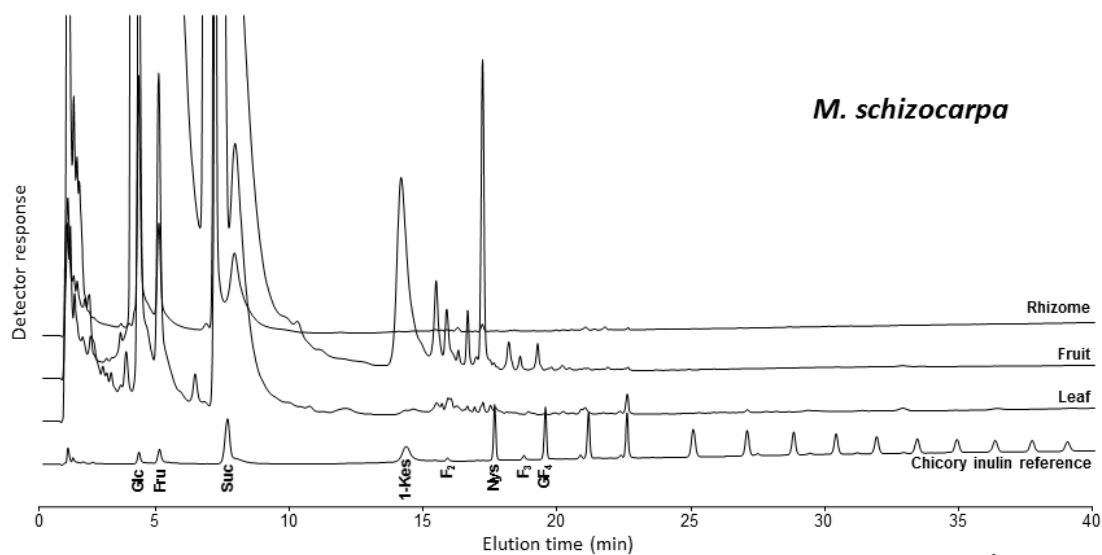


Figure 2

Figure 2.2 HPAEC-IPAD saccharide patterns of leaf, fruit and rhizome parts of *M. schizocarpa*. A pattern of chicory root inulin is provided alongside as a reference, containing glucose (Glc), fructose (Fru), sucrose (Suc), 1-kestotriose (1-Kes), inulobiose (F₂), 1,1-nystose (Nys), inulotriose (F₃), 1,1,1-kestopentaose (GF₄) and higher molecular weight inulin-type fructans.

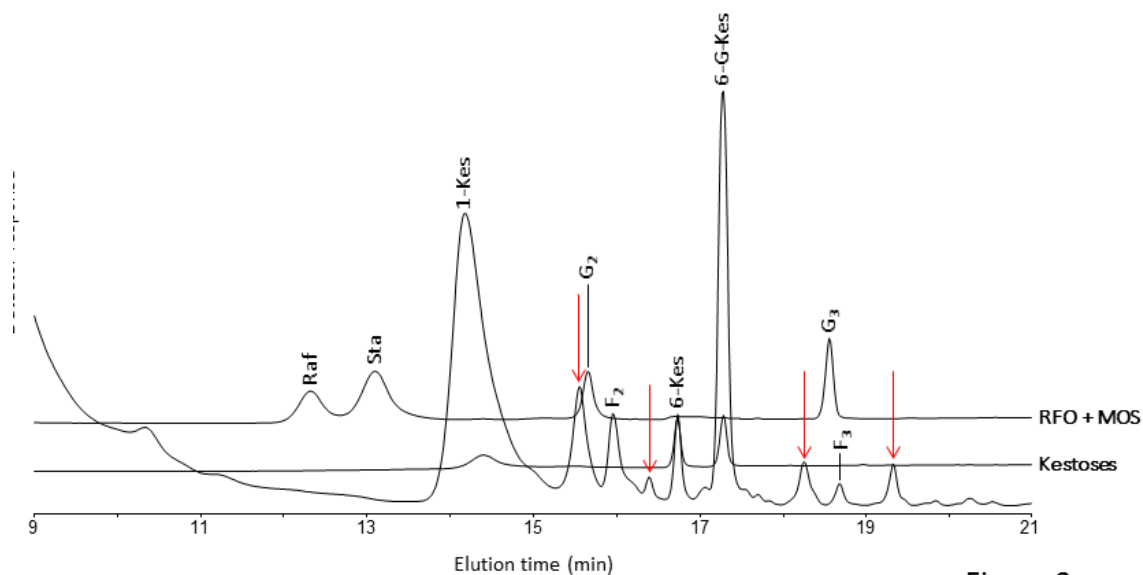


Figure 3

Figure 2.3 Part of a HPAEC-IPAD chromatogram showing the saccharides in *M. schizocarpa* fruits. Comparison with standards of 1-kestotriose (1-Kes), 6-kestotriose (6-Kes) and 6G-kestotriose (6G-Kes), raffinose (Raf), stachyose (Sta), maltose (G₂) and maltotriose (G₃). Besides the 3 kestoses, *M. schizocarpa* fruits also contain inulobiose (F₂), inulotriose (F₃) and four unknown saccharides that are indicated with red arrows.

2.3.2 PCA reveals banana groups in terms of biochemical diversity in carbohydrate metabolites

PCA analysis on the small WSC glucose, fructose, sucrose and 1-kestotriose showed that 86.6% of the total variation in WSC within the organs and among the accessions could be explained by the first four principal components. Of these, the first two accounted for 62.0% of the total variation (Figure 2.4). The seven most important pairs of variables contributing to describe the first principal component PC1 were glucose and sucrose in leaves, glucose and fructose in rhizomes, and glucose, fructose and sucrose in fruit, whereas the most important variables for PC2 were 1-kestotriose and sucrose in leaves and 1-kestotriose and glucose in rhizomes. PC3 was defined by the variable 1-kestotriose in leaves and pulp from ripe fruit. The PCA plot, built using the Eigen-values of the two first principal components, displayed two clearly defined, major groups (Figure 2.4). Group 1 comprised five accessions I, VI, VII, VIII, IX and can be divided in two subgroups. The first cluster harbors accessions I, VI and IX, as defined by the PC2-positive and PC1-negative axes, whereas the second cluster contains the triploid accessions VII and VIII, as defined by both PC2 and PC1 negative axes. Group 2 enclosed a first subgroup, containing accessions V (defined near the center of the two PCs) and III (at the positive axes of PC1 and PC2). A second subgroup harbors accessions IV and XI defined by the PC1 and PC2-positive axes. Finally, a third subgroup, with accessions II and X, can be discerned (defined by positive PC1 and negative PC2 axes).

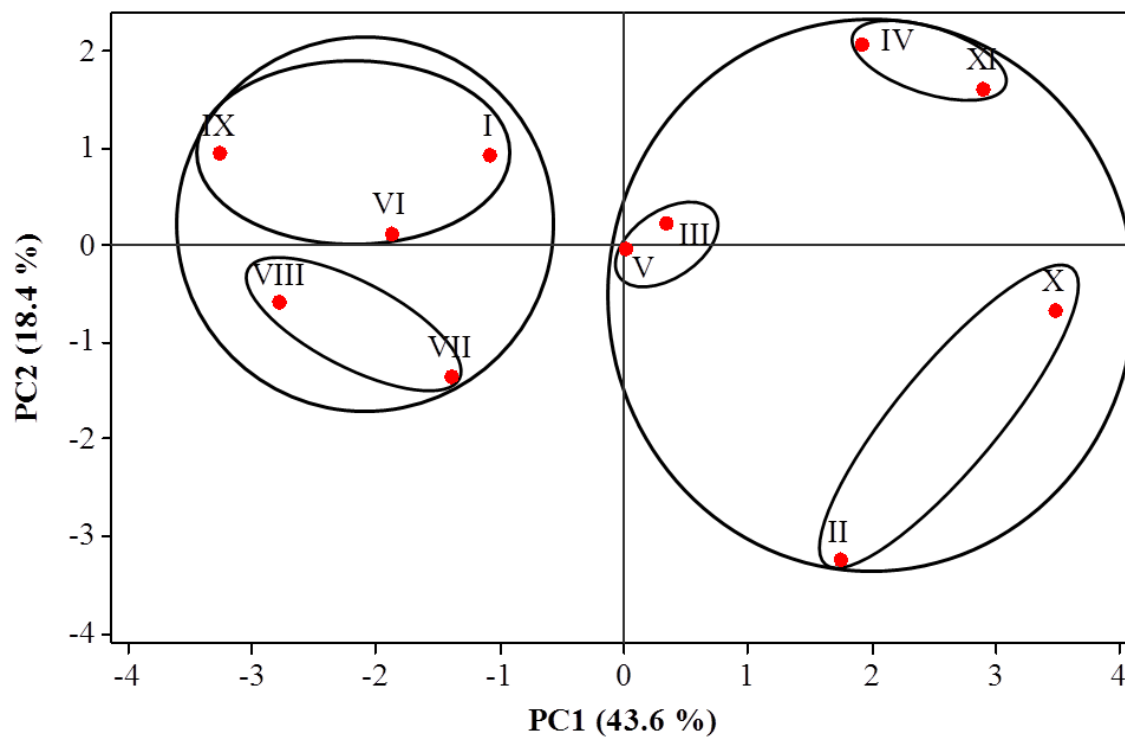


Figure 2.4 Principal component analysis (PCA) of the four WSC, sucrose, glucose, fructose and 1-kestotriose, present in three organs of eleven *Musa* accessions. Letters of different accessions correspond to those in Table 1.

2.4 DISCUSSION

2.4.1 Biochemical diversity of WSC in different organs from eleven accessions of banana

The non-reducing GF_n type of fructans 1-kestotriose, 6-kestotriose and 6G-kestotriose (older name, neokestose), as well as the reducing inulo-*n*-oses or F_n type fructans inulobiose (F₂) and, to a lesser extent, inulotriose (F₃), could be clearly detected in the pulp of ripe fruit, and in a lower degree, also in the leaves and rhizomes of three of the wild *Musa* accessions, which are in the ancestry of the cultivated bananas. Of the three putative inulin-type fructan peaks detected by HPLC-RID, only 1-kestotriose was validated by HPAEC-IPAD. Thus, the most important finding is that no 1,1-nystose and inulins of higher molecular weight were present in wild banana samples, demonstrating the inaccuracy of relying only on HPLC-RID data for fructan species identification. Total contents of 1-kestotriose varied not only in regard to the organ being studied, but also among the analyzed genotypes. To our knowledge, this is the first report of the presence of GF_n and F_n type of small fructans in the leaves and rhizomes of banana plants. It is noteworthy to point out that while low contents (~3.27 µg g⁻¹ DW) of 1-kestotriose were found in the leaves of 63.6% of the accessions, in the pulp of ripe fruits it predominated in all accessions with intermediate values. In contrast, only 45.5% of the accessions showed important levels of 1-kestotriose in their rhizomes at concentrations that ranged between 14 to 202.6 µg g⁻¹ DW. Further work needs to be done to determine the exact contents of 6-kestotriose, 6G-kestotriose, inulobiose and inulotriose in the different organs of the cultivated accessions. In particular, little is known about the natural occurrence and physiological roles of inulo-*n*-oses in plants. Van den Ende et al. (1996) reported that under some conditions they can result from 1-FFT activity with fructan as a donor substrate and fructose as acceptor substrate. The absence of 1,1-nystose and higher DP inulin-type fructans argues against the existence of a “genuine” 1-FFT in banana. Before, the existence of a real 1-SST in banana was questioned (Agopian et al., 2009). These authors rather proposed the presence of a single, soluble acidic invertase with intrinsic 1-SST side activity. Plant VIs can produce the three kestoses in a certain ratio from high sucrose (De Coninck et al., 2005). Here, we also detected such typical “kestose signature” in banana fruit, suggesting that these kestoses are the product of VI activity, when

subjected to strongly increased sucrose levels. Moreover, it can be speculated that one or more VI-type of enzymes can produce inulobiose from sucrose (donor substrate) and fructose (acceptor substrate), and inulotriose from sucrose (donor substrate) and inulobiose (acceptor substrate). This need to be further corroborated by enzyme purification and in depth characterization of the purified enzyme (or enzymes) involved.

Previous studies presented contrasting data with regard to fructan contents in banana fruits. For instance, in banana cv. Consul premium, the only fructan detected was 1-kestotriose, with contents fluctuating between 4323 to 6020 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW, depending on the degree of maturity of the fruit (L'Homme et al., 2001). On the contrary, in eight other banana cultivars, 1-kestotriose levels were found to be much lower (297 to 1630 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW). The presence of 1,1-nystose (Agopian et al., 2008), neokestose, 6-kestotriose and bifurcose were reported in ripe fruits of the Prata cultivar (Agopian et al., 2009). These data contrast with our findings, pointing at lower amounts in fruits and greater variation among the analyzed genotypes. For instance, the two wild diploid accessions *M. acuminata* ssp. *malaccensis* and *M. balbisiana* exhibited differential 1-kestotriose levels (67.4 and 27.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) in ripe fruits. The importance of these two species resides in their close genetic relations to present varieties of diploid and triploid bananas and plantains (Valdez-Ojeda et al., 2014; D'Hont et al., 2000).

In bananas, the physiological and biochemical roles of fructans remain to be fully elucidated, but they may function as a temporal storage or reserve of energy under adverse environmental conditions (Van den Ende, 2013). In cereals (e.g. wheat, barley, and oats), fructans accumulate temporarily in the stem and leaf sheath during vegetative growth, and are then hydrolyzed and transported as sucrose to developing grains (Peukert et al., 2014). This remobilization is thought to contribute to the final grain yield, especially when crops are subject to adverse abiotic stress (Zhang et al., 2015; Joudi et al., 2012). Additionally, fructans may be involved in hydroxyl radical scavenging (Peukert et al., 2014; Peshev et al., 2013) or in signaling events (Van den Ende, 2013). Similar functions may be proposed for fructans in banana.

Variations in the small WSC content in fruits, resulting from the relative contribution of sucrose, glucose and fructose to the total WSC pool, support the formation of different groups (Figure 2.1), characterized by their phenotypic WSC profile. For instance,

accessions with high levels of sucrose and low glucose and fructose contents (e.g. *M. acuminata* spp. *malaccensis*, the triploid cultivars Lep Chang Kut and Kluai Namwa Khom) formed two near clusters, whereas, an accession that was almost sucrose-free ($\leq 10\%$) and contained intermediate glucose and fructose levels (e.g. Barbaro) remained separated from the other groups (Figure 2.1). Biochemical diversity in fruits' small WSC contents might be explained by the activity of enzymes involved in starch degradation and sucrose metabolism during fruit ripening (Fils-Lycaon et al., 2011). Both α - and β -amylases are involved in starch hydrolysis, as well as α -glucosidase and sucrose synthase functioning in a catabolic way, and their products could be converted to sucrose via sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose phosphate phosphatase. SPS is a key enzyme in sucrose accumulation in ripening bananas (Do Nascimento et al., 1997), and hence, a high SPS activity may contribute to direct the carbon gradient flux from starch to sucrose in banana fruits. In this regard, the activity of VIs is probably one of the key elements in the regulation of sucrose to hexose balance during banana ripening (Fils-Lycaon et al., 2011). Therefore, it would be interesting to follow more precisely the "fructan signature" and increasing fructan levels during banana fruit maturation (L'Homme et al., 2001), since fructan accumulation may in fact correlate well with increased VIs activities under (partial) starch degradation and "banana sweetening". We propose here, as a working model for future research, that the acceptor substrate binding site of banana fruit VIs developed an affinity for sucrose and fructose (Figure 2.5), preventing that these sugars would reach toxic levels in the cell, and orchestrating the process of starch degradation with the ethylene-induced ripening process and with cellular respiration.

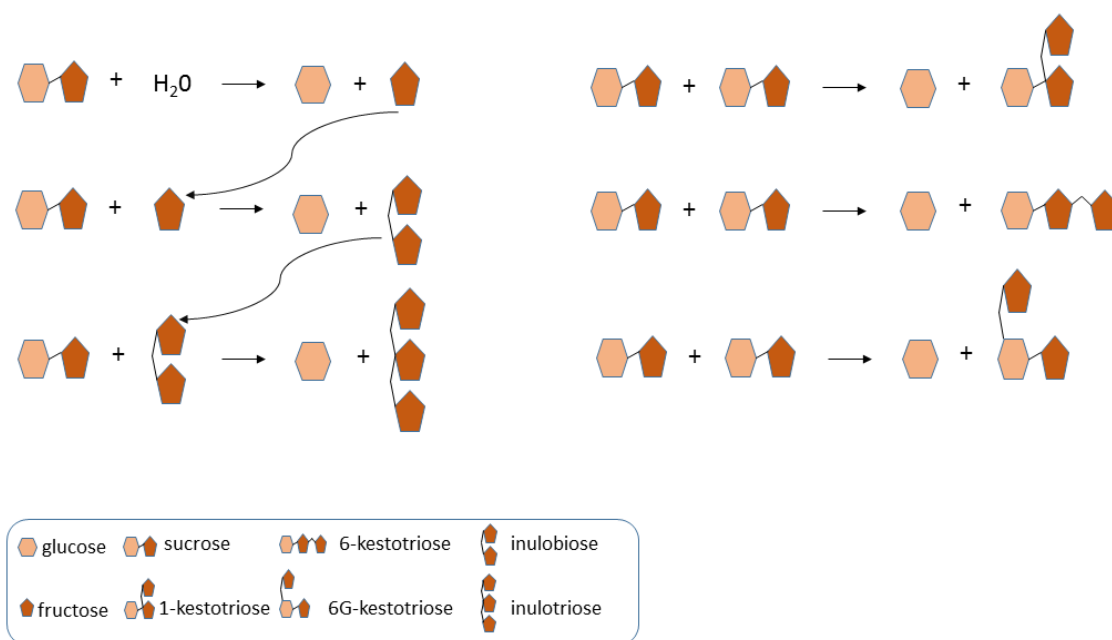


Figure 2.5 Model of vacuolar invertase action in banana fruit, linked to the identity of FOS.

Typically, vacuolar invertases use water as acceptor substrate, producing glucose and fructose. However, increased fructose and sucrose levels may lead to the replacement of water as acceptor substrate by sucrose and fructose. In particular, inulobiose may be produced from sucrose (donor substrate) and fructose (acceptor substrate). The produced inulobiose can be used as acceptor substrate to produce inulotriose. Furthermore, the three kestoses (1-kestotriose, 6-kestotriose and 6G-kestotriose) can be produced when sucrose acts as an acceptor substrate.

2.4.2 Relationships between accessions based on the profiles of their WSC metabolites

The use of metabolite profiling analysis by PCA (Figure 2.4) revealed that glucose and sucrose in leaves, fructose in fruit, and sucrose, glucose and fructose in the rhizomes were the most important traits for sorting the accessions in the first principal component that contributed to the splitting of accessions into two large groups. Furthermore, 1-kestotriose levels in leaves and rhizomes, and glucose levels in rhizomes added the most weight to the second component, for the final separation of accessions into the different groups. In summary, PCA analysis highlighted genuine differences among the three wild diploid

CAPÍTULO II

accessions with different WSC profiles, providing some clues on the nature of these differences. Particularly interesting is the grouping of the two accessions with B genomes (*M. balbisi* and Lep Chang Kut) from the other diploids and from triploids that share one or two A or B genomes.

Overall, the enormous variation in the 1-kestotriose contents within the eleven accessions highlights the necessity of deeper studies on the biochemistry of fructan biosynthesis within and between the different PCA subgroups, to further exploit banana biodiversity for breeding purposes, aiming to enrich fructan contents in fruits. The existence of VIs with “premature” fructosyltransferase characteristics in banana fruit is very interesting, suggesting that fructan metabolism is “emerging” in banana, which lacks “genuine” fructosyltransferases as occurring in typical fructan accumulators. Our knowledge on structure-function relationships in GH32 (Van den Ende et al., 2009) allows a fast development of “genuine” banana fructosyltransferases that may contribute to increase fructan contents in banana in the near future. Moreover, further studies are needed to elucidate the physiological roles of the different fructan types detected in the different banana organs.

REFERENCES

- Agopian, R. G. D., Soares, C. A., Purgatto, E., Cordenunsi, B. R., and Lajolo, F. M. (2008). Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 3305-3310. doi: 10.1021/jf073011l
- Agopian, R. G. D., Purgatto, E., Cordenunsi, B. R., and Lajolo, F. M. (2009). Synthesis of fructooligosaccharides in banana 'Prata' and its relation to invertase activity and sucrose accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 10765-10771. doi: 10.1021/jf902163f
- Asega, A. F., and de Carvalho, M. A. M. (2004). Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42, 313-319. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.02.005
- Aurore, G., Parfait, B., and Fährasmane, L. (2009). Bananas, raw materials for making processed food products. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 78-91. doi: 10.1016/j.tifs.2008.10.003
- Dadzie, B. K., and Orchard, J. E. (1997). *Routine post-harvest screening of banana/plantain hybrids: criteria and methods*. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). *INIBAP Technical Guidelines 2*; IPGRI: Rome, Italy, p 77.
- De Coninck, B., Le Roy, K., Francis, I., Clerens, S., Vergauwen, R., Halliday, A. M., Smith A. M., Van Laere A., and Van den Ende, W. (2005). *Arabidopsis* AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant Cell Environ.* 28, 432-443. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01281.x
- d'Hont, A., Paget-Goy, A., Escoute, J., and Carreel, F. (2000). The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100, 177-183. doi: 10.1007/s001220050024
- Di Bartolomeo, F., Startek, J. B., and Van den Ende, W. (2013). Prebiotics to fight

- diseases: reality or fiction? *Phytother. Res.* 27, 1457-1473. doi: 10.1002/ptr.4901
- Di Bartolomeo, F. and Van den Ende, W. (2015). Fructans and fructose: opposite effects on health? *Plant Foods Hum. Nutr.* In press.
- Do Nascimento, J. R. O., Cordenunsi, B. R., Lajolo, F. M., and Alcocer, M. J. C. (1997). Banana sucrose-phosphate synthase gene expression during fruit ripening. *Planta* 203, 283-288. doi: 10.1007/s004250050193
- Fils-Lycaon, B., Julianus, P., Chillet, M., Galas, C., Hubert, O., Rinaldo, D., and Mbéguié-A-Mbéguié, D. (2011). Acid invertase as a serious candidate to control the balance sucrose versus (glucose+ fructose) of banana fruit during ripening. *Sci. Hort.* 129, 197-206. doi: 10.1016/j.scienta.2011.03.029
- Hakkinen, M. (2013). Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). *Taxon*, 62, 809-813.
- Hendry, G. A. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans—a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.* 123, 3-14. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb04525.x
- Joudi, M., Ahmadi, A., Mohamadi, V., Abbasi, A., Vergauwen, R., Mohammadi, H., and Van den Ende, W. (2012). Comparison of fructan dynamics in two wheat cultivars with different capacities of accumulation and remobilization under drought stress. *Physiol. Plant.* 144, 1-12. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01517.x
- L'Homme, C., Peschet, J. L., Puigserver, A., and Biagini, A. (2001). Evaluation of fructans in various fresh and stewed fruits by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A.* 920, 291-297. doi:10.1016/S0021-9673(00)01262-0
- Matros, A., Peshev, D., Peukert, M., Mock, H. and Van den Ende, W. (2015). Sugars as hydroxyl radical scavengers. Proof-of-concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis*. *Plant J.* In press.

-
- Moshfegh, A. J., Friday, J. E., Goldman, J. P., and Ahuja, J. K. C. (1999). Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *J. Nutr.* 129, 1407s-1411s.
- Peshev, D., Vergauwen, R., Moglia, A., Hideg, É., and Van den Ende, W. (2013). Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *J. Exp. Bot.* 64, 1025-1038. doi:10.1093/jxb/ers377
- Peshev, D., and Van den Ende, W. (2014). Fructans: prebiotics and immunomodulators. *J. Funct. Foods.* 8, 348-357. doi: 10.1016/j.jff.2014.04.005
- Peukert, M., Thiel, J., Peshev, D., Weschke, W., Van den Ende, W., Mock, H. P., and Matros, A. (2014). Spatio-temporal dynamics of fructan metabolism in developing barley grains. *Plant Cell* 26, 3728-3744. doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.114.130211>
- Ravi, I., Uma, S., Vaganan, M. M., and Mustaffa, M. M. (2013). Phenotyping bananas for drought resistance. *Front. Plant Sci.* 4, 9. doi: 10.3389/fphys.2013.00009
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., and Prapulla, S. G. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 442-457. doi: 10.1016/j.tifs.2005.05.003
- Sims, I. M. (2003). Structural diversity of fructans from members of the order Asparagales in New Zealand. *Phytochemistry* 63, 351-359. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00132-8
- Valdez-Ojeda, R., James-Kay, A., Ku-Cauich, J. R., and Escobedo-GraciaMedrano, R. M. (2014). Genetic relationships among a collection of *Musa* germplasm by fluorescent-labeled SRAP. *Tree Genet. Genomes* 10, 465-476. doi: 10.1007/s11295-013-0694-9
- Van den Ende, W. (2013). Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Front. Plant Sci.* 4, 247. doi: 10.3389/fpls.2013.00247
- Van den Ende, W., Coopman, M., Clerens, S., Vergauwen, R., Le Roy, K., Lammens, W., and Van Laere, A. (2011). Unexpected presence of graminan-and levan-type

CAPÍTULO II

- fructans in the evergreen frost-hardy eudicot *Pachysandra terminalis* (Buxaceae): purification, cloning, and functional analysis of a 6-SST/6-SFT enzyme. *Plant Physiol.* 155, 603-614. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110>
- Van den Ende, W., Lammens, W., Van Laere, A., Schroeven, L., and Le Roy, K. (2009). Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes. *FEBS J.* 276, 5788-5798.
- Van den Ende, W., Roover, J. D., and Van Laere, A. (1996). *In vitro* synthesis of fructofuranosyl-only oligosaccharides from inulin and fructose by purified chicory root fructan: fructan fructosyl transferase. *Physiol. Plant.* 97, 346-352. doi: 10.1034/j.1399-3054.1996.970219.x
- Vergauwen, R., Van Laere, A., and Van den Ende, W. (2003). Properties of fructan: fructan 1-fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two Asteracean plants storing greatly different types of inulin. *Plant Physiol.* 133, 391-401. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.026807>
- Vogt, L., Ramasamy, U., Meyer, D., Pullens, G., Venema, K., Faas, M. M., Schols, H. A., and de Vos, P. (2013). Immune modulation by different types of β 2-1-fructans is Toll-like receptor dependent. *PLoS ONE.* 8, e68367. doi: 10.1371/journal.pone.0068367
- Wall, M. M. (2006). Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa* sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. *J. Food Compos. Anal.* 19, 434-445. doi: 10.1016/j.jfca.2006.01.002
- Zhang, J., Xu, Y., Chen, W., Dell, B., Vergauwen, R., Biddulph, B., Khan, N., Luo, H., Appels, R., and Van den Ende, W. (2015). A wheat 1-FEH w3 variant underlies enzyme activity for stem WSC remobilization to grain under drought. *New Phytol.* 205, 293-305. doi: 10.1111/nph.13030

CAPÍTULO III

ASSESSMENT OF GENETIC RELATIONSHIP IN *MUSA* USING MALE FLOWER DESCRIPTORS AND MOLECULAR MARKERS

3.1 INTRODUCTION

The genus *Musa* (Musaceae family) consists of around 75 recognized species. Previous work based on morphology divided the genus into sections: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys*, and *Eumusa* (Cheesman 1947), and *Musa* sect. *Ingentimusa* (Argent 1976), however, this subdivision into five sections have been questioned. Recently, Häkkinen (2013) based on reported molecular phylogenetic studies reconstructed the subdivision of *Musa* species into two sections from the only two monophyletic clades recovered, which correspond to the basic chromosome number of $n = x = 11$, and $x = 9$. $10 / 7$, respectively. The first one is section *Musa*, which includes all species related to pre-classified *Eumusa* and *Rhodochlamys*, and the second, *Callimusa*, comprising species of the two remaining sections (*Australimusa* and *Callimusa*). *Musa acuminata* Colla (A genome) and *M. balbisiana* Colla (B genome) are the most widely geographically represented species and are the genetic origin of the great majority of edible bananas and plantains. Although, the genetic contribution of the S genome of *M. schizocarpa* in some edible cultivars, as well as of the T genome in rare cultivated accessions has been reported (Hippolyte *et al.* 2012; Roux *et al.*, 2008; Carreel *et al.*, 1994).

World total production of banana and plantain reached approximately 102 and 37 million tons in 2012, respectively, were produced by approximately 120 countries (FAOSTAT, 2014). Several approaches have been used for the assessment of genetic diversity in *Musa*, such as morphological markers, which are known to be simple, easy, informative and cheap. Various previous studies focused on the use of morphological characteristics in *Musa*, i.e bunch (Putra *et al.*, 2010; Swennen and Vnylsteke, 1987), vegetative characters (Nzawele *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010; De Langhe, 2005; Pascua and Espino, 1987).

¹ Cruz Cardenas C, Muhammad Youssef and Escobedo-GraciaMedrano RM (2015). Assessment of genetic relationship in *Musa* using male flower descriptors and molecular markers. Horticulture, Environment and Biotechnology. To be submitted.

CAPÍTULO III

Male flower descriptors (Rodrigues *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010; Nunes de Jesus *et al.*, 2009; Sebasigari, 1987) and male inflorescence and fruit (Rodrigues *et al.*, 2012; Nzawele *et al.*, 2013; Putra *et al.*, 2010; De Langhe, 2005).

In particular, male flower descriptors have been reported as one of the most important qualitative morphological descriptors in *Musa* (Ortiz, 1997). On the other hand, several molecular markers have been used to assess the genetic diversity in *Musa*, including RAPD (Ferreira *et al.*, 2004; Crouch *et al.*, 2000), VNTR (Crouch *et al.*, 1999), RFLP (Nwakanma *et al.* 2003; Careel *et al.* 2002), diversity array technology (DArT) (Risterucci *et al.*, 2009), AFLP (Youssef *et al.*, 2011; Ude *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2001; Loh *et al.*, 2000), and SRAP (Valdez-Ojeda *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2012; Youssef *et al.*, 2011; Phothipan *et al.*, 2005).

Evaluation of the diversity, based on phenotypic characterizations alone, may not be completely reliable since traits are limited in number and influenced by cultivation and growth environmental conditions (Ahmed *et al.*, 2011). The combination of molecular and phenotypic markers could overcome the limitations of the latter. Additionally, a standard descriptor list should include reliable morphological traits and DNA markers capable of describing the diversity of the crop and its wild relatives (Ortiz and Swennen, 2014). In this regard, some studies were done using both markers to evaluate *Musa* genetic variability (Rodrigues *et al.*, 2012; Miri *et al.*, 2009; Nunes de Jesus *et al.*, 2009; De Langhe, 2005).

Evaluation of *Musa* genotypes including wild genotypes, cultivars and hybrids from different species could help in understanding the genetic diversity in the genus and selecting the proper genotypes for subsequent breeding and DNA-technology approaches. Thus, the objective of this study was to assess the genetic diversity in a *Musa* collection including wild species, cultivars and hybrids using morphological descriptors of male flower, SRAP and AFLP molecular markers.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Plant Materials

Twelve *Musa* accessions were collected from the *Musa* germplasm collection of the Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), located at the research station of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) at Uxmal (Yucatán, México). These consisted of wild species of *M. acuminata*, *M. balbisiana*, *M. schizocarpa*, *M. ornata*, commercial cultivars and hybrids (Table 3.1).

Table 3.1 *Musa* accessions used in this study

No.	Section	Species	Genome	Name	Abbreviation	ITC
1	Musa	<i>M. acuminata</i>	AAw	Malaccensis	MAL	*
2	Musa	<i>M. acuminata</i>	AAw	Banksii	BAN	0623
3	Musa	<i>M. acuminata</i>	AAcv	Pisang Berlin	BER	0611
4	Musa	<i>M. acuminata</i>	AAcv	IND-110	IND	0413
5	Musa	<i>M. acuminata</i>	AAAcv	Gran Naine	GRN	-
6	Musa	<i>M. acuminata</i>	AAAcv	Yangambi-KM5	YAN	1123
7	Musa	<i>M. balbisiana</i>	BBw	Balbisiana CICY	BAL	*
8	Musa	<i>M.a</i> × <i>M.b</i>	AB	Kunnan	KUN	1034
9	Musa	Cooking banana	ABB	Pisang Awak	AWK	0213
10	Musa	Plantains	AAB	Prata Ana	PRA	0962
11	Musa	<i>M. schizocarpa</i>	SS	Schizocarpa	SCH	0599
12	Musa	<i>M. ornata</i>	-	Ornata	ORN	-

3.2.2 Morphological characterization

Twelve morphological descriptors were evaluated among the tested *Musa* accessions including male flower and ovary lengths (cm), and 10 qualitative morphological descriptors evaluated using numerical categories according to IPGRI (1996) (Table 3.2).

Table 3.2 List of male flower descriptors used in this study

N o.	Descriptors	Categories			
		1	2	3	4
1	Male flower dominant color	White	Cream	Pink/pink-purple	-
2	Compound tepal basic color	White	Cream	Yellow	Pink/pink-purple
3	Compound tepal pigmentation	Very few	Rust-colored spots	Presence of pink	-
4	Lobe color of compound tepal	Cream	Yellow	Orange	Green
5	Free tepal Color	Translucent white	Opaque white	Tinted yellow with	Tinted with pink
6	Ovary basic color	White	Cream	Yellow	Green
7	Ovary pigmentation	Very few or no visible	White red-purple	-	-
8	Ovary shape	Straight	Arched	-	-
9	Male flower shape	Straight	Arched	-	-
10	Number of stamens	Five	Variable (5 or 6)	-	-

3.2.3 Morphological data analysis

Morphological evaluation was performed using randomized complete block design (RCBD) with six replicates for each accession. Analysis of variance was performed for male flower and ovary lengths and averages were compared by Duncan's multiple-range test using M-STATC micro-program (Nissen, 1984). For the qualitative descriptors, each was described by numerical categories (Table 3.2). The cluster analysis was done based on the simple matching coefficient (for multi-state data) using "SimQual" tool in NTSYS-pc version 2.20 (Applied Biostatistics Inc.). The sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering parameters (SAHN) program using the un-weighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) in (NTSYS) was employed to generate dendrograms. The representativeness of a dendrogram was evaluated by estimating the cophenetic correlation utilizing Mantel's matrix correspondence test (Mantel, 1967).

3.2.4 DNA extraction and quantification

Total genomic DNA from the 12 *Musa* accessions was extracted from 100 mg frozen young cigar leaves following the protocol described by Dellaporta *et al.* (1983) with some modifications (Youssef, 2012). DNA quality and concentration were determined spectrophotometrically according to Stulnig and Amberger (1994).

3.2.5 SRAP and AFLP-PCR amplification

The method of Li and Quiros (2001) was followed for the SRAP marker system. Out of 80 primer combinations, ten SRAP primer sets were selected based on higher polymorphism and used for the analysis of the different *Musa* accessions (Table 3.3). AFLP analysis was carried out according to Vos *et al.* (1995). Out of 26 primer combinations tested, 10 were selected and used (Table 3.3). SRAP and AFLP amplification products were separated on a 6% sequencing gel (urea-PAGE) and visualized by staining with silver nitrate according to Bassam *et al.* (1991) with some modifications.

CAPÍTULO III

Table 3.3 Sequence of 10 selected primer combinations of SRAP and AFLP used in this study

No	SRAP (5`-3`)		No	AFLP (5`-3`)	
1	Me-1	TGAGTCCAAACCGGATA	1	ECO-4	GACTGCGTACCAATTCAGC
	Em-1	GACTGCGTACGAATTAAT		MSE-1	GATGAGTCCTGAGTAACAA
2	Me-2	TGAGTCCAAACCGGAGC	2	ECO-1	GACTGCGTACCAATTC AAC
	Em-1	GACTGCGTACGAATTAAT		MSE-3	GATGAGTCCTGAGTAACAG
3	Me-4	TGAGTCCAAACCGGACC	3	ECO-4C	GACTGCGTACCAATTCAC
	Em-1	GACTGCGTACGAATTAAT		MSE-10	GATGAGTCCTGAGTAACCG
4	Me-8	TGAGTCCAAACCGGTGT	4	ECO-7C	GACTGCGTACCAATTCGCG
	Em-3	GACTGCGTACGAATTGAC		MSE-10	GATGAGTCCTGAGTAACCG
5	Me-3	TGAGTCCAAACCGGAAT	5	ECO-15C	GACTGCGTACCAATTCCTC
	Em-6	GACTGCGTACGAATTGCA		MSE-10	GATGAGTCCTGAGTAACCG
6	Me-1	TGAGTCCAAACCGGATA	6	ECO-4	GACTGCGTACCAATTCAGC
	Em-7	GACTGCGTACGAATTATG		MSE-13	GATGAGTCCTGAGTAACTA
7	Me-1	TGAGTCCAAACCGGATA	7	ECO-6	GACTGCGTACCAATTCAGC
	Em-8	GACTGCGTACGAATTAGC		MSE-13	GATGAGTCCTGAGTAACTA
8	Me-2	TGAGTCCAAACCGGAGC	8	ECO-5	GACTGCGTACCAATTC ACT
	Em-8	GACTGCGTACGAATTAGC		MSE-14	GATGAGTCCTGAGTAACTG
9	Me-3	TGAGTCCAAACCGGAAT	9	ECO-3	GACTGCGTACCAATTCACA
	Em-8	GACTGCGTACGAATTAGC		MSE-15	GATGAGTCCTGAGTAACTC
10	Me-4	TGAGTCCAAACCGGACC	10	ECO-6	GACTGCGTACCAATTCAGC

	Em-8	GACTGCGTACGAATTAGC		MSE-16	GATGAGTCCTGAGTAACTT
--	------	--------------------	--	--------	---------------------

3.2.6 Molecular data analysis

A binary data matrix indicating the presence (1) or the absence (0) of bands was constructed from both SRAP and AFLP profiles. Only strong, reproducible and clearly distinguishable bands were used for the analysis. The percentage of polymorphism was calculated by dividing the number of polymorphic bands per the total number of regenerated bands. The polymorphism information content (PIC) was calculated for both markers as $PIC = 2f_i(1-f_i)$; where f_i is the frequency of the marker fragments which were present (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000). Resolving power (R_p) of each primer in all markers was calculated using the formula: $R_p = \sum I_b$ where $I_b = 1 - [2|0.5 - p|]$, where p is the proportion of the accessions containing the I band (Prevost and Wilkinson 1999). The software NTSYSpc ver. 2.20s was used and genetic similarities were calculated using Jaccard's coefficient (1908) of similarity. Cluster analysis was carried out on similarity estimates using the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA). One thousand repetition counts were used to generate the bootstrapping using the FreeTree program. The representativeness of dendrograms was evaluated by estimating the cophenetic correlation using Mantel's matrix correspondence test (Mantel, 1967).

3.3 RESULTS

Twelve *Musa* accessions including four wild species of *Musa* section and commercial cultivars and hybrids, were used in this study to assess their diversity and relationships, using some morphological descriptors of the male flower and two molecular markers. The relationship among the tested accessions was clearly assessed using both morphological and molecular descriptors (Figure 3.1)

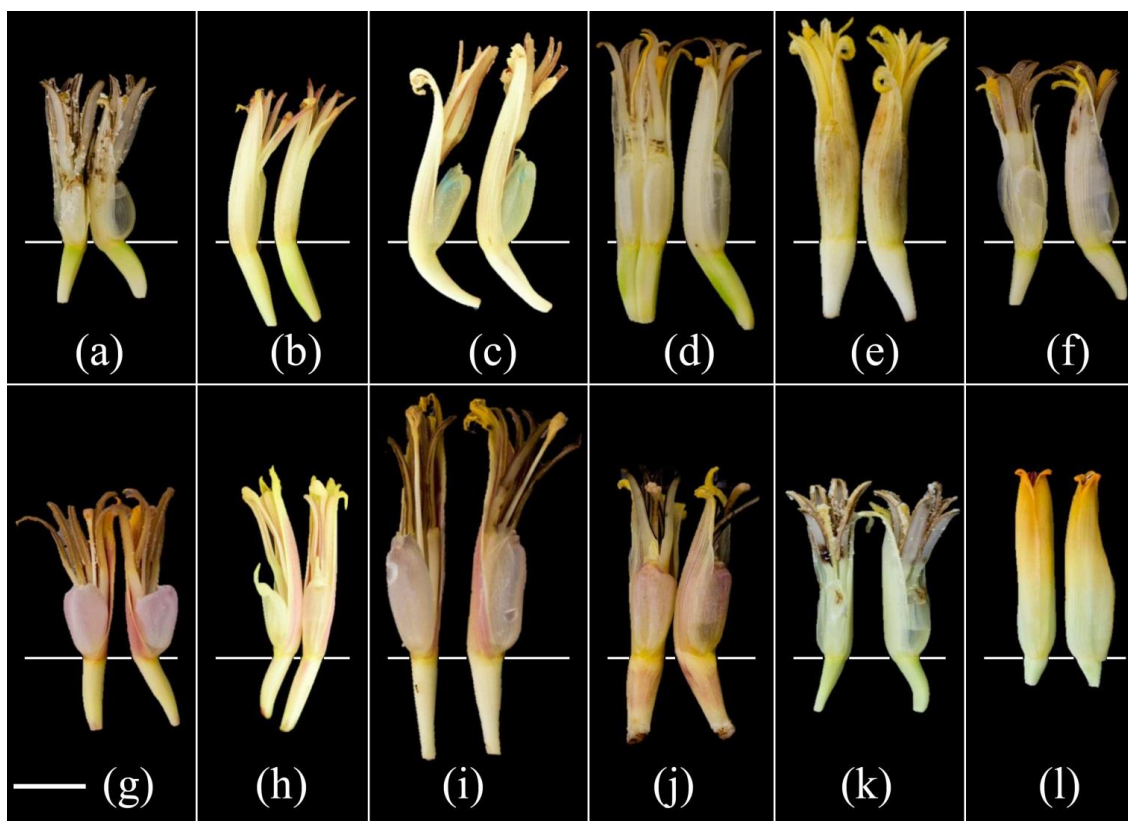


Figure 3.1 Morphological characteristics of male flowers in 12 *Musa* accessions. Malaccensis (a), Banksii (b), Pisang Berlin(c), IND-110(d), Gran Naine(e), Yangambi-KM5 (f), Balbisiana CICY (g), Kunnan (h), Pisang Awak (i), Prata Ana (j), Schizocarpa (k), Ornata (l).

3.3.1 Morphological evaluation

Analysis of variance for male flower and ovary lengths showed highly significant ($p < 0.01$) differences among the tested accessions. The highest male flower length was 7.25 cm in Pisang Awak accession, while the shortest length was 5.07 cm showed by *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*. On the other hand, the range of length of ovary varied from 0.60 cm (*M. ornata*) to 2.32 cm (Pisang Awak). Interestingly, there was a highly significant correlation between the length of male flower and ovary ($r = 0.761$, $p = 0.003$).

Ten qualitative descriptors of male flowers were evaluated in the 12 *Musa* accessions (Table 3.4). Among these descriptors, some were observed to be species-specific characters to certain accessions. For instance, the compound tepal basic color (CTBC) shown by accessions of *M. schizocarpa* and *M. ornata* was yellow, while all other

accessions from *M. acuminata* showed cream or white color. Accessions with B genome showed CTBC with pink color. Additionally, the presence of pink color in compound tepal pigmentation (CTP) was observed only in accessions that share the B genome (BAL, KUN, PRA and AWK, (Table 3.4)). It is noteworthy to point out that all *Musa* accessions in this study showed a constant number of stamens (5), with exception of Pisang Berlin and *M. schizocarpa*, which showed variable number of stamens (5 and 6) in their male flowers. Results for morphological characteristics of male flowers in 12 *Musa* accessions are shown in figure 3.1.

Cluster analysis based on 10 morphological descriptors of male flowers was able to discriminate the twelve *Musa* accessions clearly (Figure 3.2). The UPGMA-dendrogram, based on simple matching coefficient, separated the accessions into three main clusters. The first main cluster was divided into two sub-clusters: IA which contained subspecies *musa acuminata malaccensis* and IDN-110 cv., and IB that contained all accessions with B genome (Kunnan, BB-CICY, Prata Ana and Pisang Awak). The second main cluster comprises *Banksii*, the triploid dessert cultivars (Yangambi-KM5 and Grand Nain) and Pisang Berlin. Both, *M. schizocarpa* and *M. ornata* were grouped in the third main cluster. The highest similarity (0.80) was observed between *musa acuminata malaccensis* and IDN-110 cv. and Pisang Berlin with Grand Naine, independently (Figure 3.2a).

Mantel's matrix correspondence test showed that the representativeness of the dendrogram based on qualitative descriptors was highly significant ($r= 0.75$, $p<0.01$), which indicate that this provided a good representation of the relationships among *Musa* accessions.

CAPÍTULO III

Table 3.4 Comparison of male flower descriptors in different Musa accessions

No.	Descriptors	Accessions											
		MAL	BAN	BER	IND	GRN	YAN	BAL	KUN	AWK	PRA	SCH	ORN
1	Male flower dominant color	1	3	3	1	3	2	1	1	2	3	1	2
2	Compound tepal basic color	2	1	1	2	1	2	4	4	4	4	3	3
3	Compound tepal pigmentation	2	1	2	2	2	2	3	3	3	3	2	1
4	Lobe color of compound tepal	2	1	1	4	1	1	3	1	2	2	1	3
5	Free tepal Color	2	2	1	2	1	1	4	2	4	4	3	3
6	Ovary basic color	2	2	2	4	2	2	3	4	3	2	1	1
7	Ovary pigmentation	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	1
8	Ovary shape	1	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2	1
9	Male flower shape	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1
10	Number of stamens	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
11	Male flower length (cm)	5.0	5.4	6.2	6.7	6.3	5.6	5.6	5.3	7.2	5.6	5.5	5.3
12	Ovary length (cm)	1.4	1.5	2.3	1.9	2.1	1.5	1.8	1.1	2.3	1.8	1.5	0.8

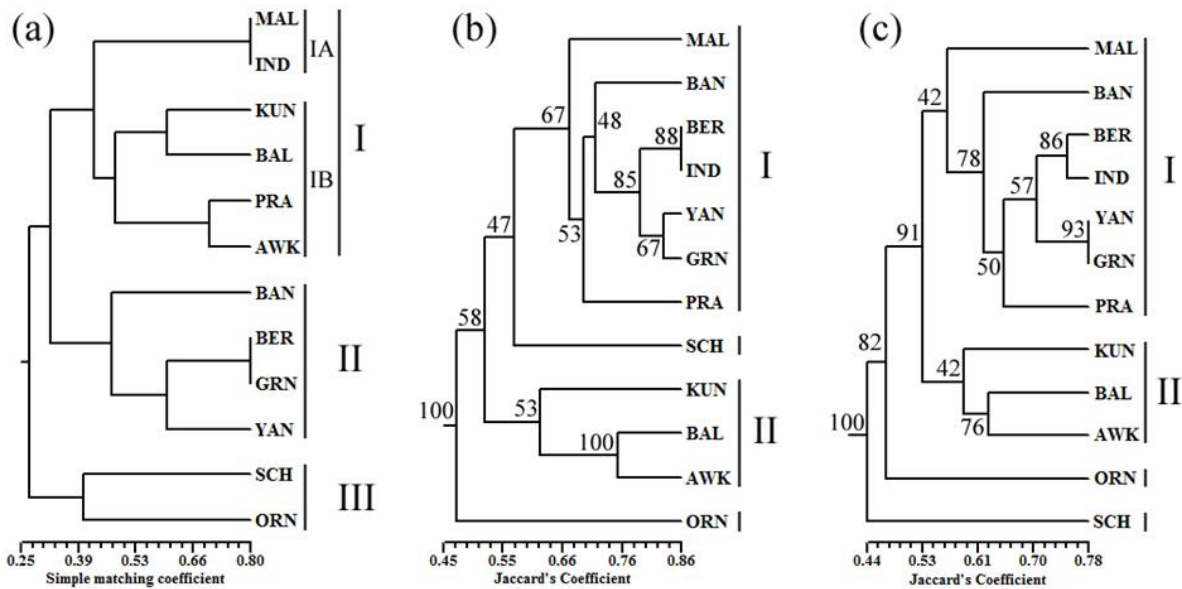


Figure 3.2 Cluster analysis, based on morphological descriptors of male flowers (a), SRAP (b), AFLP (c).

3.3.2 Molecular analysis

The ten primer combinations used for SRAP analysis generated a total of 275 bands, of which 213 were polymorphic (77.45 %). The total number of bands per primer ranged from 15 to 37, with an average of 28 bands per primer. The highest percentage of polymorphism (%P) was 83.78% generated by Me-4/Em-8 primer combination, while the lowest %P was 66.7% generated by both Me-2/Em-1 and Me-3/Em-6 primer combinations. In addition, the polymorphism information content (PIC) was calculated for SRAP primers. The highest PIC was 0.25 generated by Me-1/Em-1 primer combination and the lowest PIC was 0.19 generated by Me-2/Em-8 primer combination, with an average of 0.22 for all primers (Table 3.5).

Cluster analysis based on SRAP data separated the tested accessions into two main clusters. The first cluster included all accessions related to *M. acuminata malccensis* and *M. acuminata banksii*, AA cultivars (IND110 and Pisang Berlin), AAA cultivars (Yangambi-KM5 and Grand Enain) and a plantain (AAB) Prata Ana. Accessions with B genome, i.e. BB-CICY, Kunnan and Pisang Awak, gathered in a second cluster. Both *M. schizocarpa* and *M. ornata* stood apart from the two mentioned clusters. The two closest accessions

CAPÍTULO III

in the SRAP-based dendrogram were AA diploid cultivars Pisang Berlin and IND110, with 0.86 of similarity and 88 bootstrap repetitions (Figure 3.2b).

On the other hand, a total of 446 bands were generated by 10 primer combinations for AFLP across the 12 tested accessions, out of them 375 bands (83.91%) were polymorphic. The number of bands generated per primer ranged from 14 to 69 with an average of 42 bands per primer. The highest %P was generated by ECO-4C/MSE-10 primer combination (97.50%), while the lowest was generated by ECO-4/MSE-1 primer combination (71.88%). Additionally, PIC generated by AFLP showed a higher range than SRAP. The highest PIC was 0.32 generated by ECO-1/MSE-3 primer, while the lowest was 0.18 generated by ECO-3/MSE-15 primer combination, with an average of 0.25 with all used primers (Table 3.5).

The AFLP-based cluster analysis separated *Musa* accessions similar fashion to that in the SRAP-based analysis, with only slight differences. The UPGMA-dendrogram based on AFLP data was divided into two main clusters. All wild species and cultivars related to *M. acuminata* (ssp. *malaccensis*, *banksii*, Pisang Berlin cv., IND110 cv., Yamgambi-KM5 cv. and Grand Enain cv.) and a plantain accession Prata Ana, gathered in the first main cluster. In contrast, accessions with B genome related to *M. balbisiana* (Kunnan, BB-CICY and Pisang Awak) were grouped together in the second main cluster. Again, *M. ornata* and *M. schizacarpa* were separated from the rest, each one in separate category. The closest accessions according to the AFLP-based dendrogram were AAA cultivars (Yangambi-KM5 and Grand Nain), which gathered at similarity of 0.78 and 93 bootstrap repetitions (Figure 3.2c).

The representativeness of dendrograms using Mantel's matrix correspondence test showed that AFLP and SRAP showed a good representation of the genetic relationship among accessions by showing highly significant values ($r=0.90$, 0.91 for AFLP and SRAP, respectively, $p<0.01$). The correlation between AFLP and SRAP data was also highly significant ($r=0.87$, $p<0.01$). Furthermore, both molecular markers showed high significant correlation with morphological data ($r= 0.47$ and 0.48 for AFLP and SRAP, respectively, $p<0.01$).

SRAP and AFLP profiles generated several unique bands specific for and/or shared by

some accessions. A total of 50 bands were generated by SRAP, of which 31 and 8 bands were specific for *M. ornata* and *M. schizocarpa*, respectively. Only 2 bands were common to both of them. A total of 9 bands were shared among all accessions with B genome (Table 3.6). On the other hand, AFLP successfully generated 58 bands, out of them 25 were specific for each of *M. ornata* and *M. schizocarpa*, plus 4 shared bands between them. Additionally, all accessions with B genome shared a number of 4 bands generated by AFLP (Table 3.6).

Table 3.5 A survey of total number of bands, percentage of polymorphism, polymorphism information content and resolving power of SRAP and AFLP molecular markers

Primer*	SRAP				AFLP			
	TNB	%P	PIC	Rp	TNB	%P	PIC	Rp
1	34	76.47	0.25	12.17	64	71.88	0.22	19.17
2	15	66.67	0.22	4.50	57	92.98	0.32	27.00
3	20	80.00	0.20	5.33	40	97.50	0.26	14.33
4	32	81.25	0.24	10.67	34	91.18	0.27	12.67
5	18	66.67	0.22	5.67	14	85.71	0.23	4.17
6	28	71.43	0.22	8.83	31	74.19	0.24	10.33
7	29	79.31	0.23	9.33	69	95.65	0.31	31.00
8	33	81.82	0.19	8.17	42	76.19	0.24	15.33
9	29	75.86	0.25	10.83	48	72.92	0.18	11.67
10	37	83.78	0.23	10.67	47	80.85	0.24	15.83
All	275	77.45	0.22	8.62	446	83.91	0.25	16.15

* Primer combinations are described in table 3.3.

CAPÍTULO III

Table 3.6 Unique SRAP and AFLP markers characterized some *Musa* genotypes, represented by number of specific band per category

Primer	SRAP					AFLP				
	<i>M. ornata</i>	<i>M. schizocarpa</i>	<i>M. ornata</i> – <i>M. schizocarpa</i>	B-genome	Total	<i>M. ornata</i>	<i>M. schizocarpa</i>	<i>M. ornata</i> – <i>M. schizocarpa</i>	B-genome	Total
1	4	0	0	2	6	3	0	1	0	4
2	0	0	0	1	1	4	0	0	0	4
3	4	2	0	2	8	7	3	2	0	12
4	4	1	0	2	7	3	0	0	0	3
5	2	0	0	0	2	1	0	0	0	1
6	2	1	2	1	6	2	1	0	0	3
7	5	1	0	0	6	1	3	0	0	4
8	6	0	0	0	6	1	4	0	0	5
9	0	2	0	0	2	0	11	0	1	12
10	4	1	0	1	6	3	3	1	3	10
Total	31	8	2	9	50	25	25	4	4	58

* Primer combinations are described in table 3.3.

3.4 DISCUSSION

Twelve *Musa* accessions were evaluated in this study by morphological descriptors of male flowers, and SRAP and AFLP molecular markers. Both morphological and molecular analyses showed similar results regarding the relationships among *Musa* accessions; however, some important differences were observed.

3.4.1 Morphological evaluation

Male flower characteristics have been reported as one of the most important qualitative descriptors in *Musa* (Ortiz 1997). In addition, Nunes de Jesus et al. (2009) reported that, male flowers presented a greater number of descriptors capable of differentiating one genotype in particular. In this study, 10 qualitative male flower descriptors were used to differentiate among a collection of *Musa*, including different wild species, cultivars and hybrids. These descriptors were able to discriminate among the accessions and separated them according to their related species and genome composition. Moreover, some related genotypes showed specific descriptors uniquely related to a certain genome, i.e. accessions having B genome exclusively demonstrated unique characters for compound tepal basic color (CTBC) and compound tepal pigmentation (CTP), as shown before by Sebasigari (1987). Additionally, *M. schizocarpa* and *M. ornata* distinctively showed the same characters for CTBC, free tepal color (FTC) and ovary basic color (OBC), which set them apart from *M. acuminata* and *M. balbisiana* accessions.

Male flower descriptors have been used to evaluate the relationship among some banana and plantain genotypes. Rodrigues *et al.* (2012) used them to evaluate genetic variability in Prata Ana clones, finding high level of homogeneity among these characteristics, since these clones were derived from the same source. Our results coincided with those of Wang *et al.* (2010), who found a similar separation between A and B genome accessions with some exceptions. However, also unsuccessful clustering when the same descriptors were used has been reported (Nunes de Jesus *et al.* 2009).

3.4.2 Molecular analysis

Both SRAP and AFLP markers used in this study were able to differentiate among *Musa* accessions according to some criteria including species relatedness, genome composition and cultivation type. In this regard, all diploid and triploid cultivars with A genome clustered closely with their relative wild subspecies *banksii*. Moreover, *M. balbisiana* wild accession was in the same group that Pisang Awak, which has two copies of B genome in both SRAP and AFLP dendrograms. Results from a clustering pattern of A and B genome accessions were in agreement with the previous studies (Valdez-Ojeda *et al.*, 2014; Youssef *et al.*, 2011). On the other hand, our results based on SRAP and AFLP analyses showed good separation of *M. ornata* from both *M. acuminata* and *M. balbisiana*, contrary to former findings by Ude *et al.* (2002) and Wong *et al.* (2002).

The high number of specific and shared bands generated in this study were able to discriminate among accessions and thus, clearing their genetic relationships.

3.4.3 Comparison of morphological and molecular markers

Cluster analysis based on morphological descriptors resulted similar to that of AFLP in separating all accessions related to *M. acuminata* and *M. balbisiana* from *M. schizocarpa* and *M. ornata*. However, SRAP based-cluster analysis was not able to mark this separation, placing *M. schizocarpa* close to the cluster of *M. acuminata* accessions. A complete separation of A and B genome accessions was observed in both SRAP and AFLP analyses, with the exception of Prata Ana, while the dendrogram based on morphological descriptors grouped accessions from both genomes together (MAL and IDN with accessions of B genome). Similarity between the two molecular markers was reflected by Mantel's test in which the correlation between SRAP and AFLP matrices was higher than that between each one of them and the morphological data matrix.

The comparison of clustering behavior in *Musa* between molecular and morphological markers has been reported previously. In this regard, Nunes de Jesus *et al.* (2009) used morphological descriptors including male flower characteristics along SSR and RAPD markers to evaluate the relationship among some banana and plantain triploid and tetraploid cultivars, reporting that the clustering of some genotypes was similar by molecular markers and morphological descriptors. Similar results were obtained by Wang

et al. (2010).

In conclusion, the relationship among *Musa* accessions could be clearly assessed in the present study by both morphological and molecular markers. Both systems were able to generate several unique markers for certain accessions, which could help in discriminating among *Musa* genotypes and screening of landraces for further studies. Morphological and molecular markers are complementary to each other and both should be used together to achieve a clear picture of the genetic diversity and relationships in *Musa*.

REFERENCES

- Ahmed, B. Mannan, M.A. and S.A. Hossain. 2011. Molecular characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm by RAPD analysis. *JNS*. 1: 62-67
- Bassam, B.J. Caetano-Anolle's, G. and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83
- Careel, F. Gonzalez de Leon, D. Lagoda, P. Lanaud, C. Jenny, C. and H. Horry Tezenas du Montcel. 2002. Ascertaining maternal and paternal lineage within *Musa* by chloroplast and mitochondrial DNA RFLP analysis. *Genome*. 45:679-692
- Carreel, F. Faure, S. Gonzalez de Leon, D. Lagoda, P.J.L. and X. Perrier. 1994. Evaluation de la diversité génétique chez les bananiers diploides (*Musa* sp.). *Genet. Sel. Evol.* 26:125-136.
- Crouch, H.K. Crouch, J.H. Madsen, S. Vuylsteke, D. and R. Ortiz. 2000. Comparative analysis of phenotypic and genotypic diversity among plantain landraces (*Musa* spp., AAB group). *Theor. Appl. Genet.* 101:1056-1065
- Crouch, J.H. Crouch, H.K. Constandt, H. Van Gysel, A. Breyne, P. Van Montagu, M. Jarret, R.L. and R. Ortiz. 1999. Comparison of PCR-based molecular marker analyses of *Musa* breeding populations. *Mol. Breed.* 5:233-244
- De Langhe, E. Pillay, M. Tenkouano, A. and R. Swennen. 2005. Integrating morphological and molecular taxonomy in *Musa*: the African plantains (*Musa* spp. AAB group). *Pl. Syst. Evol.* 255:225-236
- Dellaporta, S.L. Wood, J. and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21
- FAOSTAT. 2014. Food and agriculture organization of the unied nations. <http://faostat.fao.org>
- Ferreira, C.F. Silva, S.O. Sobrinho, N.P.D. Damascena, S.C.S. Alves, F.S.A.O. and O. Pereira da Paz 2004. Molecular characterization of banana (AA) diploids with

-
- contasting levels of black and yellow sigatoka resistance. Am. J. App. Sci. 1:276-278
- Häkkinen, M. 2013. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). Taxon. 62:809-813
- Hippolyte, I. Jenny, C. Gardes, L. Bakry, F. Rivallan, R. Pomies, V. Cubry, P. Tomekpe, K. Risterucci, A.M. Roux, N. Rouard, M. Arnaud, E. Kolesnikova-Allen, M. and X. Perrier. 2012. Foundation characteristics of edible *Musa* triploids revealed from allelic distribution of SSR markers. Ann. Bot. 109: 937-951.
- IPGRI. 1996. International Plant Genetic Resources Institute. Descriptors for banana (*Musa* spp.). Editors FAOP-IPGRIINIBAP, Rome, 55p
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat 44:223-270
- Li, G. and C.F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. Theor. Appl. Genet. 103:455-461
- Loh, J.P. Kiew, R. Set, O. Gan, L.H. and Y.Y. Gan. 2000. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of 16 banana cultivars (*Musa* cvs.). Mol. Phylogenetics Evol. 17:360-366
- Mantelm, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27:175-178
- Miri, S.M. Mousavi, A. Naghavi, M.R. Mirzaii, M. Talaei, A.R. and B.N. Khiabani. 2009. Analysis of induced mutants of salinity resistant banana (*Musa acuminata* cv. Dwarf Cavendish) using morphological and molecular markers. Iran J. Biotechnol. 7:86-92
- Nissen, O. 1984. MSTAT: A microcomputer program for statistical analyses of experiments and surveys. In H Riley, AO Skjelvag, eds, The impact of climate on grass production and quality. Proc General Meet Eur Grassl Fed, 10th, As, Norway. 26–

CAPÍTULO III

- 30 June 1984. Norwegian State Agric. Res. Stations, As, pp.555-559
- Nunes de Jesus, O. Ferreira, C.F. Silva, S.O. Câmara, T.R. Soares, T.L. and K.N. Pestana. 2009. Characterization of recommended banana cultivars using morphological and molecular descriptors. *Crop Breed. Appl. Biot.* 9:164-173
- Nwakanma, D.C. Pillay, M. and B.E. Okoli. 2003. PCR-RFLP of the ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS) provides markers for the A and B genomes in *Musa* L. *Theor. App. Genet.* 108:154–159
- Nzawele, D.B. Rweyemamu, C.L. and A.P. Maerere. 2013. Genetic diversity among INERA-Mulungu (DR Congo) *Musa* spp. germplasm and their relatedness to those in Tanzania using numerical taxonomy. *Plant Genet. Resour. C.* 11:50–61
- Ortiz, R. 1997. Morphological variation in *Musa* germplasm. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 44:393–404
- Ortiz, R. and R. Swennen. 2014. From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain. *Biotech. Adv.* 32:158–169
- Pascua, O.C. and R.R.C. Espino. 1987. Taxonomic Classification of Philippine Bananas. In: Persley GJ, De Langhe EA (Eds) *Banana and Plantain Breeding Strategies, Proceedings of an International Workshop held at Cairns, Australia 13-17 October 1986.* pp 161-164
- Phothipan, S. Silayoi, B. Wanichkul, K. and S. Apisitwanich. 2005. Genetic relationship among banana in AA, AAB and B groups using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence related amplified polymorphism (SRAP) techniques. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 39:703-710
- Prevost, A. and M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112
- Putra, E.T.S. Abdullah, N.A.P. Saleh, G. and W. Zakaria. 2010. Morphological Variation and Geographical Distribution of *Musa* sp. cv. Rastali in Peninsular Malaysia. *J. Cell & Plant Sci.* 1: 23-32

-
- Risterucci, A.M. Hippolyte, I. Perrier, X. Xia, L. Caig, V. Evers, M. Huttner, E. Kilian, A. and J.C. Glaszmann. 2009. Development and assessment of diversity arrays technology for high-throughput DNA analyses in *Musa*. *Theor. Appl. Genet.* 119:1093-1103.
- Rodrigues, F.E. Librelon, S.S. Nietsche, S. Costa, M.R. and M.C.T. Pereira. 2012. Genetic variability in clones of 'Prata Anã' bananas based on phenotypic and molecular markers. *Bragantia, Campinas* 71:182-189
- Roldan-Ruiz, I. Dendauw, J. VanBockstaele, E. Depicker, A. and M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol. Breed.* 6:125–134
- Roux, N. Baurens, F.C. Doležel, J. Hribová, E. Heslop-Harrison, J.S. Town, C. Sasaki, T. Matsumoto, T. Aert, R. Remy, S. Souza, M. and P. Lagoda. 2008. Genomics of banana and plantain (*Musa* spp.), major staple crops in the tropics. In: Moore P, Ming, R (eds) *Genomics of tropical crop plants. Plant genetics and genomics, crops and models Vol 1*. Springer, New York, pp 83–111
- Sebasigari, K. 1987. Morphological Taxonomy of *Musa* in Eastern Africa. In: Persley GJ, De Langhe EA (Eds) *Banana and Plantain Breeding Strategies, Proceedings of an International Workshop held at Cairns, Australia 13-17 October 1986*. pp 172-176
- Simmonds, N.W. and K. Shepherd. 1995. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *J. Linn. Soc. Bot.* 55: 302-312
- Stulnig TM, and A. Amberger. 1994. Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *BioTechniques.* 16:403–404
- Swennen, R., and D. Vnylsteke. 1987. Morphological Taxonomy of Plantain (*Musa* Cultivars AAB) in West Africa. In: Persley GJ, De Langhe EA (Eds) *Banana and Plantain Breeding Strategies, Proceedings of an International Workshop held at Cairns, Australia 13-17 October 1986*. pp 165-171
- Ude, G. Pillay, M. Nwakanma, A. and A. Tenkouano. 2002. Analysis of genetic diversity and selectional relationships in *Musa* using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*

104:1239-1245

Ude, G. Pillay, M. Ogundiwin, E. and A. Tenkouano. 2003. Genetic diversity in an African plantain core collection using AFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 107:248-255

Valdez-Ojeda, R. James-Kay, A. Ku-Cauich, J. and R.M. Escobedo-Gracia Medrano. 2014. Genetic relationships among a collection of *Musa* germplasm by fluorescent-labeled SRAP. *Tree Genet. Genomes.* 10: 465-476

Vos, P. Hogers, R. Bleeker, M. Reijans, M. van de Lee, T. Hornes, M. Frijters, A. Pot, J. Peleman, J. Kuiper, M. and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407–4414

Wang, J.Y. Zheng, L.S. Huang, B.Z. Liu, W.L. and Y.T. Wu. 2010. Development, characterization, and variability analysis of microsatellites from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57:553–563

Wong, C. Kiew, R. Argent, G. Ohn, S. Lee, S.K. and Y.Y. Gan. 2002. Assessment of the validity of the sections in *Musa* (Musaceae) using AFLP. *Ann. Bot.* 90:231-238

Wong, C. Kiew, R. Loh, J.P. Gan, L.H Lee, S.K. Ohn, S. and Y.Y. Gan. 2001. Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as evidenced by AFLP. *Ann. Bot.* 88:1017-1025

Xie, Z.S. Liu, D.B. Wei, S.X. Chen, Y.Y. Xie, J.J. and J.Y. Wei. 2012 Analysis of genetic diversity of 29 banana genotypes by SRAP. *Acta Bot. Boreal Occid. Sin.* 8:1547-1552

Youssef, M. 2012. Khirshyat 1.0: a simple micro-program for some molecular biology protocols. *Genes, Genom. Genomics.* 6:102-105

Youssef, M. James, A. Rivera-Madrid, R. Ortiz, R. and R.M. Escobedo-Gracia Medrano. 2011. *Musa* genetic diversity revealed by SRAP and AFLP. *Mol. Biotech.* 47:189-199

CAPÍTULO IV

COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS HIDROSOLUBLES PRESENTES EN EL NÉCTAR DE MUSA

4.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas con flores a menudo atraen a los polinizadores potenciales para garantizar su reproducción, al ofrecer una recompensa: el néctar floral, que es una solución de carbohidratos que actúa como la interfaz de muchas de las interacciones planta-polinizador. En el néctar predominan altas cantidades de azúcares como: la sacarosa, la glucosa y la fructosa, además de aminoácidos, lípidos, vitaminas, proteínas, alcaloides y compuestos volátiles (Baker *et al.*, 1998). Esta solución es secretada por los órganos florales llamados nectarios. La composición de azúcares en néctar varía entre especies (Perret *et al.*, 2001)

Es de suma importancia conocer la composición de carbohidratos en néctar debido a que se relaciona con el síndrome de polinización de las especies de plantas, donde las cantidades específicas en el contenido de sacarosa, fructosa, glucosa y la proporción de hexosas juegan un papel importante en el polinizador y pueden representar un efecto en las adaptaciones a las preferencias alimentarias de polinizadores como colibríes, murciélagos, mariposas, polillas, abejas, hormigas y avispas (Baker and Baker, 1983) dichas adaptaciones le permiten a la planta crear una estrecha relación con los polinizadores que le facilitaran la polinización cruzada con otros individuos de manera natural.

Además de la relación con los polinizadores, la composición de carbohidratos de nectar está íntimamente relacionada con el grano de polen, debido a que son los carbohidratos del nectar los que permiten que se lleve a cabo la germinación de grano de polen permitiendo la fecundación de la planta. Cabe mencionar que en muchas especies de plantas incluyendo el género *Musa* no se conoce que carbohidratos son los que dan la señal para la germinación del grano de polen.

En algunas especies de flores, principalmente bromeliáceas se conoce que en la interacción planta-polinizador las características morfológicas de la flor y la composición

CAPÍTULO IV

del néctar van de la mano como atrallentes específicos aunque por si solos los marcadores morfológicos no esclarecen que polinizadores son los principales para cada especie si se apoyan en análisis moleculares pueden aportar mayor información al agrupamiento (Barfuss *et al.* 2005).

En el genero *Musa* no existen reportes sobre la composición de carbohidratos en néctar y mucho menos que relación exista en dicha composición entre las diferentes especies, subespecies y cultivares. Al existir en el genero especies diploides silvestre, la polinización de la semilla es esencial para el desarrollo del fruto (Novak, 1992); sin embargo, el establecimiento de la semilla parece estar limitado por los polinizadores, como ocurre en *Musa acuminata* subsp. *halabanensis* y *M. salaccensis* (Itino *et al.*, 1991).

Se han reportado dos tipos de néctar en Musáceas uno acuoso y otro gelatinoso, que parecen estar relacionados con las preferencias de alimentación de los polinizadores y la producción de semilla, respectivamente (Ren *et al.*, 2007) pero estos reportes únicamente indican la consistencia del néctar no aportan nada a la composición de carbohidratos de los mismos.

Para hacer frente a la brecha en el conocimiento de la química del néctar en Musáceas, se caracterizó la composición de carbohidratos del néctar de once genotipos de *Musa*, que cubren una muestra de la diversidad del género.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Flores masculinas maduras de once accesiones se obtuvieron de plantas de la Colección de Germoplasma CICY Musáceas ubicada en la Estación Experimental INIFAP-Uxmal, Yucatán (Figura 4.1).

4.2.1 Análisis de carbohidratos en néctar por HPLC-RID

Se tomó néctar de flores masculinas de plantas cultivadas en campo (~ 300 µl por flor) de 20 flores de la misma planta, utilizando un jeringa de 3 ml. Después, el néctar colectado se clarificó a través de filtros de celulosa regenerada (RC) de 0.45 µm. Cada muestra se inyectó tres veces en el HPLC (Agilent). El sistema estaba equipado con una columna analítica HPX 42C (Bio-Rad), así como un detector de índice de refracción (RID). La columna se eluyó a una tasa de flujo de 0.5 ml/min, con 100% de H₂O grado HPLC (JT Baker) a 70°C durante 30 min por cada análisis. El tiempo de retención para cada muestra se calculó utilizando curvas de calibración estándar de kestosa, D-glucosa, D-fructosa, galactosa y sacarosa (Sigma-Aldrich). Las proporciones de los diferentes carbohidratos en cada muestra analizada se estimaron integrando el área bajo los picos del cromatograma.

4.2.2 Análisis estadístico

Para determinar la importancia de las diferencias en las medias entre las muestras de cada carbohidrato, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico Statistica Analysis System con un alpha de 0.01 (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, EE.UU.).

4.3 RESULTADOS

En primera instancia, debe mencionarse que se observaron diferencias en la morfología de la flor masculina (tépalos libres), tanto en el tamaño de las estructuras como en su coloración (Figura 4.1). Así mismo, fue variable la cantidad de néctar que contenía cada accesión.

Los análisis cromatográficos del néctar de las variedades colectadas mostraron la presencia de posibles fructanos del tipo kestosa en la mayoría, además de otros

CAPÍTULO IV

carbohidratos que mostraron una importante variación de su contenido (Cuadro 4.1). La presencia de fructanos en el néctar representó un hallazgo notable, pues no existe reporte hasta el momento de su presencia en néctar de Musáceas.

Se observó la presencia de fructanos de tipo kestosa en la mayoría de las accesiones en niveles que fueron de 0.15 hasta 4.39 mg g⁻¹ PS, siendo la variedad Prata Ana la que presentó la mayor cantidad.

La sacarosa es el carbohidrato de más amplia distribución en el néctar, pues se detectaron cantidades que van desde 50 a 169 mg g⁻¹ PS (Cuadro 4.1), superando el contenido en hoja y cormo, así como en algunas variedades, al de fruto. Esta diferencia en valores podría atribuirse a la gran variedad de genotipos analizados.

Para el caso de glucosa, las variedades presentaron valores que oscilaron entre los 32 y 79 mg g⁻¹ PS, siendo el cultivar IDN 110 el que presentó el mayor nivel. Otro resultado interesante fue que en todas las variedades el valor de glucosa detectado fue similar al de sacarosa. Cabe mencionar que las cantidades de glucosa y fructosa detectadas en néctar superaron a las observadas en hoja y cormo, así como en fruto de algunas de las accesiones.

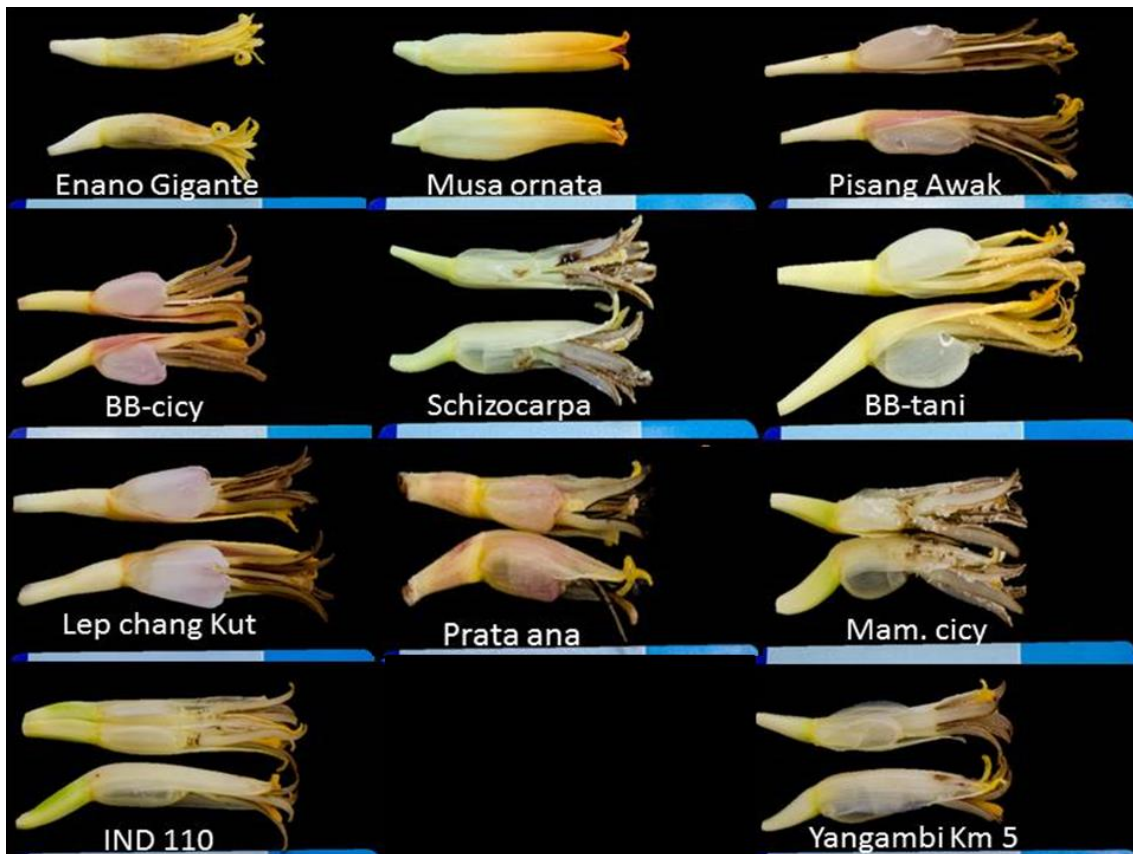


Figura 4.1 Morfología de flores masculinas de diferentes variedades de *Musa*.

CAPÍTULO IV

Cuadro 4.1. Contenido de fructanos y carbohidratos en diferentes tejidos de variedades del género *Musa* (mg.g⁻¹ PS).

Accesión	Genotipo	Kestosa [†]	Sacarosa [†]	Glucosa [†]	Fructosa [†]
<i>M. ornata</i> Verde	<i>M. ornata</i>	1.28 bcd	109.50 bc	55.69 Abc	48.60 Ab
<i>M. a. m.</i> CICY	AA	0.00 d	54.07 d	50.98 Abc	46.49 Abc
IND 110	AA	0.26 bcd	54.62 d	78.71 A	73.06 A
Yangambi Km5	AAA	0.15 cd	50.93 d	42.97 Bc	36.91 Bc
E.G-Teapa	AAA	1.42 bc	71.11 cd	32.13 B	25.39 C
Prata Ana	AAB	4.39 a	169.76 a	60.32 Ab	47.69 Ab
Pisang Awack	ABB	1.14 bcd	118.82 ab	47.17 Bc	39.31 Bc
<i>M. b.</i> CICY	BB	1.30 bc	58.05 d	48.29 B	40.18 Bc
<i>M. b.</i> Tani	BB	0.55 bcd	112.44 bc	59.11 C	47.37 Ab
Lep Chang Kut	BBB	1.57 b	56.96 d	60.49 A	60.72 Ab
<i>M. shizocarpa</i>	SS	1.00 bcd	117.39 ab	48.15 Bc	41.43 Bc
C.V.		10.19	7.19	6.87	7.30

[†] Valores con letras distintas por columna son diferentes de forma altamente significativa (Tukey, 0.01).

En el néctar se observó que en casi todas las accesiones la proporción de sacarosa/ glucosa + fructosa oscilaba entre valores de 0.2 y 1.8, lo cual podría indicar que existe una mayor degradación de sacarosa, lo cual concuerda con el hecho de que en néctar se encuentran las invertasas, enzimas responsables de la degradación de sacarosa (Figura 4.2). Sin embargo, en néctar se detectaron variedades en las que esta proporción fue igual a 1 lo que indica que existe un equilibrio entre la sacarosa que se está sintetizando y aquella que está siendo degradada para liberar glucosa y fructosa. Al igual que en los otros tejidos, en el néctar se puede apreciar la gran variabilidad que hay en los balances de estos carbohidratos entre las diferentes accesiones, considerando que todos los materiales se encuentran en el mismo estado de madurez de las plantas y las mismas condiciones geográficas y climatológicas.

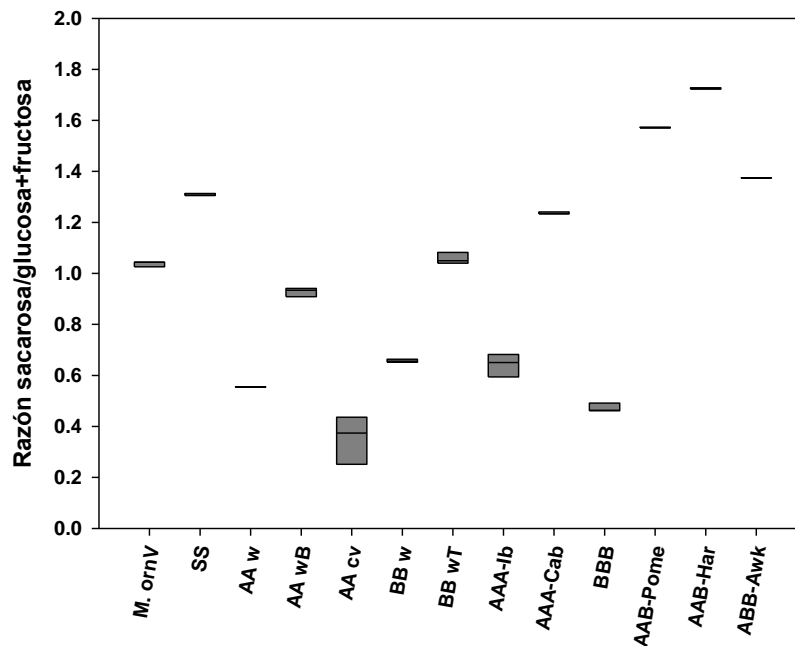


Figura 4.2 Variación en la proporción de sacarosa/glucosa + fructosa del néctar de plantas maduras de once accesiones de *Musáceas*.

Para observar la variación entre el contenido de azúcares entre variedades, se elaboró un gráfico en tres dimensiones conocido como ternario (Figura 4.3). En éste se aprecia para cada accesión, el porcentaje de contribución de cada carbohidrato (sacarosa, glucosa y fructosa) a la huella del tejido analizado, observándose que para el néctar, las accesiones formaron dos grupos ubicados en el centro del diagrama, y la diferencia entre los dos grupos era básicamente la diferencia en los contenidos de sacarosa y glucosa.

CARBOHIDRATOS EN NECTAR

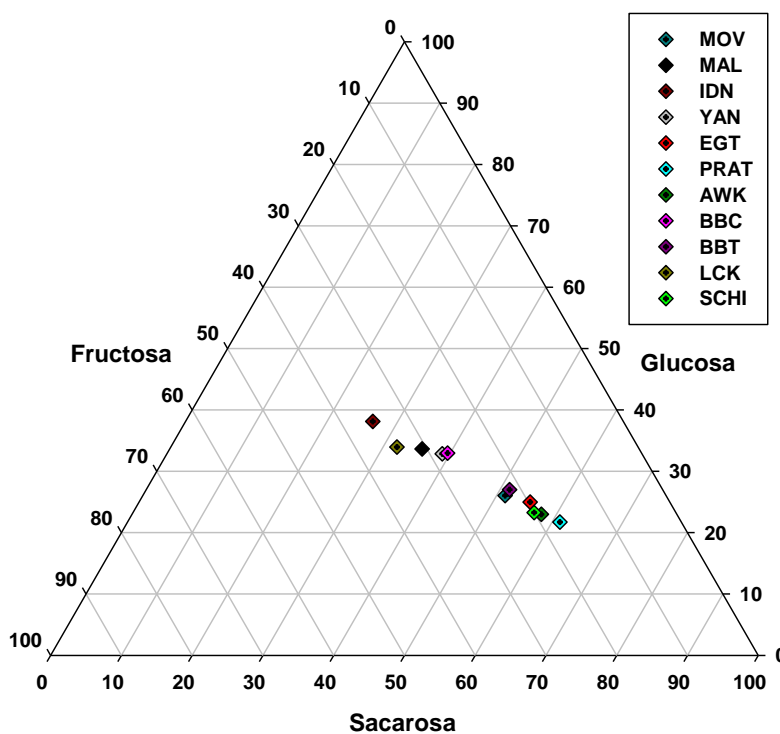


Figura 4.3 Diagrama ternario de composición de sacarosa, glucosa y fructosa del néctar de flores masculinas de once accesiones de *Musa*. Cada punto representa la composición proporcional de los carbohidratos del néctar de cada individuo analizado. La distancia de un punto con el lado del triángulo es proporcional a la importancia relativa de ese carbohidrato en la muestra.

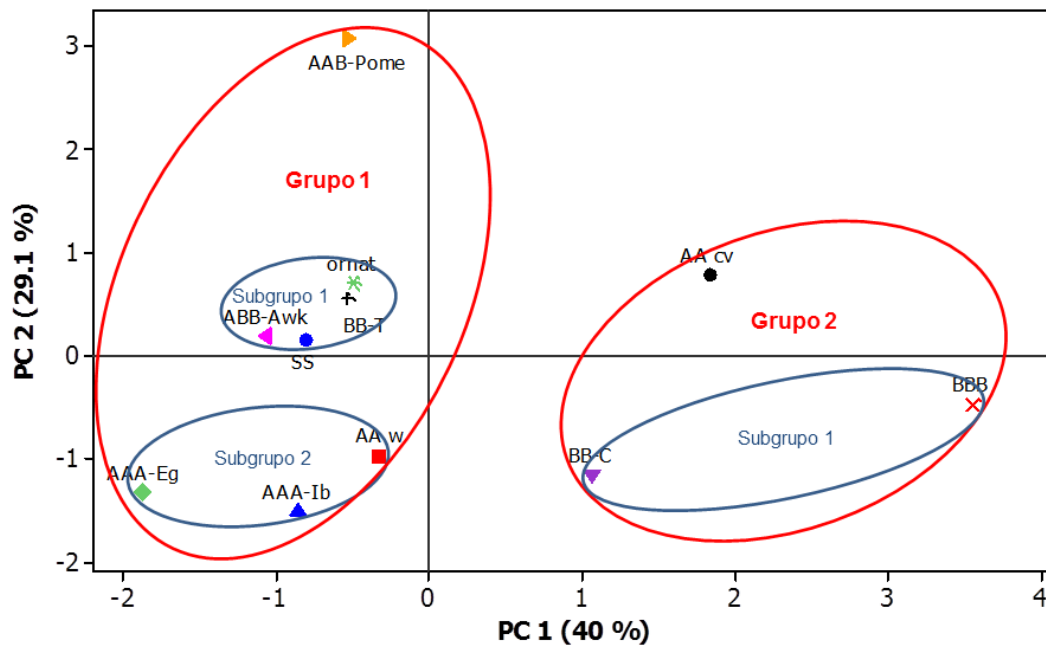


Figura 4.4 Análisis de componentes principales en néctar de once accesiones de *Musa*. Agrupamiento resultante del análisis de componentes principales del contenido de los carbohidratos kestosa, sacarosa, glucosa y fructosa encontrados en néctar de once accesiones de *Musa*.

El análisis de componentes principales (Figura 4.4), logró explicar un 69.1% de la variación total de los datos analizados, mostrando la formación de dos grupos principales: el primero que comprende dos subgrupos, donde el primero tiene influencia negativa de los dos componentes principales y se formó con las accesiones Enano Gigante, Yangambi Km5 y *m. a. malaccensis*, muestra que en el segundo tiene influencia negativa del primer componente y positiva del segundo, está conformado por las accesiones *m. schizocarpa*, Tani, *m. ornata* y Pisang Awak. La accesión Prata Ana quedó dentro del primer grupo, pero fuera de los dos subgrupos formados. El segundo grupo principal se formó, con las accesiones BB CICY, Lep Chang Kut y IND 110, observándose la

formación de un subgrupo compuesto por BB CICY y Lep Chang Kut, que son influenciados negativamente por los dos componentes principales, mientras que IND 110 se apartó de ellos, con influencia positiva de ambos componentes principales. Para corroborar el agrupamiento observado en componentes principales se realizó el análisis de conglomerados, el cual dió como resultado un agrupamiento similar al observado en el de componentes principales, donde se observan dos grupos principales: el primero con las accesiones *m. ornata*, Tani, Pisang Awack, *m. schizocarpa*, *m. a. Malaccensis*, Yangambi Km5, Enano Gigane y Prata Ana. El segundo grupo quedó conformado por BB CICY, Lep Chang Kut e IND 110. Estas coincidencias en los análisis asegura que el agrupamiento observado es real y no producto de algún error en el analisis.

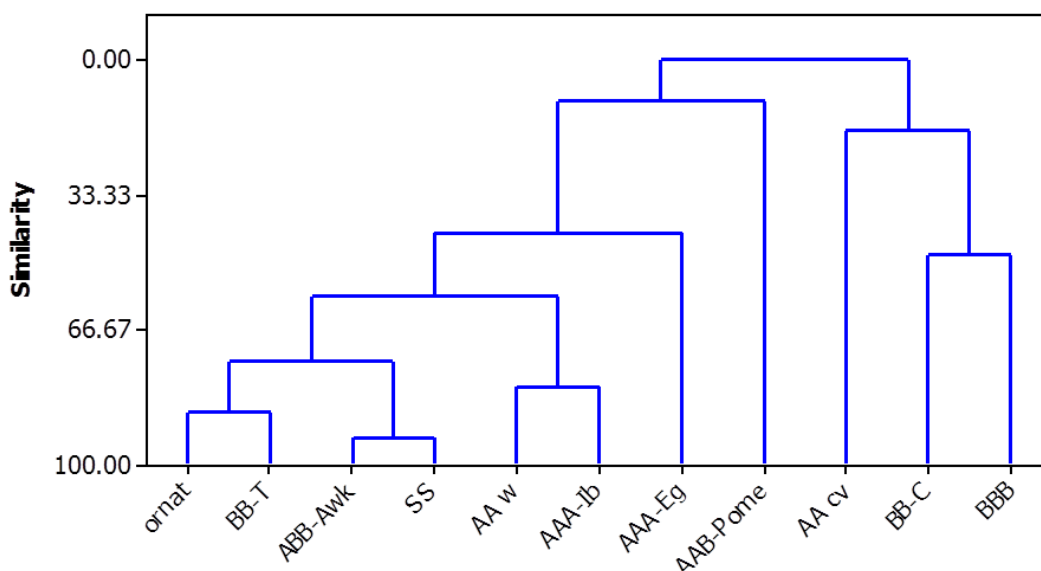


Figura 4.5 Dendrograma basado en análisis de conglomerados en nectar de once accesiones de *Musa*. Basado en el contenido de los carbohidratos kestosa, sacarosa, glucosa y fructosa encontrados en néctar de once accesiones de *Musa*.

4.4. DISCUSIÓN

No existe trabajo reportado en el análisis de la composición del néctar de *Musa*, por lo que los resultados obtenidos en este estudio abren un panorama muy importante en ese campo, dando los primeros pasos en la caracterización de cada una de las accesiones de acuerdo a las diferencias en tipo y contenido de carbohidratos.

La información que se conoce hasta el momento es que existen dos tipos de néctar en *Musáceas* uno acuoso y otro gelatinoso, que parecen estar relacionados con las preferencias de alimentación de los polinizadores y la producción de semilla, respectivamente (Ren *et al.*, 2007) este reporte únicamente indica la consistencia del néctar no aportan nada a la composición de carbohidratos de los mismos, aunque se sabe que en otras especies de plantas estas diferencias en la consistencia del néctar esta estrechamente relacionado con la presencia o ausencia de polisacáridos los que permiten que cuando se encuentran en mayor concentración el néctar se torne mas gelatinoso y menos acuoso.

Por otra parte existen reportes que indican que el néctar de algunas especies de banano favorecen la germinación del grano de polen de ellas mismas y de otras especies, lo que sugiere que existe un efecto del genotipo en la composición del néctar y la germinación del grano de polen (Fortescue and turner, 2004; Nyine and Pillay, 2007), esto tiene mucha importancia debido a que en los programas de mejoramiento convencional donde tu realizas las cruza dirigidas, al conocer la composición del néctar se podría preveer una mejor compatibilidad en la cruza permitiendo una mejor interaccion entre las plantas y de estamanera asegurar una exitosa polinización cruzada (Pillay *et al.*, 2002).

En este trabajo se observo que hay especies como *m. ornata*, *m. schizocarpa* y *m. b. tani* que poseen una concentración dos veces mayor de sacarosa que glucosa y fructosa que difieren de especies como *m. a. malaccensis* cicy y *m. b. cicy* que poseen cantidades similares de sacarosa, glucosa y fructosa, estas diferencias en la composición de carbohidratos podrían estar jugando un rol importante a la hora de la polinización de cada una de estas especies y posteriormente en la germinación de la semilla (Burgos-Hernandez *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran la composición de carbohidratos de once accesiones de banano y sugieren que la composición de carbohidratos en el néctar puede diferir entre individuos, poblaciones, variedades de la misma especie, sugiriendo que aunque exista influencia de factores ambientales sobre el metabolismo de la planta, lo que causa que la huella de carbohidratos en cada individuo se vea modificada haciendo mas difícil el agrupamiento entre individuos.

Esto hace evidente la necesidad de una mayor investigación en la bioquímica de los carbohidratos y su impacto en la polinización. Para poder establecer una correlación entre las plantas y los insectos que las polinizan hace falta hacer estudios de polinizadores que visitan a las diferentes accesiones e identificar cada uno de los polinizadores para tener un mejor panorama de que insectos son los que interactúan con cada accesión y ver si la composición de carbohidratos esta jugando algún papel como atrayente, como ocurre en otras especies de plantas.

El metabolismo de carbohidratos está influenciado por las condiciones ambientales (Hajiboland, 2012), pero también depende del genotipo de la planta, por lo que cada accesion va a poseer una huella metabólica propia aunque esta cambie su perfil de carbohidratos en diferentes condiciones ambientales (Bino *et al.*, 2004; Nicholson y Wilson 2003), que podría ser usada como marcador en la selección de individuos con mayor compatibilidad para poder crear híbridos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Baker HG, Baker I, Hodges SA (1998). Sugar composition of nectar and fruits consumed by birds and bats in the tropics and subtropics. *Biotropica* 30: 559–586.
- Baker H.G., Baker I. (1983) Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones C.E., Little R.J., (Eds), *Handbook of Experimental Pollination Biology*. Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York: 117–141.
- Barfuss M.H.J., Samuel R., Till W., Stuessy T.F. (2005) Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *American Journal of Botany*, 92, 337–351.
- Bino RJ, Hall RD, Fiehn O, Kopka J, Saito K, Draper J, Nikolau BJ, Mendes P, Roessner-Tunali U, Beale MH, Trethewey RN, Lange BM, Wurtele ES and Lloyd W. Sumner (2004) Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends in plant science*. 9:418-425.
- Burgos-Hernández, M., Castillo-Campos, G., Mata-Rosas, M., González, D., Vovides, A. P., & Murguía-González, J. (2014). Seed germination of the wild banana *Musa ornata* (Musaceae). *Seed Science and Technology*, 42(1), 16-27.
- Fortescue JA, Turner DW (2004). Pollen fertility in *Musa*: Viability in cultivars grown in Southern Australia. *Aust. J. Ag. Res.* 55: 1085-1091.
- Hajiboland R. (2012) Photosynthetic carbon metabolism: Plasticity and evolution, *Advances in photosynthesis-Fundamental aspects*. In tech. 18: 367-400. ISSN 978-953-307-928-8.
- Itino T, Kato M, Hotta M (1991). Pollination ecology of the two wild bananas *Musa acuminata* ssp *halabanensis* and *M. salaccensis*: Chiropterophily and ornithophily. *Biotropica* 23:151-158.
- Nicholson J. and Wilson I. (2003) Opinion: understanding ‘global’ systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 668–676.

- Novak FJ (1992). Musa (Bananas and Plantains). In: Hammerschlag FA, Litz RE (eds). Biotechnology of perennial fruit crops. CAB International University Press Cambridge. pp. 449-488.
- Nyine M. & Pillay M. (2007). Banana nectar as a medium for testing pollen viability and germination in Musa. African Journal of Biotechnology, 6(10).
- Perret M., Chautems A., Spichiger R., Peixoto M., Savolainen V. (2001) Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in Sinningieae (Gesneriaceae). Annals of Botany, 87, 267–273.
- Pillay M, Tenkouano A, Hartman J (2002). Future challenges in Musa breeding. In:Kang M (ed) Crop Improvement- Challenges in the twenty-first century. Food Products Press. New York. pp. 223-252
- Ren Z, Wang H (2007) Morphological comparison of floral nectaries in Musaceae, with reference to its pollinators. Biodiveresity Science (China)15: 652-657.
- Statistical System Analysis (SAS 9.0) (2002) Institute Inc., Cary, NC 27513 EE.UU.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

En las accesiones evaluadas del género *Musa* el agrupamiento observado en este estudio con los marcadores morfológicos de la flor masculina en las infructescencias fue similar al observado con los marcadores moleculares y bioquímicos, a pesar de que el número de descriptores fue bajo comparado al utilizado en otras especies; esto se debe en el hecho de que las características morfológicas de la flor masculina son uno de los más importantes descriptores cualitativos en *Musa* y de las características morfológicas que mas información nos aportan a la hora de clasificar las accesiones (Ortiz, 1997). Nunes de Jesús *et al.* (2009) argumentan que las flores masculinas presentan un mayor número de descriptores capaces de diferenciar un genotipo en particular, descriptores como número de estambres, color del tépalo, color de pétalos, longitud floral entre otros descriptores.

En este trabajo las metodologías fueron capaces de generar marcadores morfológicos, bioquímicos y genéticos únicos para ciertas accesiones, que podrían ayudar a discriminar entre genotipos de *Musa* además que se detectó una estrecha correlación entre dichos marcadores, permitiendo de esta manera, facilitar la selección de variedades para estudios posteriores. Cabe señalar que el uso en conjunto logra una imagen clara de la diversidad genética y relaciones entre las accesiones de *Musa*.

En los bananos, las funciones fisiológicas y bioquímicas de los carbohidratos y fructanos no son conocidas, pero se sabe que éstos funcionan como almacenamiento temporal o reserva de energía que las plantas utilizan cuando se encuentran bajo condiciones ambientales adversas (Van den Ende, 2013). En cereales (trigo, cebada y avena), los fructanos se acumulan temporalmente en el tallo y la envoltura de la hoja durante el crecimiento vegetativo, para después ser hidrolizados y transportados como sacarosa durante el llenado de los granos (Peukert *et al.*, 2014). Esta removilización la utiliza la planta para contribuir al rendimiento final de grano, especialmente cuando los cultivos están sujetos a condiciones adversas de tipo abiótico (Zhang *et al.*, 2015; Joudi *et al.*, 2012). Además, los fructanos pueden estar involucrados en respuesta a estrés oxidativo (Peukert *et al.*, 2014; Peshev *et al.*, 2013) o como moléculas señales (Van den Ende, 2013). Funciones similares se podrían proponer para los fructanos en banano.

Además el conocer el perfil de carbohidratos permitió usarlos como marcadores bioquímicos de selección en *Musa*, lo cual resulta muy promisorio, ya que la enorme variación en su contenido dentro de las diferentes accesiones dio pie a establecer un agrupamiento similar al obtenido por métodos moleculares y morfológicos. Sin embargo, destaca la necesidad de estudios más profundos sobre la bioquímica de los carbohidratos y fructanos. Resulta de suma importancia conocer los detalles de las rutas de biosíntesis en cada una de las accesiones dentro y entre los diferentes subgrupos, para explotar aún más la biodiversidad del banano, con el objetivo de crear sistemas de mejoramiento dirigido a enriquecer el contenido de estas moléculas en los frutos de accesiones seleccionadas.

En la mayoría de las plantas, la síntesis de los fructanos se lleva a cabo por la acción de dos o más fructosiltransferasas localizadas en la vacuola como la 1-SST, encargada de catalizar la transferencia de un residuo de fructosa de una molécula de sacarosa a otra y la 1-FFT, que transfiere un residuo terminal de fructosa de una molécula de fructano con un grado de polimerización mayor o igual a 3 a otra molécula de fructano o sacarosa. La acción conjunta de las dos enzimas da lugar a la formación de una mezcla de fructanos con GP diferentes. La regulación de la síntesis de los fructanos está controlada a nivel de la enzima 1-SST, y por la cantidad de sacarosa presente. Una alta concentración de sacarosa induce un incremento en la actividad de la enzima 1-SST. Esto es consistente con el hecho de que el metabolismo de los fructanos es una extensión del metabolismo de la sacarosa, y que son necesarios al menos niveles umbrales de este disacárido para inducir la síntesis de fructanos (Labhardt *et al.*, 1983).

El hecho de encontrar la presencia de una firma de kestosas en el fruto de banano sugiere que éstas son el producto de la actividad de la invertasa vacuolar (VI), cuando se encuentran con elevados niveles de sacarosa en el tejido (De Coninck *et al.*, 2005). La ausencia de nystosa e inulina con un mayor grado de polimerización hace creer que en banano no existe una 1-FFT genuina, así como se duda de la existencia de una real 1-SST (Agopian *et al.*, 2009). Estos hechos permiten especular que las enzimas VIs son las que están siendo responsables del metabolismo de estos FOS e inulobiosacaridos (IOS), ya que pueden producir inulobiosa a partir de sacarosa (sustrato donador) y fructosa (sustrato del aceptor) e inulotriosa, de sacarosa (sustrato donador) y inulobiosa (sustrato

del aceptor). Existe la necesidad de corroborar los resultados mediante la purificación y caracterización de la enzima (o enzimas) involucrados y de esta manera conocer la ruta metabólica que lleva al banano a acumular FOS e IOS.

Adicionalmente el hecho de encontrar la presencia de IOS sistemas en banano, abre un panorama de investigación, ya que poco se sabe de las funciones fisiológicas en las plantas.

La existencia de VIs con características de fructosiltransferasa promiscua en fruto de banano es muy interesante, sugiriendo que el metabolismo de fructanos está “surgiendo”, ya que carece de fructosiltransferasas "genuinas" como ocurre en especies que típicamente acumulan fructanos. Nuestro conocimiento sobre las relaciones estructura-función en las enzimas pertenecientes al grupo glicosil hidrolasas 32 (GH32) (Van den Ende *et al.*, 2009) permite un desarrollo rápido de fructosiltransferasas de plátano "genuinas", que pueden contribuir al aumento de contenido de fructanos en plátano en un futuro próximo. Por otra parte, se necesitan estudios adicionales para dilucidar las funciones fisiológicas de los tipos de fructanos diferentes detectados en los órganos.

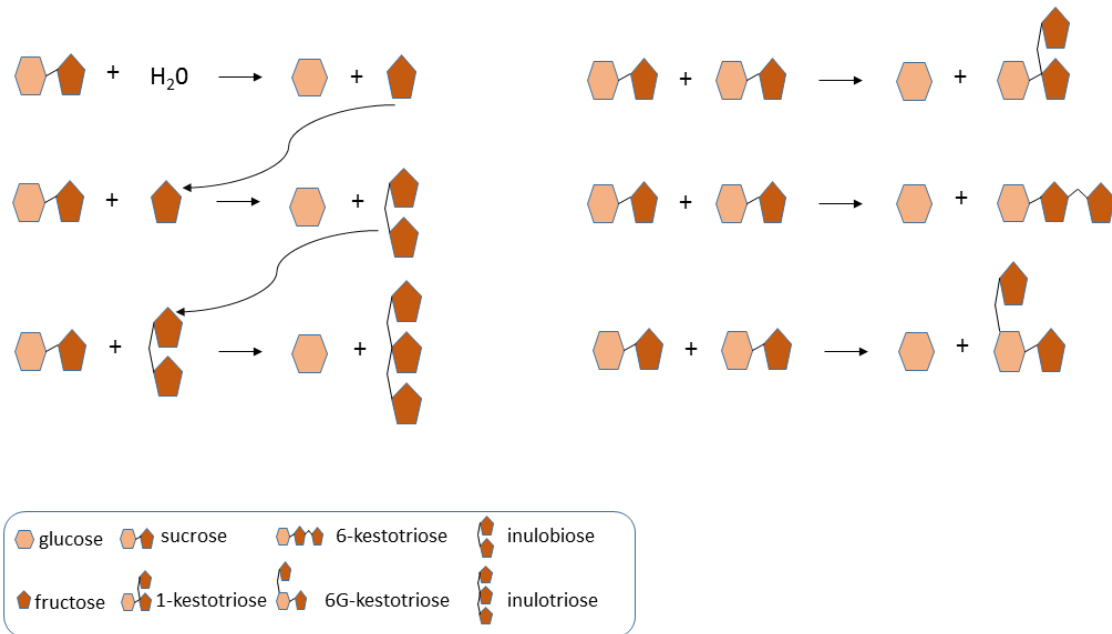


Figure 5.1 Modelo de acción de la invertasa vacuolar en fruto de *Musa*, vinculada a la identidad de los FOS. Normalmente, las invertasas vacuolares utilizan agua como sustrato aceptor, produciendo glucosa y fructosa. Sin embargo, niveles elevados de fructosa y sacarosa pueden conducir a la sustitución de agua como sustrato aceptor por sacarosa y fructosa. En particular, se puede producir inulobiosa de sacarosa (sustrato donante) y fructosa (sustrato aceptor). La inulobiosa producida puede utilizarse como sustrato aceptor para producir inulotriosa. Además, las tres kestosas (1-kestotriosa, 6 kestotriosa y 6G-kestotriosa) pueden ser producidas, cuando la sacarosa actúa como un sustrato aceptor.

BIBLIOGRAFÍA

- Agopian, R. G. D., Purgatto, E., Cordenunsi, B. R., and Lajolo, F. M. (2009). Synthesis of fructooligosaccharides in banana 'Prata' and its relation to invertase activity and sucrose accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 10765-10771. doi: 10.1021/jf902163f
- De Coninck, B., Le Roy, K., Francis, I., Clerens, S., Vergauwen, R., Halliday, A. M., Smith A. M., Van Laere A., and Van den Ende, W. (2005). *Arabidopsis* AtcWINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant Cell Environ.* 28, 432-443. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01281.x
- Joudi, M., Ahmadi, A., Mohamadi, V., Abbasi, A., Vergauwen, R., Mohammadi, H., and Van den Ende, W. (2012). Comparison of fructan dynamics in two wheat cultivars with different capacities of accumulation and remobilization under drought stress. *Physiol. Plant.* 144, 1-12. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01517.x
- Labhardt Ch, Nosberger J, Nelson CJ. (1983). Photosynthesis and degree of polymerization of fructan during reproductive growth of meadow fescue at two temperatures and two photon fluxes. *J Expr Bot.* 34:1037-1046.
- Nunes de Jesus, O. Ferreira, C.F. Silva, S.O. Câmara, T.R. Soares, T.L. and K.N. Pestana. 2009. Characterization of recommended banana cultivars using morphological and molecular descriptors. *Crop Breed. Appl. Biot.* 9:164-173
- Ortiz, R. 1997. Morphological variation in *Musa* germplasm. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 44:393-404
- Peshev, D., Vergauwen, R., Moglia, A., Hideg, É., and Van den Ende, W. (2013). Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *J. Exp. Bot.* 64, 1025-1038. doi:10.1093/jxb/ers377
- Peukert, M., Thiel, J., Peshev, D., Weschke, W., Van den Ende, W., Mock, H. P., and Matros, A. (2014). Spatio-temporal dynamics of fructan metabolism in developing

barley grains. *Plant Cell* 26, 3728-3744. doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.114.130211>

Van den Ende, W. (2013). Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Front. Plant Sci.* 4, 247. doi: 10.3389/fpls.2013.00247

Van den Ende, W., Lammens, W., Van Laere, A., Schroeven, L., and Le Roy, K. (2009). Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes. *FEBS J.* 276, 5788-5798.

Zhang, J., Xu, Y., Chen, W., Dell, B., Vergauwen, R., Biddulph, B., Khan, N., Luo, H., Appels, R., and Van den Ende, W. (2015). A wheat 1-FEH w3 variant underlies enzyme activity for stem WSC remobilization to grain under drought. *New Phytol.* 205, 293-305. doi: 10.1111/nph.13030

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis, mediante la utilización de diversas estrategias bioquímicas permitieron identificar y cuantificar los posibles FOS presentes en tejidos de varios tipos de órganos de once accesiones de banano. Además, la combinación en el uso de marcadores morfológicos bioquímicos y moleculares permite profundizar en el entendimiento de la diversidad genética de *Musa*.

A partir de los resultados obtenidos, se derivan las siguientes conclusiones:

- En este trabajo, los marcadores bioquímicos, moleculares y morfológicos fueron capaces de discriminar entre las accesiones y separarlas, según su especie y composición genómica lo que establece nuevas herramientas que pueden ser utilizadas para la selección de individuos con características deseadas.
- Los sistemas fueron capaces de generar marcadores bioquímicos y moleculares únicos para ciertas accesiones que permitirán encaminar la investigación dirigida a las características que poseen dichas accesiones.
- Se reporta por primera vez la presencia de inulobiosa e inulotriosa en banano, lo que sienta las bases para encaminar investigación básica del porque la presencia de estos polímeros y cual es su posible papel en la fisiología de la planta.
- Fue posible separar por grupos genómicos las accesiones analizadas, únicamente utilizando el perfil de carbohidratos como herramienta de análisis.

6.2 PERSPECTIVAS

En el presente trabajo, se cuantificaron los carbohidratos y se demostró la presencia de 1-kestotriosa, 1,1,1-kestpentaosa, 6G-kestotriosa, inulobiosa e inulotriosa en muestras de *Musa*. Sin embargo, aún no se ha determinado el papel fisiológico que desempeñan estas moléculas, lo cual podría involucrar la regulación de algún mecanismo de respuesta a estrés abiótico. Por lo tanto, se proponen las siguientes actividades futuras:

- Cuantificar los carbohidratos presentes a lo largo de la ontogenia del fruto y si es posible de otros tejidos de la planta para ver en que momento comienza su acumulación.
- Determinar si aplicando algún estrés abiótico a las plantas de banano, existe alguna modificación en la acumulación de estos compuestos, permitiendo una mejor respuesta de la planta en defensa al estrés causado.
- Seleccionar accesiones contrastantes, en cuanto al contenido de FOS y analizar la actividad de las enzimas responsables del metabolismo de carbohidratos.
- Purificar y caracterizar las enzimas involucradas en el metabolismo de estas moléculas.
- Probar la composición del néctar en la germinación del polen de las algunas especies de *Musa* para entender que carbohidrato está actuando como actor principal en este proceso, y poder crear un medio de germinación sintético basándose en la composición que genere mejor respuesta.