



Aplicación transversal del análisis metabolómico al sistema productivo de mandarinas

Ignacio Migue Borghini

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Abril 2026

**Aplicación transversal del análisis metabolómico al sistema
productivo de mandarinas**

Tribunal:

Facundo Ibáñez

Eduardo Boido

Eduardo Dellacassa

Horacio Heinzen, Director

Guillermo Moyna, Director

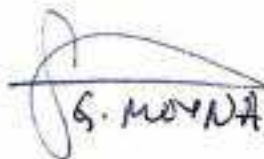
CARRERA DE	POSGRADO	DOCTORADO
ESTUDIANTE	NOMBRE: IGNACIO MIGUES	C.I. 4.249.040-7
DEFENSA	LUGAR Facultad de Química	FECHA 28/4 HORA 12:30
TÍTULO DE	"Aplicación transversal de la metabolómica al sistema productivo de mandarinas".	
DICTAMEN ¹	CALIFICACIÓN	Excelente (E)

JUSTIFICACIÓN

En la defensa de su trabajo de tesis, para obtener el título de Doctor en Química, el estudiante mostró solvencia y criterio en la elección de los ejemplos, metodología y presentación de los resultados que obtuvo. Considerando la cantidad de información generada, se pudo reconocer el esfuerzo realizado por el estudiante en su intento por mostrar la mayor cantidad de información, pero en una forma lógica y didáctica. Lo que es apreciado por el tribunal, considerando que en esta etapa sólo el estudiante, y sus supervisores, pueden tener una comprensión en detalle de lo mostrado. En consecuencia, se puede afirmar que la presentación oral no solo representó cabalmente el trabajo realizado y dio una imagen global del mismo. Por otra parte, en la etapa en la que el estudiante fue cuestionado por los integrantes del tribunal sobre aspectos particulares del trabajo, el estudiante fue claro y concreto en sus respuestas mostrando mayoritariamente conocimiento no sólo sobre sus objetivos sino también acerca de las bases metodológicas que lo llevaron a decidir que sus resultados suman un aporte relevante al conocimiento en su área de especialización. Estos aspectos, en conjunto, permiten percibir madurez en la formación del estudiante hacia su nueva realidad como investigador independiente y motivaron a los integrantes del tribunal a concederle la distinción de excelente a su tesis de doctorado.

DIRECTORES DE TESIS (nombres y firmas)


Horacio Vázquez


G. Morán

TRIBUNAL (nombres y firmas originales en la misma hoja)


EDUARDO BUIDO


EDUARDO IZQUIERDO


Eder Roberto

¹ La Tesis podrá resultar:

- a) Aprobada con los siguientes conceptos: Excelente (E); Muy Bueno (MB); Bueno (B); Aceptable (A).
b) Reprobada con los siguientes conceptos: Insuficiente (I); Muy Insuficiente (MI).



PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
Ministerio de Educación y Cultura - Universidad de la República

Área Química

ACTA. En Montevideo a los veintiocho días del mes de abril de 2026, se reúne en Facultad de Química el Tribunal que entendió en la defensa de tesis de Doctorado en Química que postula el Ignacio Migue, cuyo título es "Aplicación transversal de la metabolómica al sistema productivo de mandarinas". en todos sus integrantes: Dres. Dr. Eduardo Boido, Dr. Eduardo Dellacassa, Dr. Facundo Ibañez y Dr. G. Moyna y H. Heinzen (nombres del/los tutor/es) (Directores de tesis).

El Tribunal habiendo analizado la tesis en profundidad considera:

En la defensa de su trabajo de tesis, para obtener el título de Doctor en Química, el estudiante mostró solvencia y criterio en la elección de los ejemplos, metodología y presentación de los resultados que obtuvo. Considerando la cantidad de información generada, se pudo reconocer el esfuerzo realizado por el estudiante en su intento por mostrar la mayor cantidad de información, pero en una forma lógica y didáctica. Lo que es apreciado por el tribunal, considerando que en esta etapa sólo el estudiante, y sus supervisores, pueden tener una comprensión en detalle de lo mostrado. En consecuencia, se puede afirmar que la presentación oral no solo representó cabalmente el trabajo realizado y dió una imagen global del mismo. Por otra parte, en la etapa en la que el estudiante fue cuestionado por los integrantes del tribunal sobre aspectos particulares del trabajo, el estudiante fue claro y concreto en sus respuestas mostrando mayoritariamente conocimiento no sólo sobre sus objetivos sino también acerca de las bases metodológicas que lo llevaron a decidir que sus resultados suman un aporte relevante al conocimiento en su área de especialización. Estos aspectos, en conjunto, permiten percibir madurez en la formación del estudiante hacia su nueva realidad como investigador independiente y motivaron a los integrantes del tribunal a concederle la distinción de excelente a su tesis de doctorado.

Por lo anterior, el tribunal le otorga la calificación de excelente.


Dr. Eduardo Boido


Dr. Eduardo Dellacassa


Dr. Facundo Ibañez

ÁREA QUÍMICA

Facultad de Química. Av. General Flores 2124, Montevideo 11800, URUGUAY

Teléfonos: (+598) 29241880, 29241882, 29241883, 29241906 int. 3063.

Página web: www.pedeciba.edu.uy/quimica

Correo electrónico: presupuestoquimica@pedeciba.edu.uy – gabig@fq.edu.uy

Este trabajo está dedicado a mi familia, mi pilar fundamental... por enseñarme el valor del esfuerzo y a poner mi corazón en todo lo que hago. Les amo

Agradecimientos

Esta tesis es el resultado de **muchos** años de trabajo, aprendizaje, encuentros y también de muchísima gente que, de una forma u otra, estuvo ahí acompañando el proceso. Por eso, antes que nada, quiero agradecer a todas las personas, instituciones y grupos que formaron parte de este camino...

A la Facultad de Química, por ser mi lugar de formación, de trabajo y de crecimiento. Al **Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales**, por haberme dado un espacio para desarrollarme y aprender, todos los días aprendo algo nuevo allí, y es fascinante!

Al **DQL** del CENUR Litoral Norte, la segunda casa de esta tesis... días y noches en Paysandú, cargando el robot del RMN, haciendo extracciones, analizando en el GC, haciendo caminatas por el campo para buscar inspiración y controlar la glicemia.

Al **INIA Salto Grande**, de donde todo esto surgió, muestreos, reuniones, visitas, gracias por abrirme un espacio allí y permitirme ser parte de ustedes.

Al **FSCL** de la IAEA, donde hice mi pasantía de doctorado... fue mi hogar durante la pandemia, aprendí y crecí muchísimo allí, agradezco las libertades que me dieron para hacer lo que más tenía ganas!

A **PEDECIBA**, por apoyar la ciencia básica en Uruguay, y generar impacto no solo en sus estudiantes e investigadores, sino en la sociedad.

A **CSIC** por el apoyo brindado a través del proyecto de iniciación a la investigación (CSIC 1822), y a las tantas veces que solicité apoyo de movilidad para mostrar el trabajo y para aprender en diferentes eventos.

Sin dudas una institución a la que tengo que agradecer muchísimo es a la **ANII** por el apoyo recibido a lo largo de toda mi carrera académica, desde mi beca de iniciación a la investigación (BE_INI_2010_1750), la beca de maestría (POS_NAC_2017_1_140316), la beca de doctorado (POS_NAC_2020_1_164240) y el proyecto María Viñas (FMV_3_2020_1_162453). Sin ese respaldo, esta tesis no hubiera sido posible! **¡Ojalá vuelvan las becas de iniciación!**

Y basta de instituciones... ahora a lo más importante, las personas...

A mis directores de tesis **Horacio** y **Guille**, por la guía, la confianza, el intercambio y el apoyo durante todo este proceso. Gracias por acompañarme en este camino y por ayudarme a crecer científica y personalmente. Cada idea loca, cada carrera contra el tiempo, cada “habría que hacer...”, cada “pelea” para conseguir algo para mí, cada paso de esta formación continua, **los valoro inmensamente**. Gracias!

Al tribunal, por tomarse el tiempo de leer, comentar y discutir esta tesis. Gracias **Edu Boido**, por seguirme desde la doi siempre con una sonrisa; **EDellac** por sentarte al lado mío todos estos años y preguntarme cómo estoy/cómo voy, y ayudarme siempre que pudiste, tu impacto es enorme!; y **Facundo**, por tu conocimiento, por abrirte a compartir el trabajo, por recibirme en Las Brujas con los brazos abiertos y confiar en mí. Gracias!

A **Tato**, **Álvaro** y **Natalia**, de INIA Salto Grande... Cómo se metieron en esta tesis, cómo siempre se preocuparon por generar el material y mandármelo para que pudiera trabajar, cómo su contacto fue siempre con cariño, y cómo me enseñaron de agronomía! Espero haber estado a la altura, espero haber dado mi granito de arena, espero que lo que se generó en esta tesis pueda cambiar y mejorar la vida de quienes se dedican a la agricultura en Uruguay.

Al equipo de evaluación sensorial de FQ, en especial a **Natalia**, con quien compartimos horas y horas yendo a buscar mandarinas, probándolas, trabajando en conjunto siempre.

A **Ceci** y **Lu**, que además de amigas, trabajaron conmigo en el laboratorio generando datos para esta tesis, con las hojas y ovarios de mandarinas. Las quiero y gracias por todo el apoyo de siempre!

A **Sofi** y **Sabri**, por permitirme ser parte de su tesis de licenciatura con los Aa de mandarinas! Sofi, sos como una hermana para mí, vivimos un año en Viena y agradezco cada día que compartimos allá, medio aislados, las caminatas, los viajes, los días en el lab, y también las veces que me recibiste en tu casa en Paysandú, haciéndome sentir también en casa.

A los y las estudiantes de créditos experimentales que fueron parte de este camino: a **Maxi y Vale**, por el trabajo con hojas y flavonoides; a **Martu**, por el trabajo con ceras. A **Lu y Ana**, que se metieron en la metabolómica del café, y a cada alumno y alumna con quienes compartí horas de laboratorio, ideas, errores, aprendizajes y crecimiento. De verdad siento que crecí con cada uno de ustedes!

A **Andrés** y a todo el DQL, por recibirme siempre de la mejor manera y por hacerme sentir parte del equipo. Es un placer seguir trabajando con ustedes, seguir dando clases, seguir ayudándonos siempre a pesar de la distancia... Gracias **Lu, Sil, y Naty**.

A **Gonzalo y Horacio**, del laboratorio de resonancia de Montevideo, con quienes trabajo y con quienes sé que voy a seguir trabajando muchísimo más, ya sea en metabolómica, en cursos o en comisiones. Gracias por el apoyo de siempre y por acompañarme en este viaje.

A mis compañeros y compañeras de Farmacognosia: **Popi, Nati, Santi, Luchi, Choni, Bruno, Romi, Juli, Guzmán**, y a todos los que pasaron por el laboratorio. Siempre van a estar en mi corazón. Son parte del lab, de mi historia en Facultad y también de mi crecimiento. Son soporte, son cariño, son amigos que están ahí siempre, en los momentos difíciles y en los de alegría como este... infinitas gracias, sé que mi felicidad también es la de ustedes!

Y además de esas juventudes farmacognostas, están los grandes... **Vero**, por cuidarme y quererme tanto; **Carlos**, mi profe del curso, una de las razones por las que me metí a trabajar acá; **Álvaro**, por tus largas charlas, tus cuentos, tus enseñanzas; **Pili**, tu bomba atómica de energía es inspiradora y siempre me acompaña; **Edu y Horacio**, a ustedes les agradecí antes, pero su conocimiento y el cariño que siempre me transmiten son **ENORMES**. A todos ustedes, gracias por formarme continuamente!

A **mis amigas y amigos**, de Migue, de Tala, de toda la vida, no puedo nombrar a cada persona, pero gracias por darme fuerza, por bancarme siempre, por estar en las buenas, en las malas y en mis ausencias durante la tesis (perdón por esto!). Son muy importantes para mí y sin su aliento, sus risas y sus retos, hubiera sido imposible llegar. Tengo en mi corazón a gente muy especial,

mis amigos que me dio la FQ: **Eli, Martín, Peti, Noe y Rossi...** soy un afortunado de saber que van a estar siempre en mi vida... Gracias infinitas!

Parte de mi corazón siempre estará *in Wien...* danke **Bea und Nina! Simon**, por darme toda la libertad para trabajar y confiar en mí, **Drew, Britt, Alina** (la mejor compa de oficina!), **Marivil, Aiman, Florence y Serik**, sus sonrisas diarias ayudan cuando uno está lejos de casa... gracias!

A MI FAMILIA, sí, así con mayúscula, a ustedes va dedicado mi trabajo, este trabajo, y todo lo que hago. Son mi mayor apoyo siempre, contar con ustedes es la mayor felicidad de mi vida. **Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes.** No me alcanza el corazón para decirles lo que son para mí... **GRACIAS!**

Ari, Onyx y Nina, amores de mi vida, mi motivo, mi ayuda, gracias por cederme tiempo y amor continuo, **mi orgullo de familia**, con 2 y 4 patas, no importa, el amor no tiene forma, se siente, se valora y siempre están conmigo. **¡Esta tesis es de ustedes!**

Si bien esta tesis lleva mi nombre, está construida con el apoyo, la confianza, el afecto y el trabajo de muchísimas personas... a todas ellas, gracias!

“En la Ciencia, como en la vida, el fruto viene siempre después del amor.”

Santiago Ramón y Cajal

Aplicación transversal del análisis metabolómico al sistema productivo de mandarinas

Ignacio Mígues Borghini

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

2026

DIRECTOR: Horacio Heinzen

Facultad de Química

Universidad de la República

DIRECTOR: Guillermo Moyna

CENUR Litoral Norte

Universidad de la República

Resumen

Esta tesis se basa en el uso del análisis metabolómico como herramienta para la mejora genética y la comprensión de procesos fisiológicos en mandarinas, aspectos clave en este cultivo de alto valor económico. El objetivo central fue explorar, mediante enfoques no-dirigidos y dirigidos, los perfiles químicos de distintos órganos de la planta, incluyendo pulpa, cáscara, hojas y ovarios, y vincularlos con atributos de aceptabilidad sensorial, resistencia a enfermedades, alternancia productiva y respuesta a técnicas de cultivo.

En la pulpa se aplicó espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN) para caracterizar metabolitos hidrosolubles (azúcares y ácidos orgánicos) y correlacionarlos con la aceptabilidad sensorial de consumidores. Se desarrollaron modelos quimiométricos robustos que mostraron una alta correlación entre el cociente poder edulcorante/ácido cítrico y la preferencia del consumidor, demostrando la viabilidad para predecir objetivamente la calidad organoléptica mediante ^1H RMN. La metodología se pudo transferir a equipos de ^1H RMN de mesada, haciéndolo una herramienta accesible para programas de mejoramiento.

La compleja matriz química de la cáscara se exploró en dos etapas. Primero, un estudio no-dirigido mediante ^1H RMN permitió discriminar variedades a partir de pectinas, azúcares y compuestos lipofílicos, y sugirió un rol de los ácidos y alcoholes grasos en la resistencia al cancro cítrico. Posteriormente, un enfoque dirigido mediante GC-MS confirmó la importancia de la composición de las ceras epicuticulares. Las variedades resistentes presentaron un predominio de alcanos protectores, mientras que las susceptibles mostraron mayor proporción de alcoholes grasos, asociados a mayor permeabilidad cuticular.

El análisis de hojas se centró en la alternancia productiva, una práctica que limita la rentabilidad citrícola. La caracterización no-dirigida mediante ^1H RMN distinguió los estados productivos y no productivos, identificando acumulación diferencial de carbohidratos, prolina y ácidos orgánicos según la fase fenológica. El análisis dirigido mediante LC-MS/MS confirmó diferencias en polifenoles y limonoides, sugiriéndolos como posibles biomarcadores de alternancia.

La segunda parte de la tesis se enfocó en la variedad Afourer. Mediante la integración de datos de rendimiento productivo y de análisis metabolómicos de RMN se evaluó el impacto de técnicas de cultivo, como ser mallado, aplicación de ácido giberélico y polinización mediante abejas, sobre la producción, la calidad del fruto y el desarrollo de ovarios. La betaína, una amina cuaternaria con conocida función osmoprotectora en plantas, fue clave en las primeras etapas de desarrollo. Se desarrolló además un estudio dirigido de giberelinas en ovarios mediante LC-MS/MS que mostró que la GA1 es una hormona clave para el desarrollo de este órgano, con variaciones significativas a lo largo del proceso de maduración del mismo.

El trabajo demuestra el valor del análisis metabolómico aplicado a cítricos como herramienta de diagnóstico temprano, selección varietal y apoyo a la gestión agronómica. La combinación de enfoques no-dirigidos y dirigidos permitió identificar quimiomarcadores asociados a la aceptabilidad del consumidor, la resistencia a enfermedades y la alternancia productiva, contribuyendo a una citricultura más eficiente, sostenible y orientada a la calidad.

Palabras clave: Metabolómica; Mandarina; Quimiometría; Resonancia magnética nuclear; Espectrometría de masa.

Cross-cutting application of metabolomic analysis in the mandarin production system

Ignacio Migue Borghini

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

2026

DIRECTOR: Horacio Heinzen

Facultad de Química

Universidad de la República

DIRECTOR: Guillermo Moyna

CENUR Litoral Norte

Universidad de la República

Abstract

This thesis is based on the use of metabolomic analysis as a tool for genetic improvement and understanding physiological processes in mandarins, key aspects of this high-value crop. The central objective was to explore, using both non-targeted and targeted approaches, the chemical profiles of different plant organs, including pulp, peel, leaves, and ovaries, and to link them to attributes such as sensory acceptability, disease resistance, alternate bearing, and response to cultivation techniques.

Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy was applied to the pulp to characterize water-soluble metabolites (sugars and organic acids) and correlate them with consumer sensory acceptability. Robust chemometric models were developed that showed a high correlation between the sweetening power/citric acid ratio and consumer preference, demonstrating the feasibility of objectively predicting organoleptic quality using ^1H NMR. The methodology was successfully transferred to benchtop ^1H NMR spectrometers, making it an accessible tool for breeding programs.

The complex chemical matrix of the peel was explored in two stages. First, an untargeted ^1H NMR study allowed for the discrimination of varieties based on pectins, sugars, and lipophilic compounds, and suggested a role for fatty acids and alcohols in citrus canker resistance. Subsequently, a targeted approach using GC-MS confirmed the importance of the epicuticular wax composition. Resistant varieties exhibited a predominance of protective alkanes, while susceptible varieties showed a higher proportion of fatty alcohols, associated with greater cuticular permeability.

Leaf analysis focused on alternate bearing, a practice that limits citrus profitability. Non-targeted characterization using ^1H NMR distinguished between productive and non-productive stages, identifying differential accumulation of carbohydrates, proline, and organic acids according to the phenological phase. Targeted analysis using LC-MS/MS confirmed differences in polyphenols and limonoids, suggesting them as potential biomarkers of alternate bearing.

The second part of the thesis focused on the Afourer variety. By integrating yield data and metabolomic NMR analyses, the impact of cultivation techniques, such as netting, gibberellic acid application, and bee pollination, on production, fruit quality, and ovary development was evaluated. Betaine, a quaternary amine with a known osmoprotective function in plants, was key in the early stages of development. A targeted study of gibberellins in ovaries using LC-MS/MS was also conducted, showing that GA1 is a key hormone for the development of this organ, with significant variations throughout its maturation process.

This work demonstrates the value of metabolomic analysis applied to citrus as a tool for early diagnosis, varietal selection, and support for agronomic management. The combination of non-targeted and targeted approaches allowed for the identification of chemomarkers associated with consumer acceptability, disease resistance, and alternate bearing, contributing to a more efficient, sustainable, and quality-oriented citrus industry.

Keywords: Metabolomics; Mandarin; Chemometrics; Nuclear Magnetic Resonance; Mass Spectrometry.

Índice

1	Introducción.....	1
1.1	Encare metabolómico de desafíos productivos y de calidad en mandarinas	1
1.2	Objetivos	3
1.3	Organización de la tesis	4
1.4	Aportes de la tesis	6
2	Marco Teórico	7
2.1	Productos naturales y metabolismo secundario: evolución conceptual del campo..	7
2.2	Metabolómica para el estudio del metabolismo secundario	8
2.2.1	Definición y objetivos de la metabolómica	9
2.2.2	Metabolómica en productos naturales	9
2.2.3	Aplicaciones de metabolómica en agronomía	10
2.2.4	Limitaciones y desafíos: variabilidad biológica, identificación de metabolitos, reproducibilidad	10
2.3	Enfoques metabolómicos no dirigidos y dirigidos	11
2.4	Plataformas analíticas y metodologías espectroscópicas más comunes	13
2.4.1	RMN en metabolómica	13
2.4.2	Espectrometría de masas en metabolómica	14
2.4.3	Otros sistemas instrumentales usados en metabolómica	17
2.4.4	Comparación de plataformas	18
2.5	Flujo de trabajo metabolómico	19
2.5.1	Diseño experimental en metabolómica vegetal (biología, ambiente, fenología, replicación).....	20
2.5.2	Variabilidad preanalítica y control de calidad.....	20
2.5.3	Identificación de metabolitos y reporte	21
2.6	Tratamiento de datos y análisis estadístico en metabolómica	22
2.6.1	Preprocesamiento de datos	22
2.6.2	Estadística univariada.....	24
2.6.3	Estadística multivariada supervisada y no supervisada	24
2.7	El cultivo de <i>Citrus</i> y la mandarina como sistema productivo	27
2.7.1	Importancia agroindustrial y relevancia económica.....	27
2.7.2	Exigencias del mercado.....	29

2.7.3 Principales problemáticas productivas	30
2.7.4 Enfermedades relevantes del cultivo	33
2.8 Mejoramiento genético, nuevas variedades y desafíos para responder al mercado	35
2.9 Metabolómica en <i>Citrus</i>	37
2.10 Composición química de las mandarinas	40
2.11 Referencias bibliográficas	43
3 Metabolómica no dirigida de pulpa	74
3.1 Introducción	74
3.2 Metodología	76
3.2.1 Material vegetal	76
3.2.2 Parámetros fisicoquímicos	77
3.2.3 Evaluación sensorial de las variedades	78
3.2.4 Extracción	78
3.2.5 Análisis instrumental	79
3.2.5.1 RMN 400 MHz	79
3.2.5.2 RMN 60 MHz	80
3.2.6 Estimación del contenido de azúcares y ácido cítrico	80
3.2.7 Espectroscopía de Infrarrojo	81
3.2.8 Análisis estadístico	81
3.3 Resultados y discusión	83
3.3.1 Material vegetal y parámetros fisicoquímicos	83
3.3.2 Evaluación sensorial de las variedades	84
3.3.3 Caracterización del perfil de ¹ H RMN de la pulpa de mandarina	85
3.3.4 Desarrollo de un modelo quimiométrico de aceptabilidad basado en ¹ H RMN	90
3.3.5 Aplicación de FT-IR a la diferenciación de variedades de mandarinas	96
3.4 Conclusiones	98
3.5 Referencias bibliográficas	102
4 Metabolómica de la cáscara	107
4.1 Análisis no dirigido de la cáscara	108
4.1.1 Introducción	108
4.1.2 Metodología	110
4.1.2.1 Material vegetal	110

4.1.2.2 Extracción	110
4.1.2.3 Análisis instrumental.....	111
4.1.2.4 Análisis estadístico	111
4.1.3 Resultados y discusión	111
4.1.3.1 Clasificación de variedades mediante ¹ H RMN.....	111
4.1.3.2 Correlación de los perfiles de ¹ H RMN con la resistencia a canchros.....	116
4.1.4 Conclusiones	119
4.2 Análisis dirigido de ceras epicuticulares	120
4.2.1 Introducción.....	120
4.2.2 Metodología.....	121
4.2.2.1 Material vegetal	121
4.2.2.2 Extracción	123
4.2.2.3 Análisis instrumental.....	124
4.2.2.4 Análisis estadístico.....	125
4.2.3 Resultados y discusión	125
4.2.3.1 Contenido de ceras epicuticulares.....	125
4.2.3.2 Caracterización de las ceras epicuticulares	127
4.2.3.3 Análisis multivariado de las ceras epicuticulares de frutas inmaduras ..	132
4.2.3.3.1 Caracterización metabolómica según especie.....	132
4.2.3.3.2 Mandarinas resistentes vs susceptibles.....	135
4.2.3.3.3 Comparación entre especies más resistentes y más susceptibles.....	137
4.2.4 Conclusiones	138
4.3 Referencias bibliográficas.....	141
5 Metabolómica en las hojas.....	145
5.1 Análisis no dirigido en hojas.....	147
5.1.1 Introducción.....	147
5.1.2 Metodología.....	148
5.1.2.1 Material vegetal	148
5.1.2.2 Extracción	149
5.1.2.3 Análisis instrumental.....	150
5.1.2.4 Análisis estadístico.....	150
5.1.3 Resultados y discusión	150
5.1.3.1 Clasificación de las variedades.....	150

5.1.3.2 Diferenciación entre hojas en etapa productiva y no productiva	153
5.1.3.2.1 Extractos acuosos de hoja de Ellendale productiva y no productiva	153
5.1.3.2.2 Extractos acuosos de hoja de Page productiva y no productiva	155
5.1.3.2.3 Extractos acuosos de hoja de Satsuma productiva y no productiva.	156
5.1.3.2.5 Extractos acuosos de hoja productiva y no productiva (Todas las variedades)	158
5.1.3.2.6 Extractos orgánicos de hoja productiva y no productiva (Todas las variedades)	160
5.1.4 Conclusiones del estudio no dirigido	164
5.2 Análisis dirigido de compuestos fenólicos y limonoides	165
5.2.1 Introducción	165
5.2.2. Metodología	168
5.2.2.1 Material vegetal	168
5.2.2.2 Extracción	169
5.2.2.3 Análisis instrumental	169
5.2.2.4 Análisis estadístico	170
5.2.3 Resultados y discusión	171
5.2.3.1 Optimización de los parámetros MS/MS de los analitos	171
5.2.3.2 Identificación y cuantificación de analitos en hojas	173
5.2.3.3 Caracterización quimiotaxonómica de ramas con frutos	174
5.2.3.4 Caracterización quimiotaxonómica de ramas sin frutos	175
5.2.3.5 Comparación del perfil de metabolitos entre hojas de ramas con y sin frutos	178
5.2.4 Conclusiones	183
5.3 Referencias bibliográficas	186
6 Síntesis de la Parte I	193
6.1 Integración de resultados no dirigidos y dirigidos en los tres órganos	193
6.1.1 Pulpa (Capítulo 3): La aceptabilidad del consumidor y la ¹ H RMN como predictor objetivo	193
6.1.2 Cáscara (Capítulo 4): Identidad varietal, resistencia a enfermedades y el papel de las ceras epicuticulares	194
6.1.3 Hojas (Capítulo 5): Metabolismo foliar y la alternancia productiva	195
6.2 Conexión de los resultados con los objetivos de la tesis	196
7 Efecto del manejo de cultivo en ovarios de Afourer: metabolómica no dirigida por RMN	198

7.1	Introducción.....	198
7.2.1	Material vegetal.....	200
7.2.2	Datos de calidad productiva	201
7.2.3	Extracción	202
7.2.4	Análisis instrumental.....	202
7.2.4.1	Análisis general.....	202
7.2.4.2	Experimentos adicionales	203
7.2.5	Análisis estadístico.....	203
7.3	Resultados y discusión	204
7.3.1	Datos de calidad productiva	204
7.3.2	Análisis no dirigido mediante RMN	206
7.4	Conclusiones	216
7.5	Referencias bibliográficas.....	219
8	Análisis dirigido de giberelinas por LC-MS/MS en ovarios de mandarina Afourer bajo diferentes técnicas de cultivo	222
8.1	Introducción.....	222
8.2	Metodología.....	227
8.2.1	Material vegetal.....	227
8.2.2	Compuestos de referencia.....	228
8.2.3	Extracción	228
8.2.4	Análisis instrumental.....	229
8.2.5	Validación del método analítico	230
8.2.6	Análisis estadístico.....	231
8.3	Resultados y discusión	231
8.3.1	Validación	232
8.3.2	Cuantificación de giberelinas en los distintos tratamientos y muestreos	233
8.4	Conclusiones	243
8.5	Referencias bibliográficas.....	245
9	Síntesis de la Parte II	251
9.1	Relación entre técnicas de cultivo, productividad y semillazón	251
9.2	Metaboloma del ovario: cambios fenológicos y su significado funcional.....	252
9.3	Dinámica de giberelinas endógenas y su acoplamiento con el metaboloma	253
9.4	Del manejo agronómico a la calidad final.....	256

9.5 Importancia para la industria citrícola, limitaciones y perspectivas	257
9.6 Conclusiones	258
9.7 Referencias bibliográficas.....	259
10 Conclusiones generales y perspectivas	262
10.1 Alcance y aporte global de la tesis.....	262
10.2 Aprendizajes sobre el encare metabolómico	264
10.3 Aspectos prácticos importantes	265
10.4 Perspectivas a futuro.....	266
10.5 Conclusión.....	268
10.6 Referencias bibliográficas.....	269
Apéndices	272

Lista de tablas

Tabla 2.1. Comparación de sistemas instrumentales empleados en metabolómica.

Tabla 3.1. Descripción de las mandarinas evaluadas.

Tabla 3.2. Características fisicoquímicas de las variedades estudiadas

Tabla 3.3. Puntajes de aceptación general por consumidores de mandarina.

Tabla 3.4. Resultados de la evaluación sensorial (aceptabilidad), cociente del poder endulzante/ácido cítrico, aceptabilidad predicha por el modelo y RMSE de cada modelo (con datos del espectrómetro de 60 y 400 MHz).

Tabla 3.5. Clasificación del set de validación del modelo OPLS-DA de las variedades B475B y M16 mediante ftir.

Tabla 4.1. Clasificación de las variedades de acuerdo a su resistencia a *X. citri*.

Tabla 4.2. Descripción de los cítricos evaluados.

Tabla 4.3. Contenido de ceras en muestras resistentes y susceptibles de ambos grupos de muestras.

Tabla 4.4. Composición porcentual de las ceras de las diferentes muestras según su grupo funcional.

Tabla 5.1. Optimización de los parámetros de adquisición para cada compuesto evaluado.

Tabla 5.2. Analitos identificados en hojas con frutos de Ellendale (B-END), Willowleaf (B-WL), Page (B-PG) y Satsuma (B-SAT), y su concentración expresada en $\mu\text{g/g}$ de hoja seca.

Tabla 5.3. Analitos identificados en hojas de árboles no productivos de Ellendale (NB-END), Willowleaf (NB-WL), Page (NB-PG) y Satsuma (NB-SAT) y su respectiva concentración expresada en $\mu\text{g/g}$ de hoja seca.

Tabla 7.1. Resultados de calidad de la fruta obtenida para cada tratamiento.

Tabla 8.1. Niveles de GA1 y GA9 detectados para cada tratamiento a lo largo del muestreo.

Lista de figuras

Figura 2.1. Flujo de trabajo en metabolómica.

Figura 2.2. Alternancia productiva a nivel de rama.

Figura 2.3. Biosíntesis de giberelinas.

Figura 3.1. Espectro representativo de ^1H RMN de extractos acuosos de pulpa de mandarina de las variedades B475B y M16.

Figura 3.2. PCA y PLS de las variedades comerciales estudiadas.

Figura 3.3. Análisis de componentes principales y mínimos cuadrados parciales de las variedades híbridas estudiadas.

Figura 3.4. Representación de PCA y PLS, y variables de importancia en la proyección del análisis de PLS realizado en B475 y sus parentales.

Figura 3.5. PCA del híbrido M16 y sus parentales ($E \times WL$).

Figura 3.6. Representación del PLS-DA de las variedades más (B475B) y menos aceptadas (M16). Valores VIP del análisis de PLS-DA. Representación del OPLS-DA de las variedades más (B475B) y menos aceptadas (M16), y S-plot del mismo análisis.

Figura 3.7. Correlación entre el cociente poder endulzante / ácido cítrico y la aceptabilidad determinada por consumidores.

Figura 3.8. Comparación de los espectros de ^1H del extracto acuoso de mandarina de la variedad B475B obtenido con espectrómetros de 400 y 60 MHz (a y b, respectivamente).

Figura 3.9. Correlación entre la aceptabilidad de los consumidores y el cociente del poder endulzante / ácido cítrico determinado usando datos obtenidos a 60 y 400 MHz.

Figura 3.10. Espectro promedio de FT-IR de las variedades B475B y M16.

Figura 3.11. PCA y OPLS-DA de las variedades B475B y M16 analizadas mediante FTIR.

Figura 3.12. Principales resultados del capítulo 3.

Figura 4.1. Espectros de ^1H RMN de los extractos acuosos de cáscara de las mandarinas parentales.

Figura 4.2. PLS-DA de extractos acuosos de cáscara de las mandarinas parentales y gráfico de vip scores del mismo análisis.

Figura 4.3. Espectros de ^1H RMN de los extractos orgánicos de cáscara de las mandarinas parentales.

Figura 4.4. PLS-DA de extractos orgánicos de cáscara de las mandarinas parentales y gráfico de VIP scores del mismo análisis.

Figura 4.5. Espectros de mandarinas resistentes y susceptibles a la infección por *X. citri*.

Figura 4.6. Gráfico de puntuación del PLS-DA de extractos acuosos de cáscara de las mandarinas resistentes y susceptibles a *X. citri*, y gráfico de VIP scores del mismo análisis.

Figura 4.7. PLS-DA de extractos orgánicos de cáscara de las mandarinas resistentes y susceptibles a *X. citri* y gráfico de VIP scores del mismo análisis.

Figura 4.8. Cromatograma de corriente iónica total de quinoto.

Figura 4.9. PCA de los extractos de ceras epicuticulares de las diferentes especies en estudio, dos componentes y tres componentes.

Figura 4.10. PLS-DA y puntuación VIP de diferentes especies de cítricos.

Figura 4.11. Análisis de componentes principales de todas las frutas, coloreadas según tipo de fruta; mandarinas y otros citrus.

Figura 4.12. PLS-DA y puntuación VIP de todas las frutas, coloreadas según tipo de fruta: mandarinas y otros citrus.

Figura 4.13. PCA y PLS-DA de las variedades de mandarinas clasificadas como resistentes y susceptibles.

Figura 4.14. Puntuaciones VIP del PLS-DA de las mandarinas resistentes y susceptibles.

Figura 4.15. PCA de las especies que presentan mayor resistencia y mayor susceptibilidad a cancro.

Figura 4.16. PLS-DA y su puntuación VIP para las especies que presentan mayor resistencia y mayor susceptibilidad a cancro.

Figura 4.17. Principales resultados del capítulo 4.

Figura 5.1. PCA de los cuatro parentales 2015 de los extractos de Hoja acuoso y Hoja orgánico.

Figura 5.2. Espectro de los extractos de Hoja acuoso y orgánico de los cuatro parentales 2015.

Figura 5.3. PLS-DA del extracto acuoso de hoja de los parentales y puntajes VIP de este análisis.

Figura 5.4. PCA y PLS-DA de los extractos acuosos de hojas de Ellendale productiva y los no productiva.

Figura 5.5. VIP scores del PLS-DA realizado con Ellendale productiva y no productiva.

Figura 5.6. PLS-DA y VIP scores de los extractos acuosos de hojas de Page productiva y no productiva.

Figura 5.7. PLS-DA y VIP scores de los extractos acuosos de hojas de Satsuma productiva y los no productiva.

Figura 5.8. PLS-DA y VIP scores de los extractos acuosos de hojas de Willowleaf productiva y los no productiva.

Figura 5.9. Representación del PCA de 2 componentes y de 3 componentes de los extractos acuosos de hojas productivas y no productiva.

Figura 5.10. PLS-DA y VIP scores del PLS-DA realizado con las 4 variedades en estado productivo y no productivo utilizando únicamente las señales superiores a 5,5 ppm.

Figura 5.11. PCA de las 4 variedades parentales obtenidos a partir de los perfiles de ^1H RMN de los extractos orgánicos de hoja en etapa productiva y no productiva.

Figura 5.12. PLS-DA de las cuatro variedades parentales obtenidos a partir de los perfiles de ^1H RMN de los extractos orgánicos de hoja en etapa productiva y no productiva.

Figura 5.13. Puntajes VIP del PLS-DA realizado con Ellendale.

Figura 5.14. Estructura de los diferentes tipos de flavonoides.

Figura 5.15. Estructura y clasificación de los polifenoles cuantificados en variedades comerciales de hojas de mandarina.

Figura 5.16. Gráfico de PCA de las cuatro variedades de hojas de mandarina en etapa con frutos; VIP scores del PLS-DA realizado sobre las cuatro variedades de hojas de mandarina con frutos.

Figura 5.17. Gráfico de PCA de las cuatro variedades de hojas de mandarina en etapa sin frutos; VIP scores del análisis PLS-DA realizado sobre las cuatro variedades de hojas de mandarina sin frutos.

Figura 5.19. Mapa de calor de muestras de hojas con y sin frutos de las cuatro variedades de mandarina; vip scores del PLS-DA realizado para identificar los metabolitos que diferencian entre ambas etapas productivas.

Figura 5.20. Ruta biosintética desde la naringenina hasta la hesperidina a través del eriodictiol y la hesperetina.

Figura 5.21. Principales resultados del capítulo 5.

Figura 7.1. Esquema de las fechas de muestreo y aplicación de GA3 en los tratamientos 2 y 3; desarrollo del ovario en cada una de estas etapas.

Figura 7.2. PCA de las muestras analizadas mediante RMN.

Figura 7.3. PLS-DA y puntajes VIP del análisis realizado utilizando como variable clasificatoria la fecha de muestreo.

Figura 7.4. Espectros ^1H RMN superpuestos del tratamiento 1 (abejas) a lo largo del proceso de muestreo.

Figura 7.5. PLS-DA y puntajes VIP del análisis realizado sobre los extractos del primer muestreo utilizando como variable clasificatoria los tratamientos.

Figura 7.6. PLS-DA y puntajes VIP del análisis realizado sobre los extractos del segundo muestreo utilizando como variable clasificatoria los tratamientos.

Figura 7.7. Estructura de la glicina betaína y su HMBC.

Figura 7.8. PLS-DA y VIP scores del análisis realizado sobre los extractos del tercer muestreo utilizando como variable clasificatoria los tratamientos.

Figura 7.9. PLS-DA y puntajes VIP del análisis realizado sobre los extractos del cuarto muestreo utilizando como variable clasificatoria los tratamientos.

Figura 7.10. Principales resultados del capítulo 7.

Figura 8.1. Biosíntesis de las principales giberelinas bioactivas.

Figura 8.2. Estructura de las giberelinas seleccionadas para este estudio.

Figura 8.3. Cromatograma de un mix de las giberelinas seleccionados para el estudio.

Figura 8.4. Concentración ($\mu\text{g/kg}$) de GA20, GA34 y GA4 por fecha (M1-M4) y tratamiento (T1-T5).

Figura 8.5. Concentración ($\mu\text{g/kg}$) de GA1 y GA9 por fecha (M1-M4) y tratamiento (T1-T5).

Figura 8.6. Concentración promedio ($\mu\text{g/kg}$) de GA1 a lo largo del proceso de muestreo para cada tratamiento.

Figura 8.7. Matriz post-hoc de Kruskal-Wallis de los resultados de los niveles de GA1.

Figura 8.8. Concentración promedio ($\mu\text{g/kg}$) de GA9 a lo largo del proceso de muestreo para cada tratamiento.

Figura 8.9. Matriz post-hoc de Kruskal-Wallis de los resultados de los niveles de GA9.

Figura 8.10. Principales resultados del capítulo 8.

Lista de abreviaturas y símbolos

Término	Significado
%	porcentaje
°	grados (coordenadas geográficas)
°Brix	grados Brix
°C	grados Celsius
cm	centímetro
cm ⁻¹	número de onda (FTIR)
g	gramo
Hz	hertz
K	kelvin
kg	kilogramo
KHz	kilohertz
m	metro
M	molar
m/z	relación masa/carga
mg/kg	miligramos por kilogramo
mg/L	miligramos por litro
MHz	megahertz
min	minuto
mL	mililitro
mL/min	mililitros por minuto
mm	milímetro
N	newton
ng/g	nanogramos por gramo
ppm	partes por millón
rcf	fuerza centrífuga relativa
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo

Término	Significado
V	voltio
v/v	proporción volumen/volumen
µg/kg	microgramos por kilogramo
µg/L	microgramos por litro
µL	microlitro
µL/min	microlitros por minuto
µM	micromolar
¹ H RMN	RMN de protón
ANOVA	análisis de varianza
BBCH	escala fenológica BBCH
CAS	Chemical Abstracts Service (número CAS)
CE	Energía de colisión
CE-MS	electroforesis capilar acoplada a MS
cv.	cultivar
CXP	potencial de salida de la celda de colisión
d-SPE	extracción en fase sólida dispersiva
DP	potencial de desagrupamiento
EE. UU.	Estados Unidos
EI	ionización por impacto electrónico
EP	potential de entrada
ESI	ionización por electrospray
et al.	“y otros” (abreviatura bibliográfica)
FID	free induction decay (señal primaria de RMN)
FID	ionización de llama (cromatografía de gases)
FTIR	espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
GA1	giberelina A1
GA12	giberelina A12
GA15	giberelina A15
GA19	giberelina A19

Término	Significado
GA20	giberelina A20
GA20ox	giberelina 20-oxidasa
GA24	giberelina A24
GA29	giberelina A29
GA2ox	giberelina 2-oxidasa
GA3	ácido giberélico
GA34	giberelina A34
GA3ox	giberelina 3-oxidasa
GA4	giberelina A4
GA53	giberelina A53
GA7	giberelina A7
GA8	giberelina A8
GA9	giberelina A9
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAs	giberelinas
GC	cromatografía de gases
GC-FID	cromatografía de gases con detector FID
GC-MS	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa
HDO	agua deuterada
HILIC	cromatografía de interacción hidrofílica
HMDB	Human Metabolome Database
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución
HS-SPME	microextracción en fase sólida del espacio cabeza
IM-MS	espectrometría de movilidad iónica acoplada a espectrometría de masa
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
IR	espectroscopía de infrarrojo
KAO	ácido <i>ent</i> -kaurenoico oxidasa
KO	<i>ent</i> -kaurene oxidasa

Término	Significado
KS	<i>ent</i> -kaureno sintasa
LC	cromatografía líquida
LC-MS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LC-MS/MS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem
LC-UV	cromatografía líquida con detector ultravioleta
LFY	LEAFY, gen de identidad del meristema floral
LOQ	límite de cuantificación
M1	muestreo 1
M2	muestreo 2
M3	muestreo 3
M4	muestreo 4
MRM	monitoreo de reacciones múltiples
MS	espectrometría de masas
MS/MS	espectrometría de masas en tandem
n.d.	sin fecha (referencias)
ND	no detectado / no determinado
NIR	espectroscopía de infrarrojo cercano
NMR	nuclear magnetic resonance
OPLS-DA	mínimos cuadrados parciales ortogonales
Orbitrap	analizador Orbitrap
PC1	componente principal 1
PC2	componente principal 2
PCA	análisis de componentes principales
pH	potencial de hidrógeno
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PMF	polimetoxiflavonas
PSA	amina primaria y secundaria
PTFE	politetrafluoroetileno
PVDF	polifluoruro de vinilideno

Término	Significado
Q-Orbitrap	sistema cuadrupolo-Orbitrap
Q ²	predictibilidad del modelo
QqQ	triple cuadrupolo
qRMN	RMN cuantitativa
QToF	sistema cuadrupolo-tiempo de vuelo
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
R ²	coeficiente de determinación (ajuste)
RMN	resonancia magnética nuclear
ROC	receiver operating characteristic
RP	fase reversa
RSD	desviación estándar relativa
s. n. m.	sobre el nivel del mar
SIMCA	Soft Independent Modeling of Class Analogy
SPE	extracción en fase sólida
SPME	microextracción en fase sólida
spp.	especies
T1	tratamiento 1
T2	tratamiento 2
T3	tratamiento 3
T4	tratamiento 4
T5	tratamiento 5
UE	Unión Europea
UHPLC	cromatografía líquida de ultra eficiencia
UTEC	Universidad Tecnológica del Uruguay
UV	ultravioleta
VIP	variable de importancia en la proyección

1 Introducción

1.1 Encare metabólico de desafíos productivos y de calidad en mandarinas

La citricultura es un sistema productivo intensivo cuyo desempeño resulta de la interacción entre el genotipo, el ambiente y el manejo agronómico. Forma parte de una cadena de valor que incluye mercados de fruta fresca e industria de derivados. En Uruguay, este sector es el más importante dentro de la hortifruticultura y está fuertemente orientado a la exportación y tiene un impacto directo en el empleo y en la actividad regional. Dentro de este grupo, la mandarina es clave por su relevancia comercial y su crecimiento sostenido en los mercados internacionales. A nivel mundial, los cítricos son una de las cadenas frutales más grandes, con una producción anual de más de 150 millones de toneladas. Las mandarinas representan alrededor del 25% de la producción mundial de cítricos y su producción ha aumentado notablemente desde la década de 1980. Este crecimiento se debe, en gran medida, a atributos sensoriales y prácticos que son muy valorados por los consumidores, como la facilidad de pelado, el sabor y a su precio. Además, las tendencias de mercado favorecen frutas sin semillas, uniformes y atractivas.

La competitividad de la mandarina depende de mantener una calidad organoléptica consistente, una sanidad adecuada del cultivo y del fruto, una estabilidad productiva interanual que se alinee con la rentabilidad y características comerciales específicas, como la baja cantidad de semillas, que en ciertos cultivares son clave para acceder a nichos premium de exportación. En la práctica, estos objetivos enfrentan desafíos metodológicos y operativos. Muchos rasgos de interés se manifiestan más tarde, como cuando el árbol comienza a producir o cuando el fruto alcanza la madurez comercial. La evaluación de estos rasgos mediante métodos tradicionales suele ser costosa, lenta o depende en gran medida de las condiciones ambientales y de manejo.

Un ejemplo claro es la aceptabilidad sensorial del fruto. La evaluación sensorial clásica requiere paneles y campañas experimentales extensas. Además, los programas de mejoramiento generan anualmente una gran cantidad de nuevos híbridos, lo que hace inviable caracterizar en profundidad todas las alternativas posibles. En el trabajo previo

a esta tesis, una evaluación con consumidores en Montevideo mostró diferencias significativas en la aceptación entre variedades, vinculadas a atributos como dulzura, frescura y aroma. Características como la acidez excesiva o sabores extraños estaban relacionadas con una menor aceptación. Este hallazgo permitió seleccionar materiales que vinculan la preferencia sensorial con perfiles químicos objetivos.

Un segundo desafío importante está relacionado con la sanidad, especialmente en lo que respecta a enfermedades que afectan el valor comercial del fruto. Entre las enfermedades bacterianas más relevantes, el cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) provoca lesiones corchosas en hojas, ramas y frutos. Esto resulta en defoliación, caída prematura y degradación de la calidad, lo que puede hacer que el fruto no sea adecuado para el mercado de fruta fresca. Dado que la susceptibilidad puede variar entre genotipos y etapas de desarrollo, identificar marcadores tempranos y criterios de selección asociados a la resistencia o menor susceptibilidad es una oportunidad concreta para mejorar y manejar la fitosanidad.

Un tercer problema relevante es la alternancia productiva, que afecta la estabilidad del rendimiento y condiciona decisiones sobre poda, nutrición, riego y regulación de carga. Entender este fenómeno requiere integrar señales de asignación de carbono, balance energético y metabolismo secundario. Diagnosticarlo de forma temprana es especialmente valioso, ya que podría permitir anticipar escenarios productivos y ajustar el manejo antes de que el fenómeno se manifieste completamente.

En los cultivares de alto valor comercial como Afourer, la presencia de semillas por polinización cruzada es una restricción crítica. En variedades con capacidad partenocárpica, la falta de polinización cruzada genera frutos sin semillas. En contraste, la exposición a polen compatible aumenta el número de semillas por fruto. Esto ha llevado a prácticas como el mallado, el manejo de los polinizadores y aplicaciones hormonales para controlar el cuajado y producir fruta con pocas semillas sin afectar el rendimiento. Sin embargo, la respuesta a estas prácticas puede variar. Entender los mecanismos fisiológicos tempranos en el ovario es clave para proponer estrategias de manejo más reproducibles.

La metabolómica, que busca captar la composición química de un sistema biológico de forma global o dirigida, es un enfoque adecuado para abordar estos desafíos. Desde el punto de vista metodológico, la estrategia no dirigida permite una exploración amplia y el descubrimiento de señales que diferencian, mientras que la estrategia dirigida prioriza la precisión, la reproducibilidad y la cuantificación de metabolitos definidos. En la práctica, ambos enfoques se utilizan de manera complementaria, primero se identifica un patrón o candidato mediante metabolómica no dirigida y luego se valida mediante análisis dirigido.

Esta tesis se basa en este marco conceptual, utilizando plataformas espectroscópicas y cromatográficas complementarias, principalmente ^1H RMN, GC-MS y LC-MS/MS. También se aplican herramientas quimiométricas multivariadas para obtener información útil de los datos obtenidos. El objetivo no es solo describir diferencias químicas entre muestras, sino también traducir esas diferencias en métricas, modelos o marcadores que puedan informar decisiones concretas. Estas decisiones pueden incluir selección varietal, predicción de calidad, evaluación de resistencia o susceptibilidad, diagnóstico de estados fisiológicos y optimización de prácticas de manejo.

1.2 Objetivos

El objetivo general de la tesis es aplicar el análisis metabolómico al sistema productivo de mandarinas para comprender la variabilidad química de órganos y etapas clave. Esto busca generar información útil para la selección varietal y el manejo agronómico, enfocándose en la calidad del fruto, la aceptabilidad por parte de los consumidores, la productividad, la baja cantidad de semillas y la resistencia a enfermedades.

Este objetivo se desglosa en objetivos específicos que incluyen:

- caracterizar la variabilidad química del fruto entre variedades y su relación con la calidad y la aceptación;
- explorar diferencias químicas en la cáscara relacionadas con la respuesta a cancro cítrico;
- comparar perfiles químicos en hojas entre variedades y estados productivos para identificar indicadores del estado reproductivo;

- estudiar el efecto de prácticas de manejo de polinización sobre Afourer y su relación con la cantidad de semillas y la producción;
- describir la dinámica de giberelinas endógenas implicadas y su modulación por el manejo; e
- integrar la evidencia para proponer criterios e indicadores que se puedan aplicar a la selección y manejo enfocados en calidad y baja cantidad de semillas.

1.3 Organización de la tesis

La tesis se divide en dos partes que utilizan metabolómica no dirigida para identificar marcadores del sistema en estudio, y luego se emplea un enfoque de metabolómica dirigida para validar hipótesis, cuantificar rutas y metabolitos clave, y aumentar la transferibilidad de los resultados.

La Parte I aborda la variabilidad química de diferentes variedades de mandarina mediante el estudio de pulpa, cáscara y hojas. Se integran enfoques no dirigidos y dirigidos para responder preguntas sobre calidad sensorial, sanidad (cancro cítrico) y estabilidad productiva (alternancia). En pulpa, se utilizó ^1H RMN para identificar biomarcadores asociados a propiedades sensoriales y desarrollar modelos quimiométricos que relacionan perfiles metabólicos con aceptabilidad. Esto incluye la transferencia de la metodología a instrumentación de mesada (60 MHz). En cáscara, se estudió una matriz compleja y funcional, enfocando el análisis en la identidad varietal y en la resistencia o susceptibilidad al cancro cítrico. Esto se hizo combinando ^1H RMN (no dirigida) con GC-MS (dirigida) para profundizar en la caracterización de ceras epicuticulares y su posible rol defensivo. En hojas, se evaluaron perfiles químicos asociados al estado reproductivo del árbol, integrando una caracterización no dirigida con RMN y una validación dirigida de metabolitos secundarios (polifenoles y limonoides). Esto se hizo con el fin de proponer marcadores candidatos del estado “on/off” del árbol y contribuir al diagnóstico temprano de la alternancia.

La Parte II se centra en un problema de alto impacto económico y operativo: la producción de fruta de Afourer con poca cantidad de semillas, sin perder productividad. Se analizan, por un lado, los efectos de prácticas de manejo (mallado, abejas y

aplicaciones de ácido giberélico) sobre los resultados agronómicos y sobre el metaboloma del ovario mediante metabolómica no dirigida por ^1H RMN. Por otro lado, se estudia la dinámica de giberelinas endógenas en el mismo material vegetal mediante un enfoque dirigido por LC-MS/MS. Esta integración permite analizar cómo los cambios metabólicos y hormonales tempranos se traducen en diferencias en la cantidad de semillas y en atributos de interés productivo.

La tesis se organiza de manera progresiva. El Capítulo 2 presenta el marco teórico y el estado del arte. Aquí se integran antecedentes del sistema productivo de mandarinas y fundamentos metabolómicos, incluidos enfoques dirigidos y no dirigidos, plataformas analíticas, tratamiento y validación de datos, que son necesarios para interpretar los capítulos posteriores.

A continuación, la Parte I se desarrolla en los Capítulos 3 a 5: pulpa (calidad y aceptabilidad; modelos quimiométricos con ^1H RMN), cáscara (perfil químico y resistencia/susceptibilidad al cancro cítrico; ^1H RMN y profundización dirigida de ceras) y hojas (estado reproductivo/alternancia; integración de enfoques no dirigidos y dirigidos). El Capítulo 6 reúne esta evidencia y discute sus implicancias científicas y prácticas, consolidando el rol de la metabolómica como herramienta transversal para la selección y el manejo.

La Parte II comprende los Capítulos 7 y 8, que se centran en Afourer. El primero evalúa el impacto de diferentes manejos (mallado, abejas, GA3) y caracteriza el metaboloma del ovario con un enfoque no dirigido. El segundo cuantifica giberelinas endógenas mediante un enfoque dirigido por LC-MS/MS para conectar patrones metabólicos con la regulación hormonal temprana. El Capítulo 9 integra ambos enfoques y traduce los hallazgos a escenarios útiles para el sector productivo.

Finalmente, el Capítulo 10 presenta las conclusiones generales y perspectivas, evaluando el cumplimiento de los objetivos y proponiendo líneas futuras de investigación y transferencia.

1.4 Aportes de la tesis

Los principales aportes de esta tesis se pueden resumir en dos áreas:

1. Aportes al entendimiento de fenómenos productivos. Se muestra que la variabilidad química del sistema puede capturarse en diferentes matrices que a su vez son complementarias (pulpa, cáscara, hoja y ovario) y relacionarse con calidad, sanidad, alternancia y cantidad de semillas.

2. Aportes metodológicos dirigidos a la aplicabilidad en el sector productivo. Se demuestra la complementariedad entre enfoques no dirigidos y dirigidos como estrategia para explicar características fenotípicas. También se refuerza la transferibilidad de modelos y determinaciones hacia plataformas analíticas más accesibles.

Esta tesis propone y pone a prueba una estrategia integradora. Parte de la complejidad química del sistema (variedades, órganos y etapas) para luego construir criterios objetivos, reproducibles y transferibles, que puedan apoyar decisiones reales en citricultura.

2 Marco Teórico

En este capítulo se presenta el marco teórico y el estado del arte que sustentan la investigación, integrando antecedentes sobre el sistema productivo de mandarinas, los desafíos actuales del cultivo y las bases teóricas necesarias para interpretar los resultados de los capítulos siguientes. Se hace énfasis en la evolución del estudio del metabolismo secundario y el aporte de la metabolómica como enfoque moderno, incluyendo los fundamentos de los enfoques dirigido y no dirigido, las plataformas analíticas más utilizadas y los criterios de tratamiento y validación de datos. Esta revisión busca situar el trabajo y objetivos de la tesis junto con la bibliografía relevante.

2.1 Productos naturales y metabolismo secundario: evolución conceptual del campo

Los metabolitos secundarios originalmente fueron definidos como productos que no son esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción directa del organismo que los genera, sin embargo, actualmente son considerados componentes centrales y multifuncionales del metabolismo, responsables de la defensa y la adaptación en plantas y microorganismos (Hartmann, 2007). Los estudios ómicos y ecológicos modernos han impulsado este cambio conceptual, desde estructuras estáticas hacia redes dinámicas que responden al entorno.

Las rutas biosintéticas que dan lugar a metabolitos secundarios surgen de la diversificación de las rutas del metabolismo primario formando un metabolismo integrado y especializado de biología ecológica y evolutiva del desarrollo. Muchos metabolitos secundarios pueden comportarse como reguladores o incluso como metabolitos primarios (Barona-Gómez, Chevrette, & Hoskisson, 2023; Grigalunas, Brakmann, & Waldmann, 2022).

Los metabolitos secundarios median las interacciones bióticas y abióticas: defensa contra herbívoros y patógenos, alelopatía, atracción entre polinizadores y mutualistas, estructuración planta-microbioma y tolerancia al estrés. Funcionan como toxinas directas, sustancias disuasorias, señales o recompensas, a menudo con múltiples funciones en los

niveles tróficos, y esta multifuncionalidad explica su gran diversidad y la dificultad de su clasificación como metabolitos de función primaria, secundaria y hormonal (Elshafie, Camele, & Mohamed, 2023; Erb & Kliebenstein, 2020; Qaderi, Martel, & Strugnell, 2023; L. Yang et al., 2018).

Los perfiles de metabolitos secundarios muestran una fuerte variación intraespecífica y espacial, que a menudo supera las diferencias interespecíficas en las comunidades (Yunyun He et al., 2025; Labarrère, Prinzing, Dorey, Chesneau, & Hennion, 2019). Los factores bióticos (herbívoros, patógenos) inducen fuertemente muchas vías secundarias, mientras que los impulsores abióticos (luz, temperatura, agua, nutrientes, salinidad, factores de cambio climático) modulan cantidades y patrones (Isah, 2019; Khare et al., 2020). La etapa fenológica define aún más los perfiles, por ejemplo, los compuestos fenólicos y taninos alcanzan su máximo en las etapas reproductivas, mientras que otros metabolitos alcanzan su máximo nivel durante la senescencia (Ciocan et al., 2023).

La metabolómica y las otras ciencias ómicas relacionadas permiten ahora el fenotipado químico desde compuestos aislados hasta perfiles completos, vinculando genes, vías y función ecológica. Los análisis metabolómicos y genómicos no dirigidos revelan la evolución de las vías, la diversidad enzimática y los factores genéticos y ambientales que impulsan la diversidad de metabolitos (Grigalunas et al., 2022; Yunyun He et al., 2025).

2.2 Metabolómica para el estudio del metabolismo secundario

La metabolómica se ha consolidado rápidamente como un campo transformador dentro de las ciencias de la vida, ofreciendo un conocimiento profundo de la composición química de los sistemas biológicos y estableciendo una relación entre el genotipo y el fenotipo de un organismo. A diferencia de los enfoques clásicos que se centran en metabolitos o vías individuales, la metabolómica permite la identificación y cuantificación simultánea de miles de metabolitos, incluyendo metabolitos primarios y secundarios, en diversos tejidos vegetales y condiciones ambientales (Hao, Zhang, Luo, Yang, & Wang, 2025; Manickam et al., 2023; Rochfort, 2005; Shen, Zhan, Yang, Fernie, & Luo, 2022). Este enfoque a nivel de sistemas es muy valioso para el estudio del metabolismo secundario de las plantas, que refleja la adaptación de las plantas al medio,

la defensa y la producción de productos naturales bioactivos. La integración de la metabolómica con otras ciencias “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica) ha profundizado el conocimiento de las vías metabólicas y su activación, las respuestas al estrés, las estrategias de mejora de los cultivos, la evaluación de la calidad de los alimentos y el descubrimiento de nuevos productos naturales (J. Hong, Yang, Zhang, & Shi, 2016; Marchev et al., 2021; Razzaq, Sadia, Raza, Hameed, & Saleem, 2019). A pesar de la implementación de este enfoque, aún quedan desafíos en la estandarización, la identificación de metabolitos, la reproducibilidad de los datos y el manejo de la variabilidad biológica (Hao et al., 2025; Oh et al., 2023).

2.2.1 Definición y objetivos de la metabolómica

La metabolómica se define como el análisis de todos los metabolitos que están dentro de células, tejidos u organismos bajo condiciones específicas (Fraga-Corral et al., 2020; X. Liu & Locasale, 2017; Manickam et al., 2023). Su objetivo principal es proporcionar una visión completa del estado metabólico, que refleje la información genética y las influencias ambientales, lo que permite ver un reflejo de la expresión de los genes y la elucidación de las rutas bioquímicas que se dan dentro del organismo en una determinada situación (Hao et al., 2025; Shen et al., 2022).

En las plantas, la metabolómica ha sido fundamental para el mapeo tanto de metabolitos primarios (esenciales para el crecimiento) como de metabolitos secundarios (implicados en la defensa y adaptación) (J. Hong et al., 2016; Katam, Lin, Grant, Katam, & Chen, 2022). Este campo aprovecha plataformas analíticas avanzadas como la espectrometría de masas (MS), la resonancia magnética nuclear (RMN) y la cromatografía líquida o gasosa (LC/GC-MS) combinadas con herramientas quimiométricas y estadísticas para la interpretación de los datos (Manickam et al., 2023).

2.2.2 Metabolómica en productos naturales

En comparación con los enfoques fitoquímicos tradicionales o los métodos analíticos dirigidos que con frecuencia son trabajosos y se limitan a compuestos previamente conocidos, la metabolómica permite la detección y cuantificación de miles de metabolitos

de manera simultánea, por lo que el alcance analítico es más amplio e integrado con datos de genómica, transcriptómica y proteómica, obtiene información a nivel de biología de sistemas. Esta capacidad mejorada para identificar biomarcadores asociados a rasgos fenotípicos o a respuestas al estrés acelera el descubrimiento de productos naturales comparado con el enfoque tradicional (Adeeyo, Amao, Ngandjui, Alabi, & Msagati, 2024; Hao et al., 2025; Karakas, Bulut, & Fernie, 2025).

2.2.3 Aplicaciones de metabolómica en agronomía

La metabolómica ha transformado la investigación agrícola al ampliar las herramientas disponibles para estudiar cultivos y alimentos. Permite evaluar la calidad de los cultivos mediante la identificación de marcadores y rasgos nutricionales que pueden incorporarse en programas de mejoramiento (J. Hong et al., 2016; Mígues et al., 2021; Razzaq et al., 2019). También facilita el estudio de respuestas al estrés al caracterizar los cambios metabólicos que surgen frente a estreses abióticos y bióticos (Jorge et al., 2016; Mashabela, Masamba, & Kappo, 2023). En el ámbito de los alimentos, es fundamental para la autenticidad y para definir la denominación de origen de algunos alimentos (Djande, Pretorius, Tugizimana, Piater, & Dubery, 2020). También impulsa la selección varietal mediante fenotipado guiado por biomarcadores para la mejora de cultivares (Razzaq et al., 2019). Contribuye a la evaluación de la seguridad al analizar, a nivel metabólico, cultivos genéticamente modificados (J. Hong et al., 2016).

2.2.4 Limitaciones y desafíos: variabilidad biológica, identificación de metabolitos, reproducibilidad

A pesar de su gran potencial, la variabilidad biológica complica la interpretación de los datos entre distintos genotipos y condiciones ambientales. La identificación de metabolitos muchas veces es incompleta debido a la enorme diversidad química presente en las muestras que dificulta la interpretación y confirmación. Por otra parte, la falta de estandarización puede afectar la reproducibilidad y la comparación entre diferentes estudios. Se debe tener en cuenta que ningún método de extracción y ninguna plataforma analítica por sí solos logran capturar la totalidad del metaboloma, por lo que a menudo se requiere la integración de diferentes plataformas analíticas y diferentes tipos de extractos.

La integración del gran volumen de información que se genera hace necesario el uso de herramientas avanzadas de bioinformática y métodos estadísticos robustos que deben ser validados para realmente identificar marcadores de la situación en estudio (Fraga-Corral et al., 2020; Hao et al., 2025; Oh et al., 2023).

2.3 Enfoques metabolómicos no dirigidos y dirigidos

La metabolómica no dirigida (*untargeted*) y la dirigida (*targeted*) difieren principalmente en su objetivo analítico y por ende, en el diseño experimental y la estrategia de adquisición. El encare no dirigido se orienta a un perfilado global de la composición de la muestra, tiene un carácter generador de hipótesis que busca registrar todos los metabolitos detectables, ya sean conocidos, conocidos desconocidos para la especie en cuestión, o desconocidos desconocidos (*known unknowns* y *unknown unknowns*, respectivamente) y que fueron obtenidos bajo un conjunto de condiciones definidas (Gertsman & Barshop, 2018; Lelli, Belardo, & Timperio, 2021; Ribbenstedt, Ziarrusta, & Benskin, 2018). En general, los datos se adquieren en modos de adquisición amplios como el full-scan en LC-HRMS o mediante RMN, produciendo miles de señales (pares m/z – tiempo de retención o señales de desplazamiento químico, según corresponda) cuya cuantificación es relativa (áreas de pico normalizadas) y con una fracción importante de compuestos sin identificar (Alonso, Marsal, & Julià, 2015; Beger et al., 2024; Dunn et al., 2012; Gertsman & Barshop, 2018). La metabolómica dirigida se centra en la medición de un conjunto predefinido de metabolitos químicamente caracterizados y que a menudo forman parte de una vía metabólica o clase química específica. Para ello emplea métodos optimizados con estándares internos y curvas de calibración, lo que permite obtener datos cuantitativos o semicuantitativos con mayor exactitud y comparabilidad (Lelli et al., 2021; Ribbenstedt et al., 2018; Roberts, Souza, Gerszten, & Clish, 2012). Estas diferencias se reflejan en la práctica ya que el enfoque no dirigido maximiza la cobertura de metabolitos y la detección de cambios inesperados, pero tiene como limitante la identificación y el procesamiento de una gran cantidad de datos (Lelli et al., 2021; Schrimpe-Rutledge, Codreanu, Sherrod, & McLean, 2016). El enfoque dirigido, por otro lado, prioriza la precisión y la reproducibilidad, lo que la hace más apta para aplicaciones clínicas y regulatorias, aunque queda restringida a química conocida y a la disponibilidad de estándares (Roberts et al., 2012; Sarandi, Georgaki, Tsoukalas, & Tsatsakis, 2021).

Desde el punto de vista operativo, el flujo de trabajo en el enfoque no dirigido suele partir de extracciones genéricas para obtener la mayor diversidad posible de metabolitos (Gertsman & Barshop, 2018; Lelli et al., 2021), combinando a menudo diferentes sistemas analíticos y condiciones cromatográficas complementarias, como por ejemplo usando columnas de distinta polaridad y modos de ionización negativos y positivos para aumentar la cobertura (Jeppesen & Powers, 2023). Los datos crudos deben ser procesados por posible deriva instrumental, alineamiento, corrección de fase en caso de RMN (Souza & Patti, 2021). El resultado obtenido luego del procesamiento son matrices de muchos compuestos que se evalúan mediante estadística multivariada para separar grupos y proponer biomarcadores (Naz, Vallejo, García, & Barbas, 2014).

En la estrategia dirigida, la extracción y purificación (*clean-up*) de la muestra se ajustan para los analitos de interés para favorecer su obtención y minimizar interferencias (Gertsman & Barshop, 2018; Lelli et al., 2021; Roberts et al., 2012), y la adquisición se basa generalmente en GC o LC-MS/MS en modo MRM (monitoreo de reacciones múltiples) con transiciones y tiempos de retención optimizados para cada metabolito requiriendo estándares de calidad (Beger et al., 2024; J. Zhou & Yin, 2016). Esto permite tener una alta sensibilidad, un amplio rango dinámico y requiere validaciones analíticas (linealidad, LOQ, exactitud, precisión), para obtener datos robustos y comparables (J. Zhou & Yin, 2016).

Actualmente ambos encares metodológicos se utilizan de forma complementaria, primero se realiza un descubrimiento empleando metabolómica no dirigida, se genera una nueva hipótesis y luego la validación se hace mediante un encare dirigido, donde los candidatos discriminantes detectados inicialmente se cuantifican con precisión (Lelli et al., 2021; Sarandi et al., 2021).

2.4 Plataformas analíticas y metodologías espectroscópicas más comunes

2.4.1 RMN en metabolómica

La resonancia magnética nuclear (RMN) es uno de los dos sistemas instrumentales principales en metabolómica. Aunque suele considerarse menos competitiva que la espectrometría de masas (MS) en términos de sensibilidad, sus principales ventajas son su alta reproducibilidad y robustez instrumental, el alto contenido de información estructural que proporciona, su amplia selectividad, su capacidad para determinaciones cuantitativas y el no ser destructiva, son algunas de las ventajas en el campo de la metabolómica (Nagana Gowda & Raftery, 2021).

Desde el punto de vista físicoquímico, la RMN detecta núcleos con espín nuclear distinto de cero, los más comunes son ^1H , ^{13}C , ^{31}P y ^{15}N . De acuerdo al entorno químico de cada núcleo, las señales espectrales se ubican en un desplazamiento químico y de acuerdo al desdoblamiento de la señal (multiplicidad) y su correspondiente J (acoplamiento espín-espín) refleja la conectividad entre átomos (Emwas et al., 2019). Entre sus ventajas más relevantes se destacan que no es destructivo, la mínima preparación de muestra y la obtención de espectros altamente reproducibles con baja dependencia del operador y elevada consistencia interlaboratorio (Gowda & Raftery, 2015). Actúa como un detector casi universal para compuestos orgánicos por encima del límite de detección (generalmente mayor a 1 μM), sin los sesgos de ionización ni el efecto matriz típico de técnicas basadas en MS (Bingol & Brüschweiler, 2014; Letertre, Giraudeau, & De Tullio, 2021).

Para la elucidación estructural de compuestos, la RMN 1D de ^1H permite una caracterización rápida de matrices complejas como son los biofluidos, mientras que la RMN 2D y los experimentos multinucleares como ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C o ^1H - ^{31}P son fundamentales para resolver la superposición espectral de diferentes compuestos (Bingol & Brüschweiler, 2014). La singularidad de algunas señales típicas de metabolitos en el espectro ^1H RMN permite desarrollar otra de las capacidades importantes de este sistema instrumental como la discriminación de isómeros, por ejemplo las formas α y β de la glucosa. Existe un gran número de bases de datos espectrales que facilitan la elucidación

estructural de compuestos y que también contienen información de espectros bidimensionales, como por ejemplo la Human Metabolome Database (HMDB) (D. S. Wishart et al., 2022).

Debido a que las integrales de las señales son directamente proporcionales al número de núcleos contribuyentes, es posible usar la RMN de manera cuantitativa (relativa y absoluta). La cuantificación mediante RMN (qRMN) establece las condiciones experimentales necesarias, como la relajación completa de los núcleos y la referenciación adecuada, para alcanzar una alta exactitud y precisión. El uso de estándares internos como DSS (ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico) o TSP (propionato de trimetilsililo de sodio) permite obtener errores inferiores al 5% y una incertidumbre muy baja en un rango amplio de concentraciones. Además, bajo condiciones de qNMR una única referencia puede calibrar múltiples señales sin necesidad de curvas de calibración individuales para cada metabolito, facilitando la cuantificación múltiple (Crook & Powers, 2020; Gowda & Raftery, 2022; D. Wishart et al., 2022).

Una de las principales fortalezas de la RMN en metabolómica es su reproducibilidad, tanto entre usuarios y laboratorios como a lo largo del tiempo, gracias a su gran estabilidad instrumental y a la alta comparabilidad de espectros entre instrumentos del mismo campo magnético (Letertre et al., 2021). Sus limitaciones principales continúan siendo la menor sensibilidad (típicamente en el orden de 1 μ M) y un rango dinámico inferior al del LC o GC-MS, aunque estas desventajas pueden reducirse usando instrumentos de campos más altos, diferentes sondas e integrando datos de datos MS-RMN (De Moura et al., 2025).

2.4.2 Espectrometría de masas en metabolómica

La espectrometría de masas (MS) es actualmente uno de los principales sistemas instrumentales de la metabolómica porque permite detectar metabolitos en rangos de concentración muy amplios y con una cobertura química grande. En la práctica, casi todos los flujos de trabajo modernos, tanto dirigidos (hipótesis/validación, cuantitativos) como no dirigidos (descubrimiento), que emplean espectrometría de masas, se basan en combinaciones tipo GC-MS/MS o LC-MS/MS, y en menor medida electroforesis capilar (CE-MS) o de movilidad iónica (IM-MS), para maximizar selectividad, sensibilidad y la

capacidad de identificar y elucidar estructuras. Una de las principales ventajas es su muy alta sensibilidad, que permite el análisis de muestras muy pequeñas. Estos sistemas son útiles para realizar fenotipado metabólico hasta estudios mecanísticos de biología de sistemas (Aarika, Rajyalakshmi, Nalla, & Gajula, 2025; Alseekh et al., 2021; Plumb et al., 2023; J. Zhou et al., 2016).

En términos instrumentales, la MS se basa en una combinación de fuentes de ionización, analizadores y separaciones que se eligen según las características químicas de la muestra. En LC-MS, la ionización suave (principalmente electrospray, ESI, en modo positivo y negativo, pero en algunos casos se usa ionización química a presión atmosférica, APCI). Al acoplarse a métodos de alto poder de separación de mezclas complejas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en sus múltiples variantes: la cromatografía en fase reversa (RP), cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC), intercambio iónico, entre otras, permiten cubrir un amplio rango de polaridad y pesos moleculares de los metabolitos en estudio, desde lípidos hasta compuestos polares. Por su parte, al acoplarse con la cromatografía gaseosa (GC-MS), donde el tipo de ionización es por impacto electrónico (EI) permite estudiar metabolitos pequeños y relativamente polares luego de derivatizarlos, y el análisis metabolitos poco polares y de bajo peso molecular (menor a 650 Da) (Fiehn, 2016). En espectrometría de masas de alta resolución HRMS, que se emplean sistemas como el Orbitrap o el QToF, en ellos se gana exactitud de masa y capacidad para identificar inequívocamente nuevos metabolitos, mientras que en triple cuadrupolo se maximiza la sensibilidad y selectividad para cuantificar metabolitos concretos (Hajnajafi & Iqbal, 2025). La movilidad iónica acoplada a masas (IM-MS) es muy útil para separar isómeros, filtrar interferencias de la matriz y mejorar la identificación, por lo que surge como tendencia en estudios metabolómicos (Delafield, Lu, Kaminsky, & Li, 2022).

La diferencia operacional entre metabolómica dirigida y no dirigida depende de cómo se adquieren los datos y el sistema instrumental utilizado. En metabolómica dirigida, lo habitual es adquirir en modo monitoreo de reacciones seleccionadas (SRM) o monitoreo de reacciones múltiples (MRM) en triple cuadrupolo, para lo que se requieren curvas de calibración y estándares (marcados o no isotópicamente) para realizar la cuantificación absoluta de los metabolitos seleccionados. Como alternativa dirigida pero de alta

resolución se utilizan instrumentos híbridos tipo Q-Orbitrap que permiten monitorear transiciones o fragmentos con alta resolución (J. Zhou et al., 2016). En metabolómica no dirigida, lo típico es usar un equipo de alta resolución en modo full-scan (MS^1) y MS/MS con diferentes estrategias de adquisición de datos. En la adquisición dependiente de datos (DDA) se fragmenta los precursores más intensos, mientras que en adquisición independiente de datos (DIA) se fragmentan ventanas de m/z de forma sistemática, esta última mejora la consistencia y reproducibilidad de la fragmentación y hoy es clave para el uso de bibliotecas. Una situación intermedia son los estudios pseudo-dirigidos donde se buscan transiciones MRM desde un screening HRMS y luego se cuantifican los metabolitos en QqQ, de esta manera se combina cobertura y rendimiento cuantitativo (De Souza, Alseekh, Naake, & Fernie, 2019; Ghafari & Sleno, 2024; Guo & Huan, 2020; Luo et al., 2015).

La etapa limitante en estudios metabolómicos no es la obtención de los datos sino la asignación confiable a metabolitos. En LC-MS una fracción grande de picos corresponde a aductos, isótopos, compuestos que se fragmentan en la fuente o contaminantes, y la supresión iónica por matriz puede sesgar la cuantificación si el control de calidad no está bien diseñado. Por eso se requieren estándares de reporte desde la preparación de la muestra, uso de muestras de control de calidad (generalmente son muestras compuestas), preprocesamiento uniforme y establecer los criterios de identificación (Nash & Dunn, 2019; Sumner et al., 2007; Wang et al., 2016).

Para mejorar la identificación de metabolitos se combinan: bibliotecas y bases de datos, por ejemplo HMDB (Wishart et al., 2022), GNPS (Wang et al., 2016), o MassBank (Neumann et al., 2026) usando masas exactas, tiempo de retención y similitud del fraccionamiento; software de preprocesamiento y estadística, por ejemplo XCMS Online para la detección, alineamiento y normalización (Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012); e identificación por redes, empleando MetDNA (Zhang, Zeng, Yin, & Zhu, 2025), NetID (Chen et al., 2021) o KGMMN (Zhou et al., 2022), que propagan hipótesis estructurales desde metabolitos conocidos y por relaciones bioquímicas y la similitud espectral logran identificar metabolitos desconocidos sin necesitar estándares para su confirmación (Wishart et al., 2022). La tendencia actual es integrar HRMS con diferentes modos de adquisición (DDA/DIA) y redes de identificación, y luego utilizar un encare

dirigido mediante MRM con estándares para validar y cuantificar los metabolitos más relevantes identificados (Plumb et al., 2023).

2.4.3 Otros sistemas instrumentales usados en metabolómica

Además de RMN y la MS, la metabolómica recurre a otras plataformas instrumentales que amplían el abanico de aplicaciones y aportan información complementaria dentro de los enfoques multiplataforma. Si bien la mayoría son técnicas espectroscópicas, ya que aportan información estructural, también existen otras técnicas para detectar diferencias en la composición de muestras.

La espectroscopia vibracional, como IR medio, FTIR, NIR y Raman, es capaz de generar huellas metabólicas globales de forma rápida, no destructiva y más económica que los sistemas mencionados anteriormente, lo que los hace atractivos para los estudios metabolómicos no dirigidos (Balan et al., 2019; Çebi, Bekiroğlu, & Erarslan, 2023). Estos espectros son capaces de detectar diferentes grupos de metabolitos primarios como lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y también metabolitos secundarios, y los espectros obtenidos suelen interpretarse mediante herramientas quimiométricas multivariantes en lugar de identificaciones individuales de metabolitos (Çebi et al., 2023; Hackshaw, Miller, Aykas, & Rodriguez-Saona, 2020; Rohman et al., 2019).

FTIR y Raman han sido empleados en trabajos con encares metabolómicos en diferentes áreas como en calidad y autenticidad de alimentos, y caracterización microbiana de alimentos (Çebi et al., 2023), screening de enfermedades en biofluidos y tejidos (principalmente cáncer y enfermedades metabólicas) (Balan et al., 2019; S. Zhang, Qi, Tan, Bi, & Olivo, 2023), descubrimiento de antibióticos y para determinar su mecanismo de acción (Da Cunha, Fonseca, & Calado, 2020), y cuantificación de las principales clases de metabolitos en microorganismos (Scarsini et al., 2021). Por lo tanto, se consideran mejor como herramientas no destructivas de huellas metabólicas que complementan la MS y RMN, pero no sustituyen la elucidación estructural detallada.

La metabolómica multiplataforma incorpora estos sistemas instrumentales para ampliar la cobertura y añadir información adicional (Segers, Declerck, Mangelings, Heyden, &

Eeckhaut, 2019). En metabolómica mutiplataforma no dirigida se utilizan inclusive técnicas como LC-UV, TLC y GC-FID (Jeppesen & Powers, 2023). Las técnicas cromatográficas ofrecen separaciones y cuantificaciones dirigidas o específicas de cada clase de grupo de productos naturales que se validan de forma cruzada con la MS y RMN (Patti, 2011).

2.4.4 Comparación de plataformas

En la **tabla 2.1** se muestra una comparación de los diferentes sistemas instrumentales usados en metabolómica de acuerdo a su uso, costos, requerimiento de estándares y preparación de muestra.

Tabla 2.1 Comparación de sistemas instrumentales empleados en metabolómica.

Sistema	Uso en metabolómica	Costo / muestra	Requisito de estándares	Preparación de muestra	Observaciones
FTIR	No dirigida (baja resolución molecular)	Bajo	No imprescindible	Mínima, medición directa, secado o película según matriz	Rápido, económico, no destructivo, baja especificidad
Raman	No dirigida	Bajo a medio	No imprescindible	Mínima, puede usarse en superficies	Portátil, la fluorescencia puede interferir
LC-UV	Dirigida (metabolitos con grupos cromóforos)	Medio	Sí, para cuantificar	Extracción y limpieza según la matriz	Buena cuantificación, limitado a compuestos cromóforos
GC-FID	Dirigida (compuestos volátiles)	Bajo a medio	Sí, para cuantificar (patrón interno)	Extracción, puede requerir derivatizar según el analito	Simple y robusto, menor detalle estructural comparado al MS
MS (LC-MS o GC-MS)	Dirigida o no dirigida, depende de la resolución del instrumento y modo de adquisición	Medio a alto	En dirigido requiere estándares para una cuantificación robusta	Más compleja, extracción, limpieza, posible derivatización (GC), control del efecto de matriz	Muy sensible y universal, dependiente de la ionización y susceptible a supresión iónica

RMN	No dirigida o dirigida, depende del experimento usado	Bajo a medio	Para cuantificar requiere patrón interno. Para validación pueden usarse estándares	Relativamente simple, buffer para ajuste de pH, precipitación de proteínas, no es destructiva	Muy reproducible y cuantitativa, menos sensible (μM – mM) que el MS

2.5 Flujo de trabajo metabolómico

La metabolómica, y en particular para el estudio de plantas, se viene consolidando como un enfoque muy potente para estudiar la dinámica de metabolitos que refleja tanto la fisiología de la planta como sus respuestas a estímulos ambientales y transiciones fenológicas. Para sustentar cualquier conclusión biológica, el estudio debe estructurarse desde el diseño experimental y el muestreo, pasando por la preparación de muestra y la adquisición instrumental, hasta el procesamiento de señales, el análisis estadístico y la interpretación biológica, tal como se muestra en la **figura 2.1** (Chen, Li, & Xu, 2022; Martins, Caldana, Wolf, & De Abreu, 2018; Stancliffe et al., 2022).



Figura 2.1 Flujo de trabajo en metabolómica.

Las buenas prácticas actuales indican el uso de muestras de control de calidad (QC) para estimar la variabilidad técnica y filtrar señales inestables antes del análisis, junto con estrategias de normalización para reducir sesgos sistemáticos; la adopción de criterios de

reporte para la identificación de metabolitos, como los niveles propuestos por la Metabolomics Standards Initiative (Kirwan et al., 2022); y una interpretación biológica que conecte los metabolitos identificados con el contexto de la investigación contemplando además la posibilidad de integración con otras ómicas cuando sea pertinente (Mosley et al., 2024).

2.5.1 Diseño experimental en metabolómica vegetal (biología, ambiente, fenología, replicación)

Un diseño experimental robusto es fundamental para un análisis metabolómico significativo. Los aspectos clave incluyen la replicación biológica, la aleatorización del orden de recolección y procesamiento de muestras, el control de las variables ambientales (luz, temperatura, humedad), la selección correcta del estado fenológico de la planta, la caracterización del genotipo y la definición clara de las preguntas de investigación (Rodrigues, Ribeiro-Barros, & António, 2019; Sørensen, Møller, Strube, & Gotfredsen, 2024). Los enfoques de Diseño de Experimentos se recomiendan cada vez más para optimizar la selección de factores y minimizar el uso de recursos (Jacyna, Kordalewska, & Markuszewski, 2019). La documentación de metadatos, como las condiciones de crecimiento o el estadio de desarrollo, es crucial para la reproducibilidad (Gibon & Rolin, 2011; Rodrigues et al., 2019).

2.5.2 Variabilidad preanalítica y control de calidad

Los pasos previos a la determinación analítica agregan una variabilidad significativa si no se controlan estrictamente. La inhibición inmediata del metabolismo tras la cosecha se logra generalmente congelando la muestra con nitrógeno líquido; la posterior liofilización rápida de las muestras y los métodos de homogeneización estandarizados (molienda en condiciones estrictamente definidas) y adaptados al tipo de tejido son esenciales para minimizar la introducción de variabilidad en las muestras. Las condiciones de almacenamiento, generalmente a -20 °C o -80 °C, deben ser constantes para evitar la degradación de la muestra, e incluso pequeñas variaciones pueden alterar considerablemente los perfiles metabólicos, no solo al momento del almacenamiento sino

en cada etapa del proceso (Mashabela, Masamba, & Kappo, 2022; Ocampos et al., 2024; Peters et al., 2018; Rodrigues et al., 2019).

El aseguramiento y control de calidad es fundamental para garantizar la fiabilidad de los datos. Las prácticas recomendadas incluyen el uso de blancos para detectar contaminación, muestras compuestas de control de calidad para monitorizar la deriva analítica, adición de estándares internos para poder hacer la normalización, la realización de pruebas de idoneidad del sistema antes de los análisis, la aleatorización del orden de las muestras durante el análisis, réplicas técnicas y la calibración periódica de los instrumentos (Broadhurst et al., 2018; Dudzik, Barbas-Bernardos, García, & Barbas, 2018; Kirwan et al., 2022; Märten et al., 2023). El Consorcio de Garantía y Control de Calidad en Metabolómica (mQACC) describe siete etapas principales de control de calidad, que van desde el diseño del estudio hasta la revisión de la calidad de los datos ya que se ha visto que a pesar del uso creciente de muestras compuestas de control de calidad en estudios basados en LC-MS, los informes detallados sobre su preparación y uso siguen siendo inconsistentes (Broeckling et al., 2023; Mosley et al., 2024).

2.5.3 Identificación de metabolitos y reporte

La identificación precisa de metabolitos se basa en el uso de bibliotecas espectrales y estándares de referencia. Existen cuatro niveles de confianza en la identificación, el nivel 1 es mediante confirmación con un estándar, el nivel 2 es cuando se identifica presuntamente por coincidencia con una biblioteca espectral, el nivel 3 es cuando se identifica el grupo de producto natural al cual pertenece el metabolito, y el nivel 4 es cuando se desconoce el metabolito. El uso de múltiples técnicas analíticas, así como la combinación de los patrones de fragmentación de MS/MS con el tiempo de retención de los analitos o en su defecto su índice de retención, mejora la confianza de la asignación (Yang Chen et al., 2022; Ciasca et al., 2020; Schrimpe-Rutledge et al., 2016).

El correcto reporte de los metabolitos identificados facilita la reproducibilidad de la investigación. La información mínima debe incluir los detalles sobre el origen de las muestras, la preparación y el almacenamiento de las mismas, la plataforma analítica usada y los modos de adquisición en la misma, también los procedimientos de control de calidad

empleados, los pasos de procesamiento de datos y los criterios de selección de metabolitos relevantes, los niveles de confianza en la identificación, y la disponibilidad de datos brutos y procesados (Kirwan et al., 2022; Mosley et al., 2024).

2.6 Tratamiento de datos y análisis estadístico en metabolómica

La investigación en metabolómica, ya sea mediante RMN o GC/LC-MS, genera conjuntos de datos complejos y de gran tamaño que requieren de un estricto procesamiento de datos y análisis estadístico para extraer información con significado biológico. El flujo de trabajo suele incluir etapas de preprocesamiento como alineación, normalización, escalado, corrección de derivas y filtrado, seguidas de análisis estadísticos univariados y multivariados, modelado supervisado, estrategias de validación y determinación de los biomarcadores (Di Guida et al., 2016; Euceda, Giskeødegård, & Bathen, 2015; Sun & Xia, 2023). La estadística univariada se utiliza para la selección de características o variables y la prueba de hipótesis, pero debe corregirse cuidadosamente para comparaciones múltiples (Vinaixa et al., 2012). Los enfoques multivariados, tanto no supervisados como supervisados, sirven para reducir la dimensionalidad de los datos, el reconocimiento de patrones, la clasificación y el descubrimiento de biomarcadores (Chen et al., 2022; Liland, 2011; Saccenti, Hoefsloot, Smilde, Westerhuis, & Hendriks, 2013). Los métodos de validación robustos, como la validación cruzada y las pruebas de permutación, son fundamentales para evitar el sobreajuste a los datos y garantizar la reproducibilidad (Blaise et al., 2021; Xu et al., 2023).

2.6.1 Preprocesamiento de datos

El preprocesamiento en metabolómica son una serie de etapas cuyo objetivo es convertir señales instrumentales complejas en una matriz de variables lo más comparable posible entre muestras, minimizando variaciones técnicas (instrumentales) manteniendo las variables que tengan importancia biológica. El procesamiento incluye la eliminación de ruido y la corrección de línea base, la detección de picos, alineamiento y asignación a compuestos por tiempo de retención en GC/LC-MS o alineamiento espectral en el caso de RMN. También se filtran los datos, por ejemplo, aquellos que no pudieron ser alineados, y se eliminan outliers ya que ambos aumentan la varianza y pueden sesgar los análisis

estadísticos posteriores (Euceda et al., 2015; Karaman, 2017; Karaman, Pinto, & Graça, 2018; Sun & Xia, 2023).

Otras etapas de procesamiento aplican a casos donde se buscan comparar muestras, y son requeridos para fortalecer la estadística. La normalización de los espectros busca reducir los efectos de las diferentes escalas en la intensidad de las señales para que los espectros resulten comparables entre instrumentos. Las estrategias más utilizadas son la normalización por suma total o área, la normalización a una determinada señal, la normalización por vector, y la normalización por cociente probabilístico. En espectroscopía, la normalización se orienta a uniformizar la intensidad global del espectro, y aunque su impacto suele ser secundario respecto de la corrección de línea de base, ayuda a mejorar la robustez de los análisis multivariados y la capacidad de clasificación (Liberda et al., 2021; C. Yan, 2025). Las transformaciones, como puede ser la logarítmica o de potencia, se usan para estabilizar la varianza y reducir la asimetría de las distribuciones, haciendo que los grupos tengan una forma más simétrica y así cumplan los supuestos de muchos modelos estadísticos. En metabolómica, estas transformaciones ayudan a disminuir la dominancia de variables muy abundantes naturalmente, lo que ayuda a interpretar los perfiles y genera una mejor estructura de los datos, facilitando la agrupación en análisis de componentes principales (PCA) y el desempeño de los modelos multivariados aplicados posteriormente (Berg, Hoefsloot, Westerhuis, Smilde, & Werf, 2006; van den Berg, Hoefsloot, Westerhuis, Smilde, & van der Werf, 2006; Yarto-Jaramillo, 2015). El centrado y escalado de variables es una etapa clave del preprocesamiento porque controla la contribución relativa de cada variable al análisis multivariado, especialmente cuando existen grandes diferencias de magnitud entre señales. El centrado se logra al restar la media, y se combina con distintas formas de escalado según el objetivo. Si se busca igualar la influencia de todas las variables, se usa el autoscaling; cuando se busca achicar picos muy intensos, como ocurre en el caso de algunas señales de RMN, se usa el escalado Pareto (Varmuza & Filzmoser, 2024); y también se usa el escalado por rangos para reducir la dependencia de la concentración absoluta. Dado que la elección del método de escalado modifica la separación entre clases, el ordenamiento de variables importantes y el rendimiento de los modelos de clasificación, no existe un único método óptimo, por lo que se recomienda comparar los métodos y evaluar cuál funciona mejor de acuerdo a lo que se busca (Ahsan, Mahmud,

Saha, Gupta, & Siddique, 2021; Amorim, Cavalcanti, & Cruz, 2022; van den Berg et al., 2006).

2.6.2 Estadística univariada

Los datos metabolómicos son de gran tamaño, donde el número de variables supera al número de muestras, y se necesitan pruebas univariantes para analizar estas características (variables). Las pruebas t o el análisis de varianza (ANOVA), se aplican a cada variable de forma independiente para identificar diferencias significativas entre los diferentes grupos (Sumner et al., 2007; Vinaixa et al., 2012). En el análisis de múltiples metabolitos, la corrección por comparaciones múltiples es esencial para controlar los falsos positivos. La transformación de Bonferroni reduce la probabilidad de obtener un falso positivo pero es muy conservador a medida que aumenta el número de metabolitos evaluados, reduciendo la potencia estadística (Vinaixa et al., 2012). Existen otras transformaciones menos conservadoras que Bonferroni y las hace más aptas para estudios metabolómicos donde la dimensionalidad es muy alta y es común la dependencia entre variables (metabolitos correlacionados) (Benjamini, 2010; Benjamini & Hochberg, 1995; Benjamini & Yekutieli, 2001).

2.6.3 Estadística multivariada supervisada y no supervisada

Los estudios metabolómicos generan conjuntos de datos que requieren enfoques estadísticos robustos para lograr una interpretación biológica significativa. Los métodos multivariados no supervisados, como el análisis de componentes principales (PCA), se utilizan generalmente para la exploración estructural de los datos y la evaluación inicial de la calidad de los mismos, mientras que los modelos supervisados, como el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), las proyecciones ortogonales a estructuras latentes o mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS), los modelos tipo *support vector machine* (SVM) y *random forest* permiten la clasificación, la regresión, la selección de variables y el descubrimiento de biomarcadores. La interpretación de estos modelos y el riesgo de sobreajuste requieren estrategias de validación estrictas, como la validación cruzada, las pruebas de permutación y el uso de conjuntos de pruebas externos (Ghosh, Zhang, Ghosh, & Kechris, 2020; Grissa et al., 2016; Worley & Powers, 2012).

El análisis de componentes principales (PCA) es el método no supervisado más utilizado en metabolómica para la reducción de la dimensionalidad y la visualización de la estructura de las muestras (Kellogg, Kvalheim, & Cech, 2020; Nyamundanda, Brennan, & Gormley, 2010). El PCA ayuda a identificar valores atípicos (*outliers*), efectos de lote y patrones de agrupamiento entre muestras, y refleja la estructura de los datos sin utilizar información sobre el grupo al que pertenece la muestra antes de aplicar modelos supervisados (Debik, Sangermani, Wang, Madssen, & Giskeødegård, 2021). Otras técnicas no supervisadas incluyen el análisis jerárquico de clusters (HCA), donde se agrupan las muestras en base a su similitud y el agrupamiento de *k-means* donde las muestras se agrupan en base a un determinado número de grupos '*k*' (Gal et al., 2020). Más recientemente surgen los modelos no supervisados compuestos que usan múltiples PCA para hacer análisis más completos sobre la similitud de las muestras, o modelos probabilísticas del PCA que permiten el modelado con covariables, y las visualizaciones basadas en redes para mejorar la interpretación de los datos (Kellogg et al., 2020).

Los modelos supervisados como PLS-DA, OPLS(-DA), SVM, *random forest*, regresión logística, y el *machine learning* se utilizan ampliamente para tareas de clasificación y regresión en metabolómica (Elguoshy, Zedan, & Saito, 2025; Ghosh et al., 2020; Gromski et al., 2015). Estos modelos permiten la identificación de características discriminantes o biomarcadores asociados con fenotipos o condiciones experimentales (Grissa et al., 2016). Los modelos supervisados más usados en metabolómica son el PLS-DA y el OPLS(-DA), ambos suman una matriz de respuesta *Y* codificada por clases donde se generan variables latentes que maximizan la covarianza entre *X* (variables espectrales) e *Y* favoreciendo la separación entre grupos. A partir del modelo de PLS-DA se obtienen representaciones en el espacio y las variables de importancia en la proyección (VIP) que son medidas para seleccionar las variables potencialmente discriminantes de los grupos. PLS-DA es sensible al sobreajuste, por lo que su uso debe acompañarse de validación estricta mediante validación cruzada, prueba de permutaciones y/o conjuntos externos, y del reporte de métricas como el ajuste (R^2) y la predictibilidad (Q^2) del modelo (Gromski et al., 2015; Ruiz-Perez, Guan, Madhivanan, Mathee, & Narasimhan, 2020). El OPLS-DA además del componente predictivo entre *X* e *Y*, introduce una dimensión ortogonal que explica la variación no relacionada con la clase, demostrando variabilidad de cada grupo

del análisis. Este análisis mejora la interpretación al concentrar la información de discriminación en menos componentes y facilitar la identificación de la contribución de las variables. Este análisis, al igual que el PLS-DA, corre riesgo de sobreajuste y requiere de validación (Boccard, González-Ruiz, Codesido, & Rudaz, 2020).

La validación de modelos supervisados como PLS-DA y el OPLS-DA es fundamental en metabolómica porque estos métodos pueden sobreajustar y generar separaciones aparentes que en realidad no generalizan a otro grupo de datos (Westerhuis et al., 2008). Para controlar este riesgo es recomendable optimizar el número de componentes mediante una adecuada validación cruzada que puede hacerse por diferentes métodos (*leave-one-out*, *k-folds*, *holdout*). En estos métodos se omiten observaciones o grupos y se recalcula el modelo con el resto, se predicen las observaciones omitidas y se evalúan los resultados del modelo, se selecciona aquel modelo con mayor ajuste (R^2) (Minitab, n.d.). Además de la validación cruzada, se recomienda reportar las métricas de cada modelo (R^2 y Q^2) como se mencionó anteriormente junto con los resultados de pruebas de permutación, donde se cambian las etiquetas de los grupos o clases para evaluar si la capacidad predictiva del modelo originales es mayor que cuando se genera con datos aleatorios (Westerhuis et al., 2008). Siempre que sea posible, lo mejor es validar mediante una validación externa, donde el conjunto de datos se separa aleatoriamente en un grupo de prueba, utilizado para crear el modelo, y un grupo de validación que se usa para probar el modelo, y se considera un buen modelo cuando las métricas de ambos grupos son similares (Westerhuis et al., 2008).

Para evaluar cuantitativamente el rendimiento discriminante de los modelos de PLS-DA y el OPLS-DA también se utilizan métricas basadas en curvas de ROC (*Receiver Operating Characteristic*), donde se construye la curva de sensibilidad (verdaderos positivos) en función de la especificidad (falsos positivos). Si el área bajo la curva es próxima a 0,5, el desempeño del modelo es aleatorio mientras que si el área es cercana a 1, el desempeño del modelo es perfecto (Martínez Pérez & Pérez Martín, 2023; Vu, Siemek, Bhinderwala, Xu, & Powers, 2019).

2.7 El cultivo de *Citrus* y la mandarina como sistema productivo

Los cítricos (*Citrus* spp.) forman parte de un sistema productivo intensivo, fuertemente condicionado por la interacción entre genotipo, condiciones ambientales, manejo y por una cadena de valor que combina mercados de fruta fresca y derivados industriales. En la literatura reciente, la industria citrícola se discute recurrentemente como un sector de alta relevancia económica y social, pero también como un sistema expuesto a presiones sanitarias severas y persistentes, capaces de generar pérdidas importantes y comprometer la continuidad productiva. (Ramel, 2023; Spreen, Gao, Fernandes, & Zansler, 2020; Torres, Fernández-Izquierdo, Ferrero-Ferrero, Escrig-Olmedo, & Rivera-Lirio, 2022). En Uruguay, la citricultura se describe como el rubro hortofrutícola de mayor importancia, con un perfil agroindustrial fuertemente orientado a la exportación de fruta fresca, principalmente naranjas, mandarinas y limones, y un impacto significativo en empleo y actividad regional (Rivas et al., 2020). Las mandarinas son actualmente uno de los cítricos de más rápido crecimiento a nivel mundial, valoradas por su facilidad de pelado, su sabor y sus beneficios para la salud, y en Uruguay son una importante fuente de exportación e ingresos (Lujambio, Pellicer, & Lado, 2023).

2.7.1 Importancia agroindustrial y relevancia económica

Los cítricos constituyen una de las cadenas frutícolas más grandes del mundo, con una producción anual superior a los 150 millones de toneladas y una importante generación de empleo y comercio (Barbieri, Fernandes, Pontes, Pereira, & Fill, 2023; Villar-Luna, Santos-Cervantes, Rodríguez-Negrete, Méndez-Lozano, & Leyva-López, 2024). Aproximadamente el 50 % de la producción mundial se concentra en China, Brasil, la UE, EE. UU. y México, siendo Brasil quien produce más de tres cuartas partes de las exportaciones mundiales de jugo de naranja (Barbieri et al., 2023; Neves, Trombin, Marques, & Martinez, 2020).

Los productos cítricos (frescos y procesados) son estratégicos para la agroindustria global, con una fuerte especialización regional entre fruta fresca, jugo y otros derivados (Spreen et al., 2020; Zulian, Dörr, & Almeida, 2013). La industria del jugo de naranja es un pilar de la industria brasileña, generando importantes ingresos por exportación y

cooperativas que integran a los pequeños agricultores en las cadenas de valor (Neves et al., 2020; Zulian et al., 2013). En México, los cítricos abarcan unas 678.000 hectáreas y su producción alcanza un valor de entre 2400 y 2800 millones de dólares, proporcionando ingresos a alrededor de 69.000 familias (Fernández-Echeverría et al., 2024; Villar-Luna et al., 2024).

En Uruguay, los cítricos se incorporan a las cadenas de valor globales principalmente a través del limón y otras exportaciones de cítricos, donde la coordinación público-privada en materia de sanidad vegetal, trazabilidad y estándares de calidad ha generado nuevas oportunidades de exportación, empleos e inversión extranjera, y ha mejorado el acceso a los bienes públicos sectoriales para los pequeños productores (Lachman, Tacsir, & Pereyra, 2022). Las valoraciones regionales de los servicios de polinización en América Latina también identifican a los cítricos como un grupo diferenciado y de gran importancia económica dentro de los cultivos dependientes de los polinizadores (Basualdo et al., 2022).

Las mandarinas representan alrededor del 25 % de la producción mundial de cítricos, superadas solo por las naranjas dulces (Goldenberg, Yaniv, Porat, & Carmi, 2018; Gosal et al., 2024). La producción y la superficie mundial de mandarinas han aumentado aproximadamente un 375 % desde principios de la década de 1980, con un crecimiento anual promedio de la producción de entre el 4 % y el 7 % China es el principal productor (más de la mitad de las mandarinas del mundo), seguida de países como Turquía, España, Brasil y Japón (Regmi & Dhungana, 2024).. España es el mayor exportador, con más del 25 % de las mandarinas y clementinas comercializadas a nivel mundial.

Las mandarinas se consumen frescas y se procesan para elaborar jugos, concentrados, mermeladas, aromas y licores, la cáscara y los subproductos de su procesamiento proporcionan aceites esenciales, flavonoides, carotenoides y limonoides para usos alimentarios y farmacéuticos (Shorbagi, Fayek, Shao, & Farag, 2022).

2.7.2 Exigencias del mercado

El consumo mundial de mandarinas ha experimentado un fuerte aumento, impulsado en gran medida por su comodidad a la hora de consumirse (fácil pelado) y la preferencia por frutas sin semillas, uniformes y atractivas. Las demandas del mercado ahora integran la apariencia externa, la calidad del producto y los aspectos de seguridad y nutrición a lo largo de toda la cadena productiva.

Estudios realizados en EE. UU., Europa y Asia encuentran consistentemente que los consumidores buscan fruta sin semillas, sin imperfecciones, y se enfocan en la apariencia. La frescura y el sabor son atributos críticos al momento de seleccionar la fruta. Algunos mercados penalizan fuertemente la presencia de semillas y los defectos de la piel, mientras que otros sacrifican una apariencia perfecta por un precio más bajo o el origen local (Badar et al., 2023; Budiyati, Rejeki, & Zamzami, 2021; House et al., 2011; Tarancón, Tárrega, González, & Besada, 2021).

Los programas de mejoramiento se centran en la ausencia de semillas, la facilidad de pelado, la uniformidad de los frutos pequeños y medianos y una alta calidad sensorial, a menudo mediante híbridos triploides (Aleza, Cuenca, Juárez, Pina, & Navarro, 2010; Pina & Navarro, 2020). Las nuevas líneas y mutantes buscan frutos de tamaño uniforme, de color naranja brillante, sin o con muy pocas semillas, para satisfacer la demanda del mercado nacional y de exportación (Neves et al., 2018; Tarancón, Tárrega, Aleza, & Besada, 2020).

La seguridad y calidad de los alimentos se abordan mediante el procesamiento controlado (en particular en la producción de jugos), la atención a la aparición de sabores desagradables y la conservación de la vitamina C, los carotenoides y los compuestos fenólicos (Bandić et al., 2023; Putnik et al., 2017). Las prácticas poscosecha como el encerado para evitar la deshidratación de la cáscara y los cuidados durante el almacenamiento en frío son fundamentales para mantener la apariencia y la aceptabilidad requeridas por el mercado.

2.7.3 Principales problemáticas productivas

Los sistemas productivos de mandarina en todo el mundo enfrentan problemas de sanidad vegetal, rendimientos inestables, defectos de calidad y grandes pérdidas poscosecha, a menudo provocados por una mala gestión de los cultivos, la presencia de plagas y enfermedades, y un almacenamiento y manipulación inadecuados.

Los rendimientos inestables se deben en gran medida a que presentan alternancia productiva, fenómeno que se caracteriza por una fuerte oscilación entre una alta producción de frutos y una baja producción de frutos, lo que perjudica el tamaño, la calidad y la estabilidad económica de los mismos. Esta situación se debe a los efectos hormonales, los carbohidratos y el crecimiento de los brotes, pero existen diversas técnicas de cultivo y químicas que pueden reducir su gravedad. Las cosechas abundantes actúan como potentes consumidores de carbohidratos, lo que limita el crecimiento radicular, el crecimiento de los brotes de verano y la floración recurrente en la mandarina Nadorcott o Afourer (Stander, Barry, & Cronjé, 2018). La carga de fruta y las semillas aportan giberelinas y auxinas, que inhiben la inducción floral y los genes de floración de un ciclo a otro (Haim, Pochamreddy, et al., 2025; Muñoz-Fambuena et al., 2011; Shaban, El-Banna, & Rashedy, 2025b, 2025a). Este fenómeno se da a nivel del árbol e incluso a nivel de las ramas, siendo productivas en una cosecha y no productivas en la siguiente como se puede ver en la **figura 2.2**. Las ramas se comportan como unidades independientes frente a la inhibición por parte del fruto ya que la misma es una interacción a corta distancia.

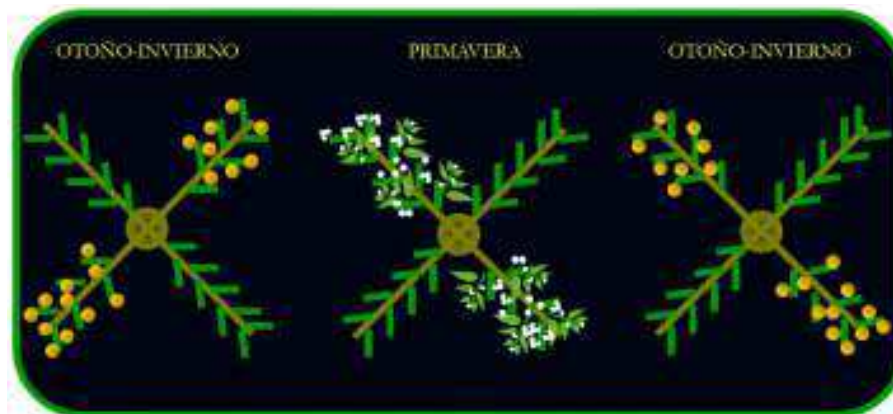


Figura 2.2 Alternancia productiva a nivel de rama. Imagen creada y cedida por Fernando Rivas.

Es por esto que la poda en primavera en años de floración regular (reduciendo los brotes florales a la mitad) aumenta la cantidad de brotes nuevos y aumenta el rendimiento acumulado a 4 años en aproximadamente un 25 % atenuando la alternancia, y podas severas en un año de baja producción rompen la alternancia en mandarinas mejorando el tamaño y la calidad del fruto a lo largo de 6 años (Mesejo et al., 2020; Procopiou & El-Gazzar, 1972). La aplicación de 2,4-D en plena floración en la mandarina Satsuma ‘Miyagawa’ aumenta la caída de frutos, el tamaño del fruto y los azúcares, y se propone para controlar la alternancia (Adouli, Zamani, Fattahi-Mohgadam, Golein, & Rezaei, 2018). La aplicación de hormonas como el ácido giberélico GA3 (40 mg/L) en años de baja producción reducen la brotación y la floración en las mandarinas ‘Montenegrina’ y ‘Rainha’, con el objetivo de evitar una gran producción en un año de baja producción tras una cosecha escasa (Griebeler et al., 2025; Griebeler, Gonzatto, Böettcher, & Schwarz, 2023; Ramos-Hurtado et al., 2006). GA3 en dosis bajas durante años de baja producción invernal en mandarina ‘Orri’ genera un aumento de las inflorescencias y aumenta el rendimiento fuera de temporada en un 40% (Haim, Kamara, Morozov, & Sadka, 2025). Las combinaciones de GA3 y CuSO₄ durante la floración logra una reducción del número de semillas y mejora el rendimiento tanto dentro como fuera de temporada (Shaban et al., 2025a).

La salud del árbol y la estabilidad del rendimiento en cítricos están condicionadas también por otros múltiples factores que actúan de manera conjunta. En primer lugar, los estreses bióticos como el Huanglongbing, la mosca de la fruta, la tristeza, la gomosis, la mancha negra, y otras plagas y enfermedades, son las causas principales de la disminución del rendimiento y del deterioro progresivo de los árboles (Joshi, Neupane, Pandey, & Khatri, 2023; Pariyar & Goswami, 2023; Regmi & Dhungana, 2024). En segundo lugar, los problemas de suelo y nutrición, como el descenso de la fertilidad, el pH inadecuado, las deficiencias de nutrientes y el intercalado con cultivos que extraen nutrientes del suelo, reducen la productividad y comprometen la calidad del fruto (Pariyar & Goswami, 2023). Las limitaciones hídricas y la variabilidad climática desestabilizan la floración y el cuajado afectando los rendimientos finales en la producción, aunque estrategias como el riego deficitario regulado pueden ahorrar entre 20 y 40 % de agua sin sacrificar el

rendimiento mejorando algunos atributos de calidad (Conesa et al., 2014; Conesa, Rosa, Fernández-Trujillo, Domingo, & Pérez-Pastor, 2018).

La calidad del fruto, tanto en pre- como poscosecha, está determinada por problemas fisiológicos de la cáscara y por decisiones del manejo que afectan su calidad comercial. Durante la cosecha los problemas de la cáscara varían según la variedad y la posición del fruto en la copa, y estos problemas se ven agravados por cambios en la humedad del ambiente, por lo que aplicaciones pre-cosecha de 2,4-D, GA3 o antitranspirantes formadores de película pueden disminuir el daño de la cáscara, aunque el GA3 puede retrasar el desarrollo del color (Rezk et al., 2024). El momento y el método de cosecha son determinantes ya que la fecha de recolección influye marcadamente en el tamaño, el contenido de azúcares, la acidez, la vitamina C y los antioxidantes, y las ventanas óptimas varían entre cultivares (Manzoor et al., 2023), además, prácticas de cosecha bruscas al recolectar generan más daño físico, mayores pérdidas (Rokaya, Baral, Gautam, Shrestha, & Paudyal, 2020).

Las pérdidas poscosecha y la conservación del fruto dependen fundamentalmente de la tecnología de almacenamiento empleada (Khanal, Timilsina, Aryal, Khanal, & Lamsal, 2023; Shrestha, Awasthi, & Das, 2024). Una causa de deterioro es el daño físico y mecánico ya que la compresión o la manipulación brusca puede producir daño interno de la pulpa acelerando la respiración, el ablandamiento y la pudrición (Tian, Chen, & Li, 2024). En comparación con el almacenamiento a temperatura ambiente, el uso de cámaras frigoríficas o almacenamiento con humedad relativa adecuada reduce en forma sustancial la pérdida de peso y el deterioro por hongos (Khanal et al., 2023; Rokaya et al., 2020). La optimización de la temperatura es clave dado que para distintas mandarinas el rango de 4 a 10 °C con alta humedad relativa suele mantener la calidad durante 45 a 120 días sin afectar el sabor (Cao et al., 2024; El-Shemy, 2019). El envasado y los ambientes modificados contribuyen a extender la vida útil, por ejemplo usando empaques plásticos con ventilación adecuada (Bhusal et al., 2025). Los tratamientos químicos como el ácido salicílico y la putrescina reducen la pérdida de peso y la pudrición, y ayudan a mantener la firmeza, los sólidos solubles totales, la acidez y el contenido de vitamina C durante el almacenamiento en frío junto con el uso de fungicidas puede extender el almacenamiento a temperatura ambiente hasta 78 días (Poudel, 2021).

2.7.4 Enfermedades relevantes del cultivo

Entre las enfermedades bacterianas de mayor relevancia, el cancro cítrico se describe como un problema que importante en la industria citrícola y que afecta directamente el valor comercial del fruto. Estudios recientes centrados en infección en fruto señalan que cuando el fruto es infectado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, puede reducirse o incluso perderse su valor comercial. Se ha reportado que la susceptibilidad del fruto disminuye a medida que avanza el desarrollo, observándose patrones temporales de aparición de lesiones en etapas tempranas posfloración y ausencia de nuevas lesiones en etapas de madurez, lo que aporta opciones para el manejo sanitario (L. Liu et al., 2024).

Xanthomonas citri subsp. *citri* provoca lesiones corchosas en hojas, ramas y frutos, provoca la defoliación, manchas en los frutos y caída prematura de los mismos, lo que los hace inadecuados para el mercado en fresco y reduce el rendimiento y la calidad (Ali et al., 2023; Danish et al., 2022). Las mandarinas infectadas presentan niveles reducidos de clorofila, calcio, magnesio, potasio y fósforo, y compuestos antioxidantes en los frutos, lo que degrada aún más la calidad (Nawaz, Ghani, et al., 2024).

Uruguay se encuentra dentro de la zona sudamericana de cancrrosis, históricamente afectada por cepas específicas con un rango de hospedadores relativamente estrecho.

En Uruguay se reporta con una incidencia localizada, aunque aún no tan extendida como en algunos países vecinos (FERENCE et al., 2018; Shahbaz et al., 2022). La “cancrosis sudamericana B” (*X. citri* subsp. *aurantifolii* B) apareció en Argentina en 1923 y se extendió a los países vecinos de Uruguay y Paraguay (Barbieri et al., 2023; Danish et al., 2022). Estas cepas infectan principalmente limones, limas, naranja agria, raramente afectan a naranja dulce y no afectan al pomelo, siendo las mandarinas variables en cuanto a su susceptibilidad dependiendo de la variedad considerada. Este rango de hospedadores determina qué sectores citrícolas uruguayos presentan mayor riesgo (Danish et al., 2022; Russi, Menoni, del Campo, & Peyrou, 2013). Las mandarinas generalmente muestran una resistencia intermedia a moderada, pero ningún genotipo es inmune. Un análisis de campo de 186 genotipos de cítricos encontró grupos de mandarinas en un rango medio en cuanto a la gravedad de las lesiones, algunas (como 'Muscia') se encontraban entre las más resistentes, mientras que el pomelo y la lima dulce eran mucho más susceptibles. Bajo

presión severa, incluso las mandarinas resistentes desarrollan síntomas característicos de cancro (Ali et al., 2023; Danish et al., 2022; de Carvalho et al., 2014).

El manejo integrado de plagas típico para combatir el cancro incluye la exclusión y cuarentena de plantas, y el uso de plantas de vivero libres de enfermedades. Las aplicaciones de cobre, cortavientos, poda y destrucción de tejidos o árboles infectados son la práctica más común, o incluso se usa estreptomicina u otros antibióticos, pero plantean problemas de resistencia a los antimicrobianos y regulación. También se seleccionan combinaciones de mandarina/portainjerto más resistentes siempre que sea posible y hay enfoques ecológicos como el control biológico y estrategias basadas en endófitos que son prometedoras contra el cancro (Ali et al., 2023; Bahadur & Srivastava, 2022; Danish et al., 2022; Nasreen, 2020; Subedi, Pandey, Bhandari, & Khanal, 2024).

A nivel de interacción hospedero–patógeno, existen trabajos que describen que el desarrollo de síntomas es un componente central de la enfermedad y que factores moleculares del patógeno participan en la capacidad de colonización y en la manifestación de cancro. Este conocimiento muestra el interés por entender la susceptibilidad como un rasgo complejo y dinámico, con implicancias para selección de germoplasma, evaluación comparativa de materiales y diseño de estrategias de control (Yan et al., 2025). Existe además una tendencia hacia estrategias de control innovadoras orientadas a reducir el impacto ambiental y mejorar la especificidad, como enfoques basados en silenciamiento genético. Este tipo de propuestas muestra el esfuerzo en la investigación dedicado a generar alternativas de manejo frente a una enfermedad con consecuencias directas sobre productividad y calidad comercial (Gaffar, 2023).

Entre otras de las enfermedades bacterianas más devastadoras de la mandarina está el HLB, causado por *Candidatus liberibacter*, daña huertos ya establecidos y reduce la productividad, y aumenta los costos de producción (Chaulagai & Shrestha, 2022). En países como Tailandia, el HLB afectó al 88% de los huertos mientras que el cancro coexistió en aproximadamente un 82% (Chanvatic et al., 2019). La podredumbre de la raíz suele afectar a países de elevada humedad y es causada por una combinación de hongos (*Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*) y bacterias (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Rhizomonas*) (Bodah, 2017). Otras patologías

comunes en mandarinas son la gomosis, la muerte regresiva, el virus de la tristeza, la fumagina, la sarna y la melanosis, que generan pérdidas económicas importantes a nivel mundial (Yiqun Chen et al., 2023; Dahal, Pant, Bhusal, Koirala, & Niraula, 2021; Riolo, Aloï, Pane, Cara, & Cacciola, 2021; Singh et al., 2024).

2.8 Mejoramiento genético, nuevas variedades y desafíos para responder al mercado

Los mercados mundiales de mandarinas demandan cada vez más frutas sin semillas, fáciles de pelar, de alto sabor, con tolerancia a enfermedades y una estacionalidad más amplia, algo que las variedades más antiguas no pueden ofrecer por sí mismas (Cristofani-Yaly et al., 2024; Goldenberg et al., 2018).

En Uruguay, el mejoramiento genético de mandarinas está fuertemente orientado a la competitividad del negocio de fruta fresca para exportación, con un programa liderado por INIA en conjunto con la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, que busca generar materiales adaptados a las condiciones agroecológicas locales y a las exigencias comerciales. El foco actual de desarrollo busca ampliar el periodo de cosecha y mejorar atributos clave de calidad interna y externa (sabor, jugosidad, color, facilidad de pelado, bajo semillado), junto con rasgos agronómicos y de poscosecha (rendimiento, capacidad de retención en planta, tolerancia a enfermedades y comportamiento poscosecha) por lo tanto los materiales generados cultivares con ventajas concretas para productor y consumidor y que mantiene una cartera en continuidad con expectativas de nuevas liberaciones en los próximos años (Neff, 2019; Sajami, 2025).

La demanda de nuevas variedades se ha orientado hacia frutas sin semillas o con pocas semillas, fáciles de pelar, de color naranja intenso, con un equilibrio entre dulzor y acidez y un aroma intenso (Cristofani-Yaly et al., 2024; Goldenberg et al., 2018; Neves et al., 2018). Los trabajos de evaluación sensorial identifican características imprescindibles para su aceptación: refrescante, muy aromática, dulce, jugosa, sabor intenso, ligeramente ácida, poco fibrosa, además de segmentos pequeños en algunos mercados (Gámbaro et al., 2021; Giménez-Sanchis, Tárrega, Tarancón, Aleza, & Besada, 2021). La apariencia externa también aparece como factor importante, sin embargo, el sabor y el valor

nutricional terminan siendo decisivos al momento de la elección por parte del consumidor (Goldenberg et al., 2018; Omura & Shimada, 2016).

Actualmente las principales limitaciones debidas a enfermedades y problemas sanitarios incluyen la mancha marrón por *Alternaria* y el Huanglongbing. Esto reduce la superficie plantada y aumenta el uso de fungicidas e insecticidas, y es allí donde los nuevos híbridos muestran una tolerancia diferencial a *Alternaria* manteniendo una buena calidad organoléptica (Das, Sharma, & Manshad, 2024; Moura et al., 2025; Raveh et al., 2020). Algunos tipos de mandarina muestran tolerancia al HLB, lo que los hace interesantes para la generación de cultivares con resistencia, estos cultivares presentan respuestas inmunitarias más fuertes y una mejor regeneración del floema (Ribeiro et al., 2022; Shahzad, Vashisth, Ritenour, & Brecht, 2023).

Las plantaciones existentes dependen de muy pocos cultivares y portainjertos, lo que resulta en períodos de cosecha cortos y vulnerabilidad a plagas y enfermedades. El mejoramiento y la selección buscan una mayor eficiencia de rendimiento, una maduración más temprana o tardía para extender la oferta a los meses de temporada baja y la adaptación a diversos climas (trópicos, subtrópicos, zonas más frías o más secas) (Cantuarias-Avilés, Filho, Stuchi, Da Silva, & Espinoza-Núñez, 2010; Da Cruz et al., 2021; Kulyan, 2019; Smith, 2016).

La generación de nuevas variedades se ve limitada por la lentitud de los ciclos biológicos, la necesidad de pruebas en diferentes climas, los altos costos de infraestructura y operación, y la complejidad de los sistemas de mejoramiento y regulación. Nuevas herramientas, como el mejoramiento rápido y la selección genómica, pueden reducir el tiempo y la carga de las pruebas en campo, pero presentan desafíos de costo e implementación (Atlin, Cairns, & Das, 2017; Wanga, Shimelis, Mashilo, & Laing, 2021; Yan, 2021). Es por esto que la caracterización química es actualmente un criterio de selección central ya que discrimina el germoplasma, predice el desempeño sensorial y funcional y orienta las variedades con su uso final específico, haciendo que el mejoramiento y la elección de materiales sean más precisos y orientados al mercado (Djande, Piater, Steenkamp, Tugizimana, & Dubery, 2021; Serrano, Kombrink, & Meesters, 2015)

2.9 Metabolómica en *Citrus*

Los cítricos son de importancia mundial debido a sus propiedades nutricionales, organolépticas y beneficiosas para la salud. La metabolómica en *Citrus* es capaz de integrar las características determinantes de calidad, fisiología y defensa en un cultivo donde las variaciones en azúcares, ácidos, terpenoides y fenoles generan diferencias sensoriales y agronómicas relevantes. En cítricos, el uso combinado de LC-MS para metabolitos semipolares (fenilpropanoides, flavonoides, limonoides), CG-MS para estudiar el volatiloma (monoterpenos, aldehídos, ésteres) y RMN para perfiles cuali y cuantitativos de metabolitos polares (azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos) permiten analizar tanto el metabolismo primario como secundario y empleando quimiometría logran determinar características metabólicas de los cultivos. Este tipo de enfoque metodológico ha servido para determinar la diversidad de flavonoides entre especies y tejidos de diferentes *Citrus* y para vincular metabolitos a sus funciones ecológicas y de aplicación en salud humana (Wang et al., 2017).

En calidad de fruto, los estudios en mandarinas muestran que la transición hacia la maduración implica un reordenamiento del metabolismo de carbohidratos y ácidos orgánicos, donde se incrementan los azúcares solubles (sacarosa, glucosa, fructosa) mientras que disminuyen los ácidos orgánicos, y esto tiene gran impacto en el consumidor (Batista-Silva et al., 2018; H. R. Hong et al., 2024). El estudio integrado del transcriptoma y metaboloma en mandarinas Ponkan (*Citrus reticulata*), es un ejemplo de la aplicación del encar metabolómico donde se describen las variaciones temporales de metabolitos primarios durante la maduración y su acoplamiento con genes y enzimas asociados a acumulación de azúcares y la degradación de ácidos (Lin et al., 2015). Los estudios metabolómicos no solo abarcan fruta fresca sino a subproductos como el jugo, donde se ha estudiado los perfiles de diferentes frutas cítricas mediante RMN y muestran la importancia de los metabolitos primarios en la discriminación varietal y de especies, aportando datos para determinar autenticidad y trazabilidad de subproductos de la cadena citrícola (Villa-Ruano et al., 2019). Además de los metabolitos primarios, los flavonoides y terpenoides influyen en parámetros de calidad de los cítricos, estos compuestos afectan el sabor, aroma y valor nutricional de los mismos. Factores ambientales como la luz y la

temperatura influyen significativamente en los perfiles de estos metabolitos, afectando la calidad de la fruta (Lado, Gambetta, & Zacarias, 2018; Wang et al., 2024).

En cuanto al aroma, la “volatilómica” ha descrito compuestos clave como el limoneno que son marcadores del flujo metabólico de los cítricos durante el desarrollo (Kim et al., 2022). En variedades específicas de mandarinas se han realizado estudios (Jiaxian He et al., 2024) combinados de HS-SPME-GC-MS y transcriptómica mostrando la dinámica del volatiloma a lo largo de diferentes estadios del desarrollo y la asociación entre los genes de la vía del metileritritol fosfato y el contenido de volátiles. Este tipo de estudios son especialmente relevantes para programas de mejoramiento orientados a *flavor*.

Los estudios metabolómicos de la cáscara han estudiado la composición de la cutícula, las ceras, las funciones de defensa y la diferenciación varietal (Wang et al., 2020; Wang et al., 2024; Wu et al., 2023). La composición de la misma es crítica en mandarinas por su relación con la apariencia comercial, la tolerancia poscosecha y la tolerancia a patógenos (Liu et al., 2025; Pervaiz et al., 2023; Tunsagool et al., 2019). En un mutante de naranja ‘Newhall’ con deficiencia de ceras cuticulares, el análisis combinado del metaboloma y el transcriptoma mostró una orientación hacia la defensa mediada por jasmonatos, con disminución del contenido de lípidos de cadena larga y un aumento del jasmonato y otros metabolitos inducidos por el mismo (He et al., 2018). Estudios en cáscara de mandarinas ‘Shatangju’ basados en UHPLC-QQQ-MS caracterizó muchos metabolitos presentes en la misma, y detectó un aumento en la activación de la ruta de fenilpropanoides y flavonoides durante el desarrollo del fruto y bajo la presencia de HLB (Wang et al., 2020).

Los trabajos en metabolómica de hojas se centran en la carga frutal y respuesta a condiciones de estrés como la sequía o el ataque de patógenos (Pott, Vallarino, & Osorio, 2020; Xue et al., 2025). En brotes vegetativos de cítricos se vinculó la carga frutal con cambios en coenzimas, azúcares y aminoácidos, mostrando que la presencia del fruto redirige el metabolismo de carbono y nitrógeno (Martínez-Alcántara et al., 2015; Nishikawa, Iwasaki, Fukamachi, & Matsumoto, 2015). Otros estudios en hojas de cítricos sometidos a condiciones de sequía cuantificaron flavonoides específicos asociados a tolerancia mostrando el rol de los compuestos antioxidantes fenólicos como parte de los

mecanismos de defensa frente a estrés además de su valor nutracéutico (Rao et al., 2023; Wang et al., 2023).

En cuanto a defensa de la planta, Huanglongbing (HLB) es hoy la enfermedad principal que afecta a los cítricos a nivel mundial e impulsa el desarrollo metodológico en metabolómica de cítricos por ser una enfermedad sistémica y mortal para la planta (Pérez et al., 2019). En mandarinas tolerantes comparadas con susceptibles se identificaron redes metabólicas asociadas a tolerancia donde se integran metabolismo de aminoácidos, en particular aspartato y glutamato, las purinas adenina y guanina y la biosíntesis de hormonas como auxinas y citoquininas (Suh, Tang, Zhang, Gmitter, & Wang, 2021). Esta regulación hormonal aumentada es coherente con el crecimiento y regeneración del floema, fundamental para la resistencia a esta enfermedad. Un estudio metabolómico del floema indica que el ambiente metabólico previo a la infección puede modular el desempeño de la planta frente al HLB, lo que permite la selección de variedades resistentes en los programas de mejoramiento (Herranz et al., 2024). En jugos obtenidos de frutos infectados, se han reportado los metabolitos diferenciales vinculados a carbono y nitrógeno como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, y limonoides, mostrando el potencial diagnóstico de la metabolómica aplicada a esta área (Slisz, Breksa, Mishchuk, McCollum, & Slupsky, 2012). Enfoques recientes sobre mapeo molecular espacial han logrado vincular la severidad del HLB con interrupciones en la composición de flavonoides y con la acumulación de poliaminas indicando cómo se relaciona el metabolismo fenólico y de poliaminas con la progresión de la enfermedad (Aksenov et al., 2024).

Otra enfermedad importante en los cítricos es el cancro, producido por la bacteria *Xanthomonas citri*. La metabolómica se está usando para identificar la respuesta química de la planta frente a este patógeno, identificando rutas y metabolitos que funcionan como biomarcadores de infección y como metabolitos de defensa. Un trabajo en hojas de *Citrus sinensis* donde se usó una estrategia de metabolómica por MS junto con redes moleculares permitió detectar biomarcadores inducidos y vinculó la respuesta con la vía del triptófano, donde se acumularon derivados *N*-metilados de triptamina con actividad inhibitoria *in vitro* contra *X. citri* (Saldanha et al., 2022). Otros estudios de metabolómica empleando ¹H RMN durante el desarrollo del cancro mostraron que la infección altera el metabolismo primario generando cambios en precursores como el triptófano, tirosina

y poliaminas como la putrescina (do Prado Aparecido, Carlos, Lião, Vieira, & Alcantara, 2017). Para el diagnóstico del cancro existen técnicas metabolómicas combinadas con quimiometría que pueden discriminar perfiles de hojas con lesiones de cancro de hojas sanas (Niculau et al., 2022). En las diferentes variedades de mandarinas existen menos trabajos de metabolómica de cancro. En mandarina ‘Kinnow’ se evaluó el impacto del cancro sobre rasgos morfológicos y fisiológicos demostrando que existe un fenotipo característico cuando existe la infección (Nawaz, Babar, et al., 2024). Otro trabajo estudió los perfiles de minerales y metabolitos en frutos y hojas infectadas con cancro, sugiriendo candidatos a marcadores de la enfermedad (Nawaz, Ghani, et al., 2024). La ventaja de las mandarinas es que ya existe una base metabolómica robusta capaz de discriminar variedad, portainjerto y origen de los cultivares, que puede usarse para generar estudios de infección y búsqueda de marcadores específicos de cancro (comparables a los descritos en naranja dulce). (Feng, Niu, Suh, Hung, & Wang, 2018).

2.10 Composición química de las mandarinas

La caracterización química de *Citrus reticulata* muestra una matriz compleja dominada principalmente por metabolitos primarios que determinan su calidad organoléptica y valor energético. La pulpa y el jugo están constituidos fundamentalmente por azúcares solubles, específicamente sacarosa, glucosa y fructosa, que se encuentran en una proporción aproximada de 2:1:1. Estos azúcares no solo actúan como sustratos metabólicos, sino que funcionan como indicadores de autenticidad varietal y son los principales responsables del perfil de dulzor del fruto (Lado, Cuellar, Rodrigo, & Zacarías, 2016; Maciá-Vázquez, Núñez-Gómez, Martínez-Nicolás, Legua, & Melgarejo, 2023).

Los ácidos orgánicos constituyen el segundo grupo de compuestos del metabolismo primario en mandarinas. El ácido cítrico es el ácido mayoritario, seguido por el ácido málico, cuyas concentraciones varían dependiendo del cultivar y del estado fenológico del fruto (Liao et al., 2019). El ácido ascórbico (Vitamina C) destaca como un componente hidrosoluble esencial que, además de tener gran relevancia nutricional, aporta a la capacidad antioxidante y a la acidez titulable, parámetros que son dependientes

de factores climáticos durante la maduración tardía (Bermejo, Pardo, Morales, & Cano, 2016; Maciá-Vázquez et al., 2023; Saini, Capalash, Varghese, Kaur, & Singh, 2020).

Las mandarinas se distinguen por un alto contenido de flavonoides, particularmente flavanonas glicosiladas. Los compuestos mayoritarios son la hesperidina y la narirutina, las cuales se encuentran en mayor proporción en la cáscara y en frutos inmaduros (Ye et al., 2011). Estos metabolitos secundarios han sido objeto de estudio debido a su capacidad nutracéutica, que incluye propiedades antiinflamatorias y antioxidantes vinculadas a la protección contra enfermedades crónicas (Ye et al., 2011). Este género se caracteriza por la presencia de flavonas polimetoxiladas (PMFs), tales como la nobiletina y la tangeretina. A diferencia de otros flavonoides, estos compuestos presentan una estructura altamente metoxilada que les confiere una naturaleza más apolar, que hace que se acumulen en el flavedo y en las glándulas de aceite esencial (Chen et al., 2020; Wang et al., 2017). Otros metabolitos secundarios importantes son los limonoides, que son compuestos triterpenoides, como la limonina y la nomilina, que poseen actividad contra insectos y también son responsables de la amargura en los productos procesados y tienen potencial anticarcinogénico (Gulawani, Mahajan, Waghole, & Srivastava, 2025; Saini et al., 2022; Yang et al., 2024).

Los compuestos nitrogenados de la mandarina incluyen los aminoácidos esenciales y no esenciales, así como aminas biógenas con funciones fisiológicas específicas. Los aminoácidos como el aspartato, la arginina y el GABA son abundantes en el jugo, mientras que la prolina y la prolina-betaína actúan como osmoprotectores y amortiguadores redox fundamentales en la respuesta de la planta a estreses abióticos, como la salinidad y la sequía (Maciá-Vázquez et al., 2023). Las poliaminas (putrescina, espermidina, espermina) desempeñan roles clave en el desarrollo reproductivo y en la integridad de la corteza frente a desórdenes fisiológicos (Killiny & Nehela, 2020; Maciá-Vázquez, Núñez-Gómez, Martínez-Nicolás, Legua, & Melgarejo, 2024).

La pigmentación característica del fruto se debe a una composición diversa de carotenoides, donde la beta-criptoxantina es el pigmento predominante (Lado et al., 2016). Este compuesto es precursor de la vitamina A y potente antioxidante lipofílico (Burri, 2015). Las células tienen una gran cantidad de compuestos poliméricos como

las pectinas, localizadas principalmente en el albedo y las membranas de los segmentos, agregando beneficios para la salud intestinal del consumidor (Wu et al., 2021).

En mandarinas, como en otros cítricos, la fisiología del fruto (cuajado, crecimiento del ovario, desarrollo de semillas, maduración y senescencia) depende del balance entre diferentes fitohormonas (Mesejo et al., 2013). En diferentes trabajos en mandarinas se indica que junto con azúcares, ácidos y otros metabolitos secundarios, las hormonas forman parte de los compuestos que sostienen la fisiología y el metabolismo del fruto (Bureš, Maslov Bandić, & Vlahoviček-Kahlina, 2023). En trabajos donde se comparan diferentes cultivares de mandarina con distinta capacidad de polinización, semillado y partenocarpia se indica que la capacidad de producir semillas impacta el estado hormonal de la planta y se estudia en paralelo con la expresión génica de las diferentes GA-oxidasas para entender la contribución de las giberelinas al cuajado del fruto (Bermejo et al., 2015; Talón, Zacarías, & Primo-Millo, 1990).

La biosíntesis de giberelinas comienza a partir de GGDP y mediante las enzimas copalil difosfato sintasa (CPS) y *ent*-kaureno sintasa (KS) forman el *ent*-kaureno, que posteriormente es oxidado por la *ent*-kaureno oxidasa (KO) y la ácido *ent*-kaurenoico oxidasa (KAO) para formar la primer giberelina, la GA12 (Shah, Islam, Mohammad, & Siddiqui, 2023). Desde allí la ruta se bifurca en dos ramas principales, la rama 13-no hidroxilada (13-H), donde GA12 forma la GA9 mediante la giberelina 20-oxidasa (GA20ox) y luego la 3 β -hidroxilación por la giberelina 3-oxidasa (GA3ox) para dar la GA4 (bioactiva), y por otro lado la rama 13-hidroxilada (13-OH), donde GA12 se hidroxila a GA53 y mediante sucesivas reacciones de oxidación con GA20ox y GA3ox, se llega a GA1 (bioactiva) (**Figura 2.3**) (Magome et al., 2013; Yamaguchi, 2008).

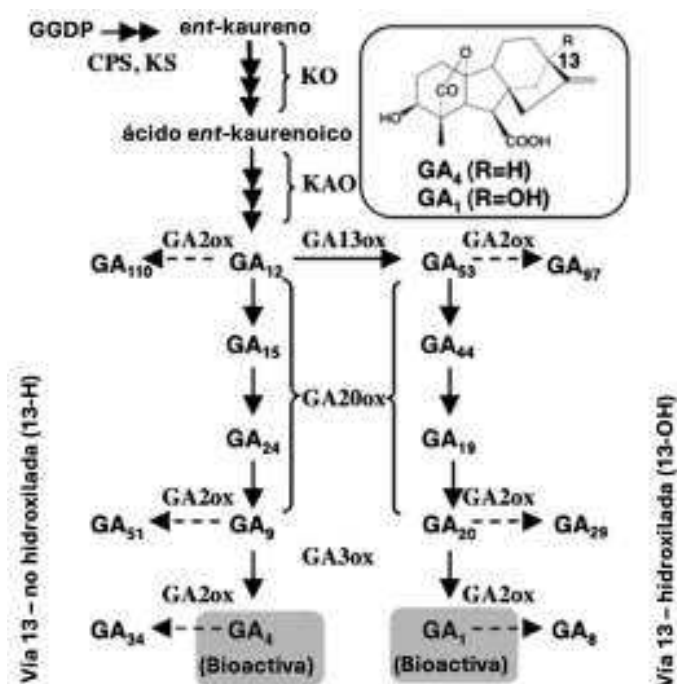


Figura 2.3 Biosíntesis de giberelinas (Magome et al., 2013).

Solo una pequeña parte de las más de 100 giberelinas conocidas es bioactiva siendo GA1 y GA4 las principales formas hormonales activas, el resto son precursoras o metabolitos inactivos de éstas (Magome et al., 2013; Yamaguchi, 2008). Sintetizar más GA1 (vía 13-OH) o más GA4 (vía 13-H) no es un detalle menor, ya que puede cambiar la señal hormonal total de la planta, y esto depende de la actividad de la GA 13-oxidasa. Cuando se bloquea esa 13-hidroxilación, disminuyen las giberelinas de la vía 13-OH GAs (GA1) y aumentan las de la vía 13-H GAs (GA4, reportada como más bioactiva que GA1), por lo que la 13-hidroxilación actúa como un mecanismo de ajuste fino de la bioactividad global y de la homeostasis de giberelinas (He et al., 2019; He, Xin, Xueting, Chu, & Wang, 2020; Magome et al., 2013; Yamaguchi, 2008).

2.11 Referencias bibliográficas

- Aksenov, A., Blacutt, A., Ginnan, N., Rolshausen, P. E., V. Melnik, A., Lotfi, A., ... Roper, M. C. (2024). Spatial chemistry of citrus reveals molecules bactericidal to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Scientific Reports*, 14(1), 20306. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70499-z>
- Aarika, K., Rajyalakshmi, R., Nalla, L. V., & Gajula, S. (2025). From Complexity to

- Clarity: Expanding Metabolome Coverage With Innovative Analytical Strategies. *Journal of Separation Science*, 48. <https://doi.org/10.1002/jssc.70099>
- Adeeyo, A., Amao, I., Ngandjui, Y. A. T., Alabi, M., & Msagati, T. (2024). Metabolic profiling of plant and other natural products: Platforms, applications and quality evaluation. *Microchemical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111779>
- Adouli, B., Zamani, Z., Fattahi-Mohgadam, M. R., Golein, B., & Rezaei, K. (2018). Effects of alternate bearing and 2,4-D application on fruit growth pattern, abscission enzymes activity, ACC content of calyx and carbohydrates partitioning of fruits in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) cv. Miyagawa. *Scientia Horticulturae*, 238, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.042>
- Ahsan, M., Mahmud, M., Saha, P., Gupta, K. D., & Siddique, Z. (2021). Effect of Data Scaling Methods on Machine Learning Algorithms and Model Performance. *Technologies*. <https://doi.org/10.3390/technologies9030052>
- Aleza, P., Cuenca, J., Juárez, J., Pina, J., & Navarro, L. (2010). “Garbí” Mandarin: A New Late- maturing Triploid Hybrid. *Hortscience*, 45, 139–141. <https://doi.org/10.21273/hortsci.45.1.139>
- Ali, S., Hameed, A., Muhae-Ud-Din, G., Ikhlaiq, M., Ashfaq, M., Atiq, M., ... Wang, Y. (2023). Citrus Canker: A Persistent Threat to the Worldwide Citrus Industry—An Analysis. *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy13041112>
- Alonso, A., Marsal, S., & Julià, A. (2015). Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>
- Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y., Contrepois, K., D’Auria, J., Ewald, J., ... Fernie, A. (2021). Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nature Methods*, 18, 747–756. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01197-1>
- Amorim, L., Cavalcanti, G., & Cruz, R. (2022). The choice of scaling technique matters for classification performance. *Appl. Soft Comput.*, 133, 109924. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2022.109924>
- Atlin, G., Cairns, J., & Das, B. (2017). Rapid breeding and varietal replacement are critical to adaptation of cropping systems in the developing world to climate change. *Global Food Security*, 12, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.01.008>
- Badar, H., Abbas, A., Mushtaq, K., Dogot, T., Lebailly, P., Parra-Acosta, Y. K., ... López-

- Carr, D. (2023). Unravelling Consumer Preferences and Segments: Implications for Pakistan's Mandarin Industry Development through Market Relocation. *Land*. <https://doi.org/10.3390/land12050953>
- Bahadur, A., & Srivastava, J. (2022). Integrated Management of Citrus Canker Disease (*Xanthomonas Axonopodis* Pv. Citri). *Diseases of Horticultural Crops*. <https://doi.org/10.1201/9781003160397-9>
- Balan, V., Mihai, C., Cojocaru, F., Uritu, C., Dodi, G., Botezat, D., & Gardikiotis, I. (2019). Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials*, 12. <https://doi.org/10.3390/ma12182884>
- Bandić, M., Vlahoviček-Kahlina, K., Bureš, S., Stracenski, K. S., Jalšenjak, N., Fruk, G., Antolkkovic, A.M., Jurić, S. (2023). Fruit Quality of Satsuma Mandarins from Neretva Valley and Their Flavonoid and Carotenoid Content. *Horticulturae*. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030383>
- Barbieri, H., Fernandes, L. S., Pontes, J., Pereira, A., & Fill, T. (2023). An overview of the most threatening diseases that affect worldwide citriculture: Main features, diagnose, and current control strategies, 2. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2023.1045364>
- Barona-Gómez, F., Chevrette, M., & Hoskisson, P. (2023). On the evolution of natural product biosynthesis. *Advances in Microbial Physiology*, 83, 309–349. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2023.05.001>
- Basualdo, M., Cavigliasso, P., De Avila, R. S., Aldea-Sánchez, P., Correa-Benítez, A., Harms, J., Ramos, A.K., Rojas-Bravo, V., Salvarrey, S. (2022). Current status and economic value of insect-pollinated dependent crops in Latin America. *Ecological Economics*. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2022.107395>
- Batista-Silva, W., Nascimento, V., Medeiros, D., Nunes-Nesi, A., Ribeiro, D., Zsögön, A., & Araújo, W. (2018). Modifications in Organic Acid Profiles During Fruit Development and Ripening: Correlation or Causation? *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01689>
- Beger, R., Goodacre, R., Jones, C., Lippa, K., Mayboroda, O., O'Neill, D., ... Dunn, W. (2024). Analysis types and quantification methods applied in UHPLC-MS metabolomics research: a tutorial. *Metabolomics*, 20. <https://doi.org/10.1007/s11306-024-02155-6>
- Benjamini, Y. (2010). Discovering the false discovery rate. *Journal of the Royal*

- Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 72.
<https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2010.00746.x>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*, 57, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Benjamini, Y., & Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics*, 29, 1165–1188.
<https://doi.org/10.1214/aos/1013699998>
- Berg, R., Hoefsloot, H., Westerhuis, J., Smilde, A., & Werf, M. (2006). UvA-DARE (Digital Academic Repository) Centering , scaling and transformations : improving the biological information content of metabolomics data.
- Bermejo, A., Primo-Millo, E., Agustí, M., Mesejo, C., Reig, C., & Iglesias, D. (2015). Hormonal Profile in Ovaries of Mandarin Varieties with Differing Reproductive Behaviour. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 584–594.
<https://doi.org/10.1007/s00344-015-9492-y>
- Bermejo, A., Pardo, J. M., Morales, J., & Cano, A. (2016). Comparative Study of Bioactive Components and Quality from Juices of Different Mandarins: Discriminant Multivariate Analysis of Their Primary and Secondary Metabolites. *Agricultural Sciences*, 07, 341–351. Retrieved from
<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:100553537>
- Bhusal, S., Acharya, B., Adhikari, S., Giri, H., Adhikari, D., Shrestha, S., Shrestha, A. (2025). Effect of Storage Conditions and Plastic Packaging on Postharvest Quality of Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco.) in Dhankuta, Nepal. *International Journal of Horticulture, Agriculture and Food Science*, 9.
- Bingol, K., & Brüscheweiler, R. (2014). Multidimensional approaches to NMR-based metabolomics. *Analytical Chemistry*, 86 1, 47–57.
<https://doi.org/10.1021/ac403520j>
- Blaise, B., Correia, G., Haggart, G., Surowiec, I., Sands, C., Lewis, M., Pearce, J., Trygg, J., Nicholson, J., Holmes, E., Ebbels, T. (2021). Statistical analysis in metabolic phenotyping. *Nature Protocols*, 16, 4299–4326. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00579-1>
- Boccard, J., González-Ruiz, V., Codesido, S., & Rudaz, S. (2020). Chapter 21 - Mass

- spectrometry metabolomic data handling for biomarker discovery. In H. J. Issaq & T. D. B. T.-P. and M. A. to B. D. (Second E. Veenstra (Eds.) (pp. 369–388). Boston: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818607-7.00021-9>
- Bodah, E. (2017). Root Rot Diseases in Plants: A Review of Common Causal Agents and Management Strategies, 5. <https://doi.org/10.19080/artoaj.2017.05.555661>
- Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S. N., Kuligowski, J., Wilson, I. D., Lewis, M. R., & Dunn, W. B. (2018). Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society*, 14(6), 72. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>
- Broeckling, C., Beger, R., Cheng, L., Cumeras, R., Cuthbertson, D., Dasari, S., Mosley, J. (2023). Current Practices in LC-MS Untargeted Metabolomics: A Scoping Review on the Use of Pooled Quality Control Samples. *Analytical Chemistry*, 95, 18645–18654. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02924>
- Budiyati, E., Rejeki, S., & Zamzami, L. (2021). Analysis of consumer preferences for 5 varieties of mandarins. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 803. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/803/1/012055>
- Bureš, M. S., Maslov Bandić, L., & Vlahoviček-Kahlina, K. (2023). Determination of Bioactive Components in Mandarin Fruits: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 53(7), 1489–1514. <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2035209>
- Burri, B. (2015). Beta-cryptoxanthin as a source of vitamin A. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 9, 1786–1794. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6942>
- Cantuarias-Avilés, T., Filho, F., Stuchi, E., Da Silva, S. R., & Espinoza-Núñez, E. (2010). Tree performance and fruit yield and quality of ‘Okitsu’ Satsuma mandarin grafted on 12 rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 123, 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.020>
- Cao, J., Jiang, Q., Chen, Y., Xu, S., Wu, J., Wang, Y., & Sun, C. (2024). The effects of controlled freezing-point storage on the postharvest quality of satsuma mandarin. *Journal of Future Foods*. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2024.05.006>
- Çebi, N., Bekiroğlu, H., & Erarslan, A. (2023). Nondestructive Metabolomic Fingerprinting: FTIR, NIR and Raman Spectroscopy in Food Screening. *Molecules*, 28. <https://doi.org/10.3390/molecules28237933>

- Chanvatik, S., Donnua, S., Lekagul, A., Kaewkhankhaeng, W., Vongmongkol, V., Athipunyakom, P., Tangcharoensathien, V. (2019). Antibiotic use in mandarin production (*Citrus reticulata* Blanco) in major mandarin-producing areas in Thailand: A survey assessment. *PLoS ONE*, 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225172>
- Chaulagai, B., & Shrestha, P. (2022). A review on economic impact of citrus greening on Mandarin production in Nepal. *International Journal of Horticulture and Food Science*. <https://doi.org/10.33545/26631067.2022.v4.i2c.153>
- Chen, L., Lu, W., Wang, L., Xing, X., Chen, Z., Teng, X., ... Rabinowitz, J. D. (2021). Metabolite discovery through global annotation of untargeted metabolomics data. *Nature Methods*, 18(11), 1377–1385. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01303-3>
- Chen, Q., Wang, D., Tan, C.-J., Hu, Y., Sundararajan, B., & Zhou, Z. (2020). Profiling of Flavonoid and Antioxidant Activity of Fruit Tissues from 27 Chinese Local Citrus Cultivars. *Plants*, 9. <https://doi.org/10.3390/plants9020196>
- Chen, Yang, Li, E.-M., & Xu, L.-Y. (2022). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>
- Chen, Yiqun, Yi, L., Zhong, K., Wang, C., Chen, B., & Li, S. (2023). Population genetic characteristics of citrus tristeza virus from wild mandarins in the Nanling Mountains of China. *Tropical Plant Pathology*, 48, 270–282. <https://doi.org/10.1007/s40858-023-00567-8>
- Ciasca, B., Lanubile, A., Marocco, A., Pascale, M., Logrieco, A., & Lattanzio, V. (2020). Application of an Integrated and Open Source Workflow for LC-HRMS Plant Metabolomics Studies. Case-Control Study: Metabolic Changes of Maize in Response to *Fusarium verticillioides* Infection. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00664>
- Ciocan, A., Tecuceanu, V., Enache-Preoteasa, C., Mitoi, E., Helepciuc, F., Dimov, T., ... Cogălniceanu, G. (2023). Phenological and Environmental Factors' Impact on Secondary Metabolites in Medicinal Plant *Cotinus coggygria* Scop. *Plants*, 12. <https://doi.org/10.3390/plants12091762>
- Conesa, M., García-Salinas, M., Rosa, J., Fernández-Trujillo, J., Domingo, R., & Pérez-Pastor, A. (2014). Effects of deficit irrigation applied during fruit growth period of late mandarin trees on harvest quality, cold storage and subsequent shelf-life.

- Scientia Horticulturae*, 165, 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.023>
- Conesa, M., Rosa, J., Fernández-Trujillo, J., Domingo, R., & Pérez-Pastor, A. (2018). Deficit irrigation in commercial mandarin trees: water relations, yield and quality responses at harvest and after cold storage. *Spanish Journal of Agricultural Research*. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018163-12631>
- Cristofani-Yaly, M., Dezotti, A. L., Cavichioli, T., Roverssi, F., Novelli, V., & Bastianel, M. (2024). Genetic Characterization and Fruit Quality Analysis of New Mandarin Hybrids. *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy14112666>
- Crook, A., & Powers, R. (2020). Quantitative NMR-Based Biomedical Metabolomics: Current Status and Applications. *Molecules*, 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25215128>
- Da Cruz, M. A., Neves, C., De Carvalho, D., Colombo, R., Bai, J., Yada, I., ... Tazima, Z. (2021). Five Rootstocks for “Emperor” Mandarin Under Subtropical Climate in Southern Brazil. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.777871>
- Da Cunha, B. R., Fonseca, L., & Calado, C. (2020). Metabolic Fingerprinting with Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy: Towards a High-Throughput Screening Assay for Antibiotic Discovery and Mechanism-of-Action Elucidation. *Metabolites*, 10. <https://doi.org/10.3390/metabo10040145>
- Dahal, B., Pant, C., Bhusal, N., Koirala, R., & Niraula, R. (2021). Farmer's perception on mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) disease in gorkha, Nepal. Socio Economy and policy studies. <https://doi.org/10.26480/seps.02.2021.52.55>
- Danish, S., Gał, A., Zaka, S., Atif, S., Naqvi, H., Wang, J., ... Datta, R. (2022). Citrus Canker—Distribution, Taxonomy, Epidemiology, Disease Cycle, Pathogen Biology, Detection, and Management: A Critical Review and Future Research Agenda. *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051075>
- Das, S., Sharma, A., & Manshad, S. (2024). Crop improvement in citrus: A review. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*. <https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v8.i7sf.1536>
- de Carvalho, S. A., de Carvalho Nunes, W. M., Belasque, J., Machado, M. A., Croce-Filho, J., Bock, C. H., & Abdo, Z. (2014). Comparison of Resistance to Asiatic Citrus Canker Among Different Genotypes of Citrus in a Long-Term Canker-Resistance Field Screening Experiment in Brazil. *Plant Disease*, 99(2), 207–218.

- <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0384-RE>
- De Moura, P. H. B., Leleu, G., Da Costa, G., Marti, G., Pétriacq, P., Fonayet, J. V., & Richard, T. (2025). Integrating NMR and MS for Improved Metabolomic Analysis: From Methodologies to Applications. *Molecules*, 30. <https://doi.org/10.3390/molecules30122624>
- De Souza, L. P., Alseekh, S., Naake, T., & Fernie, A. (2019). Mass Spectrometry-Based Untargeted Plant Metabolomics. *Current Protocols in Plant Biology*, 4 4. <https://doi.org/10.1002/cppb.20100>
- Debik, J., Sangermani, M., Wang, F., Madssen, T., & Giskeødegård, G. (2021). Multivariate analysis of NMR-based metabolomic data. *NMR in Biomedicine*, 35. <https://doi.org/10.1002/nbm.4638>
- Delafield, D. G., Lu, G., Kaminsky, C. J., & Li, L. (2022). High-end ion mobility mass spectrometry: A current review of analytical capacity in omics applications and structural investigations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 157, 116761. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116761>
- Di Guida, R., Engel, J., Allwood, J., Weber, R., Jones, M., Sommer, U., ... Dunn, W. (2016). Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling. *Metabolomics*, 12. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1030-9>
- Djande, C. H., Piater, L., Steenkamp, P., Tugizimana, F., & Dubery, I. (2021). A Metabolomics Approach and Chemometric Tools for Differentiation of Barley Cultivars and Biomarker Discovery. *Metabolites*, 11. <https://doi.org/10.3390/metabo11090578>
- Djande, C. H., Pretorius, C., Tugizimana, F., Piater, L., & Dubery, I. (2020). Metabolomics: A Tool for Cultivar Phenotyping and Investigation of Grain Crops. *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060831>
- do Prado Aparecido, R., Carlos, E. F., Lião, L. M., Vieira, L. G. E., & Alcantara, G. B. (2017). NMR-based metabolomics of transgenic and non-transgenic sweet orange reveals different responses in primary metabolism during citrus canker development. *Metabolomics*, 13(2), 20. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1163-5>
- Dudzik, D., Barbas-Bernardos, C., García, A., & Barbas, C. (2018). Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. *Journal of*

- Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 149.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.044>
- Dunn, W., Erban, A., Weber, R., Creek, D., Brown, M., Breitling, R., ... Viant, M. (2012). Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, 9, 44–66. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0434-4>
- El-Shemy, M. (2019). Pre and Post-Harvest Treatments to Improve Ponkan Mandarin Fruits Quality 1. Maintaining Fruit Quality during Cold Storage. *Journal of Plant Production*. <https://doi.org/10.21608/jpp.2019.62511>
- Elguoshy, A., Zedan, H., & Saito, S. (2025). Machine Learning-Driven Insights in Cancer Metabolomics: From Subtyping to Biomarker Discovery and Prognostic Modeling. *Metabolites*, 15. <https://doi.org/10.3390/metabo15080514>
- Elshafie, H., Camele, I., & Mohamed, A. (2023). A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24043266>
- Emwas, A.-H., Roy, R., McKay, R., Tenori, L., Saccenti, E., Gowda, G., ... Wishart, D. (2019). NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*, 9. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
- Erb, M., & Kliebenstein, D. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiology*, 184, 39–52. <https://doi.org/10.31219/osf.io/6ba7r>
- Euceda, L., Giskeødegård, G., & Bathen, T. (2015). Preprocessing of NMR metabolomics data. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 75, 193–203. <https://doi.org/10.3109/00365513.2014.1003593>
- Feng, S., Niu, L., Suh, J. H., Hung, W.-L., & Wang, Y. (2018). Comprehensive Metabolomics Analysis of Mandarins (*Citrus reticulata*) as a Tool for Variety, Rootstock, and Grove Discrimination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(39), 10317–10326. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03877>
- Ference, C., Gochez, A., Behlau, F., Wang, N., Graham, J., & Jones, J. (2018). Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. *Molecular Plant Pathology*, 19 6, 1302–1318. <https://doi.org/10.1111/mpp.12638>
- Fernández-Echeverría, E., Lavoignet-Ruiz, M., García-Santamaría, L. E., Fernández-

- Lambert, G., Ruvalcaba-Sánchez, L., Bautista-Santos, H., ... Romero-Romero, Y. (2024). Management of Citrus Cultivation in Emerging Rural Communities in Mexico: Practices and Challenges in the Central-Northern Region of Veracruz. *Sustainability*. <https://doi.org/10.3390/su16208732>
- Fiehn, O. (2016). Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, 114, 30.4.1-30.4.32. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>
- Fraga-Corral, M., Carpena, M., García-Oliveira, P., Pereira, A., Prieto, M., & Simal-Gándara, J. (2020). Analytical Metabolomics and Applications in Health, Environmental and Food Science. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52, 712–734. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1823811>
- Gaffar, F. (2023). RNA-based disease control of citrus canker caused by *Xanthomonas*: challenges and perspectives. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 130, 947–960. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00770-4>
- Gal, J., Bailleux, C., Chardin, D., Pourcher, T., Gilhodes, J., Jing, L., ... Chimorey, E. (2020). Comparison of unsupervised machine-learning methods to identify metabolomic signatures in patients with localized breast cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1509–1524. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.05.021>
- Gámbaro, A., Roascio, A., Hodos, N., Miguez, I., Lado, J., Heinzen, H., & Rivas, F. (2021). The impact of sensory attributes of mandarins on consumer perception and preferences. *Journal of Agriculture and Food Research*, 6, 100196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100196>
- Gertsman, I., & Barshop, B. (2018). Promises and pitfalls of untargeted metabolomics. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41, 355–366. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0130-7>
- Ghafari, N., & Sleno, L. (2024). Challenges and recent advances in quantitative mass spectrometry-based metabolomics. *Analytical Science Advances*, 5. <https://doi.org/10.1002/ansa.202400007>
- Ghosh, T., Zhang, W., Ghosh, D., & Kechris, K. (2020). Predictive Modeling for Metabolomics Data. *Methods in Molecular Biology*, 2104, 313–336. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_16
- Gibon, Y., & Rolin, D. (2011). Aspects of experimental design for plant metabolomics

- experiments and guidelines for growth of plant material. *Methods in Molecular Biology*, 860, 13–30. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-594-7_2
- Giménez-Sanchis, A., Tárrega, A., Tarancón, P., Aleza, P., & Besada, C. (2021). Check-All-That-Apply Questions including the Ideal Product as a Tool for Selecting Varieties in Breeding Programs. A Case Study with Mandarins. *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112243>
- Goldenberg, L., Yaniv, Y., Porat, R., & Carmi, N. (2018). Mandarin fruit quality: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98 1, 18–26. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8495>
- Gosal, S. R., Khobarkar, V., More, G., Dangore, U., Shende, N., & Bharad, S. (2024). Comparative economics of high density planting under Indo-Israel production technology and conventional method of Nagpur mandarin cultivation in Amravati district of Maharashtra. *International Journal of Agriculture Extension and Social Development*. <https://doi.org/10.33545/26180723.2024.v7.i8c.909>
- Gowda, G. N., & Raftery, D. (2015). Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *Journal of Magnetic Resonance*, 260, 144–160. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2015.07.014>
- Gowda, G. N., & Raftery, D. (2022). Quantitative NMR Methods in Metabolomics. *Handbook of Experimental Pharmacology*. https://doi.org/10.1007/164_2022_612
- Griebeler, S. R., Gonzatto, M., Böettcher, G. N., Schneider, L. A., Da Silva Santos, R. A., De Araujo Mariath, J., & Schwarz, S. F. (2025). Reducing Flowering with Successive Applications and Different Concentrations of Gibberellic Acid in Alternate Bearing ‘Rainha’ Mandarin. *Applied Fruit Science*, 67. <https://doi.org/10.1007/s10341-025-01512-6>
- Griebeler, S. R., Gonzatto, M., Böettcher, G. N., & Schwarz, S. (2023). Successive applications of gibberellic acid in alternate bearing mandarins. *Revista Brasileira de Fruticultura*. <https://doi.org/10.1590/0100-29452023445>
- Grigalunas, M., Brakmann, S., & Waldmann, H. (2022). Chemical Evolution of Natural Product Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 144, 3314–3329. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c11270>
- Grissa, D., Pétéra, M., Brandolini, M., Napoli, A., Comte, B., & Pujos-Guillot, E. (2016). Feature Selection Methods for Early Predictive Biomarker Discovery Using Untargeted Metabolomic Data. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3.

- <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00030>
- Gromski, P., Muhamadali, H., Ellis, D., Xu, Y., Correa, E., Turner, M., & Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis--a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*, 879, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>
- Gulawani, S., Mahajan, S., Waghole, R. J., & Srivastava, P. (2025). Comprehensive metabolic profiling of Mandarin Peel different extracts obtained by conventional and green methods by Sciex LC-MS/MS-Qtrap. *Journal of Food Composition and Analysis*, 140, 107254. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.107254>
- Guo, J., & Huan, T. (2020). Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 92(12), 8072–8080. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05135>
- Hackshaw, K., Miller, J., Aykas, D., & Rodriguez-Saona, L. (2020). Vibrational Spectroscopy for Identification of Metabolites in Biologic Samples. *Molecules*, 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25204725>
- Haim, D., Kamara, I., Morozov, M., & Sadka, A. (2025). Gibberellin Treatment Toward Off-crop Season as a Practical Tool to Increase Yield in ‘Orri’ Mandarin. *HortScience*. <https://doi.org/10.21273/hortsci18228-24>
- Haim, D., Pochamreddy, M., Doron-Faigenboim, A., Kamara, I., Ben-Ari, G., & Sadka, A. (2025). Auxin treatment reduces inflorescences number and delays bud development in the alternate bearing Citrus cultivar Murcott mandarin. *Tree Physiology*. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaf009>
- Hajnajafi, K., & Iqbal, M. A. (2025). Mass-spectrometry based metabolomics: an overview of workflows, strategies, data analysis and applications. *Proteome Science*, 23(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12953-025-00241-8>
- Hao, Y., Zhang, Z., Luo, E., Yang, J., & Wang, S. (2025). Plant metabolomics: applications and challenges in the era of multi-omics big data. *ABIOTECH*, 6, 116–132. <https://doi.org/10.1007/s42994-024-00194-0>
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68 22-24, 2831–2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- He, Jiaxian, Qin, Z., Liu, K., Li, X., Kou, Y., Jin, Z., ... Wang, Z. (2024). Volatile

- metabolomics and transcriptomics analyses provide insights into the mechanism of volatile changes during fruit development of ‘Ehime 38’ (*Citrus reticulata*) and its bud mutant. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1430204>
- He, Juan, Chen, Q., Xin, P., Yuan, J., Yihua, Wang, X., ... Wang, G. (2019). CYP72A enzymes catalyze 13-hydrolyzation of gibberellins. *Nature Plants*, 5, 1057–1065. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0511-z>
- He, Juan, Xin, P., Xueting, Chu, J., & Wang, G. (2020). Gibberellin Metabolism in Flowering Plants: An Update and Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00532>
- He, Yizhong, Han, J., Liu, R., Ding, Y., Wang, J., Sun, L., ... Cheng, Y. (2018). Integrated transcriptomic and metabolomic analyses of a wax deficient citrus mutant exhibiting jasmonic acid-mediated defense against fungal pathogens. *Horticulture Research*, 5. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0051-0>
- He, Yunyun, Junker, R., Xiao, J., Lasky, J., Cao, M., Asefa, M., ... Sedio, B. (2025). Genetic and environmental drivers of intraspecific variation in foliar metabolites in a tropical tree community. *New Phytologist*, 246. <https://doi.org/10.1111/nph.70146>
- Herranz, M. C., Navarro, J. A., Locascio, A., Peña, L., Manzanares, P., Marcos, J. F., & Pallás, V. (2024). Comparative metabolomic analysis of the phloem sap of nine citrus relatives with different degrees of susceptibility to Huanglongbing disease. *European Journal of Plant Pathology*, 170(3), 463–478. <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02910-4>
- Hong, H. R., Oh, E., Han, S. G., Yun, S., Kim, H. B., & Song, K. (2024). Characterizing the Metabolic Regulation of Organic Acids in the Fruits of ‘Minihyang’ Mandarin at Different Developmental Stages and on Different Rootstocks. *Horticultural Science and Technology*. <https://doi.org/10.7235/hort.20240042>
- Hong, J., Yang, L., Zhang, D., & Shi, J. (2016). Plant Metabolomics: An Indispensable System Biology Tool for Plant Science. *International Journal of Molecular Sciences*, 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17060767>
- House, L., Gao, Z., Spreen, T., Gmitter, F., Valim, M., Plotto, A., & Baldwin, E. (2011). Consumer Preference for Mandarins: Implications of a Sensory Analysis. *Agribusiness*, 27, 450–464. <https://doi.org/10.1002/agr.20275>
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production.

- Biological Research*, 52. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Jacyna, J., Kordalewska, M., & Markuszewski, M. (2019). Design of Experiments in metabolomics-related studies: An overview. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, 598. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.027>
- Jeppesen, M., & Powers, R. (2023). Multiplatform Untargeted Metabolomics. *Magnetic Resonance in Chemistry : MRC*. <https://doi.org/10.1002/mrc.5350>
- Jorge, T., Rodrigues, J., Caldana, C., Schmidt, R., Van Dongen, J., Thomas-Oates, J., & António, C. (2016). Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrometry Reviews*, 35 5, 620–649. <https://doi.org/10.1002/mas.21449>
- Joshi, Y., Neupane, M., Pandey, K., & Khatri, S. (2023). Constraints determination and financial analysis of mandarin production in Darchula district, Nepal. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2023-07.16>
- Karakas, E., Bulut, M., & Fernie, A. (2025). Metabolome guided treasure hunt - learning from metabolic diversity. *Journal of Plant Physiology*, 309, 154494. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2025.154494>
- Karaman, I. (2017). Preprocessing and Pretreatment of Metabolomics Data for Statistical Analysis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 965, 145–161. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8_6
- Karaman, I., Pinto, R., & Graça, G. (2018). Metabolomics Data Preprocessing: From Raw Data to Features for Statistical Analysis, 82, 197–225. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2018.08.003>
- Katam, R., Lin, C.-Y., Grant, K., Katam, C., & Chen, S. (2022). Advances in Plant Metabolomics and Its Applications in Stress and Single-Cell Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23136985>
- Kellogg, J., Kvalheim, O., & Cech, N. (2020). Composite score analysis for unsupervised comparison and network visualization of metabolomics data. *Analytica Chimica Acta*, 1095, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.029>
- Khanal, A., Timilsina, S., Aryal, S., Khanal, S., & Lamsal, M. (2023). Post-harvest study of mandarin in cold storage condition and ambient condition at Syangja, Nepal. *International Journal of Horticulture and Food Science*. <https://doi.org/10.33545/26631067.2023.v5.i2a.172>

- Khare, S., Singh, N., Singh, A., Hussain, I., Niharika, K., Yadav, V., ... Amist, N. (2020). Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. *Journal of Plant Biology*, 63, 203–216. <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09245-7>
- Killiny, N., & Nehela, Y. (2020). Citrus Polyamines: Structure, Biosynthesis, and Physiological Functions. *Plants*, 9. <https://doi.org/10.3390/plants9040426>
- Kim, S., Kim, H., Park, K., Kang, S.-B., Park, Y., Han, S.-G., ... Kim, D.-S. (2022). Metabolomic Profiling of Citrus unshiu during Different Stages of Fruit Development. *Plants*, 11. <https://doi.org/10.3390/plants11070967>
- Kirwan, J., Gika, H., Beger, R., Bearden, D., Dunn, W., Goodacre, R., ... Wilson, I. (2022). Quality assurance and quality control reporting in untargeted metabolic phenotyping: mQACC recommendations for analytical quality management. *Metabolomics*, 18. <https://doi.org/10.1007/s11306-022-01926-3>
- Kulyan, R. (2019). Economic and biological characteristics of new promising forms of mandarin (*Citrus reticulata* var. unshiu Tan.). *The Agrarian Scientific Journal*. <https://doi.org/10.28983/asj.y2019i8pp24-28>
- Labarrère, B., Prinzing, A., Dorey, T., Chesneau, E., & Hennion, F. (2019). Variations of Secondary Metabolites among Natural Populations of Sub-Antarctic *Ranunculus* Species Suggest Functional Redundancy and Versatility. *Plants*, 8. <https://doi.org/10.3390/plants8070234>
- Lachman, J., Tacsir, E., & Pereyra, M. (2022). Public–private cooperation and the provision of public goods for lemons and citrus exports from Argentina and Uruguay. *Journal of Agribusiness in Developing and Emerging Economies*. <https://doi.org/10.1108/jadee-11-2021-0274>
- Lado, J., Cuellar, F., Rodrigo, M., & Zacarias, L. (2016). Nutritional Composition of Mandarins, 419–443. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-408117-8.00018-0>
- Lado, J., Gambetta, G., & Zacarias, L. (2018). Key determinants of citrus fruit quality: Metabolites and main changes during maturation. *Scientia Horticulturae*, 233(January), 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.055>
- Lelli, V., Belardo, A., & Timperio, A. (2021). From Targeted Quantification to Untargeted Metabolomics. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96852>
- Letertre, M., Giraudeau, P., & De Tullio, P. (2021). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Clinical Metabolomics and Personalized Medicine: Current

- Challenges and Perspectives. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.698337>
- Liao, L., Dong, T., Qiu, X., Rong, Y., Wang, Z., & Zhu, J. (2019). Nitrogen nutrition is a key modulator of the sugar and organic acid content in citrus fruit. *PLoS ONE*, 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223356>
- Liberda, D., Pięta, E., Pogoda, K., Piergies, N., Roman, M., Koziol, P., ... Kwiatek, W. (2021). The Impact of Preprocessing Methods for a Successful Prostate Cell Lines Discrimination Using Partial Least Squares Regression and Discriminant Analysis Based on Fourier Transform Infrared Imaging. *Cells*, 10. <https://doi.org/10.3390/cells10040953>
- Liland, K. (2011). Multivariate methods in metabolomics – from pre-processing to dimension reduction and statistical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 827–841. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.007>
- Lin, Q., Wang, C., Dong, W., Jiang, Q., Wang, D., Li, S., ... Chen, K. (2015). Transcriptome and metabolome analyses of sugar and organic acid metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during fruit maturation. *Gene*, 554(1), 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.10.025>
- Liu, H., Long, C., Fu, X., Wang, S., Lou, Y., Dong, J., ... Zhou, X.-Y. (2025). Comparative Global Metabolome Profile and Transcriptome Sequence Analysis of the Rough and Smooth Peel of the Orah Mandarin (*Citrus reticulata*). *Horticulturae*. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11050496>
- Liu, L., Liu, X., Liu, L., Zhu, T., Ye, R., Chen, H., ... Deng, Z. (2024). Clarification of the infection pattern of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on citrus fruit by artificial inoculation. *Plant Methods*, 20. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01190-7>
- Liu, X., & Locasale, J. (2017). Metabolomics: A Primer. *Trends in Biochemical Sciences*, 42 4, 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.004>
- Lujambio, M. I. C., Pellicer, M. N. S., & Lado, J. (2023). Assessment of the environmental sustainability of citrus production in Uruguay using life cycle analysis. *Agrociencia Uruguay*. <https://doi.org/10.31285/agro.27.1454>
- Luo, P., Dai, W., Yin, P., Zeng, Z., Kong, H., Zhou, L., ... Xu, G. (2015). Multiple Reaction Monitoring-Ion Pair Finder: A Systematic Approach To Transform Nontargeted Mode to Pseudotargeted Mode for Metabolomics Study Based on Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 87(10), 5050–

5055. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00615>
- Maciá-Vázquez, A. A., Núñez-Gómez, D., Martínez-Nicolás, J. J., Legua, P., & Melgarejo, P. (2024). Mandarin Variety Significantly Affects the Metabolites Present in the Leaves. *Horticulturae*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/horticulturae10040359>
- Maciá-Vázquez, A., Núñez-Gómez, D., Martínez-Nicolás, J., Legua, P., & Melgarejo, P. (2023). Morphological and Biochemical Characterization of Late-Season Varieties of Mandarin Growing in Spain under Homogeneous Growing Conditions. *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071825>
- Magome, H., Nomura, T., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Ohnishi, T., Shinma, Y., ... Yamaguchi, S. (2013). CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(5), 1947–1952. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215788110>
- Manickam, S., Rajagopalan, V., Kambale, R., Rajasekaran, R., Kanagarajan, S., & Muthurajan, R. (2023). Plant Metabolomics: Current Initiatives and Future Prospects. *Current Issues in Molecular Biology*, 45, 8894–8906. <https://doi.org/10.3390/cimb45110558>
- Manzoor, M., Hussain, S., Anjum, M., Naseer, M., Ahmad, R., & Ziogas, V. (2023). Effects of Harvest Time on the Fruit Quality of Kinnow and Feutrell's Early Mandarins (Citrus reticulata Blanco). *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030802>
- Marchev, A., Vasileva, L., Amirova, K., Savova, M., Balcheva-Sivenova, Z., & Georgiev, M. (2021). Metabolomics and health: from nutritional crops and plant-based pharmaceuticals to profiling of human biofluids. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 78, 6487–6503. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03918-3>
- Märtens, A., Holle, J., Mollenhauer, B., Wegner, A., Kirwan, J., & Hiller, K. (2023). Instrumental Drift in Untargeted Metabolomics: Optimizing Data Quality with Intrastudy QC Samples. *Metabolites*, 13. <https://doi.org/10.3390/metabo13050665>
- Martínez-Alcántara, B., Iglesias, D., Reig, C., Mesejo, C., Agustí, M., & Primo-Millo, E. (2015). Carbon utilization by fruit limits shoot growth in alternate-bearing citrus trees. *Journal of Plant Physiology*, 176, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.001>
- Martínez Pérez, J. A., & Pérez Martin, P. S. (2023). La curva ROC. *Medicina de Familia*.

- SEMERGEN*, 49(1). <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2022.101821>
- Martins, M., Caldana, C., Wolf, L., & De Abreu, L. (2018). The Importance of Experimental Design, Quality Assurance, and Control in Plant Metabolomics Experiments. *Methods in Molecular Biology*, 1778, 3–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7819-9_1
- Mashabela, M., Masamba, P., & Kappo, A. (2022). Metabolomics and Chemoinformatics in Agricultural Biotechnology Research: Complementary Probes in Unravelling New Metabolites for Crop Improvement. *Biology*, 11. <https://doi.org/10.3390/biology11081156>
- Mashabela, M., Masamba, P., & Kappo, A. (2023). Applications of Metabolomics for the Elucidation of Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Special Focus on Osmotic Stress and Heavy Metal Toxicity. *Plants*, 12. <https://doi.org/10.3390/plants12020269>
- Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Balasch, S., Primo-Millo, E., & Agustí, M. (2020). Mechanical pruning attenuates alternate bearing in ‘Nadorcott’ mandarin. *Scientia Horticulturae*, 261, 108993. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108993>
- Mesejo, C., Yuste, R., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Iglesias, D., Primo-Millo, E., & Agustí, M. (2013). Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (*Citrus clementina*). *Physiologia Plantarum*, 148 1, 87–96. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01697.x>
- Migues, I., Hodos, N., Moltini, A. I., Gámbaro, A., Rivas, F., Moyna, G., & Heinzen, H. (2021). 1H NMR metabolic profiles as selection tools of new mandarin cultivars based on fruit acceptability. *Scientia Horticulturae*, 287, 110262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110262>
- Minitab, L. L. C. (n.d.). Validación cruzada en la regresión PLS. Retrieved from <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/help-and-how-to/statistical-modeling/regression/supporting-topics/partial-least-squares-regression/cross-validation-in-pls-regression/>
- Mosley, J., Schock, T., Beecher, C., Dunn, W., Kuligowski, J., Lewis, M., ... Zanetti, K. (2024). Establishing a framework for best practices for quality assurance and quality control in untargeted metabolomics. *Metabolomics*, 20. <https://doi.org/10.1007/s11306-023-02080-0>
- Moura, V. S., Verruma-Bernardi, M. R., Rodrigues, J., Cristofani-Yaly, M., De Azevedo, F. A., & Bastianel, M. (2025). Evaluation of pre-selected mandarin hybrids based on

- tolerance to alternaria brow spot, physicochemical characteristics and acceptability. *Frontiers in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.3389/frfst.2025.1507538>
- Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M., Primo-Millo, E., Agustí, M., & Iglesias, D. (2011). Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing “Moncada” mandarin. *Annals of Botany*, 108 3, 511–519. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr164>
- Nagana Gowda, G. A., & Raftery, D. (2021). NMR-Based Metabolomics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1280, 19–37. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9_2
- Nash, W., & Dunn, W. (2019). From mass to metabolite in human untargeted metabolomics: Recent advances in annotation of metabolites applying liquid chromatography-mass spectrometry data. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.022>
- Nasreen, R. (2020). Citrus Canker: Developments down the lane. *Annals of plant and soil research*. <https://doi.org/10.47815/apsr.2020.10011>
- Nawaz, R., Babar, Z. U., Saba, I., Shah, A. A., Abbas, T., Elansary, H. O., ... Imran, S. (2024). Morpho-physiological and biochemical characterization of Kinnow (Citrus reticulata) in response to canker pathogens (Xanthomonas axonopodis pv. citri). *Scientific Reports*, 14(1), 17315. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68257-2>
- Nawaz, R., Ghani, A., Nadeem, M., Abbas, T., Shah, A. A., Shaffique, S., ... Moussa, I. (2024). Comparative mineral and biochemical characterization of Citrus reticulata fruits and leaves to citrus canker pathogens, Xanthomonas axonopodis. *BMC Plant Biology*, 24. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05075-8>
- Naz, S., Vallejo, M., García, A., & Barbas, C. (2014). Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of Chromatography. A*, 1353, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.071>
- Neff, E. (2019, February 3). Citrus Breeding in Uruguay. Retrieved from <https://citrusindustry.net/2019/01/04/citrus-breeding-in-uruguay/>
- Neumann, S., Meier, R., Wenk, M., Elapavalore, A., Nishioka, T., Schulze, T., ... Schymanski, E. L. (2026). MassBank: an open and FAIR mass spectral data resource. *Nucleic Acids Research*, 54(D1), D601–D606. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf1193>

- Neves, C. G., Amaral, D., Paula, M., De Nascimento, L. S., Costantino, G., Passos, O., ... Micheli, F. (2018). Characterization of tropical mandarin collection: Implications for breeding related to fruit quality. *Scientia Horticulturae*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.022>
- Neves, M., Trombin, V. G., Marques, V., & Martinez, L. F. (2020). Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. *Tropical Plant Pathology*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00378-1>
- Niculau, E. D. S., Ferreira, D., Rodrigues-Filho, E., Behlau, F., Magnani, R. F., Toffano, L., ... Silva, M. F. das G. F. da. (2022). MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Diagnosis of Citrus Canker Caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(24). <https://doi.org/10.3390/molecules27248947>
- Nishikawa, F., Iwasaki, M., Fukamachi, H., & Matsumoto, H. (2015). The Effect of Fruit Bearing on Low-molecular-weight Metabolites in Stems of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *The Horticulture Journal*, 85, 23–29. <https://doi.org/10.2503/hortj.mi-044>
- Nyamundanda, G., Brennan, L., & Gormley, I. (2010). Probabilistic principal component analysis for metabolomic data. *BMC Bioinformatics*, 11, 571. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-571>
- Ocampos, F. M. M., de Souza, A. J. B., Ribeiro, G. H., Almeida, L. S., Cônsolo, N. R. B., & Colnago, L. A. (2024). NMR-based plant metabolomics protocols: a step-by-step guide. *Frontiers in Natural Products*, Volume 3-2024. <https://doi.org/10.3389/fntpr.2024.1414506>
- Oh, S., Imran, M., Kim, E.-H., Park, S., Lee, S.-G., Park, H.-M., ... Ryu, T.-H. (2023). Approach strategies and application of metabolomics to biotechnology in plants. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1192235>
- Omura, M., & Shimada, T. (2016). Citrus breeding, genetics and genomics in Japan. *Breeding Science*, 66(1), 3–17. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.66.3>
- Pariyar, B., & Goswami, B. (2023). Yield Constraints of Sikkim Mandarin (*Citrus reticulata*) and Possible Management Strategies: A Review. *Journal of Scientific Research and Reports*. <https://doi.org/10.9734/jsrr/2023/v29i81768>
- Patti, G. (2011). Separation strategies for untargeted metabolomics. *Journal of Separation Science*, 34 24, 3460–3469. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100532>
- Pérez, E., Bertalmío, A., Buenahora, J., Otero, Á., Maeso, D., & Rivas, F. (2019). El HLB:

- una enfermedad que amenaza la citricultura de Uruguay. *Revista INIA (Uruguay)*, (56), 70–74. Retrieved from <https://ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/12608/1/Revista-INIA-56-hort.pdf>
- Pervaiz, T., Park, S., Rezk, A., Hur, M., Obenland, D., Arpaia, M., & El-Kereamy, A. (2023). Metabolomic analyses provide insights into the preharvest rind disorder in Satsuma Owari Mandarin. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1263354>
- Peters, K., Worrich, A., Weinhold, A., Alka, O., Balcke, G., Birkemeyer, C., ... Dam, N. (2018). Current Challenges in Plant Eco-Metabolomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19051385>
- Pina, A., & Navarro, L. (2020). Alborea: A New Mid-late Mandarin Triploid Hybrid [(Citrus clementina 3 C. tangerina) 3 (C. nobilis 3 C. deliciosa)].
- Plumb, R. S., Gethings, L. A., Rainville, P. D., Isaac, G., Trengove, R., King, A. M., & Wilson, I. D. (2023). Advances in high throughput LC/MS based metabolomics: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 160, 116954. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.116954>
- Pott, D., Vallarino, J., & Osorio, S. (2020). Metabolite Changes during Postharvest Storage: Effects on Fruit Quality Traits. *Metabolites*, 10. <https://doi.org/10.3390/metabo10050187>
- Poudel, S. (2021). Effect of postharvest treatments on quality attributes and shelf life of mandarin (Citrus reticulata Blanco). *Plant Physiology and Soil Chemistry*. <https://doi.org/10.26480/ppsc.02.2021.70.74>
- Procopiou, J., & El-Gazzar, A. (1972). Severe Pruning Overcomes Alternate Bearing of Mandarin Trees in Rhodes1. *HortScience*. <https://doi.org/10.21273/hortsci.7.2.124>
- Putnik, P., Barba, F., Lorenzo, J., Gabrić, D., Shpigelman, A., Cravotto, G., & Kovačević, D. (2017). An Integrated Approach to Mandarin Processing: Food Safety and Nutritional Quality, Consumer Preference, and Nutrient Bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16 6, 1345–1358. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12310>
- Qaderi, M., Martel, A., & Strugnell, C. (2023). Environmental Factors Regulate Plant Secondary Metabolites. *Plants*, 12. <https://doi.org/10.3390/plants12030447>
- Ramel, M. (2023). Social and Economic Needs and Contributions of the Citrus Industry in Nueva Vizcaya, Philippines. *International Journal of Engineering, Business and*

- Management*. <https://doi.org/10.22161/ijebm.7.1.4>
- Ramos-Hurtado, A. M., Koller, O., Mariath, J., Sartori, I. A., Theisen, S., & Reis, B. (2006). Diferenciação floral, alternância de produção e uso de ácido giberélico em tangerineira “Montenegrina” (*Citrus deliciosa* Tenore). *Revista Brasileira De Fruticultura*, 28, 355–359. <https://doi.org/10.1590/s0100-29452006000300005>
- Rao, M. J., Feng, B., Ahmad, M. H., Tahir Ul Qamar, M., Aslam, M. Z., Khalid, M. F., ... Wang, L. (2023). LC-MS/MS-based metabolomics approach identified novel antioxidant flavonoids associated with drought tolerance in citrus species. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1150854. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1150854>
- Raveh, E., Goldenberg, L., Porat, R., Carmi, N., Gentile, A., & Malfa, S. (2020). Conventional Breeding of Cultivated Citrus Varieties, 33–48. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15308-3_4
- Razzaq, A., Sadia, B., Raza, A., Hameed, M. K., & Saleem, F. (2019). Metabolomics: A Way Forward for Crop Improvement. *Metabolites*, 9. <https://doi.org/10.3390/metabo9120303>
- Regmi, A., & Dhungana, S. (2024). Production, Marketing and Future Prospects of Mandarin in Nepal. *Journal La Lifesci*. <https://doi.org/10.37899/journallalifesci.v5i4.1304>
- Rezk, A., Pervaiz, T., Douhan, G., Obenland, D., Arpaia, M., & El-Kereamy, A. (2024). Preharvest Mandarin Rind Disorder: Insights into Varietal Differences and Preharvest Treatments Effects on Postharvest Quality. *Plants*, 13. <https://doi.org/10.3390/plants13081040>
- Ribbenstedt, A., Ziarrusta, H., & Benskin, J. (2018). Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLoS ONE*, 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207082>
- Ribeiro, C., Xu, J., Hendrich, C., Pandey, S. S., Yu, Q., Gmitter, F., & Wang, N. (2022). Seasonal transcriptome profiling of susceptible and tolerant citrus cultivars to citrus Huanglongbing. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/phyto-05-22-0179-r>
- Riolo, M., Aloï, F., Pane, A., Cara, M., & Cacciola, S. (2021). Twig and Shoot Dieback of Citrus, a New Disease Caused by *Colletotrichum* Species. *Cells*, 10. <https://doi.org/10.3390/cells10020449>
- Rivas, F., Otero, A., Grasso, R., Goñi, C., Pérez, E., Rubio, L., ... Espino, M. (2020). Desafíos de la citricultura en el Uruguay y el aporte de INIA a su competitividad.

- Informe especial. *Revista INIA*, 55–68. Retrieved from [http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos compartidos/Rev-INIA-61-Junio-2020-p-55-68.pdf](http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos_compartidos/Rev-INIA-61-Junio-2020-p-55-68.pdf)
- Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1(SUPPL.98), 30.2.1-30.2.24. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>
- Rochfort, S. (2005). Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of Natural Products*, 68 12, 1813–1820. <https://doi.org/10.1021/np050255w>
- Rodrigues, A., Ribeiro-Barros, A., & António, C. (2019). Experimental Design and Sample Preparation in Forest Tree Metabolomics. *Metabolites*, 9. <https://doi.org/10.3390/metabo9120285>
- Rohman, A., Windarsih, A., Lukitaningsih, E., Rafi, M., Betania, K., & Fadzillah, N. (2019). The use of FTIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics for analysis of biomolecules in biomedical fluids: A review. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 8, 55–71. <https://doi.org/10.3233/bsi-200189>
- Rokaya, P., Baral, D., Gautam, D., Shrestha, A., & Paudyal, K. (2020). Effect of Harvesting Methods on Storage Behaviour of Mandarin (Citrus Reticulata Blanco) Under Cellar Condition. *International Journal of Science and Qualitative Analysis*, 6, 1, 8-12. <https://doi.org/10.11648/j.ijjsqa.20200601.12>
- Ruiz-Perez, D., Guan, H., Madhivanan, P., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2020). So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*, 21(Suppl 1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3310-7>
- Russi, P., Menoni, M., del Campo, R., & Peyrou, M. (2013). Caracterización de cepas de *Xanthomonas citri* sbsp. *citri*, agente causal del cancro cítrico . *Agrociencia (Uruguay)* . scielouy .
- Saccenti, E., Hoefsloot, H., Smilde, A., Westerhuis, J., & Hendriks, M. (2013). Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, 10, 361–374. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0598-6>
- Saini, M., Capalash, N., Varghese, E., Kaur, C., & Singh, S. (2020). Quantitative metabolomics approach reveals dynamics of primary metabolites in ‘Kinnow’ mandarin (*C. nobilis* × *C. deliciosa*) during advanced stages of fruit maturation under

- contrasting growing climates. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 95, 106–112. <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1647118>
- Saini, R., Ranjit, A., Sharma, K., Prasad, P., Shang, X., Gowda, K. G. M., & Keum, Y. (2022). Bioactive Compounds of Citrus Fruits: A Review of Composition and Health Benefits of Carotenoids, Flavonoids, Limonoids, and Terpenes. *Antioxidants*, 11. <https://doi.org/10.3390/antiox11020239>
- Sajami, D. (2025). In Uruguay, varietal development has concentrated on new mandarin varieties. Retrieved from <https://www.freshplaza.com/north-america/article/9777224/in-uruguay-varietal-development-has-concentrated-on-new-mandarin-varieties/>
- Saldanha, L. L., Allard, P.-M., Dilarri, G., Codesido, S., González-Ruiz, V., Queiroz, E. F., ... Wolfender, J.-L. (2022). Metabolomic- and Molecular Networking-Based Exploration of the Chemical Responses Induced in Citrus sinensis Leaves Inoculated with Xanthomonas citri. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(46), 14693–14705. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05156>
- Sarandi, E., Georgaki, S., Tsoukalas, D., & Tsatsakis, A. (2021). Metabolomics methodology and workflow: challenges and future prospects. *Toxicological Risk Assessment and Multi-System Health Impacts from Exposure*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85215-9.00030-1>
- Scarsini, M., Thurotte, A., Veidl, B., Amiard, F., Niepceron, F., Badawi, M., ... Marchand, J. (2021). Metabolite Quantification by Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Diatoms: Proof of Concept on Phaeodactylum tricornutum. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.756421>
- Schrimpe-Rutledge, A., Codreanu, S., Sherrod, S., & McLean, J. (2016). Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 27, 1897–1905. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>
- Segers, K., Declerck, S., Mangelings, D., Heyden, Y., & Eeckhaut, A. (2019). Analytical techniques for metabolomic studies: a review. *Bioanalysis*, 11 24, 2297–2318. <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0014>
- Serrano, M., Kombrink, E., & Meesters, C. (2015). Considerations for designing chemical screening strategies in plant biology. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00131>

- Shaban, A., El-Banna, M., & Rashedy, A. (2025a). Co-application of gibberellin and copper sulphate reduces number of seeds as innovative technique for alleviating alternate bearing in Balady mandarin. *Scientific Reports*, 15. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-22663-2>
- Shaban, A., El-Banna, M., & Rashedy, A. (2025b). Potassium and methionine mitigate the alternate bearing of Balady mandarin via reducing gibberellins and increasing salicylic acid and auxins. *Scientific Reports*, 15. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-04943-z>
- Shah, S. H., Islam, S., Mohammad, F., & Siddiqui, M. H. (2023). Gibberellic Acid: A Versatile Regulator of Plant Growth, Development and Stress Responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(12), 7352–7373. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11035-7>
- Shahbaz, E., Ali, M., Shafiq, M. I., Atiq, M., Hussain, M., Balal, R., ... Shahid, M. (2022). Citrus Canker Pathogen, Its Mechanism of Infection, Eradication, and Impacts. *Plants*, 12. <https://doi.org/10.3390/plants12010123>
- Shahzad, F., Vashisth, T., Ritenour, M., & Brecht, J. (2023). Huanglongbing disease symptoms and the postharvest quality of ‘LB8-9’ (Sugar Belle®) and ‘Tango’ mandarins as affected by ethylene treatment. *Scientia Horticulturae*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111766>
- Shen, S., Zhan, C., Yang, C., Fernie, A., & Luo, J. (2022). Metabolomics-centered mining of plant metabolic diversity and function: past decade and future perspectives. *Molecular Plant*. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.09.007>
- Shorbagi, M., Fayek, N., Shao, P., & Farag, M. (2022). Citrus reticulata Blanco (the common mandarin) fruit: An updated review of its bioactive, extraction types, food quality, therapeutic merits, and bio-waste valorization practices to maximize its economic value. *Food Bioscience*. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101699>
- Shrestha, S., Awasthi, S., & Das, B. K. (2024). Post-harvest losses in mandarin orange (Citrus reticulata blanco.) in the Gulmi District of Nepal. *International Journal of Horticulture, Agriculture and Food Science*. <https://doi.org/10.22161/ijhaf.8.4.1>
- Singh, D., Sharma, S., Das, A., Thakuria, D., Sahoo, L., Kharbikar, L., ... Shakywar, R. (2024). First report of Phytophthora vexans causing gummosis and root rot of Khasi Mandarin (Citrus reticulata Blanco) in north eastern states of India. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-23-1156-pdn>

- Slisz, A. M., Breksa, A. P. I. I., Mishchuk, D. O., McCollum, G., & Slupsky, C. M. (2012). Metabolomic Analysis of Citrus Infection by ‘Candidatus Liberibacter’ Reveals Insight into Pathogenicity. *Journal of Proteome Research*, 11(8), 4223–4230. <https://doi.org/10.1021/pr300350x>
- Smith, M. (2016). Commercial development of subtropical mandarin hybrids.
- Sørensen, M., Møller, J. K., Strube, M. L., & Gotfredsen, C. (2024). Designing optimal experiments in metabolomics. *Metabolomics*, 20. <https://doi.org/10.1007/s11306-024-02122-1>
- Souza, A. L., & Patti, G. J. (2021). A Protocol for Untargeted Metabolomic Analysis: From Sample Preparation to Data Processing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2276, 357–382. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1266-8_27
- Spreen, T., Gao, Z., Fernandes, W., & Zansler, M. (2020). Global economics and marketing of citrus products, 471–493. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812163-4.00023-1>
- Stancliffe, E., Schwaiger-Haber, M., Sindelar, M., Murphy, M. J., Soerensen, M., & Patti, G. J. (2022). An Untargeted Metabolomics Workflow that Scales to Thousands of Samples for Population-Based Studies. *Analytical Chemistry*, 94(50), 17370–17378. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01270>
- Stander, O., Barry, G., & Cronjé, P. (2018). Fruit Load Limits Root Growth, Summer Vegetative Shoot Development, and Flowering in Alternate-bearing ‘Nadorcott’ Mandarin Trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 143, 213–225. <https://doi.org/10.21273/jashs04438-18>
- Subedi, S., Pandey, K., K, A., Bhandari, A., & Khanal, P. (2024). Adoption of management practices and impacts on major diseases among mandarin growers in Syangja, Nepal. *Cogent Food & Agriculture*, 10. <https://doi.org/10.1080/23311932.2024.2344399>
- Suh, J. H., Tang, X., Zhang, Y., Gmitter, F. G., & Wang, Y. (2021). Metabolomic Analysis Provides New Insight Into Tolerance of Huanglongbing in Citrus. *Frontiers in Plant Science, Volume 12-2021*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.710598>
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., ... Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics : Official Journal of the Metabolomic Society*, 3(3), 211–221.

- <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Sun, J., & Xia, Y. (2023). Pretreating and normalizing metabolomics data for statistical analysis. *Genes & Diseases*, *11*. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.04.018>
- Talón, M., Zacarías, L., & Primo-Millo, E. (1990). Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiologia Plantarum*, *79*, 400–406. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb06759.x>
- Tarancón, P., Tárrega, A., Aleza, P., & Besada, C. (2020). Consumer Description by Check-All-That-Apply Questions (CATA) of the Sensory Profiles of Commercial and New Mandarins. Identification of Preference Patterns and Drivers of Liking. *Foods*, *9*. <https://doi.org/10.3390/foods9040468>
- Tarancón, P., Tárrega, A., González, M., & Besada, C. (2021). External Quality of Mandarins: Influence of Fruit Appearance Characteristics on Consumer Choice. *Foods*, *10*. <https://doi.org/10.3390/foods10092188>
- Tautenhahn, R., Patti, G. J., Rinehart, D., & Siuzdak, G. (2012). XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. *Analytical Chemistry*, *84*(11), 5035–5039. <https://doi.org/10.1021/ac300698c>
- Tian, H., Chen, H., & Li, X. (2024). Mechanical Damage Caused by Compression and Its Effects on Storage Quality of Mandarin. *Foods*, *13*. <https://doi.org/10.3390/foods13060892>
- Torres, M. J. M., Fernández-Izquierdo, M., Ferrero-Ferrero, I., Escrig-Olmedo, E., & Rivera-Lirio, J. (2022). Transitioning the agri-food system. Does closeness mean sustainability? how production and shipping strategies impact socially and environmentally. Comparing Spain, South Africa and U.S. citrus fruit productions. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, *46*, 540–577. <https://doi.org/10.1080/21683565.2022.2039835>
- Tunsagool, P., Wang, X., Leelasuphakul, W., Jutidamrongphan, W., Phaonakrop, N., Jaresitthikunchai, J., ... Li, L. (2019). Metabolomic study of stress responses leading to plant resistance in mandarin fruit mediated by preventive applications of *Bacillus subtilis* cyclic lipopeptides. *Postharvest Biology and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110946>
- van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological

- information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7(1), 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- Varmuza, K., & Filzmoser, P. (2024). Adjusted Pareto Scaling for Multivariate Calibration Models. *Journal of Chemometrics*, 38. <https://doi.org/10.1002/cem.3588>
- Villa-Ruano, N., Pérez-Hernández, N., Zepeda-Vallejo, L. G., Quiroz-Acosta, T., Mendieta-Moctezuma, A., Montoya-García, C., ... Becerra-Martínez, E. (2019). (1) H-NMR Based Metabolomics Profiling of Citrus Juices Produced in Veracruz, México. *Chemistry & Biodiversity*, 16(5), e1800479. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800479>
- Villar-Luna, H., Santos-Cervantes, M., Rodríguez-Negrete, E., Méndez-Lozano, J., & Leyva-López, N. (2024). Economic and Social Impact of Huanglongbing on the Mexico Citrus Industry: A Review and Future Perspectives. *Horticulturae*. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10050481>
- Vinaixa, M., Samino, S., Saez, I., Duran, J., Guinovart, J., & Yanes, Ó. (2012). A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites*, 2, 775–795. <https://doi.org/10.3390/metabo2040775>
- Vu, T., Siemek, P., Bhinderwala, F., Xu, Y., & Powers, R. (2019). Evaluation of Multivariate Classification Models for Analyzing NMR Metabolomics Data. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00227>
- Wang, F., Huang, Y.-X., Wu, W., Zhu, C., Zhang, R., Chen, J., & Zeng, J. (2020). Metabolomics Analysis of the Peels of Different Colored Citrus Fruits (*Citrus reticulata* cv. ‘Shatangju’) During the Maturation Period Based on UHPLC-QQQ-MS. *Molecules*, 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25020396>
- Wang, H., Wang, P., Wang, F., Chen, H., Chen, L., Hu, Y., & Liu, Y.-P. (2024). Integrated HS-GC–IMS and UPLC-Q-Orbitrap HRMS-based metabolomics revealed the characteristics and differential volatile and nonvolatile metabolites of different citrus peels. *Current Research in Food Science*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100755>
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V, Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., ... Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>

- Wang, S., Shen, S., Wang, C., Wang, X., Yang, C., Zhou, S., ... Luo, J. (2023). A metabolomics study in citrus provides insight into bioactive phenylpropanoid metabolism. *Horticulture Research*, 11. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad267>
- Wang, S., Yang, C., Tu, H., Zhou, J., Liu, X., Cheng, Y., ... Xu, J. (2017). Characterization and Metabolic Diversity of Flavonoids in Citrus Species. *Scientific Reports*, 7(1), 10549. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10970-2>
- Wanga, M., Shimelis, H., Mashilo, J., & Laing, M. (2021). Opportunities and challenges of speed breeding: A review. *Plant Breeding*. <https://doi.org/10.1111/pbr.12909>
- Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C. J., Smit, S., Vis, D. J., Smilde, A. K., van Velzen, E. J. J., ... van Dorsten, F. A. (2008). Assessment of PLSDA cross validation. *Metabolomics*, 4(1), 81–89. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0099-6>
- Wishart, D., Cheng, L., Copié, V., Edison, A., Eghbalnia, H., Hoch, J., ... Uchimiya, M. (2022). NMR and Metabolomics—A Roadmap for the Future. *Metabolites*, 12. <https://doi.org/10.3390/metabo12080678>
- Wishart, D. S., Guo, A., Oler, E., Wang, F., Anjum, A., Peters, H., ... Gautam, V. (2022). HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D622–D631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1062>
- Worley, B., & Powers, R. (2012). Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1 1, 92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235x11301010092>
- Wu, D., Ye, X., Linhardt, R., Liu, X., Zhu, K., Yu, C., ... Chen, S. (2021). Dietary pectic substances enhance gut health by its polycomponent: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12723>
- Wu, S., Li, X., Jiang, J., Huang, H., Cheng, X., Li, G.-Y., ... Zhu, X. (2023). Reveal the relationship between the quality and the cuticle composition of Satsuma mandarin (Citrus unshiu) by postharvest heat treatment. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16803>
- Xu, S., Bai, C., Chen, Y., Yu, L., Wu, W., & Hu, K. (2023). Comparing univariate filtration preceding and succeeding PLS-DA analysis on the differential variables/metabolites identified from untargeted LC-MS metabolomics data. *Analytica Chimica Acta*, 1287, 342103. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.342103>
- Xue, H., Liu, Z., Liu, W., Huang, G., Wang, X., Du, M., ... Zhou, Y. (2025). The genomic design of fruit metabolomes. *Plant Communications*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2025.101484>

- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>
- Yan, C. (2025). A review on spectral data preprocessing techniques for machine learning and quantitative analysis. *IScience*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.112759>
- Yan, W. (2021). A Systematic Narration of Some Key Concepts and Procedures in Plant Breeding. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.724517>
- Yan, Y., Tang, X., Zhu, Z., Yin, K., Zhang, Y., Xu, Z., ... Chen, G. (2025). Two TAL effectors of *Xanthomonas citri* promote pustule formation by directly repressing the expression of GRAS transcription factor in citrus. *Molecular Horticulture*, 5. <https://doi.org/10.1186/s43897-024-00131-1>
- Yang, C., Li, Y., Hu, Q., Shi, H.-C., Duan, J.-Q., He, M.-T., ... Zhi, X.-Y. (2024). Redevelopment of limonoid as potential pesticidal resource from non-edible wastes of the citrus industry: Combinatorial synthesis and insecticidal evaluation of limonin-derived oxime ethers with scaffold diversity. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119215>
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Yarto-Jaramillo, E. (2015). Chapter 42 - Rodentia A2 - Miller, R. Eric. In M. E. B. T.-F. Z. and W. A. M. Fowler Volume 8 (Ed.) (pp. 384–422), ISBN 9781455773978, St. Louis: W.B. Saunders. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-7397-8.00042-6>
- Ye, X.-Q., Chen, J.-C., Liu, D.-H., Jiang, P., Shi, J., Xue, S., ... Kakuda, Y. (2011). Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, 124(4), 1561–1566. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.013>
- Zhang, H., Zeng, X., Yin, Y., & Zhu, Z.-J. (2025). Knowledge and data-driven two-layer networking for accurate metabolite annotation in untargeted metabolomics. *Nature Communications*, 16(1), 8118. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-63536-6>
- Zhang, S., Qi, Y., Tan, S. P. H., Bi, R., & Olivo, M. (2023). Molecular Fingerprint Detection Using Raman and Infrared Spectroscopy Technologies for Cancer Detection: A Progress Review. *Biosensors*, 13.

<https://doi.org/10.3390/bios13050557>

- Zhou, J., Liu, H., Liu, Y., Liu, J., Zhao, X., & Yin, Y. (2016). Development and Evaluation of a Parallel Reaction Monitoring Strategy for Large-Scale Targeted Metabolomics Quantification. *Analytical Chemistry*, 88(8), 4478–4486. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00355>
- Zhou, J., & Yin, Y. (2016). Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *The Analyst*, 141 23, 6362–6373. <https://doi.org/10.1039/c6an01753c>
- Zhou, Z., Luo, M., Zhang, H., Yin, Y., Cai, Y., & Zhu, Z.-J. (2022). Metabolite annotation from knowns to unknowns through knowledge-guided multi-layer metabolic networking. *Nature Communications*, 13(1), 6656. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34537-6>
- Zulian, A., Dörr, A. C., & Almeida, S. (2013). Citricultura and cooperative agribusiness in Brazil, 11, 2291–2306. <https://doi.org/10.5902/223611708700>

3 Metabolómica no dirigida de pulpa

3.1 Introducción

La aceptabilidad del consumidor surge como un factor primordial para el éxito comercial de las frutas y, en el caso particular de las mandarinas, las características sensoriales son atributos determinantes. Sin embargo, la evaluación sensorial tradicional de la gran cantidad de nuevas variedades híbridas que anualmente se generan en los programas de mejoramiento genético representa un trabajo complejo, costoso y demandante en tiempo y recursos. Esta realidad acentúa la necesidad de desarrollar herramientas objetivas y rápidas que permitan predecir de manera temprana la aceptabilidad del fruto, optimizando los procesos de selección y desarrollo varietal.

En el marco de un proyecto previo en conjunto entre el Área Sensorial del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Química (CYTAL-FQ), INIA y nuestro laboratorio, se realizó una evaluación sensorial de diferentes variedades de mandarinas con consumidores habituales (Gámbaro et al., 2021). El estudio se llevó a cabo en Montevideo (Uruguay) entre marzo y agosto, con la participación de 100 consumidores divididos en dos grupos, quienes evaluaron las frutas con o sin cáscara según el grupo asignado. Se observaron diferencias significativas en la aceptación de las muestras determinadas por las características sensoriales de cada variedad, mientras que el hecho de pelar o no la mandarina no tuvo efecto significativo sobre la aceptabilidad general. Las variedades Page, B475B y F7P3 obtuvieron los mayores puntajes de aceptabilidad. Se asociaron con atributos positivos como "olor natural", "olor dulce", "sabor frutal", "sabor equilibrado" y "sabor dulce". En cambio, la muestra M16 fue la menos aceptada. Se relacionó con descriptores negativos como "muy ácida", "olor extraño" y "sabor feo". El análisis factorial múltiple mostró que los atributos más influyentes en la preferencia de los consumidores fueron la dulzura, la frescura, y un aroma agradable. Por el contrario, la acidez excesiva, sabores extraños y la cáscara verde y porosa se asociaron con menor agrado. Este trabajo sentó la base para la selección de los cultivares para realizar la correlación de estos perfiles de aceptabilidad con su caracterización quimiométrica.

Se seleccionó la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN) por ser una herramienta prometedora y versátil para el análisis químico no dirigido (Bingol, 2018; Rivera-Pérez, Romero-González, & Garrido Frenich, 2023), con el objetivo de identificar biomarcadores químicos asociados a las propiedades sensoriales clave en mandarinas. Este capítulo se centra en el estudio de extractos acuosos de pulpa, los cuales se componen de compuestos hidrosolubles tales como azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa) y ácidos orgánicos (citrato, malato, succinato). La proporción de estos metabolitos ha sido vinculada con la percepción del dulzor y la acidez, factores considerados críticos para la aceptación del fruto por sus características típicas.

El objetivo principal de este estudio fue el desarrollo de un modelo quimiométrico robusto capaz de vincular directamente los perfiles metabólicos obtenidos mediante ^1H RMN con los resultados de aceptabilidad sensorial previamente reseñados, los cuales sirvieron como base de referencia para comprender los atributos organolépticos que influyen en la preferencia del consumidor. La caracterización del perfil de ^1H RMN de la pulpa de mandarina se realizó empleando espectrómetros de campo alto (400 MHz) y de mesada (60 MHz), permitiendo la identificación y cuantificación relativa de metabolitos clave.

El análisis de los datos se basó en herramientas quimiométricas multivariadas, incluyendo el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), así como su variante ortogonalizada (OPLS-DA), técnicas que permiten la exploración, clasificación y detección de variables relevantes en datos metabolómicos. La validación de los modelos generados se realizó mediante pruebas de permutación y el cálculo de parámetros estadísticos como el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de predicción cruzada (Q^2), asegurando la robustez y capacidad predictiva de los modelos. Además, se exploró la relación entre la aceptabilidad y el poder endulzante total respecto al contenido de ácido cítrico, calculada directamente a partir de los datos de RMN.

Una contribución significativa de esta investigación involucra la transferencia de esta metodología de clasificación quimiométrica a plataformas analíticas más accesibles y operativamente sencillas, como ser el RMN de mesada (60 MHz) y la espectroscopía de infrarrojo (IR).

3.2 Metodología

3.2.1 Material vegetal

Las muestras de mandarinas fueron cultivadas en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) - Salto Grande (S 31°16'18" W 57°53'26") en la temporada de cosecha llevada a cabo durante 2015 (mayo a setiembre). Las variedades híbridas se obtuvieron cruzando cuatro líneas parentales, incluyendo Ellendale (E; *Citrus reticulata* Blanco), Page (P; *Citrus reticulata* Blanco), Willowleaf (WL; *Citrus deliciosa* Tenore), y Satsuma cv Owari (S; *Citrus unshiu* Marcovitch). Los híbridos seleccionados, incluyendo B475 (E × WL), B79 (E × S), F7P3 (E × P), y M16 (E × WL), cubren un amplio rango de aceptabilidad después de la evaluación sensorial (**Tabla 3.1**). Las frutas se obtuvieron de la zona media de la copa de árboles de 12 años, se recolectaron en su momento óptimo de cosecha (porcentaje de jugo superior al 35% m/m y relación sólidos solubles/acidez total superior a 7) (Bello, Vasquez, & Nanci, 2016; Hardy et al., n.d.), y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. Dos submuestras de cv. B475: B475A y B475B se recolectaron en dos etapas diferentes de madurez, con el fin de estudiar la evolución de los perfiles químicos durante el desarrollo del fruto.

Tabla 3.1 Descripción de las mandarinas evaluadas.

Líneas parentales	Nombre científico	Linaje	Referencias
Ellendale	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Desconocido. Probablemente una planta casual de un cruce entre mandarina y naranja dulce	(Ross, 1949)
Page	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	<i>Minneola tangelo</i> (pomelo Duncan × mandarina Dancy) × mandarina Clementina	(Shimizu et al., 2016)
Willowleaf	<i>Citrus deliciosa</i> Tenore	Desconocido	(Curk et al., 2016)

Satsuma 'Owari'	cv	<i>Citrus</i> Marcovitch	<i>unshiu</i>	Desconocido. Probablemente un cruce entre 'kishuu mikan' y mandarina 'Kunenbo'	(Fujii et al., 2016)
Código híbrido	Linaje	Origen			
B475	Ellendale (♀) × Willowleaf (♂)	Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Cítricos-Uruguay			
B79	Ellendale (♀) × Satsuma cv. 'Owari' (♂)	Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Cítricos-Uruguay			
F7P3	Ellendale (♀) × Page (♂)	Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Cítricos-Uruguay			
M16	Ellendale (♀) × Willowleaf (♂)	Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Cítricos-Uruguay			

3.2.2 Parámetros fisicoquímicos

El color externo e interno se midió con un colorímetro Konica Minolta CR-400 (Japón), utilizando el espacio de color CIE $L^*A^*B^*$. Para cada fruta se realizaron tres lecturas en la zona ecuatorial (color externo) y en una de las mitades (color interno), promediándose los valores de L^* , a^* y b^* (donde L^* indica la luminosidad, y a^* y b^* son las coordenadas cromáticas) entre diez frutos por variedad. Con estos valores se determinó el índice de color de cítricos (ICC) mediante la siguiente fórmula:

$$ICC = \frac{1000 a^*}{L^* b^*}$$

La firmeza se determinó en las mismas frutas con un texturómetro TA.XT-plus (Stable Micro Systems, Reino Unido), aplicando una fuerza máxima de 10 N en la zona ecuatorial con un plato de 75 mm de diámetro. Se midió la deformación provocada en mm, y se clasificó la firmeza como “dura” (< 1,8 mm), “ideal” (1,8–3,5 mm) y “blanda” (> 3,5 mm).

Los sólidos solubles se estimaron con un refractómetro de mesa Atago DBX-55 (Japón) utilizando jugo fresco extraído con una exprimidora doméstica y filtrado, y se expresaron como °Brix a 20 °C. La acidez titulable se determinó volumétricamente utilizando fenolftaleína como indicador y se expresó como % de ácido cítrico/100 mL de jugo. Este dato se utilizó para calcular la relación °Brix/acidez.

3.2.3 Evaluación sensorial de las variedades

El estudio fue realizado previamente por el grupo de Evaluación Sensorial del CYTAL-FQ. La metodología detallada se encuentra en el artículo de Gambaro *et al.* (Gámbaro *et al.*, 2021), donde se indica que se realizó con 100 consumidores habituales de mandarinas, quienes evaluaron diferentes variedades en seis sesiones entre marzo y agosto. Los participantes, divididos aleatoriamente en dos grupos (sin cáscara vs. con cáscara), calificaron el agrado general de las muestras en una escala hedónica de nueve puntos y completaron un cuestionario CATA (Check-All-That-Apply) con términos previamente definidos a partir de un estudio exploratorio. Las pruebas se llevaron a cabo en cabinas sensoriales bajo condiciones controladas. El análisis estadístico incluyó pruebas de significancia, análisis de correspondencia y análisis factorial múltiple para explorar la relación entre los atributos sensoriales y la aceptabilidad de las muestras.

3.2.4 Extracción

Se trituró la pulpa congelada, se pesaron $2,00 \pm 0,10$ g del material triturado en balanza analítica (Shimadzu ATX224, Japón), se colocó en tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL y se adicionó 8,00 mL de CHCl_3 (LiChrosolv®, Merck, Alemania), 4,00 mL de MeOH (LiChrosolv®, Merck, Alemania), y 4,00 mL de agua ultrapura (Millipore Milli-Q® Ultrapure Water Solutions Type 1). Se sometió a agitación con vórtex (WiseMix VM-10, Wisd, Alemania) a 110 rcf durante 30 s y a baño de ultrasonido (SB-120DT, Wollen Lab, China) durante 60 s. Se centrifugó (Eppendorf 5702, Alemania) durante 5 min a 1400 rcf, se retiró la capa orgánica y se agregaron 8,00 mL de CHCl_3 . Se repitió la etapa de vórtex, ultrasonido y centrifugado, se juntaron las fases orgánicas y se secaron con Na_2SO_4 anhidro. Se filtró el extracto orgánico seco mediante papel de filtro Whatman y se eliminó el solvente bajo corriente de nitrógeno gaseoso empleando un concentrador de

fracciones (Turbovap LV, Biotage, Suecia). El extracto acuometanólico se filtró mediante papel, se eliminó el MeOH mediante destilación a presión reducida empleando rotavaporador (Büchi R-114, Suiza), y finalmente se liofilizó (BenchTop Pro, VirTis SP Scientific, Estados Unidos) para eliminar el agua. Se realizaron 10 réplicas de cada extracción, siendo cada una de las réplicas proveniente de una mandarina diferente. Las muestras secas se almacenaron en desecador hasta su análisis instrumental.

3.2.5 Análisis instrumental

3.2.5.1 RMN 400 MHz

Los extractos acuosos liofilizados se disolvieron en 600 μ L de agua deuterada (MagniSolvTM, 99,9 % D, Merck, Alemania) y se transfirieron a tubos de RMN de 5 mm (NE-HL5-7, New Era Enterprises, Estados Unidos). Todos los espectros de RMN de ^1H se obtuvieron a 298 K en un espectrómetro Bruker Avance III 400 (Bruker, Alemania) que operaba a una frecuencia de ^1H de 400,13 MHz, utilizando una sonda BBFO-Plus con gradiente z. Se utilizó un ancho espectral de 8 KHz, un tamaño de datos de 32 K y un total de 64 escaneos para registrar cada espectro, utilizando un pulso de 30° y un tiempo de relajación de 1 segundo entre escaneos.

Las señales en el dominio del tiempo (FID) obtenidas se rellenaron con ceros hasta 64 K puntos y se apodizaron con una función de ventana exponencial de 0,3 Hz antes de aplicar la transformación de Fourier. Se ajustó la fase de los espectros de RMN ^1H manualmente, sus líneas base se corrigieron por segmentos utilizando MestReNova (versión 11.0, MestreLab Research, S.L., España), y se referenciaron inicialmente a la señal HDO residual a 4,70 ppm. Los espectros fueron alineados en función de su derivada por regiones seleccionadas manualmente y utilizando su promedio como referencia. Los datos se normalizaron por masa de extracto seco y los espectros procesados se segmentaron en bins de 0,04 ppm de ancho sin tener en cuenta las regiones correspondientes a señales de disolventes ni las regiones no alineadas. La matriz de datos resultante se exportó como un archivo de texto para su uso en análisis multivariado.

3.2.5.2 RMN 60 MHz

Una vez analizados por RMN a 400 MHz, los extractos acuosos fueron liofilizados y almacenados bajo atmosfera de nitrógeno a -20 °C para ser transportados a Austria y ser analizados en otro sistema instrumental (actividad enmarcada en mi pasantía de doctorado). Estos extractos fueron retomados en 600 µL de agua deuterada (MagniSolv™, 99,9 % D, Merck, Alemania), transferidos a tubos de RMN de 5 mm (NE-HL5-7, New Era Enterprises, Estados Unidos). Se obtuvieron los espectros de RMN de ¹H a temperatura ambiente en un espectrómetro de mesada Magritek Spinsolve 60 (Magritek GmbH, Alemania) con una frecuencia de ¹H de 62,32 MHz con un ancho espectral de 5 KHz. Los espectros obtenidos tuvieron un tamaño de 32 K y fueron obtenidos mediante un pulso de excitación de 90°. Se realizaron 256 escaneos con un tiempo de relajación de 1 s. Las FID fueron procesadas de manera análoga a las obtenidas en el equipo de 400 MHz.

3.2.6 Estimación del contenido de azúcares y ácido cítrico

La estimación del contenido relativo de azúcares y ácido cítrico de cada muestra se realizó con base en el área de la señal del protón anomérico de la sacarosa a 5,40 ppm, a la que se le asignó un valor arbitrario de 1,00. Las áreas de las señales correspondientes a los protones anoméricos de α-glucosa a 5,20 ppm, β-glucosa a 4,60 ppm y fructosa a 4,05 ppm, así como los cuatro protones metiánicos del ácido cítrico a 2,70 ppm, se estimaron en relación con la señal de sacarosa. Utilizando estos valores y la escala de dulzor de Schiffman y colaboradores (1995), donde el poder de dulzor de la sacarosa se toma como 1,0, la fructosa como 1,3 y la glucosa como 0,6 (Schiffman, Booth, Losee, Pecore, & Warwick, 1995; Stampanoni, 1993), el poder endulzante de las muestras (PEM) se determinó como:

$$PEM = \sum_n (Poder\ endulzante\ del\ azúcar \times Contenido\ del\ azúcar)_n$$

Se calculó el cociente entre el contenido total de azúcar expresado como equivalentes de sacarosa (PEM) y el contenido de ácido cítrico.

3.2.7 Espectroscopía de Infrarrojo

Las variedades B475B y M16 fueron seleccionadas para el estudio mediante espectroscopía de infrarrojo. Se tomaron 10 mandarinas de cada variedad, se liofilizaron enteras (BenchTop Pro, VirTis SP Scientific, Estados Unidos) y se molieron con molino de corte de acero inoxidable modelo LI1.5 (Skymsem, Brasil) durante 2 minutos a 900W en primera instancia y luego en molino de bolas oscilante modelo MM400 (Retsch GmbH, Alemania) durante 2 min a 30 Hz. El polvo obtenido fue analizado en un FT-IR C91022 (Perkin Elmer, Reino Unido) equipado con accesorio de reflexión total atenuada (ATR), y los espectros obtenidos fueron procesados con el software Spectrum IR (versión 10.6.2, Perkin Elmer, Reino Unido). Cada variedad fue evaluada a partir de 100 fracciones de polvo independientes. Para cada fracción se adquirieron cuatro espectros, que se promediaron con el fin de obtener un único espectro representativo, siguiendo el protocolo del laboratorio. Así, se obtuvieron 100 espectros por variedad, que constituyeron las observaciones empleadas en el análisis estadístico.

3.2.8 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos multivariados se realizaron utilizando la interfaz web de MetaboAnalyst versión 4.0 (Chong et al., 2018; Chong & Xia, 2018), un software libre diseñado para el análisis y la visualización de datos ómicos. En todos los casos, se empleó el método de escalado Pareto, mediante el cual cada variable se centra respecto a su media y se divide por la raíz cuadrada de su desviación estándar. Este procedimiento reduce la influencia de las variables con mayor varianza, lo que resulta adecuado para datos metabolómicos (van den Berg, Hoefsloot, Westerhuis, Smilde, & van der Werf, 2006). Para la exploración inicial de los datos, la clasificación de las variedades y la detección de valores atípicos dentro de cada grupo, se utilizó el análisis de componentes principales (PCA), una técnica no supervisada que permite reducir la dimensionalidad de los datos y visualizar patrones generales. La identificación de fitomarcadores se llevó a cabo mediante técnicas supervisadas, como el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y su variante ortogonal, el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA). Estos métodos permiten maximizar la

separación entre grupos predefinidos y detectar las variables más relevantes para dicha separación.

Los modelos generados a partir de los análisis PLS-DA y OPLS-DA fueron validados mediante una prueba de permutación con 1000 iteraciones. Este procedimiento permite evaluar si la capacidad de discriminación de los modelos es significativamente superior a la esperable por azar y detectar un posible sobreajuste. Los parámetros estadísticos utilizados para evaluar el desempeño de los modelos incluyeron el coeficiente de determinación (R^2), que mide el ajuste del modelo, y el coeficiente de predicción cruzada (Q^2), que evalúa su capacidad predictiva. Estas herramientas aseguraron la robustez y la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Se realizaron pruebas de Levene, Shapiro-Wilk, ANOVA y comparaciones múltiples sobre datos de contenido de azúcar/ácido cítrico para evaluar las diferencias entre muestras, utilizando para este propósito el paquete de software RStudio (versión 1.1.463).

Los resultados de FTIR fueron analizados con el software SIMCA, versión 16.0 (Umetrics, Suecia). Se realizó un PCA para detectar posibles agrupamientos de las muestras analizadas, se evaluó la fracción acumulada de la variación de X (R^2X) y la fracción acumulada de la variación de X que el análisis puede reconstruir por validación cruzada (Q^2X). Se evaluó la presencia de outliers mediante el estadístico de Hotelling's T^2 , que mide cuánto se aleja una observación del centro del PCA en el espacio de scores. El OPLS-DA se realizó con el 70% de las muestras (set de entrenamiento) para identificar los números de onda responsables del agrupamiento de las muestras (VIP scores), y luego el modelo fue validado externamente por un 30% de las muestras (set de validación). Se realizó la tabla de clasificación que muestra cuán bien el modelo puede clasificar correctamente las muestras en sus grupos reales.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Material vegetal y parámetros fisicoquímicos

En la **tabla 3.2** se muestran los datos de cosecha del material vegetal, y los parámetros fisicoquímicos determinados.

Tabla 3.2 Características fisicoquímicas de las variedades estudiadas

Variedad	Cosecha	Color externo	Color interno	Deformación (mm)	% de jugo	Brix	Acidez
Satsuma	Mayo	5,21	8,02	2,5	45,3	11,6	1,1
F7P3	Mayo	9,85	6,33	1,4	51,6	14,4	1,0
Page	Junio	10,28	5,48	1,7	57,0	11,3	1,4
Willowleaf	Junio	1,65	3,64	3,4	44,2	14,1	0,9
B475 A	Julio	7,46	5,38	1,7	53,6	13,9	1,4
Ellendale	Agosto	7,34	6,33	1,8	50,3	14,8	1,5
B475 B	Agosto	6,24	3,64	2,3	46,8	14,3	1,2
B79	Agosto	8,57	6,79	2,1	47,9	10,2	1,0
M16	Agosto	7,46	7,18	ND	ND	13,3	2,5

ND: No determinado

Los valores obtenidos permitieron comparar objetivamente las diferencias de coloración entre las variedades, tanto en la epidermis como en la pulpa. Este análisis es relevante ya que la coloración del fruto constituye un atributo visual clave que influye en la elección del consumidor. Además, el ICC es utilizado como estimador del grado de madurez (en mandarinas $ICC > 6$) (Cubero et al., 2016; Lado, Rodrigo, & Zacarías, 2014), así como la evolución de la pigmentación de la cáscara.

La firmeza permite estimar la resistencia del tejido al colapso y, por ende, constituye un indicador indirecto de la textura percibida al tacto y al morder el fruto, ambos aspectos sensoriales relevantes.

Los sólidos solubles totales y la acidez se midieron en jugo fresco mediante refractometría y se expresaron como °Brix y como porcentaje de ácido cítrico por 100 mL de jugo, respectivamente. La relación °Brix/acidez sirve como indicador en la percepción global del sabor y los atributos característicos de las mandarinas.

Estos parámetros permitieron una caracterización comparativa entre las muestras estudiadas, proporcionando una base objetiva para interpretar las diferencias sensoriales y su posible asociación con los perfiles metabolómicos de cada variedad.

3.3.2 Evaluación sensorial de las variedades

En la **tabla 3.3** se presenta una selección de los resultados promedio de los puntajes de aceptabilidad según muestra y grupo obtenidos en el estudio sensorial realizado previamente (Gámbaro et al., 2021). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la aceptabilidad de las muestras evaluadas con y sin cáscara (Grupo "A" vs. Grupo "B"), pero el factor "muestra" tuvo una influencia significativa en los puntajes de agrado general ($p < 0,0001$).

Tabla 3.3 Valores promedio de los puntajes de aceptación general (evaluados en una escala estructurada de 9 puntos) por consumidores de mandarina.

Muestra	Grupo "A"	Grupo "B"	Promedio
B475B	7,2 ^{a,b}	7,5 ^a	7,4 ^a
Page	7,4 ^a	7,2 ^{a,b}	7,3 ^a
F7P3	7,0 ^{a,b,c}	6,8 ^{a,b,c}	6,9 ^{a,b}
Ellendale	6,4 ^{a,b,c}	6,3 ^{a,b,c,d}	6,4 ^b
Willowleaf	6,1 ^{a,b,c}	6,3 ^{a,b,c,d}	6,2 ^{b,c}
B475A	5,7 ^{c,d}	5,4 ^{d,e}	5,5 ^{c,d}
B79	4,7 ^{d,e}	4,9 ^{e,f}	4,8 ^d
M16	3,4 ^e	3,8 ^f	3,6 ^e

Los consumidores utilizaron el cuestionario CATA (Check-All-That-Apply) para describir las muestras, seleccionando los términos sensoriales que consideraban aplicables.

Características como "ácida", "sin olor", "sabor extraño", "poco sabor", "amarga", "olor verde", "olor extraño", "sabor feo", "cáscara verde", "con poco jugo", "cáscara muy pegada", "muy ácida", "no muy dulce", "con semillas grandes", "blanda", "con muchas semillas", "cáscara con manchas" y "cáscara porosa" se correlacionaron negativamente con la dirección de agrado general. Por otro lado, características como "sabor dulce", "muy dulce", "olor fresco", "olor dulce", "brillante", "sabor frutal", "sabor fresco", "sabor típico", "sabor equilibrado" y "sabor rico" se correlacionaron positivamente con la dirección de agrado general, siendo capaces de inducir sentimientos de agrado. Estos datos fueron la base para la correlación quimiométrica.

3.3.3 Caracterización del perfil de ^1H RMN de la pulpa de mandarina

La **figura 3.1** muestra un espectro típico de ^1H RMN correspondiente al extracto acuoso de pulpa de los cultivares B475 y M16, representativo del perfil observado para todos los cultivares analizados. El espectro está dominado por señales ubicadas en el rango de 3,1 a 5,4 ppm, atribuibles principalmente a protones de los anillos de los carbohidratos solubles: sacarosa, fructosa y glucosa. Considerando las integrales de los protones anoméricos de estos azúcares, fue posible estimar de forma relativa su proporción en la matriz. En todos los cultivares evaluados, la sacarosa resultó ser el azúcar predominante, seguida por fructosa y glucosa en proporciones variables.

La diferenciación entre estos tres azúcares fue clara en los espectros: la glucosa presentó señales características de los protones H-1 del anómero β a 4,60 ppm, mientras que el anómero α presentó señales más desprotegidas en 5,20 ppm. En 5,40 ppm se distingue el doblete del H-1 de la glucosa perteneciente a la sacarosa, y la fructosa se identificó en 4,05 ppm por la señal de H-3,

Además de los carbohidratos, en todos los extractos se detectaron señales correspondientes a otros grupos de metabolitos primarios y secundarios. En el rango de 2,3 a 3,0 ppm se observaron señales características de protones α a grupos carboxilo, correspondientes a ácidos orgánicos como el citrato, malato y succinato, todos ellos intermediarios del ciclo de Krebs y componentes importantes de la acidez percibida en la

fruta. En la región aromática del espectro (6,1 a 7,6 ppm), así como a campos más bajos (9,0 a 10,0 ppm), se identificaron señales consistentes con compuestos fenólicos y aldehídos, incluyendo flavonoides solubles y otros metabolitos antioxidantes presentes en menor proporción.

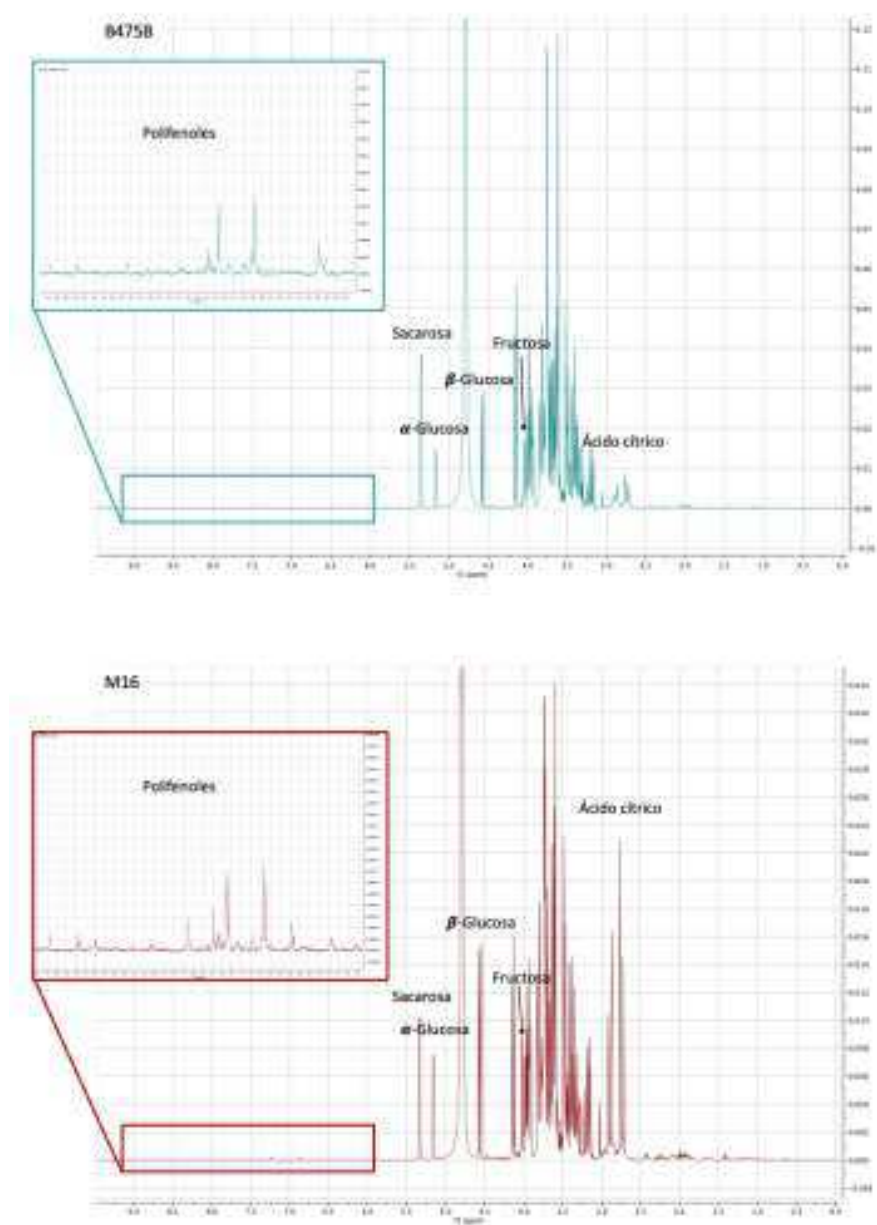


Figura 3.1 Espectro representativo de ¹H RMN de extractos acuosos de pulpa de mandarina de las variedades B475B y M16. Se indican las regiones correspondientes a ácidos orgánicos, azúcares y polifenoles.

Aunque el espectro de ^1H RMN del extracto acuoso de pulpa presenta cierta complejidad, fue posible observar diferencias que permitieron discriminar entre varios cultivares mediante análisis multivariados. El análisis de componentes principales (PCA) de los datos espectrales de las cuatro variedades comerciales (Satsuma, Ellendale, Willowleaf y Page) explicó el 84 % de la varianza total en los dos primeros componentes, permitiendo una clara separación de Satsuma, Ellendale y Willowleaf. Sin embargo, Page no pudo distinguirse de forma concluyente del resto, posiblemente debido a su perfil metabólico intermedio. Un análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) confirmó esta clasificación (**Figura 3.2**).

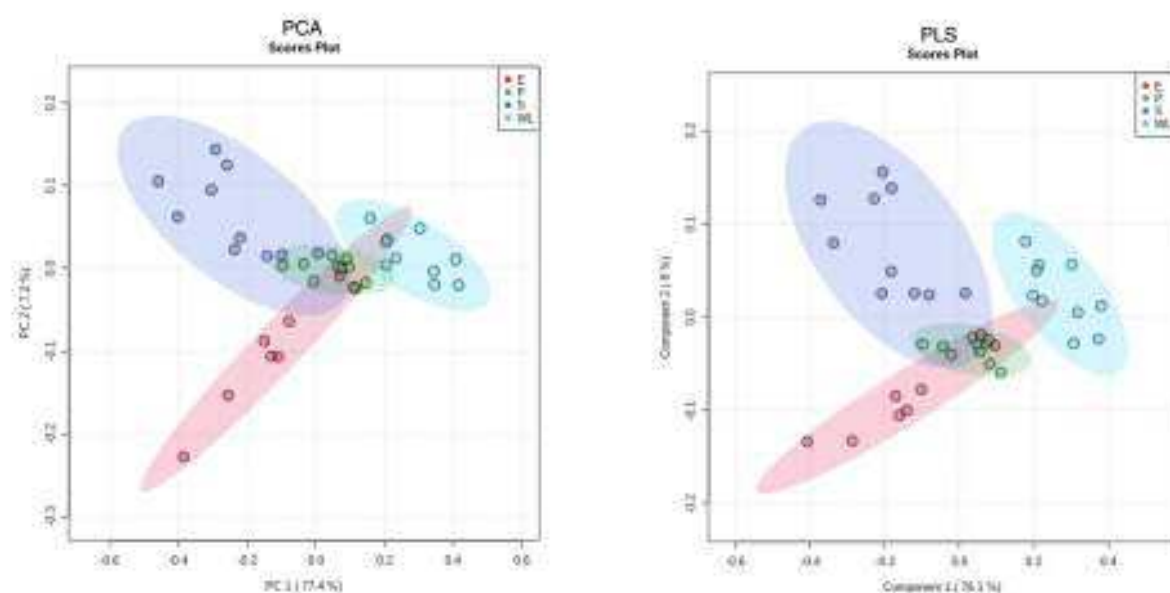


Figura 3.2 PCA (izquierda) Y PLS (derecha) de las variedades comerciales estudiadas.

En contraste, el PCA realizado sobre los datos de los cuatro híbridos en evaluación no logró una separación tan clara entre todos los genotipos. No obstante, los cultivares B475 y M16 formaron un grupo separado del resto, posiblemente reflejando su origen genético común como descendientes del cruzamiento Ellendale $\times$ Willowleaf. El análisis explicó aproximadamente el 80 % de la varianza total en los dos primeros componentes, y esta tendencia fue corroborada por un modelo PLS (**Figura 3.3**).

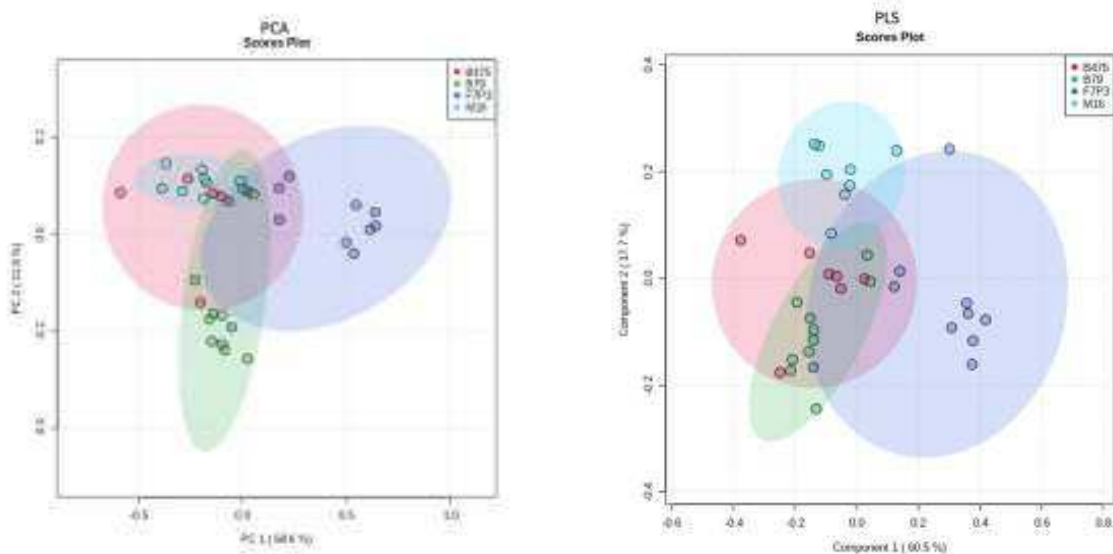


Figura 3.3 Análisis de componentes principales (izquierda) y mínimos cuadrados parciales (derecha) de las variedades híbridas estudiadas.

La transferencia de rasgos fenotípicos de los cultivares parentales hacia sus híbridos fue evaluada a través del análisis comparativo de los perfiles metabólicos obtenidos mediante espectroscopía de ^1H RMN. Este enfoque ha sido empleado en otros estudios metabolómicos, pero empleando GC-MS. En este caso se exploró la heredabilidad de perfiles metabólicos en cítricos y su resistencia a enfermedades, demostrando que ciertos metabolitos primarios y secundarios presentan patrones de transmisión heredable (Killiny et al., 2020).

En este trabajo se analizaron los perfiles de híbridos derivados del cruzamiento entre Willowleaf (WL) y Ellendale (E), particularmente los cultivares B475 y M16, con el objetivo de visualizar la herencia metabólica de sus compuestos solubles en agua. El PCA aplicado a los espectros de ^1H RMN mostró que en todos los casos evaluados las dos primeras componentes explicaron aproximadamente el 80 % de la varianza total, permitiendo una representación clara de las relaciones entre los perfiles de los parentales y sus descendientes.

En la mayoría de los casos, las puntuaciones de los híbridos se posicionaron entre las correspondientes a sus progenitores, con superposición parcial con uno o ambos parentales (**Figura 3.4**). Este patrón sugiere una contribución combinada de ambos

genomas parentales a la composición metabólica final de la pulpa. Tal comportamiento intermedio ha sido reportado también en estudios metabolómicos con otras plataformas analíticas como LC-MS y GC-MS, donde los híbridos presentan perfiles que reflejan combinaciones de los metabolitos dominantes de cada parental (Bi et al., 2022; Killiny et al., 2020; Kim et al., 2021).

Un ejemplo ilustrativo de este fenómeno se observa en el cultivar B475, el cual mostró una alta aceptación sensorial. Al compararse sus perfiles espectrales con los de sus progenitores WL y E, se constató una baja dispersión de las réplicas y una ubicación central en el espacio multivariado (**Figura 3.4**). Esta posición refleja un perfil metabólico intermedio, consistente con una herencia cuantitativa de metabolitos solubles, como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos (Bassene et al., 2009; Kumar et al., 2024; Sdiri, Bermejo, Aleza, Navarro, & Salvador, 2012). Además, el análisis de las variables de importancia para la proyección (VIP) derivadas del modelo PLS mostró que los valores correspondientes a B475 tienden a ser intermedios para las señales que más contribuyen a la separación entre genotipos, lo cual respalda aún más esta interpretación.

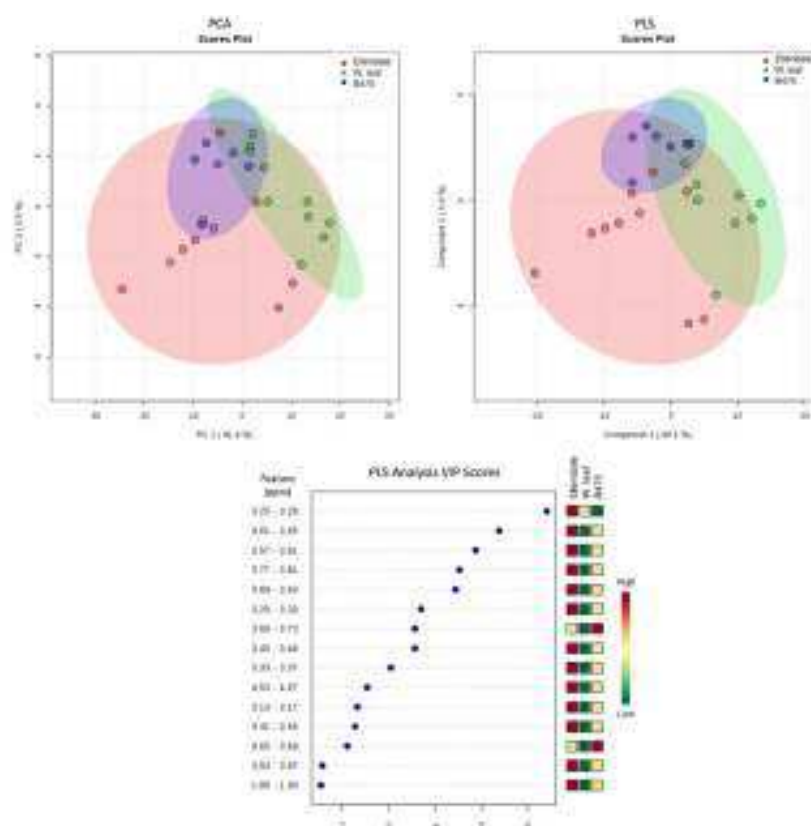


Figura 3.4 Representación de PCA (A) y PLS (B), y variables de importancia en la proyección del análisis de PLS (C) realizado en B475 y sus parentales.

En contraste, el cultivar M16, también derivado del cruzamiento $WL \times E$ pero con baja aceptación sensorial, presentó un perfil diferenciado respecto a sus parentales. En el gráfico de puntuaciones del PCA (**Figura 3.5**), donde PC1 y PC2 explicaron el 88 % de la varianza, se observa que M16 no se superpone con WL y presenta solapamiento limitado con E. Esta segregación sugiere diferencias marcadas en la concentración de ciertos metabolitos determinantes de calidad y explica, por ejemplo, la alta acidez total observada en este híbrido. Estos resultados indicarían que aunque muchos metabolitos presentan una herencia aditiva, otros pueden responder a mecanismos más complejos como dominancia, epistasis o regulación específica por el ambiente o el desarrollo del fruto (Alseekh et al., 2015; Rowe, Hansen, Halkier, & Kliebenstein, 2008).

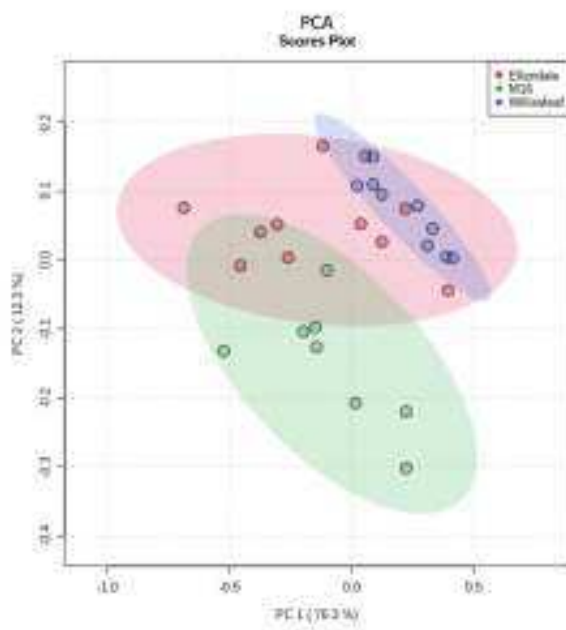


Figura 3.5 PCA del híbrido M16 y sus parentales ($E \times WL$).

3.3.4 Desarrollo de un modelo quimiométrico de aceptabilidad basado en ^1H RMN

Los análisis sensoriales, empleando los atributos organolépticos descritos anteriormente, indican que un sabor dulce y equilibrado, con acidez moderada, constituye el principal factor de aceptación, mientras que una acidez excesiva es el atributo más asociado al rechazo por parte de los consumidores.

El modelo quimiométrico desarrollado en este estudio se basa en datos espectroscópicos de ^1H RMN y fue diseñado para vincular directamente los perfiles metabólicos con los resultados de aceptabilidad sensorial. El análisis PLS-DA permitió separar con claridad dos variedades con comportamiento extremo: la más aceptada (B475) y la menos aceptada (M16), mostrando que las señales correspondientes a azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) fueron las principales responsables de la discriminación a favor de B475, mientras que en M16 predominaron las señales correspondientes a ácidos orgánicos, particularmente citrato (**Figura 3.6**). El análisis OPLS-DA confirmó esta tendencia, revelando una contribución diferencial de estos metabolitos, lo que es consistente con el patrón sensorial observado.

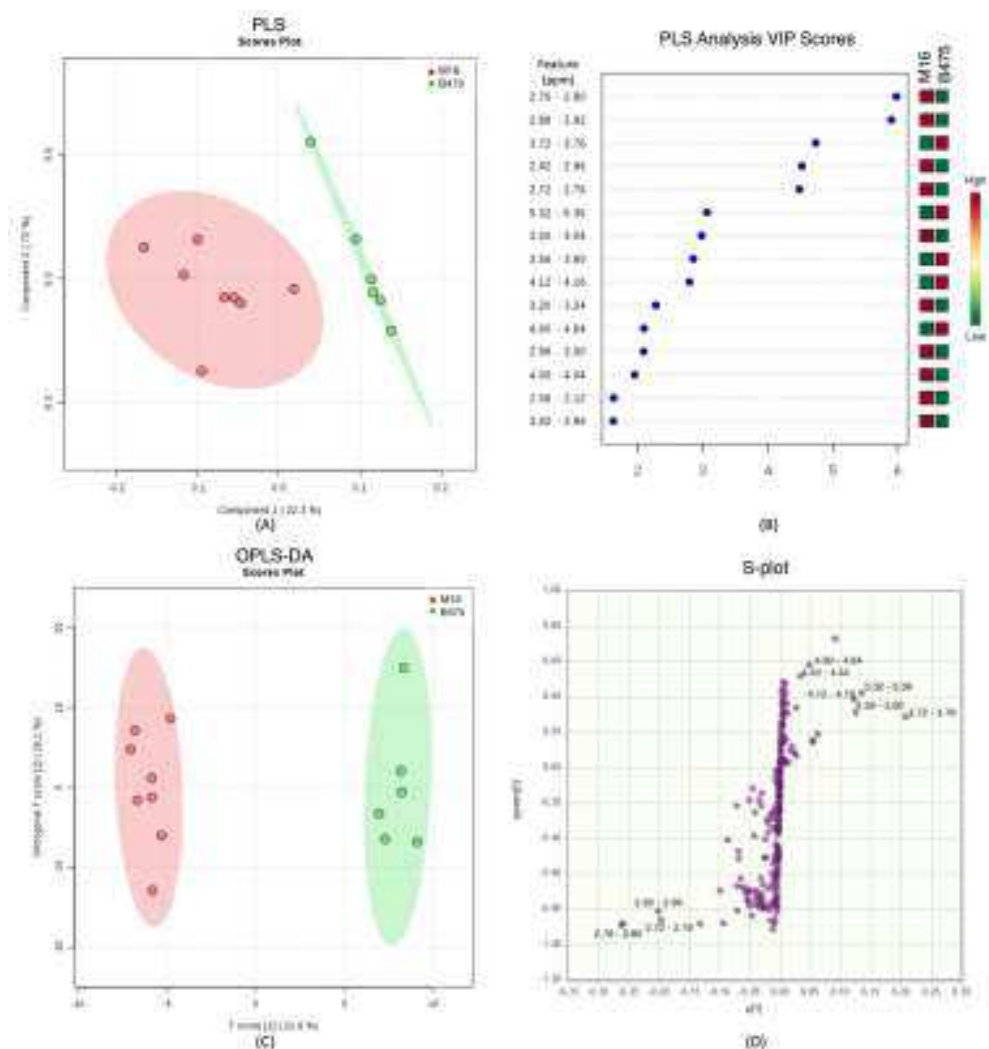


Figura 3.6 (A) Representación del PLS-DA de las variedades más (B475B) y menos aceptadas (M16). (B) Valores VIP del análisis de PLS-DA. (C) Representación del OPLS-DA de las variedades más (B475B) y menos aceptadas (M16), y (D) S-plot del mismo análisis.

En comparación con métodos tradicionales, como el índice °Brix/acidez, empleado habitualmente como indicador indirecto de palatabilidad en cítricos (Gupta et al., 2022; Lado, Gambetta, & Zacarias, 2018), el uso de perfiles metabólicos completos mediante RMN proporciona una evaluación más precisa y multidimensional del sabor, ya que permite la identificación simultánea de múltiples compuestos involucrados en la percepción del gusto y aroma (Hu et al., 2024; Shu et al., 2023).

Con el fin de evaluar si un enfoque más simplificado basado en los principales metabolitos identificados podía explicar la aceptabilidad, se construyó un modelo de correlación lineal entre el cociente del poder edulcorante calculado mediante la corrección del área de la señal de cada azúcar por el índice relativo de dulzor de cada azúcar según la escala de Schiffman (Schiffman et al., 1995) y el contenido de ácido cítrico, contra el puntaje sensorial de aceptabilidad. El modelo resultante presentó un buen coeficiente de correlación ($R^2 = 0,79$), lo cual indica que esta relación azúcares/ácido cítrico, determinada por RMN, puede ser un fuerte predictor del agrado del consumidor (Figura 3.7).

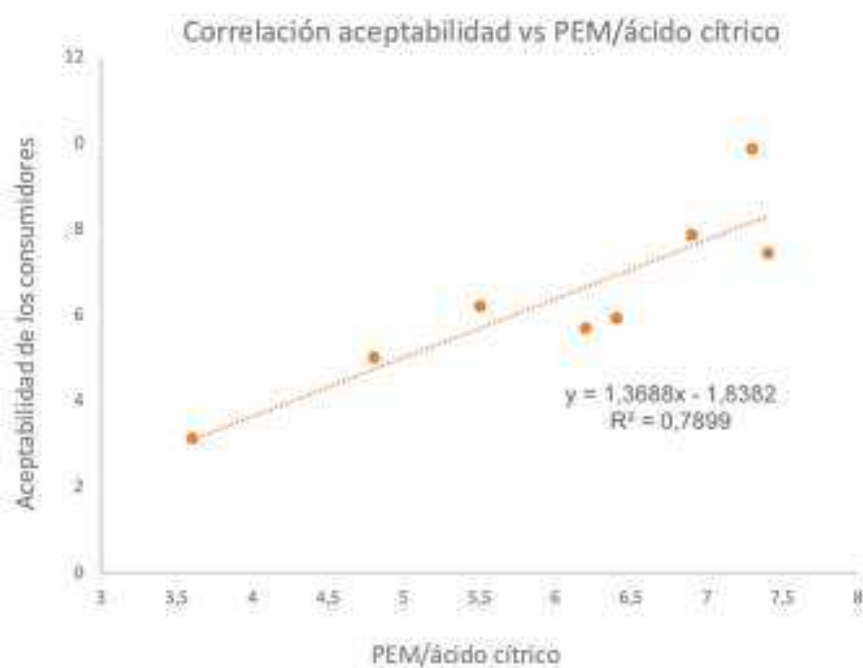


Figura 3.7 Correlación entre el cociente poder endulzante/ácido cítrico y la aceptabilidad determinada por consumidores.

La validez de este modelo fue interrogada utilizando una nueva variedad híbrida (A30), que no formó parte del conjunto original de entrenamiento. El valor de relación calculado por RMN fue de 5,9, lo cual predijo una aceptabilidad de 6,1. El valor sensorial determinado experimentalmente fue de 6,6, lo que representa un error relativo inferior al 7%. Este buen ajuste sugiere que el modelo desarrollado no solo explica adecuadamente los datos observados, sino que también posee capacidad predictiva para variedades no incluidas en la generación del modelo. Esto lo convierte en una herramienta de utilidad para programas de mejoramiento genético y selección temprana de cultivares.

Este tipo de abordaje se alinea con investigaciones previas que han utilizado metabolómica para comprender la herencia de características sensoriales complejas en cítricos. Además, se destaca que la espectroscopía de RMN, por su reproducibilidad, bajo requerimiento de preparación de muestras y capacidad para detectar metabolitos clave sin necesidad de estándares, representa una herramienta ideal para la evaluación objetiva de la calidad organoléptica en frutas (Cuthbertson, Andrews, Reganold, Davies, & Lange, 2012; Liu et al., 2025; Silva Barbosa Correia et al., 2024).

Luego de establecer un modelo quimiométrico robusto basado en datos obtenidos por RMN de alto campo, se exploró la posibilidad de aplicar esta estrategia utilizando espectrómetros de RMN de mesada. A pesar de su menor resolución, estos equipos de bajo campo tienen ventajas operativas y logísticas que los hacen preferibles, particularmente a la hora de desarrollar un método aplicable a programas de mejoramiento genético o control de calidad en campo. En esta etapa se buscó determinar si las ventajas observadas, en particular la capacidad de discriminar entre variedades aceptadas y rechazadas por los consumidores mediante sus perfiles metabólicos, podían mantenerse al utilizar equipos de menor resolución.

En primer lugar, se compararon los espectros de ^1H RMN obtenidos a 400 y 60 MHz para el mismo extracto acuoso de la variedad de mandarina B475B (**Figura 3.8**). Como era esperable, los espectros obtenidos a 60 MHz mostraron un mayor solapamiento de señales que los registrados a 400 MHz, particularmente en la región de 3,00 a 4,30 ppm, lo cual dificulta la asignación inicial sin un conocimiento técnico específico. Sin embargo, las señales correspondientes a protones anoméricos de los azúcares (sacarosa, glucosa y

fructosa) y a los protones metilénicos del ácido cítrico se encuentran en regiones menos congestionadas, lo que posibilita su integración confiable incluso a menor resolución. Esta observación permitió adaptar la metodología previamente desarrollada con espectros de 400 MHz para aplicarla en el análisis de los datos obtenidos con RMN de mesa.

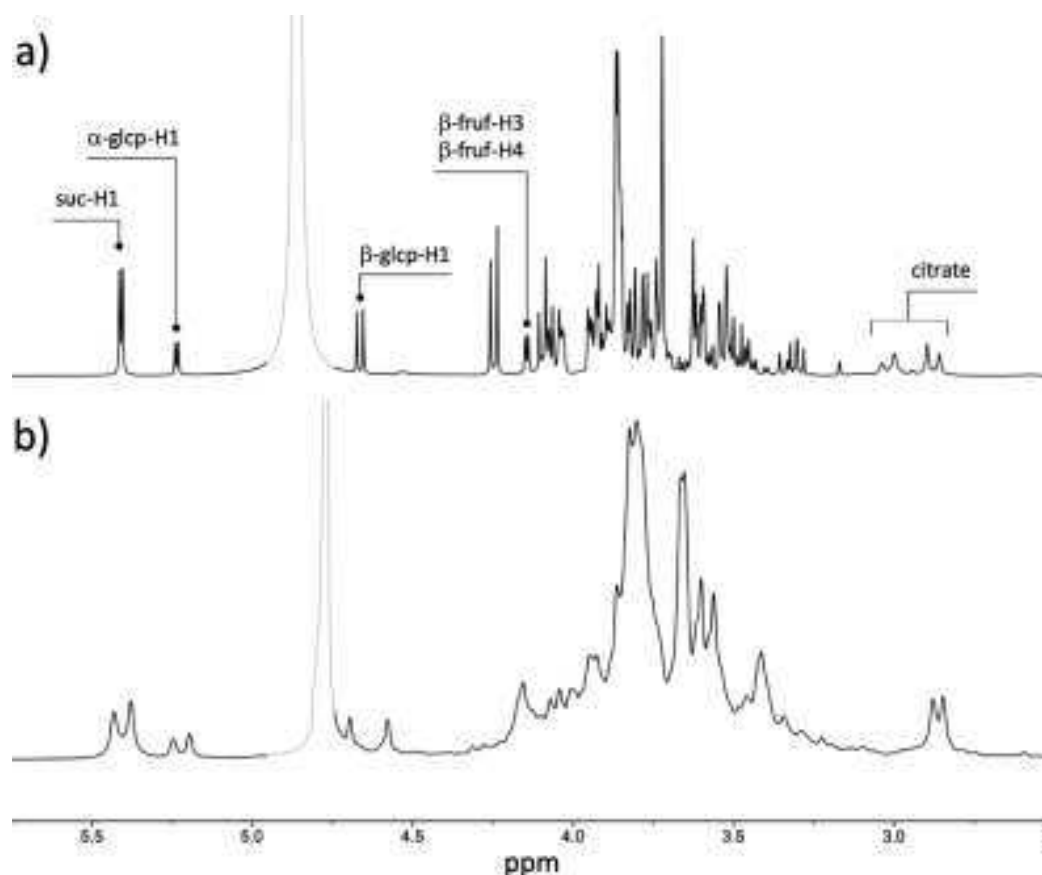


Figura 3.8 Comparación de los espectros de ^1H del extracto acuoso de mandarina de la variedad B475B obtenido con espectrómetros de 400 y 60 MHz (a y b, respectivamente). Las resonancias empleadas en las estimaciones se muestran en el espectro de 400 MHz. La región atenuada en ambos espectros corresponde al pico residual de HDO.

Se calcularon los valores del cociente poder edulcorante / ácido cítrico para cinco variedades de mandarina utilizando datos adquiridos tanto con espectrómetros de 400 como de 60 MHz (**Tabla 3.4**). La aceptabilidad predicha mediante el modelo mostró un alto grado de correlación con los valores determinados sensorialmente por consumidores, con coeficientes de determinación (R^2) de 0,94 y 0,96 para los modelos construidos con datos de 400 y 60 MHz, respectivamente (**Figura 3.9**). En ambos casos, el error

cuadrático medio de predicción (RMSE) fue bajo (0,35 y 0,29), lo que destaca la robustez del modelo aun con instrumentación de menor resolución.

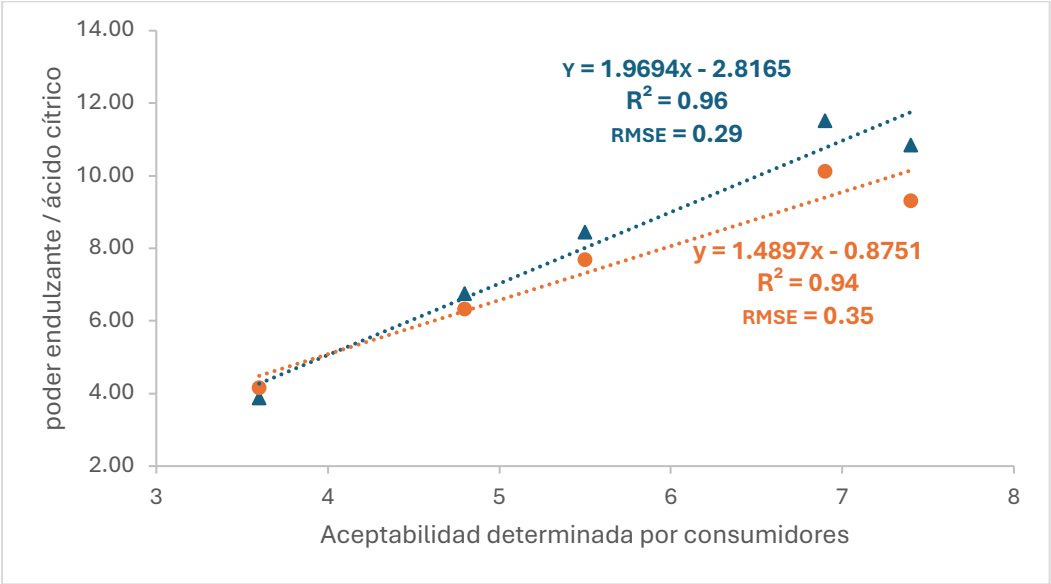


Figura 3.9 Correlación entre la aceptabilidad de los consumidores y el cociente del poder endulzante / ácido cítrico determinado usando datos obtenidos a 60 y 400 MHz (triángulos azules y círculos naranja respectivamente).

Tabla 3.4 Resultados de la evaluación sensorial (aceptabilidad), cociente del poder endulzante/ácido cítrico, aceptabilidad predicha por el modelo y RMSE de cada modelo (con datos del espectrómetro de 60 y 400 MHz).

Variedad	Aceptabilidad	60 MHz			400 MHz		
		Poder endulzante/ácido cítrico*	Aceptabilidad predicha	RMSE	Poder endulzante/ácido cítrico*	Aceptabilidad predicha	RMSE
B475B	7,4	10,85	6,88	0,29	9,31	6,76	0,35
F7P3	6,9	11,53	7,21		10,12	7,27	
B475A	5,5	8,45	5,72		7,70	5,75	
B79	4,8	6,75	4,89		6,34	4,90	
M16	3,6	3,88	3,50		4,16	3,53	

*Los valores reportados corresponden al promedio de 5 réplicas. El RSD fue inferior al 20% para todas las variedades analizadas.

Además, se observó una alta correlación ($R^2 > 0,99$) entre las predicciones obtenidas con ambos modelos, lo que refuerza la equivalencia de las dos plataformas para esta aplicación específica. Esta equivalencia también fue evidente al comparar directamente los valores del cociente dulzor/acidez determinados con ambas técnicas, con una correlación $R^2 > 0,99$, confirmando la consistencia cuantitativa del método.

Si bien los espectros de bajo campo presentan ciertas limitaciones en cuanto a resolución y requieren atención especial durante el preprocesamiento e integración de señales, especialmente en regiones con alta densidad de señales, también presentan ventajas operativas importantes. Al tener menor resolución, aquellas señales que sufren desplazamientos por el pH o la temperatura son más fáciles de alinear para posteriormente hacer estudios metabolómicos rutinarios (Matviychuk, Yeo, & Holland, 2019).

Estos resultados demuestran que la espectroscopía de RMN de mesa, pese a sus limitaciones técnicas, es una herramienta válida para predecir la aceptabilidad de frutas cítricas, replicando con éxito un modelo desarrollado originalmente con equipamiento de alta resolución. Esto abre una vía accesible y confiable para la implementación de modelos quimiométricos en ambientes no especializados, con potencial para su adopción en centros de evaluación de germoplasma o unidades productivas interesadas en la selección temprana de nuevas variedades con buenas aptitudes sensoriales.

3.3.5 Aplicación de FT-IR a la diferenciación de variedades de mandarinas

Para seguir buscando plataformas analíticas aptas para uso en campo, se utilizó FT-IR como técnica no destructiva que permite llevar a cabo estudios metabolómicos. Al analizar visualmente los espectros FT-IR de B475B y M16, se pueden ver perfiles similares, tal como ocurría con los espectros de ^1H RMN. Sin embargo, ciertas regiones del espectro muestran intensidades diferentes para cada muestra (**Figura 3.10**). Las mayores diferencias se pueden identificar en la región de $3600 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ (vibración de estiramiento de enlaces con hidrógeno como O-H, C-H) y $1800 - 900 \text{ cm}^{-1}$ (vibraciones de estiramiento y flexión de enlaces múltiples como C=O, y enlaces simples con diferencia de electronegatividad como C-O).

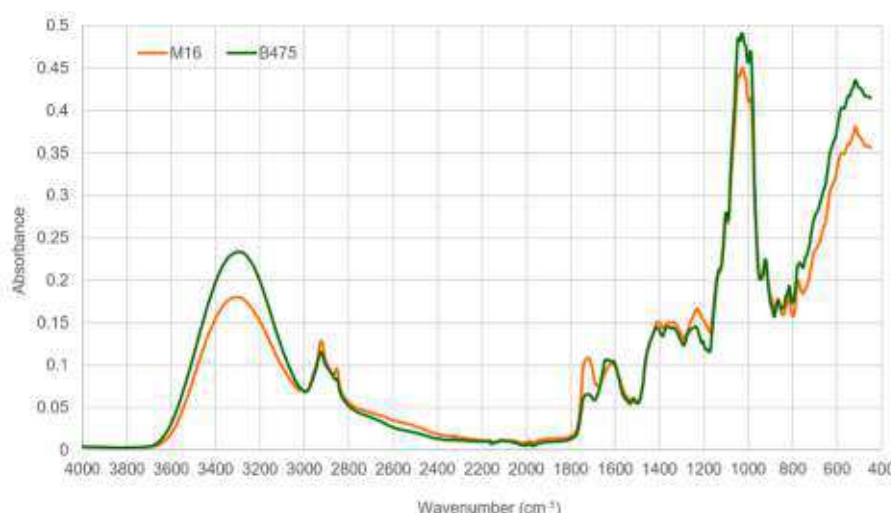


Figura 3.10 Espectro promedio de FT-IR de las variedades B475B y M16.

La muestra M16 se caracteriza por alta intensidad en 1722 cm^{-1} y 1226 cm^{-1} , característica de ácidos carboxílicos, mientras que la muestra B475B se caracteriza por alta intensidad en 1054 cm^{-1} y 998 cm^{-1} , que podría atribuirse a señales de azúcares (**Figura 3.11**). Estos resultados son concordantes con los obtenidos mediante ^1H RMN.

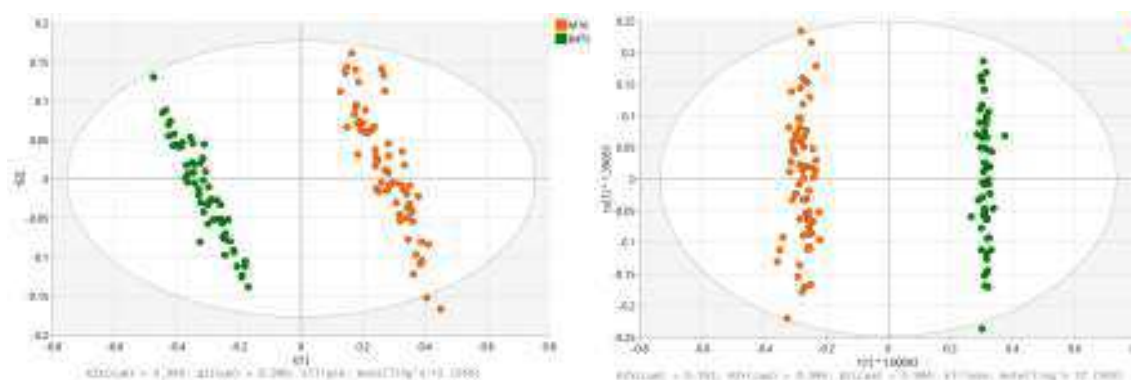


Figura 3.11 PCA (izquierda) y OPLS-DA (derecha) de las variedades B475B y M16 analizadas mediante FTIR.

El modelo pudo predecir correctamente la variedad de mandarina de las muestras en el conjunto de datos de prueba, ya que se logró una tasa de clasificación correcta del 100% para las variedades M16 y B475 en la validación externa del mismo (**Tabla 3.5**).

Tabla 3.5 Tabla de clasificación del set de validación del modelo OPLS-DA de las variedades B475B y M16 mediante FTIR.

Muestra	n	M16	B475B	% de predicción correcta de muestras
M16	32	32	0	100
B475B	29	0	29	100
Sin clase	0	0	0	0
Total	61	32	29	100

Fisher's $4,6e^{-18}$

Estos resultados muestran que la espectroscopía de FT-IR, combinada con análisis multivariado, constituye una herramienta analítica prometedora para la diferenciación de variedades de mandarina. Además, esta estrategia puede contribuir a la identificación y prevención de prácticas fraudulentas en el comercio de frutas cítricas. Asimismo, representa un aporte potencial al registro de variedades y a la protección de la propiedad intelectual.

3.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la espectroscopía de ^1H RMN, tanto de alto como de bajo campo, constituye una herramienta poderosa y versátil para el análisis químico no dirigido de mandarinas, y en particular para la predicción de su aceptabilidad por parte del consumidor. La integración de metodologías metabolómicas con modelos quimiométricos simples demuestra ser una estrategia efectiva para anticipar características sensoriales a partir de parámetros químicos objetivos.

En una primera instancia, se desarrolló un modelo de predicción de aceptabilidad basado en la razón entre el poder edulcorante y el contenido de ácido cítrico, obtenida a partir de perfiles de RMN de campo alto (400 MHz). Este modelo mostró una excelente capacidad predictiva ($R^2 = 0,94$, $\text{RMSE} = 0,35$), apoyando la hipótesis de que la aceptabilidad sensorial de las mandarinas se encuentra fuertemente influenciada por el equilibrio entre dulzor y acidez, como ha sido señalado previamente (Lado et al., 2018). El poder edulcorante, definido como una medida ponderada de las concentraciones molares de sacarosa, glucosa y fructosa, resultó un descriptor eficaz de la percepción global del

dulzor, mientras que la concentración de ácido cítrico sirvió como un indicador confiable de la acidez organoléptica.

Posteriormente, se adaptó y validó esta estrategia analítica utilizando datos obtenidos mediante un espectrómetro de RMN de mesada (60 MHz). A pesar de la menor resolución de este tipo de equipos, fue posible identificar e integrar señales clave (protones anoméricos de los azúcares y metilénicos del ácido cítrico), permitiendo aplicar el modelo de predicción con resultados altamente satisfactorios ($R^2 = 0,96$, $RMSE = 0,29$). Esta validación constituye un hallazgo de gran importancia, ya que demuestra que los modelos quimiométricos desarrollados con datos de RMN de alto campo pueden ser replicados con éxito en plataformas más accesibles, siempre que se mantenga rigurosidad en el procesamiento y análisis de datos.

Además, la alta correlación entre los valores experimentales obtenidos en ambas plataformas ($R^2 > 0,99$ para el cociente dulzor/acidez; $R^2 > 0,99$ para las aceptabilidades predichas) confirma la consistencia cuantitativa del método y subraya la robustez del enfoque analítico empleado. Por lo tanto, se destacan las ventajas operativas de la RMN de bajo campo, como la simplificación de la alineación espectral, lo que podría facilitar su adopción en la industria o laboratorios no especializados.

Estos resultados coinciden con estudios recientes que han propuesto la RMN de mesada como una tecnología emergente para aplicaciones agrícolas, alimentarias y ambientales (Di Matteo et al., 2025; Gouilleux, Marchand, Charrier, Remaud, & Giraudeau, 2018), y se alinean con las tendencias actuales en quimiometría sensorial aplicada a frutas (Milbert, Müller, Krenz, Pflaum, & Seifert, 2024; Zielinski et al., 2014). En este sentido, el presente trabajo representa una contribución significativa a la validación empírica de estas propuestas, al demostrar su aplicabilidad concreta en un caso de estudio relevante para el mejoramiento genético de cítricos.

Desde un punto de vista metodológico, este capítulo muestra cómo la integración de herramientas espectroscópicas no dirigidas con modelos matemáticos simples puede servir como estrategia eficaz para sustituir (al menos parcialmente) ensayos sensoriales intensivos en recursos y tiempo. En particular, este enfoque puede ser especialmente útil

durante las etapas tempranas del desarrollo varietal, permitiendo filtrar materiales de bajo interés sensorial antes de escalar los ensayos a nivel comercial o de consumidor.

Los hallazgos presentados en este capítulo (**Figura 3.12**) permiten afirmar que es posible predecir la aceptabilidad sensorial de mandarinas a partir de mediciones químicas rápidas y no destructivas, lo cual representa una alternativa eficaz a la realización de paneles sensoriales extensos, costosos y logísticamente complejos [Apéndice 1: The impact of sensory attributes of mandarins on consumer perception and preferences (Gámbaro *et al.*, 2021)]. La aplicación de este modelo químico en extractos acuosos de mandarina mediante espectroscopía de RMN de protón permitió desarrollar y validar herramientas de predicción basadas en metabolómica. [Apéndice 2: ^1H RMN metabolic profiles as selection tools of new mandarin cultivars based on fruit acceptability (Migues *et al.*, 2021)]. Finalmente, este enfoque fue transferido con éxito a espectroscopía de bajo campo (60 MHz), validando la aplicabilidad de instrumentos de mesada para este tipo de análisis sin pérdida significativa de precisión, ampliando el acceso a estas tecnologías en entornos con menores recursos instrumentales [Apéndice 3: Predicting Mandarin Fruit Acceptability: From High-Field to Benchtop NMR Spectroscopy (Migues, Rivas, Moyna, Kelly, & Heinzen, 2022)].

La metodología desarrollada presenta una clara orientación hacia la transferencia tecnológica a empresas, programas de mejoramiento genético y otras instancias de evaluación de germoplasma. Contempla condiciones realistas de implementación, como simplicidad analítica, robustez y reproducibilidad, y abre la posibilidad de transferir los hallazgos metabolómicos a herramientas de menor complejidad operativa y costo. Este trabajo realizado sobre pulpa muestra el valor de la metabolómica como herramienta de predicción y apoyo a la toma de decisiones, tanto para la selección temprana de cultivares como para definir estrategias de diferenciación comercial reduciendo la dependencia exclusiva de evaluaciones sensoriales costosas y prolongadas. Esta estrategia de transferencia se alinea con buenas prácticas internacionales donde el objetivo no es solo detectar diferencias entre muestras, sino convertir la información analítica en herramientas para la toma de decisión trazable y auditable (Sumner *et al.*, 2007).



Figura 3.12 Principales resultados del capítulo 3, creada con NotebookLM.

En futuras investigaciones se podrá explorar la integración de otros descriptores sensoriales, como el aroma o la textura, así como la incorporación de técnicas espectroscópicas complementarias, tales como la espectrometría de masas, con el fin de desarrollar modelos más integrales y precisos de evaluación de la calidad organoléptica de los frutos. En este sentido, uno de los desarrollos derivados del estudio metabólico no dirigido realizado en esta tesis fue la publicación de un trabajo centrado en el análisis de aminoácidos libres en pulpa de mandarina mediante espectrometría de masas, que permitió identificar diferencias significativas entre variedades cultivadas en Uruguay [Apéndice 4: Variability levels of selected amino acids among mandarins produced in Uruguay (Rezende et al., 2021)], el cual formó parte de la tesis final de la licenciatura en alimentos de la UTEC de Sofía Rezende y Sabrina Banchemo. Estos resultados aportan evidencia adicional sobre la utilidad de los perfiles químicos como herramienta de caracterización sensorial. Además, la combinación de datos químicos con enfoques de aprendizaje automático representa una estrategia promisorio para mejorar aún más la precisión y aplicabilidad de los modelos predictivos desarrollados, especialmente en contextos reales de producción, selección varietal y programas de mejoramiento genético.

3.5 Referencias bibliográficas

- Alseekh, S., Tohge, T., Wendenberg, R., Scossa, F., Omranian, N., Li, J., ... Fernie, A. R. (2015). Identification and mode of inheritance of quantitative trait loci for secondary metabolite abundance in tomato. *The Plant Cell*, 27(3), 485–512. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132266>
- Bassene, J., Berti, L., Costantino, G., Carcouet, E., Kamiri, M., Tomi, F., ... Froelicher, Y. (2009). Inheritance of characters involved in fruit quality in a citrus interspecific allotetraploid somatic hybrid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 11, 5065–5070. <https://doi.org/10.1021/jf803872f>
- Bello, F., Vasquez, D., & Nanci, A. (2016). Momento De Cosecha, (1), 5–7.
- Bi, X., Liao, L., Deng, L., Jin, Z., Huang, Z., Sun, G., ... Wang, Z. (2022). Combined Transcriptome and Metabolome Analyses Reveal Candidate Genes Involved in Tangor (*Citrus reticulata* × *Citrus sinensis*) Fruit Development and Quality Formation. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms23105457>
- Bingol, K. (2018). Recent Advances in Targeted and Untargeted Metabolomics by NMR and MS/NMR Methods. *High-Throughput*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/ht7020009>
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., ... Xia, J. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486–W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Chong, J., & Xia, J. (2018). MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics*, 34(24), 4313–4314. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty528>
- Cubero, S., Albert, F., García Fernández-Pacheco, D., Prats-Montalbán, J. M., Blasco, J., & Aleixos, N. (2016). Estimación del Índice de Color de los Cítricos utilizando dispositivos móviles. In *VIII Congreso Ibérico de Agroingeniería. Retos de la Nueva Agricultura Mediterránea* (pp. 926–935). Orihuela-Algorfa. Retrieved from [https://innovacionumh.es/editorial/VIII Congreso Iberico de Agroingenieria.pdf#page=926](https://innovacionumh.es/editorial/VIII_Congreso_Iberico_de_Agroingenieria.pdf#page=926)
- Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., & Ollitrault, P. (2016). Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear

- markers. *Annals of Botany*, 117(4), 565–583. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw005>
- Cuthbertson, D., Andrews, P. K., Reganold, J. P., Davies, N. M., & Lange, B. M. (2012). Utility of metabolomics toward assessing the metabolic basis of quality traits in apple fruit with an emphasis on antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8552–8560. <https://doi.org/10.1021/jf3031088>
- Di Matteo, G., Grassi, S., Emanuele, M. C., Scioli, G., Brigante, F. I., Bontempo, L., ... Mannina, L. (2025). Current applications of benchtop FT-NMR in food science: From quality control to adulteration detection. *Food Research International*, 209, 116327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116327>
- Fujii, H., Ohta, S., Nonaka, K., Katayose, Y., Matsumoto, T., Endo, T., ... Shimada, T. (2016). Parental diagnosis of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) revealed by nuclear and cytoplasmic markers. *Breeding Science*, 66(5), 683–691. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.16060>
- Gámbaro, A., Roascio, A., Hodos, N., Miguez, I., Lado, J., Heinzen, H., & Rivas, F. (2021). The impact of sensory attributes of mandarins on consumer perception and preferences. *Journal of Agriculture and Food Research*, 6, 100196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100196>
- Gouilleux, B., Marchand, J., Charrier, B., Remaud, G. S., & Giraudeau, P. (2018). High-throughput authentication of edible oils with benchtop Ultrafast 2D NMR. *Food Chemistry*, 244, 153–158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.016>
- Gupta, A. K., Pathak, U., Tongbram, T., Medhi, M., Terdwongworakul, A., Magwaza, L. S., ... Mishra, P. (2022). Emerging approaches to determine maturity of citrus fruit. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(19), 5245–5266. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1883547>
- Hardy, A. S., Barkley, P., Treeby, M., Smith, M., Sanderson, G., Hardy, S., ... Smith, M. (n.d.). Australian mandarin production manual. NSW Department of Primary Industries, 2017.
- Hu, Z., Chen, M., Zhu, K., Liu, Y., Wen, H., Kong, J., ... Xu, J. (2024). Multiomics integrated with sensory evaluations to identify characteristic aromas and key genes in a novel brown navel orange (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, 444, 138613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138613>
- Killiny, N., Jones, S. E., Hijaz, F., Kishk, A., Santos-Ortega, Y., Nehela, Y., ... Dutt, M.

- (2020). Metabolic Profiling of Hybrids Generated from Pummelo and Citrus latipes in Relation to Their Attraction to Diaphorina citri, the Vector of Huanglongbing. *Metabolites*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/metabo10120477>
- Kim, D.-S., Lee, S., Park, S., Yun, S., Gab, H.-S., Kim, S., & Kim, H.-J. (2021). Comparative Metabolomics Analysis of Citrus Varieties. *Foods*, 10. <https://doi.org/10.3390/foods10112826>
- Kumar, R., Sharma, N., Dubey, A., Sharma, R., Sethi, S., Mishra, G., ... Sharma, N. (2024). Fruit Quality Assessment of Novel Hybrid Pummelo × Sweet Orange and Its Molecular Characterization Using Acidity Specific Markers. *Food Technology and Biotechnology*, 62, 35–45. <https://doi.org/10.17113/ftb.62.01.24.8349>
- Lado, J., Gambetta, G., & Zacarias, L. (2018). Key determinants of citrus fruit quality: Metabolites and main changes during maturation. *Scientia Horticulturae*, 233, 238–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.055>
- Lado, J., Rodrigo, M. J., & Zacarías, L. (2014). Maturity indicators and citrus fruit quality. *Stewart Postharvest Review*, 10(2), 1–6.
- Liu, J., Sun, J., Wang, Y., Liu, X., Zhang, Y., & Fu, H. (2025). Non-Destructive Detection of Fruit Quality: Technologies, Applications and Prospects. *Foods*. <https://doi.org/10.3390/foods14122137>
- Matviychuk, Y., Yeo, J., & Holland, D. J. (2019). A field-invariant method for quantitative analysis with benchtop NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 298, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2018.11.010>
- Migues, I., Hodos, N., Moltini, A. I., Gámbaro, A., Rivas, F., Moyna, G., & Heinzen, H. (2021). ¹H NMR metabolic profiles as selection tools of new mandarin cultivars based on fruit acceptability. *Scientia Horticulturae*, 287, 110262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110262>
- Migues, I., Rivas, F., Moyna, G., Kelly, S. D., & Heinzen, H. (2022). Predicting Mandarin Fruit Acceptability: From High-Field to Benchtop NMR Spectroscopy. *Foods*. <https://doi.org/10.3390/foods11162384>
- Milbert, S., Müller, T. M., Krenz, O., Pflaum, M., & Seifert, S. T. (2024). Development and application of chemometrical methods based on ¹H-NMR spectra of fruit juices – Structural approach for analysis of wide and unbalanced datasets. *Food Control*, 164, 110584. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110584>
- Rezende, S., Banchemo, S., Migues, I., Cesio, M. V., Rivas, C. F., Heinzen, H., & Besil,

- M. N. (2021). Variability levels of selected amino acids among mandarins produced in Uruguay. *Eclética Química*, 46(4 SE-Original articles), 47–59. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v46.4.2021.p47-59>
- Rivera-Pérez, A., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2023). Untargeted 1H NMR-based metabolomics and multi-technique data fusion: A promising combined approach for geographical and processing authentication of thyme by multivariate statistical analysis. *Food Chemistry*, 420, 136156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136156>
- Ross, A. A. (1949). The origin of the Ellendale mandarin and its relatives. *Queensland Agricultural Journal*, 69, 224–224.
- Rowe, H. C., Hansen, B. G., Halkier, B. A., & Kliebenstein, D. J. (2008). Biochemical Networks and Epistasis Shape the Arabidopsis thaliana Metabolome. *The Plant Cell*, 20(5), 1199–1216. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058131>
- Schiffman, S. S., Booth, B. J., Losee, M. L., Pecore, S. D., & Warwick, Z. S. (1995). Bitterness of sweeteners as a function of concentration. *Brain Research Bulletin*, 36(5), 505–513. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)00225-P](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)00225-P)
- Sdiri, S., Bermejo, A., Aleza, P., Navarro, P., & Salvador, A. (2012). Phenolic composition, organic acids, sugars, vitamin C and antioxidant activity in the juice of two new triploid late-season mandarins. *Food Research International*, 49, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.040>
- Shimizu, T., Kitajima, A., Nonaka, K., Yoshioka, T., Ohta, S., Goto, S., ... Nakamura, Y. (2016). Hybrid Origins of Citrus Varieties Inferred from DNA Marker Analysis of Nuclear and Organelle Genomes. *PLOS ONE*, 11(11), e0166969–e0166969. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166969>
- Shu, N., Chen, X., Sun, X., Cao, X., Liu, Y., & Xu, Y.-J. (2023). Metabolomics identify landscape of food sensory properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(27), 8478–8488. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2062698>
- Silva Barbosa Correia, B., Ferraz de Arruda, H., Spricigo, P. C., Ceribeli, C., Souza Almeida, L., Rodrigues Cardoso, D., ... Colnago, L. A. (2024). Emerging studies of NMR-based metabolomics of fruits regarding botanic family species associated with postharvest quality. *Journal of Food Composition and Analysis*, 130, 106136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106136>
- Stampanoni, C. R. (1993). Influence of acid and sugar content on sweetness, sourness and

- the flavour profile of beverages and sherbets. *Food Quality and Preference*, 4(3), 169–176. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0950-3293\(93\)90159-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0950-3293(93)90159-4)
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., ... Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics : Official Journal of the Metabolomic Society*, 3(3), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7(1), 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- Zielinski, A. A. F., Haminiuk, C. W. I., Nunes, C. A., Schnitzler, E., van Ruth, S. M., & Granato, D. (2014). Chemical Composition, Sensory Properties, Provenance, and Bioactivity of Fruit Juices as Assessed by Chemometrics: A Critical Review and Guideline. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(3), 300–316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12060>

4 Metabolómica de la cáscara

La cáscara de los cítricos representa una barrera natural altamente especializada cuya compleja composición química despierta un creciente interés desde múltiples perspectivas, incluyendo defensa vegetal, diferenciación varietal y calidad poscosecha. Este capítulo estudia su perfil metabólico con el fin de identificar compuestos clave asociados tanto a la identidad química de cada variedad como a su potencial resistencia frente al cancro cítrico, una enfermedad de alto impacto productivo. Esto se llevó a cabo utilizando enfoques no dirigidos y dirigidos, analizando en ambos los metabolitos presentes en esta matriz rica en ceras, lípidos, azúcares y polifenoles, mediante herramientas espectroscópicas y cromatográficas combinadas con estadística multivariada.

En la primera sección (4.1) se presenta un estudio no dirigido mediante espectroscopía de ^1H RMN aplicado a extractos acuosos y orgánicos de cáscara. Este enfoque busca encontrar diferencias globales en el perfil químico de distintas variedades de mandarinas y explorar asociaciones entre sus metabolitos y la resistencia al cancro cítrico. En la segunda sección (4.2) se profundiza con una estrategia dirigida basada en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Específicamente, estos análisis se centran en la caracterización de las ceras epicuticulares, un componente clave en la interfaz entre la fruta y su entorno. Los estudios se realizaron en una diversidad de frutas cítricas, incluyendo mandarinas, para evaluar su rol potencial en los mecanismos de defensa contra infecciones bacterianas.

Ambas secciones se complementan para proporcionar una visión integrada de los metabolitos presentes en la cáscara y su relación con la resistencia varietal, proponiendo marcadores químicos útiles en programas de mejoramiento genético y estrategias sostenibles de manejo fitosanitario.

4.1 Análisis no dirigido de la cáscara

4.1.1 Introducción

Como se mencionó anteriormente, la cáscara de los cítricos es rica en metabolitos primarios y secundarios de diversas polaridades que pueden influir en propiedades sensoriales, caracteres de poscosecha y de defensa vegetal. En particular, la composición de las ceras epicuticulares de los cítricos puede variar significativamente dependiendo de la especie o el cultivar particular, las condiciones y duración del almacenamiento, la exposición a factores de estrés abiótico (como el estrés hídrico), la posición de la fruta en el árbol y las prácticas de cultivo (Ding et al., 2020; Romero & Lafuente, 2021). Los alcanos de cadena larga impar (C25-C31) son los más abundantes mientras que los de cadena larga par (C22-C34) son muy minoritarios. Los ácidos grasos libres encontrados son principalmente de cadena par, siendo los mayoritarios los de 24 y 26 átomos de carbono seguidos de palmítico, esteárico y eicosanoico. El ácido graso pentadecanoico es el ácido de cadena impar más frecuente en ceras. Los alcoholes y aldehídos grasos encontrados son generalmente primarios, y los más abundantes son de 22, 24 y 25 átomos de carbono al igual que los aldehídos. Los terpenoides encontrados en la cera son los triterpenos α - y β -amirinas, lupenona y el sitosterol, mientras que otros terpenoides como el farnesol, escualeno, friedelina y friedelanona se acumulan después de la cosecha. En conjunto con estos compuestos, pueden extraerse metabolitos de mayor hidrofilicidad, pero que generalmente se encuentran en las capas más externas de la cáscara (flavedo) como flavonoides glicosilados (como narirutina, naringina y hesperidina), polimetoxiflavonas (nobiletina, tangeretina y sinensetina) y algunas pectinas (Duan et al., 2022; Peng et al., 2024; Russo et al., 2016; Tran et al., 2022).

Los estudios metabolómicos no dirigidos constituyen una herramienta poderosa para explorar esta diversidad química y detectar biomarcadores para la diferenciación varietal y la resistencia a enfermedades. El cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, constituye una de las principales enfermedades que afectan al cultivo de cítricos, generando pérdidas económicas significativas a través de la reducción del rendimiento, el aumento de frutos descartados y las restricciones para la exportación. Se

trata de una enfermedad cuarentenaria para destinos clave como la Unión Europea, lo cual obliga a que la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSA/MGAP) implemente rigurosos controles anuales, habilitando únicamente los predios libres de la enfermedad (Presidencia de la República Oriental del Uruguay, 2003). Como consecuencia, los productores invierten importantes recursos en medidas de manejo como el uso de cortinas rompevientos y aplicaciones sucesivas de agroquímicos, principalmente oxiclورو de cobre, en cantidades que alcanzan hasta 40 kg por hectárea por zafra, sin lograr en muchos casos un control efectivo de la enfermedad. Estas prácticas no solo encarecen la producción, comprometiendo la competitividad del sector, sino que también generan impactos ambientales considerables.

Por lo tanto, es importante identificar mecanismos naturales de resistencia que puedan ser aprovechados en programas de mejoramiento genético. Aunque se ha documentado la existencia de genotipos cuyos frutos no presentan síntomas visibles de la enfermedad, y que por ello, se clasifican como resistentes, este criterio no ha sido incorporado hasta el momento en el Programa de Mejoramiento Genético de cítricos de INIA. Históricamente, la selección de compuestos marcadores de resistencia se ha orientado hacia otras enfermedades. Entre ellas, se destaca la causada por *Alternaria alternata*. En consecuencia, la tolerancia a cancro cítrico no ha sido aún considerada como criterio de selección.

En esta sección se desarrolló un análisis metabolómico no dirigido de la cáscara de distintas variedades de mandarinas empleando ^1H RMN. Para abarcar la diversidad química de la matriz, que incluye compuestos con un amplio rango de polaridades como azúcares, ácidos orgánicos, lípidos y terpenoides, se emplearon extractos tanto acuosos como orgánicos.

Los análisis estadísticos multivariados (PCA, PLS-DA y OPLS-DA) aplicados sobre datos provenientes de espectros de ^1H RMN revelaron diferencias significativas en ambos perfiles de las variedades estudiadas. Estas diferencias se asociaron principalmente con la composición y grado de metilación de las pectinas, así como con la presencia de azúcares libres y compuestos lipofílicos como limoneno, lípidos y ceras cuticulares. En una segunda etapa se identificaron metabolitos que permitieron discriminar variedades

resistentes y susceptibles al cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*), destacándose señales asociadas a ácidos y alcoholes grasos, lo que sugiere un papel potencial de estas sustancias en los mecanismos de defensa.

4.1.2 Metodología

4.1.2.1 Material vegetal

Las muestras de mandarinas maduras fueron las mismas que se describieron en la sección correspondiente del Capítulo 3 (3.2.1).

4.1.2.2 Extracción

Se separó la cáscara congelada de la pulpa y se cortó en trozos de 3 × 3 mm con cuchillo, se pesó $1,00 \pm 0,10$ g del material en balanza analítica (Shimadzu ATX224, Japón), se colocó en tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL y se adicionó 4,00 mL de CHCl₃ (LiChrosolv®, Merck, Alemania), 2,00 mL de MeOH (LiChrosolv®, Merck, Alemania), y 2,00 mL de agua ultrapura (Millipore Milli-Q® Ultrapure Water Solutions Type 1). Se sometió a agitación con vórtex (WiseMix VM-10, Wids, Alemania) a 110 rcf durante 30 s y a baño de ultrasonido (SB-120DT, Wollen Lab, China) durante 60 s. Se centrifugó (Eppendorf 5702, Alemania) durante 5 minutos a 1400 rcf, se retiró la capa orgánica y se agregaron 4,00 mL de CHCl₃. Se repitió la etapa de vórtex, ultrasonido y centrifugado, se juntaron las fases orgánicas y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró el extracto orgánico seco mediante papel de filtro Whatman y se eliminó el solvente bajo corriente de nitrógeno gaseoso empleando un concentrador de fracciones (Turbovap LV, Biotage, Suecia). El extracto acuo-metanólico se filtró mediante papel, se eliminó el MeOH mediante destilación a presión reducida empleando rotavaporador (Büchi R-114, Suiza), y finalmente se liofilizó (BenchTop Pro, VirTis SP Scientific, Estados Unidos) para eliminar el agua. Se realizaron 10 réplicas de cada extracción, correspondiendo cada una a una mandarina diferente. Las muestras secas se almacenaron en desecador hasta su análisis instrumental.

4.1.2.3 Análisis instrumental

Los espectros de ^1H RMN de los extractos acuosos de cascaras de mandarinas se obtuvieron utilizando los protocolos descritos en el Capítulo 3 (3.2.5.1).

Se realizaron análisis empleando los espectros completos y los espectros filtrados de las señales correspondientes a azúcares y zonas sin alinear. En estos últimos, se eliminaron las siguientes regiones: 5,46 – 5,35; 5,27 – 5,16; 5,02 – 4,61; 4,24 – 4,18; 4,12 – 4,08; 4,05 – 4,35; y 3,24 – 3,22 ppm.

Los extractos orgánicos secos se disolvieron en 600 μL de cloroformo deuterado (MagniSolvTM, 99,9 % D, Merck, Alemania) y se transfirieron a tubos de RMN de 5 mm (NE-HL5-7, New Era Enterprises, Estados Unidos). Los espectros de RMN de ^1H se obtuvieron y procesaron de igual manera que los de los extractos acuosos, a excepción de la etapa de referenciado que fue realizada en base a la señal de CHCl_3 residual a 7,26 ppm.

4.1.2.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos multivariados se realizaron de la misma manera que en el Capítulo 3 (3.2.8).

4.1.3 Resultados y discusión

4.1.3.1 Clasificación de variedades mediante ^1H RMN

Considerando la composición química de la cáscara de los cítricos, los extractos acuosos comprenden compuestos provenientes del flavedo y del albedo. Ambos tejidos presentan una composición química compleja, caracterizada por la presencia de metabolitos secundarios inmersos en una matriz constituida principalmente por polímeros de carbohidratos, celulosa y pectinas. En la **figura 4.1** se pueden ver los espectros de las variedades parentales Ellendale (rojo), Page (verde), Satsuma (azul) y Willowleaf (celeste).

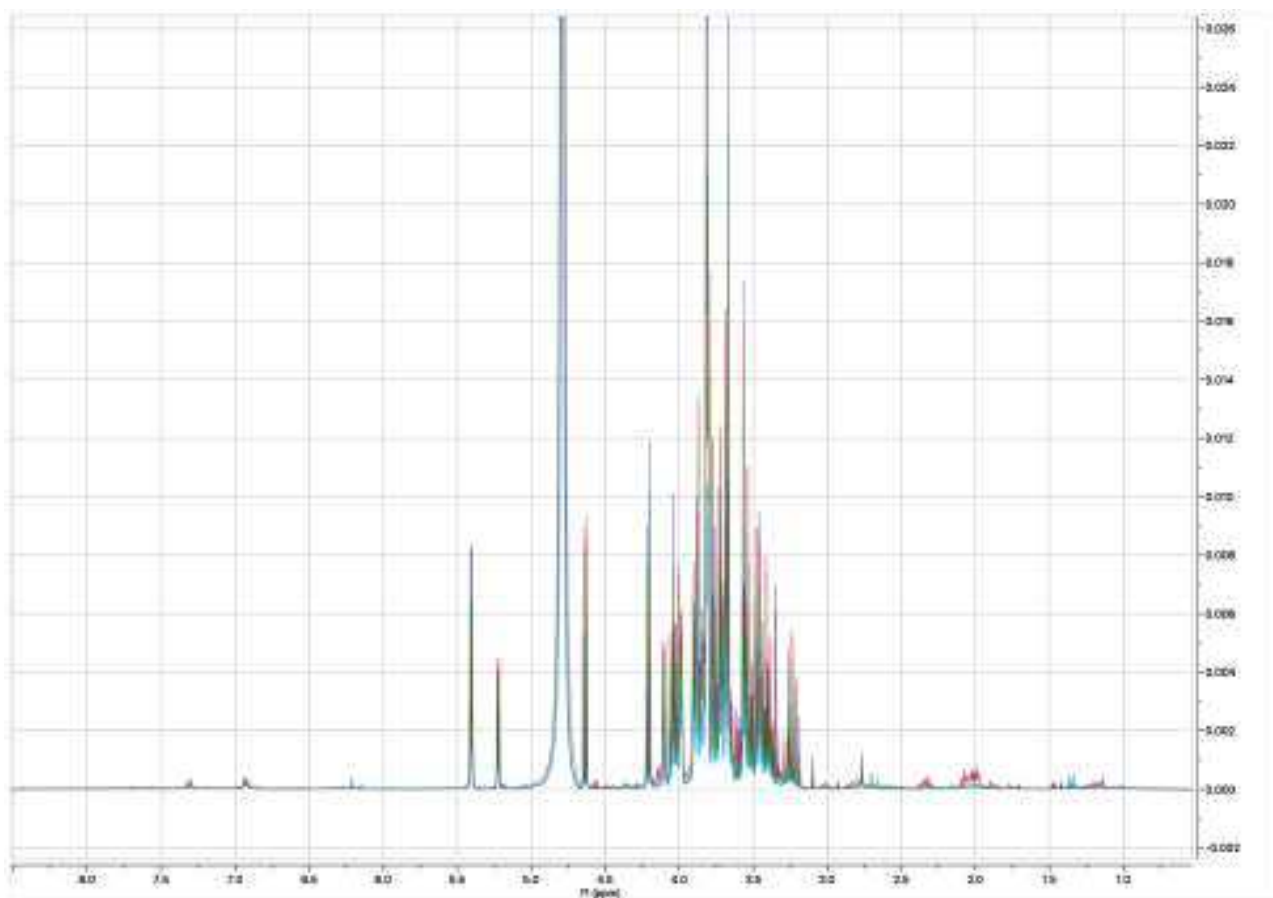


Figura 4.1 Espectros de ^1H RMN de los extractos acuosos de cáscara de las mandarinas parentales (Ellendale en rojo, Page en verde, Satsuma en azul y Willowleaf en celeste).

En la **figura 4.2** se muestran los resultados del análisis estadístico de extractos acuosos de cáscara de mandarina de las variedades parentales (E, P, S y WL), incluyendo el gráfico del modelo PLS-DA y su correspondiente gráfico de puntuación VIP (Variable Importance in Projection) para identificar las señales que caracterizan a cada variedad. Se observa una clara separación de la variedad WL del resto de las muestras. Ellendale también forma un grupo distintivo, pero las variedades P y S muestran cierto solapamiento entre sí, aunque también se distinguen de E y WL, con P tendiendo a agruparse más cerca de E y S con cierta dispersión entre P y WL. Esta separación indica que existen diferencias en la composición química de los extractos acuosos de las cáscaras.

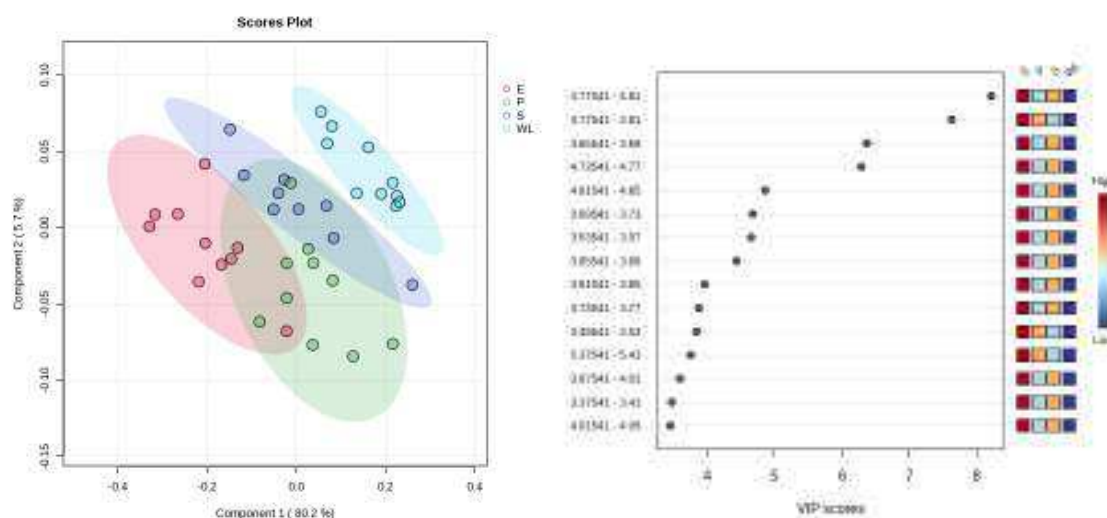


Figura 4.2 PLS-DA de extractos acuosos de cáscara de las mandarinas parentales (izquierda, Ellendale en rojo, Page en verde, Satsuma en azul y Willowleaf en celeste) y gráfico de VIP scores del mismo análisis (derecha).

El gráfico de puntuación VIP se usa para identificar qué señales (variables) son las más importantes para discriminar entre los grupos. Las señales con VIP scores más altos son las que más contribuyen a la diferenciación observada en el resultado del PLS-DA. Ellendale se caracteriza por altas concentraciones de metabolitos con señales con puntuaciones VIP altas a 3,78 – 3,81; 4,82 – 4,85 y 3,70 – 3,73 ppm, mientras que Willowleaf tiene bajos niveles de los mismos que son consistentes con puntuaciones VIP bajas. Al comparar con literatura (Gaglianò, De Luca, Conidi, & Cassano, 2023; Tamaki, Konishi, & Tako, 2008), entre los azúcares que presentan señales en esta zona (4,7 – 4,9 ppm), pueden encontrarse el ácido galacturónico (H-5) o a la galactosa (H-1), pero también puede atribuirse al H-1 de β -glucosa. Por otro lado, la región de 3,6 – 3,8 ppm corresponde con un grupo metoxilo ($-\text{OCH}_3$), por lo que esta señal puede ser indicadora del grado de metilación de las pectinas de bajo peso molecular solubles, presentes en la cáscara, y por ende un factor clave en la separación, así como al metoxilo de la hesperidina, una de las flavanonas más comunes en el flavedo de los cítricos, como se verá en el siguiente capítulo. Esta región también puede corresponderse a los protones H-2 y H-3 del ácido galacturónico (3,6 – 3,9 ppm), así como a diferentes protones de glucosa, fructosa y sacarosa. Page y Satsuma presentan concentraciones intermedias de las señales con los mayores VIP scores. Page tiende a tener niveles medio-altos, mientras que Satsuma presenta niveles medio-bajos. Esto contribuye a su separación entre sí y

respecto a Ellendale y Willowleaf, aunque con cierto solapamiento, como se ve en el Scores Plot. Estos resultados sugieren que las diferentes variedades de mandarinas podrían tener variaciones significativas en la cantidad o estructura de sus pectinas y azúcares en los extractos de la cáscara, lo que permite su discriminación mediante el análisis de ^1H RMN.

Para la clasificación de las variedades usando los extractos orgánicos de cáscara (**Figura 4.3**) se llevó a cabo un estudio análogo al presentado anteriormente. En el mismo, el gráfico de puntuación del PLS-DA muestra que Ellendale y Page forman agrupaciones distintas, separándose de Satsuma y Willowleaf (**Figura 4.4**). Esta prueba fue validada por el test de permutaciones arrojando un resultado de $p < 0,0005$, lo que indica que la separación observada entre los grupos no es aleatoria y es estadísticamente significativa y da validez al modelo discriminante.

Las señales con los VIP scores más altos se observan en el rango de 0,8 a 0,9 ppm, correspondiente a grupos metilos de cadenas alquílicas, señales entre 1,26 – 1,37 ppm correspondientes a protones metilénicos y señales entre 1,58 – 1,61 ppm que corresponden a los hidrógenos β -carbonílicos y protones metilénicos. En comparación con literatura (Silva, Alves Filho, Choze, Lião, & Alcantara, 2012) sobre composición de cáscaras de naranja, estas señales se podrían atribuir al limoneno, muy abundante en cáscaras de cítricos, y lípidos/residuos alquílicos superpuestos tanto de compuestos pertenecientes a la cera epicuticular, a los aceites esenciales, como a los lípidos de membrana. Satsuma se caracteriza por tener los niveles más altos de estas señales. Willowleaf y Satsuma presentan mayor intensidad en la señal en el rango 4,26 – 4,29 ppm que puede corresponderse a los hidrógenos α (extremos) del glicerol (triacilglicéridos).

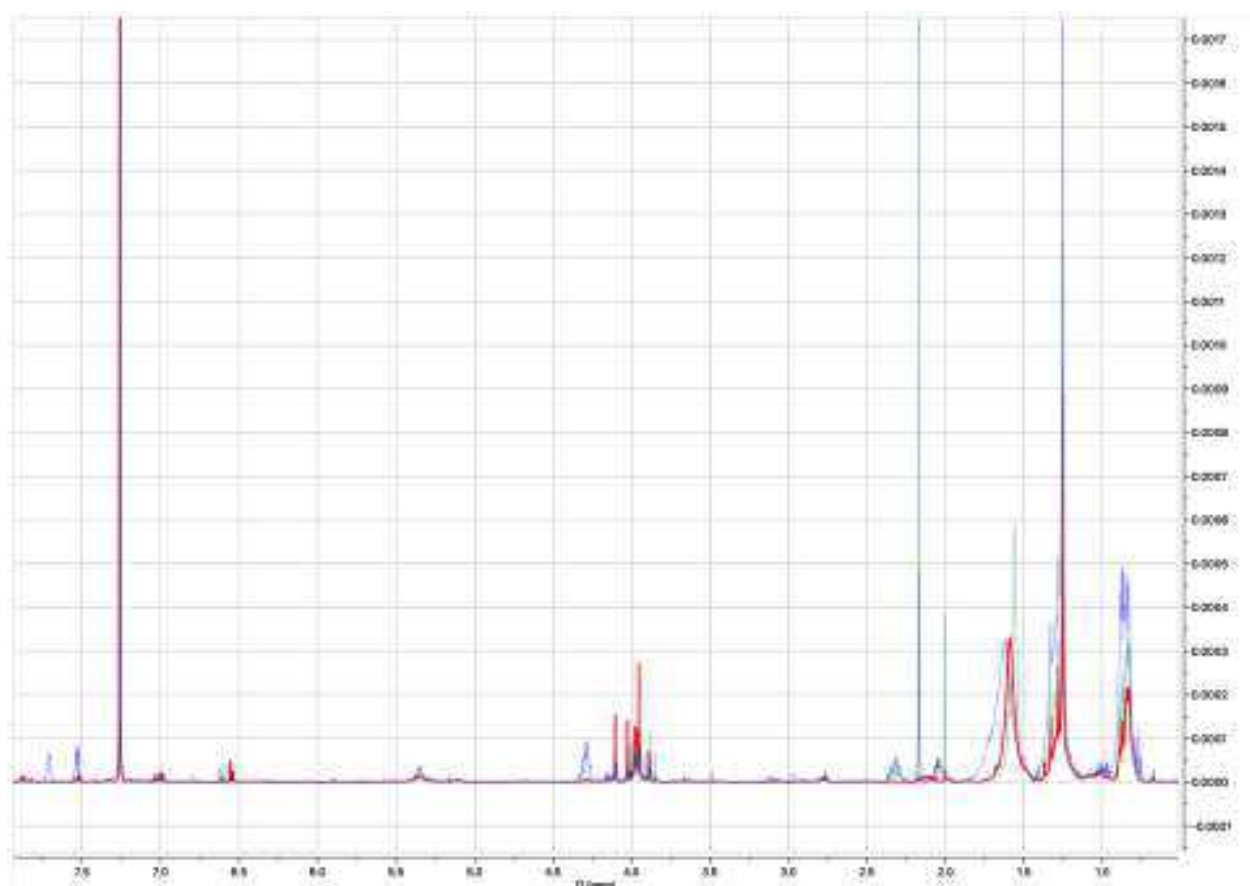


Figura 4.3 Espectros de ^1H RMN de los extractos orgánicos de cáscara de las mandarinas parentales (Ellendale en rojo, Page en verde, Satsuma en azul y Willowleaf en celeste).

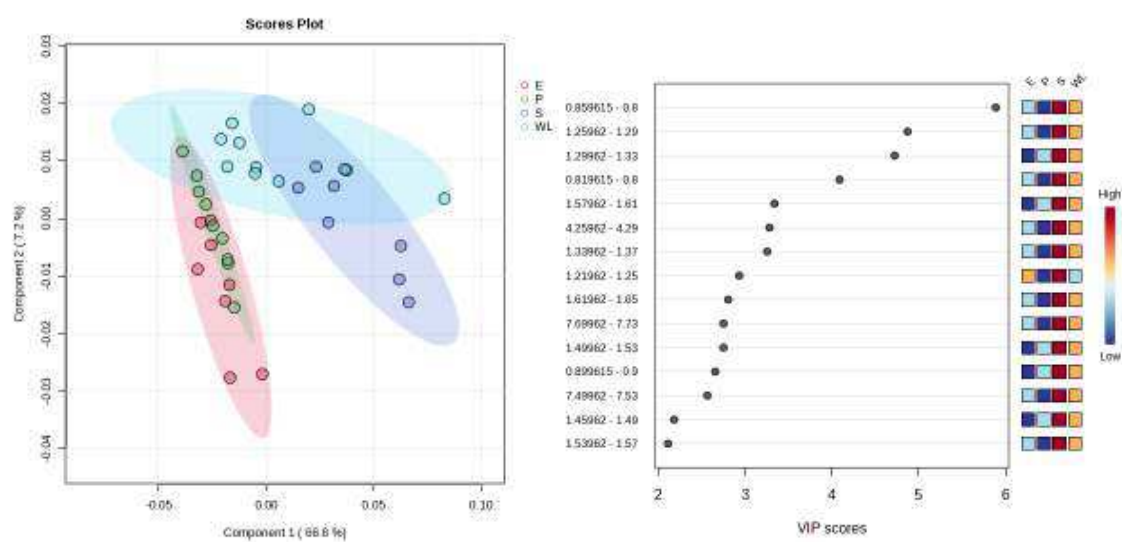


Figura 4.4 PLS-DA de extractos orgánicos de cáscara de las mandarinas parentales (izquierda) y gráfico de VIP scores del mismo análisis (derecha).

Los polifenoles, agliconas de flavanonas como naringenina o hesperetina, u otros ácidos aromáticos presentes en las cáscaras, por lo que la señal en 7,70 – 7,73 ppm podría pertenecer a este tipo de compuestos. Las variedades Satsuma y Willowleaf podrían caracterizarse por niveles relativamente más altos de estos compuestos aromáticos en comparación con las variedades Ellendale y Page. Sin embargo, es importante notar que los VIP scores de estas señales son menores en comparación con las otras, lo que indica que su contribución a la diferenciación general entre las variedades es menos significativa que la de los lípidos/limoneno.

4.1.3.2 Correlación de los perfiles de ^1H RMN con la resistencia a cancrrosis

Basado en los resultados de caracterización y clasificación de variedades de mandarinas en función de los perfiles metabólicos de extractos acuosos y orgánicos de cáscara, se planteó la hipótesis de que estas mismas matrices podrían emplearse para explorar diferencias relacionadas con la resistencia al cancro cítrico (*Xanthomonas citri* sub. *citri*) (Ali et al., 2023). La asignación de señales en dichos extractos, basada en bibliografía especializada y bases de perfiles de ^1H RMN, permitiría una aproximación estructurada al estudio de los metabolitos involucrados en las defensas de estas plantas.

Con el fin de evaluar esta hipótesis, investigadores del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) clasificaron las variedades analizadas como resistentes o susceptibles a cancro cítrico. La clasificación se basó en observaciones sistemáticas realizadas en parcelas experimentales bajo condiciones naturales de infección (**Tabla 4.1**). A partir de la misma y utilizando el enfoque metabolómico previamente establecido, se exploraron los perfiles químicos de las variedades en función de su resistencia frente a *X. citri*. En la **figura 4.5** se muestran los espectros de ^1H RMN de las variedades de mandarina coloreadas según su resistencia (verde) o susceptibilidad (rojo) a cancro.

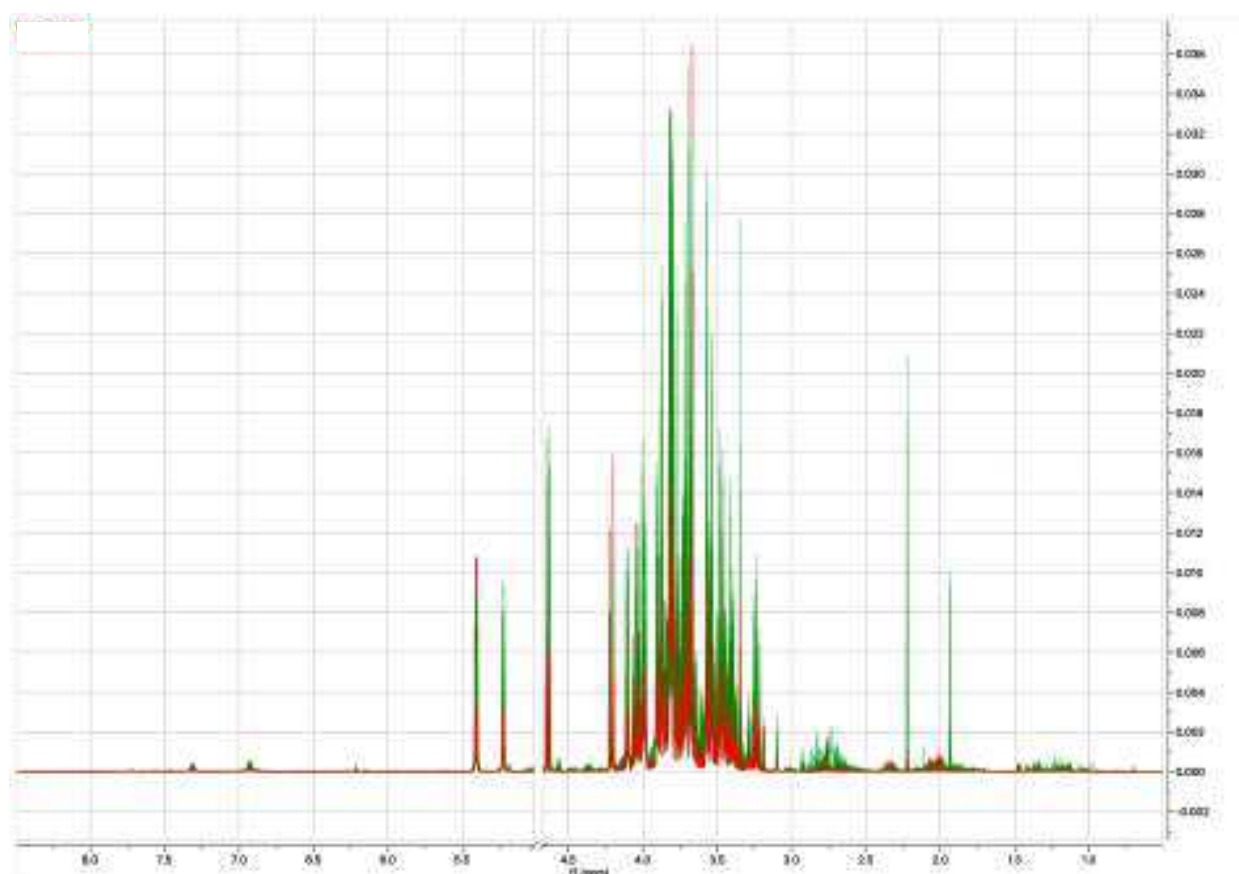


Figura 4.5 Espectros de mandarinas resistentes (verde) y susceptibles (rojo) a la infección por *X. citri*.

Tabla 4.1 Clasificación de las variedades de acuerdo a su resistencia a *X. citri*. (de Carvalho et al., 2014)

Variedades resistentes	Variedades susceptibles
Satsuma	Ellendale
Willowleaf	Page
B475 (E × WL)	F7P3 (E × P)
M16 (E × WL)	
B79 (E × S)	

Para analizar los extractos acuosos, se eliminaron las señales correspondientes a azúcares, ya que dominaban los espectros y no permitían encontrar otras diferencias en los extractos. Se realizó un PLS-DA y se identificaron las señales responsables de esta separación mediante VIP scores (**Figura 4.6**).

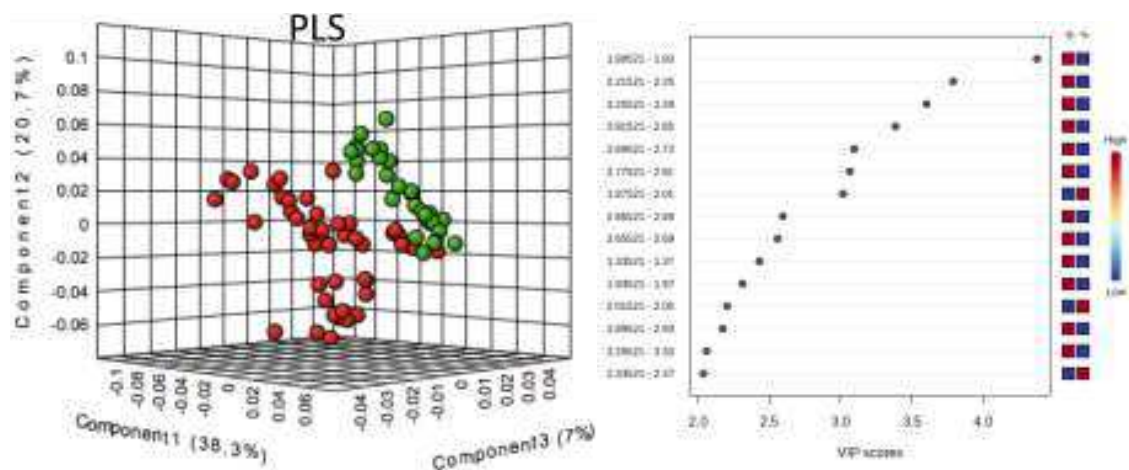


Figura 4.6 Gráfico de puntuación del PLS-DA (izquierda) de extractos acuosos de cáscara de las mandarinas resistentes (rojo) y susceptibles (verde) a *X. citri*, y gráfico de VIP scores del mismo análisis (derecha).

En este análisis, la señal a 1,93 ppm destaca por ser la de mayor peso en la diferenciación de las variedades. Esta señal es un singulete de gran intensidad en las muestras resistentes. Mediante experimentos bidimensionales (HSQC y HMBC) de estos extractos se observaron correlaciones directas y a larga distancia de este singulete con señales a 22,7 y 180,6 ppm en ^{13}C , respectivamente, permitiendo asignar a esta especie como acetato.

En cuanto al extracto orgánico, el modelo PLS-DA mostró una clara separación entre el grupo de variedades resistentes (rojo) y susceptibles (verde) (**Figura 4.7**). Las señales con mayor importancia para la clasificación están en el rango 0,86 – 0,78 ppm, que corresponden a grupos metilo terminal de cadenas alquílicas como ser hidrocarburos, ésteres, aldehídos y ácidos o alcoholes grasos, por otro lado, aparecen señales importantes alrededor de 1,3 – 1,2 ppm que corresponden a protones metilénicos de estos compuestos. Las señales próximas a 2,16 ppm pueden atribuirse a protones alfa al carbonilo de los ácidos grasos.

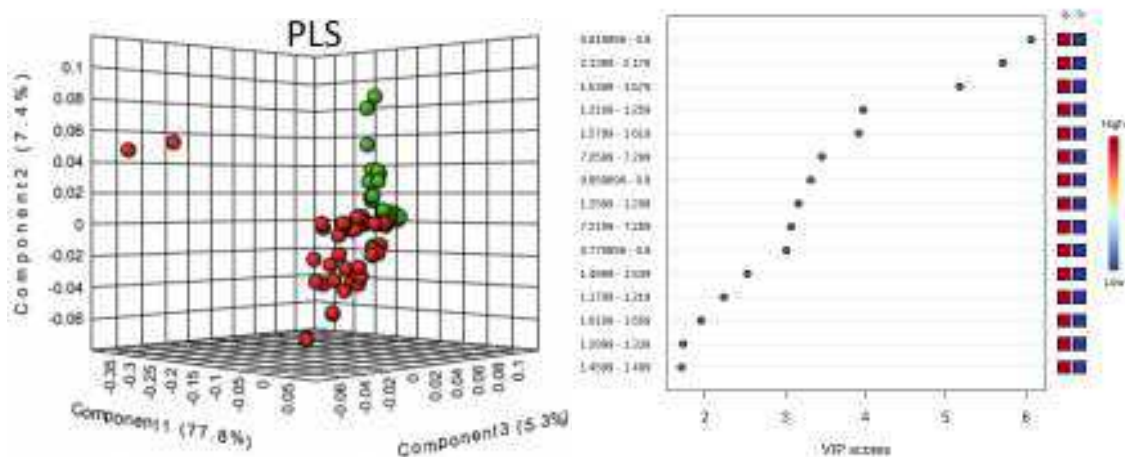


Figura 4.7 PLS-DA (izquierda) de extractos orgánicos de cáscara de las mandarinas resistentes (rojo) y susceptibles (verde) a *X. citri* y gráfico de VIP scores del mismo análisis (derecha).

Por lo tanto, más de la mitad de las señales de mayor relevancia en variedades resistentes se corresponden con señales características de ceras epicuticulares de mandarinas.

4.1.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos mediante el enfoque no dirigido permitieron identificar señales diferenciales en extractos acuosos y orgánicos de cáscara, asociadas con la resistencia de ciertas variedades de mandarina frente a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Particularmente, las señales más relevantes en los extractos orgánicos correspondieron a estructuras compatibles con compuestos lipofílicos, incluyendo ácidos y alcoholes grasos, elementos clave en la composición de las ceras epicuticulares. Esta observación sugiere que las ceras podrían desempeñar un rol activo en la defensa frente al cancro cítrico, actuando como barrera física o química ante la infección.

A partir de esta hipótesis, se implementó una estrategia metabolómica dirigida (*targeted*) centrada en la caracterización y cuantificación de componentes de la cera. Este abordaje tuvo como finalidad profundizar en las diferencias entre variedades resistentes y susceptibles, así como evaluar su posible implicancia en los mecanismos de resistencia.

Los resultados obtenidos aportan una base para comprender la relevancia de los metabolitos presentes en la cáscara, tanto en su contribución a la identidad química varietal como en su posible vínculo con procesos de resistencia a enfermedades. En este contexto, surgió la necesidad de avanzar hacia un enfoque dirigido orientado al estudio detallado de los componentes de la cera epicuticular, dada su relevancia emergente como barrera física y química frente a infecciones bacterianas en cítricos.

4.2 Análisis dirigido de ceras epicuticulares

4.2.1 Introducción

Las ceras epicuticulares surgen como un componente estructural y funcional clave en la defensa de los frutos. Estos compuestos constituyen la primera barrera física y química frente al estrés abiótico y biótico, incluyendo infecciones por patógenos bacterianos. Su composición, que incluye una mezcla de alcanos, ácidos grasos, alcoholes, aldehídos, ésteres y triterpenoides, determina sus propiedades fisicoquímicas y, por ende, su rol en los mecanismos de defensa. Diversos estudios han demostrado la actividad antifúngica de ceras epicuticulares en otras especies vegetales, como cebada (García, García, Heinzen, & Moyna, 1997) y solanáceas (Cesio, Dutra, Moyna, & Heinzen, 2006), y en cítricos se ha reportado su implicancia en el control de la expansión de *Penicillium digitatum* (Ding et al., 2020; Zhu et al., 2020).

Dadas las características de la enfermedad provocada por *X. citri* subsp. *citri*, se planteó que la composición de las ceras epicuticulares podría estar relacionada con la resistencia observada en ciertos genotipos. En la [Sección 4.1](#) se presentó un análisis metabolómico no dirigido realizado sobre la cáscara de mandarina mediante ¹H RMN, el cual reveló diferencias consistentes en señales asociadas a compuestos lipofílicos, especialmente ácidos y alcoholes grasos, entre variedades resistentes y susceptibles.

Esta sección se centra en un análisis metabolómico dirigido de las ceras epicuticulares con el objetivo de caracterizar sus componentes, y determinar además si existen diferencias composicionales específicas entre variedades con distinto grado de susceptibilidad al cancro cítrico. Mediante el uso de herramientas estadísticas

multivariadas, se buscó identificar metabolitos discriminantes, especialmente aquellos pertenecientes a las clases de ácidos, aldehídos y alcoholes grasos. Este enfoque no solo pretende aportar sobre el rol potencial de las ceras en los mecanismos de defensa natural de los cítricos, sino también al desarrollo de nuevos criterios de selección para programas de mejoramiento genético enfocados en la resistencia a esta enfermedad de alta relevancia sanitaria, productiva y comercial.

4.2.2 Metodología

4.2.2.1 Material vegetal

Se trabajó con dos grupos de muestras. El primero corresponde con las muestras descritas en la sección Material vegetal del Capítulo 3 (3.2.1). Estas muestras no tenían cáscara entera, por lo que se siguió una metodología específica de extracción. El segundo grupo de muestras corresponde a diferentes frutas cítricas recolectadas en febrero, inmaduras para detectar defensas tempranas frente a cancro, y que se describen en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2 Descripción de los cítricos evaluados.

Fruta	Nombre comercial	Nombre científico (parentales en caso de híbridos)	Linaje	Referencias
Pomelo		<i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr.	Especie cítrica ancestral (no híbrido)	(Nicolosi et al., 2000)
Limón	Criollo	<i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck	Híbrido de cidro (<i>C. medica</i>) × naranja agria (<i>C. aurantium</i>)	(Curk et al., 2016)
	Meyer	<i>Citrus × meyeri</i>	Híbrido de cidro (<i>C. medica</i>) × (<i>C. maxima</i> × <i>C. reticulata</i>) híbrido pomelo/mandarina	(Curk et al., 2016)
Naranja	Navel	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Híbrido natural entre mandarina (<i>C. reticulata</i>) y pomelo (<i>C. maxima</i>)	(Curk et al., 2016; G Albert Wu et al., 2014)
	Valencia	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck		(Curk et al., 2016)

Lima	Mexicana	<i>Citrus aurantiifolia</i>	Híbrido de cidro (<i>C. medica</i>) × papeda (<i>C. micrantha</i>)	(Curk et al., 2016; Guohong Albert Wu et al., 2018)
Quinoto		<i>Fortunella</i> spp.	Especie separada, posiblemente híbrida de <i>Citrus japonica</i>	(Guohong Albert Wu et al., 2018)
Mandarina	Fremont	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Híbrido de Murcott × (Clementina × Ponkan)	(Gora et al., 2022)
	Clementina	<i>Citrus clementina</i>	Mandarina Willowleaf (<i>Citrus deliciosa</i> Tenore) × naranja dulce (<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck)	(Ollitrault et al., 2012)
	Murcott	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck × <i>C. reticulata</i> Blanco	(Borges & Pio, 2003)
	Ortanique	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck × <i>C. reticulata</i> Blanco	(Borges & Pio, 2003)
	Ponkan	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Cultivar chino, probablemente especie pura o con introgresión de <i>C. maxima</i>	(G Albert Wu et al., 2014)
	Ellendale	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Desconocido. Probablemente una plántula casual de un cruce entre mandarina y naranja dulce	(Ross, 1949)
	Page	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	<i>Minneola tangelo</i> (pomelo Duncan × mandarina Dancy) × mandarina Clementina	(Shimizu et al., 2016)
	Willowleaf	<i>Citrus deliciosa</i> Tenore	Desconocido	(Curk et al., 2016)
	Satsuma cv 'Owari'	<i>Citrus unshiu</i> Marcovitch	Desconocido. Probablemente un cruce entre 'kishuu mikan' y mandarina 'Kunenbo'	(Fujii et al., 2016)
	B475	Ellendale (♀) × Willowleaf (♂)	Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Cítricos-Uruguay	
	B79	Ellendale (♀) × Satsuma cv. 'Owari' (♂)	Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Cítricos-Uruguay	
	F7P3	Ellendale (♀) × Page (♂)	Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Cítricos-Uruguay	

F2P3	Ellendale (♀) × Page (♂)	Programa Mejoramiento Cítricos-Uruguay	Nacional Genético	de

4.2.2.2 Extracción

Para el análisis del primer grupo de muestras (3.2.1) se separó la cáscara congelada de la pulpa y se cortó en cuadrados de 2×2 cm. Se sumergieron usando un colador con malla de acero inoxidable durante 60 s en un crisol de porcelana conteniendo 25 mL de CHCl_3 (LiChrosolv®, Merck, Alemania). Se secó el extracto con Na_2SO_4 anhidro, se filtró mediante papel de filtro Whatman y se eliminó el solvente bajo corriente de nitrógeno gaseoso empleando un concentrador de fracciones (Turbovap LV, Biotage, Suecia). Se realizaron tres réplicas de cada extracción, siendo cada una de las réplicas proveniente de una mandarina diferente. Los extractos secos fueron pesados en balanza de precisión (Kern ABJ 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Alemania) y se almacenaron en desecador hasta su análisis.

El segundo grupo de muestras fue extraído por inmersión dinámica de los frutos intactos en 300 mL de CH_2Cl_2 destilado durante 60 s usando una malla de acero inoxidable. Se secó el extracto con Na_2SO_4 anhidro, se filtró mediante papel de filtro Whatman y se eliminó el solvente mediante destilación a presión reducida empleando rotavaporador (Büchi R-114, Suiza). El extracto obtenido se retomó en CHCl_3 (3 mL, LiChrosolv®, Merck, Alemania), se transfirió a tubos de vidrio previamente pesados y se eliminó el solvente bajo corriente de nitrógeno gaseoso mediante un concentrador de fracciones (Turbovap LV, Biotage, Suecia). Los extractos secos fueron pesados en balanza de precisión (Kern ABJ 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Alemania) y se almacenaron en desecador hasta su análisis instrumental. Se realizaron 5 réplicas de cada extracción para cada muestra.

Para la determinación del área superficial de las muestras se procedió al pelado manual de los frutos, disponiendo las cáscaras sobre hojas de papel de gramaje 75 g/m². Las siluetas obtenidas fueron recortadas y sus masas registradas utilizando una semimicrobalanza (Radwag AS 82/220.X2 plus, Polonia). Con el fin de establecer una

relación entre la masa del papel y el área cubierta, se construyó una curva de calibración mediante la determinación de la masa de áreas conocidas del mismo tipo de papel, permitiendo así interpolar el área superficial de cada muestra a partir de la masa registrada de sus respectivas siluetas. Adicionalmente, se midieron y registraron el peso, el diámetro polar y el diámetro ecuatorial de cada uno de los frutos incluidos en la muestra. Este procedimiento se aplicó a todos los frutos analizados, con excepción de las muestras correspondientes a mandarina común y quinoto, debido a que su reducido tamaño impidió realizar las medidas necesarias.

4.2.2.3 Análisis instrumental

Las muestras de ambos grupos fueron resuspendidas en acetato de etilo (1 mL, LiChrosolv®, Merck, Alemania) y posteriormente filtradas por membrana de PTFE de 0,22 μm . El análisis de compuestos volátiles de ambos grupos de muestras se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en un equipo Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra (Shimadzu, Japón), operando en modo de ionización por impacto electrónico (EI) con una energía de ionización de 70 eV. Se inyectó 1 μL de cada muestra en modo splitless a 280 °C, utilizando una columna capilar de sílice fundida Rtx-5MS (30 m $\times$ 0,25 mm de diámetro interno y espesor de film de 0,25 μm , Restek, Estados Unidos), con helio como gas portador. La temperatura de la columna se programó comenzando a 180 °C, manteniéndose durante 1 min, seguida de un aumento progresivo hasta alcanzar los 300 °C a los 6 min, temperatura que se mantuvo hasta los 37 min. La interfase se mantuvo a 280 °C y la fuente de ionización a 220 °C. Se aplicó un corte de solvente a los 4,5 min. Los espectros se adquirieron en modo “full scan” en el rango de m/z 50–500, entre los 5 y 37 min del tiempo de análisis. El procesamiento de los datos cromatográficos se realizó mediante el software GC-MS Solution, versión 4.11 SU2, empleando la biblioteca NIST11.lib. Se consideraron como positivos aquellos compuestos cuyos espectros de masas presentaron una similitud > 80% con la biblioteca y cuya asignación fue además respaldada por fragmentos diagnósticos compatibles con la estructura propuesta y por un índice de retención concordante con valores reportados.

4.2.2.4 Análisis estadístico

Las medias de los grupos se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA). En aquellos casos en que se detectaron diferencias estadísticamente significativas, se aplicó un análisis de comparaciones múltiples de Tukey con corrección de Bonferroni para identificar los pares de grupos con diferencias entre sí, considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, empleando el software libre RStudio Version 1.2.5033 (Estados Unidos). Los análisis estadísticos multivariados fueron realizados utilizando la plataforma en línea MetaboAnalyst 6.0. Para la exploración inicial de la estructura de los datos se empleó PCA. La identificación de fitomarcadores discriminantes entre grupos se llevó a cabo mediante PLS-DA y análisis de puntuaciones VIP. La validez de los modelos generados se evaluó mediante validación cruzada de 5 segmentos (5-fold cross-validation). Como métrica de desempeño del clasificador, se calculó la precisión, definida como la fracción de muestras asignadas por el modelo a una determinada clase que verdaderamente pertenecían a ella ($Precisión = \frac{VP}{VP+FP}$), donde VP y FP representan los verdaderos y falsos positivos, respectivamente. El desempeño predictivo se estimó utilizando el Q^2 como métrica de validación cruzada.

Adicionalmente, la significancia de los modelos se evaluó mediante pruebas de permutación con 1000 permutaciones de las etiquetas de clase, usando la exactitud de clasificación como criterio de comparación frente al modelo original.

4.2.3 Resultados y discusión

4.2.3.1 Contenido de ceras epicuticulares

En la **tabla 4.3** se presentan los datos de resistencia al patógeno *Xanthomonas citri* subsp. *citri* obtenidos a partir de evaluaciones fitopatológicas realizadas por el equipo de INIA. Estas permitieron establecer un marco comparativo entre variedades con diferente comportamiento frente a la enfermedad, sirviendo como base para la interpretación de los perfiles químicos obtenidos. En esta tabla además se presenta el contenido de ceras determinado para ambos grupos de muestras.

Tabla 4.3 Resultados del contenido de ceras en muestras resistentes y susceptibles de ambos grupos de muestras.

Grupo 1: muestras maduras, extractos en fragmentos de cáscara			
Muestras resistentes		Muestras susceptibles	
Nombre	Contenido ceras (mg/cm²)	Nombre	Contenido ceras (mg/cm²)
Satsuma owari	0,0450 ^a	Ellendale	0,0458 ^b
Willowleaf	0,1263 ^a	Page	0,1450 ^a
B475 (E × WL)	0,0542 ^a	F7P3 (E × P)	0,0504 ^b
M16 (E × WL)	0,0433 ^a	F2P3 (E × P)	0,0383 ^b
B79 (E × S)	0,0558 ^a		
Promedio	0,0751^a	Promedio	0,0626^a
Grupo 2: muestras inmaduras, extractos en fruta entera			
Muestras resistentes		Muestras susceptibles	
Nombre	Contenido ceras (mg/cm²)	Nombre	Contenido ceras (mg/cm²)
Satsuma owari	0,0064 ^a	Ellendale	0,017 ^a
Willowleaf	ND (0,7 mg)	Page	0,015 ^{ab}
B475 (E × WL)	0,0088 ^a	F7P3 (E × P)	0,012 ^{bc}
B79 (E × S)	0,0073 ^a	F2P3 (E × P)	0,011 ^c
Ponkan	0,0096 ^a	Clementina	0,010 ^{abc}
Quinoto	ND (0,6 mg)	Fremont	0,015 ^{ab}
		Murcott	0,0087 ^{abc}
		Ortanique	0,0063 ^{bc}
		Lima	0,0049 ^c
		Naranja Navel	0,013 ^{abc}
		Naranja Valencia	0,0061 ^{bc}
		Limón Criollo	0,0079 ^{abc}
		Limón Meyer	0,0077 ^{abc}
		Pomelo	0,013 ^{abc}
Promedio	0,0080^a	Promedio	0,0105^a

ND: no determinado debido al tamaño pequeño de la fruta, entre paréntesis se muestran los mg de extracto obtenidos. En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente entre sí según el test de comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni ($p \leq 0,05$). Para los valores promedio, el test de Bonferroni fue aplicado para diferenciar resistentes de susceptibles en cada grupo.

En el Grupo 1 (muestras maduras, fragmentos de cáscara) se observa que el contenido promedio de ceras fue ligeramente mayor en las muestras resistentes (0,0751 mg/cm²)

que en las susceptibles ($0,0626 \text{ mg/cm}^2$). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, lo que indica que las variaciones individuales dentro de cada grupo son altas o el número de réplicas es insuficiente. Entre las variedades resistentes, Willowleaf mostró un valor significativamente superior al resto de los genotipos dentro de su grupo ($0,1263 \text{ mg/cm}^2$), lo cual podría indicar una mayor capacidad de acumulación de ceras en la madurez. No obstante, este valor también se ve compensado por valores bajos en otras variedades resistentes, como M16 ($0,0433 \text{ mg/cm}^2$) y Satsuma owari ($0,0450 \text{ mg/cm}^2$), lo que reduce el promedio general del grupo. En el grupo susceptible, los valores individuales fueron también variables, destacando Page con un valor relativamente alto ($0,1450 \text{ mg/cm}^2$), el más alto de todas las muestras analizadas. Esto sugiere que en muestras maduras el contenido total de ceras no se correlaciona linealmente con la resistencia observada, y que además del contenido total podrían intervenir otros factores cualitativos como composición química o estructura física de las ceras.

En el Grupo 2 (muestras inmaduras, frutas completas) el contenido total de ceras cuticulares fue menor, lo que concuerda con que la biosíntesis y depósito de ceras es un proceso que se intensifica hacia los estadios finales de maduración. En este grupo, los valores promedio oscilaron entre $0,0049$ y $0,017 \text{ mg/cm}^2$, con medias de $0,0080 \text{ mg/cm}^2$ en las variedades resistentes y $0,0105 \text{ mg/cm}^2$ en las susceptibles, pero sin presentar diferencias significativas.

El contenido total de ceras por sí solo no explica completamente los mecanismos de resistencia al cancro cítrico, por lo que es probable que juegue un rol importante su composición química (por ejemplo, presencia y proporción de aldehídos, alcoholes, triterpenoides o ácidos grasos específicos con actividad antimicrobiana).

4.2.3.2 Caracterización de las ceras epicuticulares

Los cromatogramas obtenidos fueron procesados para alinear e integrar los picos cromatográficos, y los compuestos correspondientes a los mismos se identificaron mediante por comparación con datos de la biblioteca NIST11. Se identificaron alrededor de 100 compuestos que fueron clasificados según su clase química (**Tabla 4.4**), y se

elaboró la matriz correspondiente para realizar el análisis estadístico multivariado. En la **figura 4.8** se muestra como ejemplo el cromatograma de corriente iónica total de una de las muestras de quinoto, especie resistente a cancro perteneciente a las muestras del Grupo 2 (inmaduras).

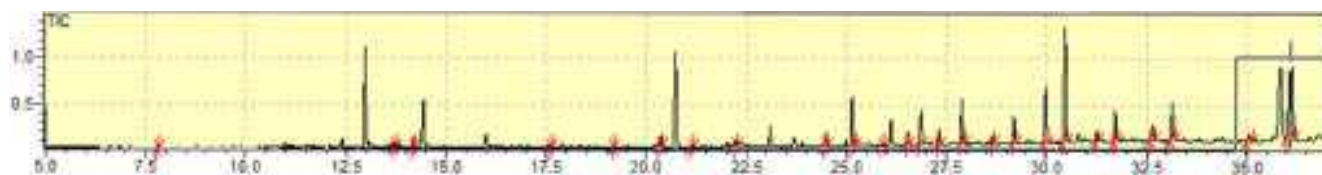


Figura 4.8 Cromatograma de corriente iónica total de quinoto.

Tabla 4.4 Composición porcentual de las ceras de las diferentes muestras según su grupo funcional.

Grupo 1: muestras maduras, extractos en fragmentos de cáscara							
Tipo	Muestra	% Alcanos	% Isoalcanos	% Alcoholes	% Ácidos	%Aldehídos	% Otros
Resistente	Satsuma owari*	13,33 ^b	1,84 ^{bc}	16,94 ^a	23,86 ^a	40,89 ^a	3,14 ^a
	Willowleaf*	14,90 ^b	1,24 ^c	19,03 ^a	12,31 ^b	46,42 ^a	6,10 ^a
	B475 (E × WL)*	17,45 ^a	4,40 ^{ab}	14,77 ^a	10,41 ^b	48,19 ^a	4,78 ^a
	M16 (E × WL)*	58,22 ^a	3,04 ^{bc}	6,09 ^a	3,31 ^c	28,20 ^a	1,15 ^a
	B79 (E × S)*	62,56 ^a	5,93 ^a	3,05 ^a	3,25 ^c	24,53 ^a	0,68 ^a
	Promedio	33,29^a	3,29^a	11,98^a	10,63^a	37,64^a	3,17^a
Susceptible	Ellendale*	32,25 ^a	6,75 ^{ab}	18,85 ^a	7,33 ^b	29,20 ^a	3,63 ^a
	Page*	37,09 ^a	2,00 ^b	8,68 ^a	14,49 ^a	35,35 ^a	2,38 ^a
	F7P3 (E × P)*	34,25 ^a	1,75 ^b	19,84 ^a	11,32 ^{ab}	27,53 ^a	5,15 ^a
	F2P3 (E × P)*	27,28 ^a	8,32 ^a	14,08 ^a	8,19 ^b	34,82 ^a	7,30 ^a
	Promedio	33,26^a	4,71^a	15,36^a	10,33^a	31,73^a	4,62^a
Grupo 2: muestras inmaduras, extractos en fruta entera							
Tipo	Muestra	% Alcanos	% Isoalcanos	% Alcoholes	% Ácidos	%Aldehídos	% Otros
Resistente	Satsuma owari*	45,32 ^a	17,71 ^c	1,35 ^a	9,05 ^a	13,95 ^b	12,61 ^b
	Willowleaf*	39,21 ^{ab}	26,13 ^{ab}	0,00 ^b	18,88 ^a	13,10 ^b	2,68 ^{bc}
	B475 (E × WL)*	31,98 ^{bc}	17,70 ^c	0,08 ^b	19,48 ^a	30,75 ^a	0,00 ^c
	B79 (E × S)*	40,11 ^a	20,52 ^{bc}	0,78 ^{ab}	12,53 ^a	25,73 ^a	0,33 ^c
	Ponkan*	31,85 ^{bc}	21,14 ^{bc}	1,33 ^a	16,09 ^a	25,93 ^a	3,66 ^{bc}
	Quinoto	27,05 ^c	33,11 ^a	0,50 ^{ab}	1,34 ^a	13,23 ^b	24,78 ^a
	Promedio	35,92^b	22,72^a	0,67^b	12,89^a	20,45^a	7,34^a
Suscep tible	Ellendale*	40,70 ^{cd}	20,39 ^{ab}	0,36 ^b	13,93 ^a	23,14 ^{bc}	1,48 ^d
	Page*	37,88 ^{cd}	18,72 ^{ab}	3,02 ^b	13,72 ^a	9,42 ^d	17,23 ^a

F7P3 (E × P)*	31,53 ^d	17,11 ^{ab}	0,98 ^b	11,86 ^a	38,52 ^a	0,00 ^d
F2P3 (E × P)*	33,79 ^d	15,32 ^{ab}	2,35 ^b	11,91 ^a	18,64 ^{bcd}	17,98 ^a
Clementina*	43,94 ^{bcd}	22,58 ^{ab}	0,91 ^b	15,03 ^a	12,07 ^{cd}	5,46 ^{bcd}
Fremont*	42,68 ^{bcd}	24,40 ^a	0,49 ^b	10,74 ^a	21,32 ^{bcd}	0,38 ^d
Murcott*	36,88 ^{bc}	16,66 ^{ab}	0,68 ^c	16,66 ^a	29,11 ^{ab}	0,00 ^d
Ortanique*	32,82 ^d	18,70 ^{ab}	1,32 ^b	14,59 ^a	28,87 ^{ab}	3,70 ^{cd}
Lima	55,14 ^{ab}	18,06 ^{ab}	1,26 ^b	1,08 ^a	10,06 ^d	14,40 ^{ab}
Naranja Navel	43,83 ^{bcd}	21,37 ^{ab}	3,37 ^b	1,80 ^a	27,35 ^{ab}	2,29 ^{cd}
Naranja Valencia	60,80 ^a	3,47 ^c	3,22 ^b	0,09 ^a	26,62 ^{ab}	5,80 ^{bcd}
Limón Criollo	40,42 ^{cd}	14,66 ^b	4,26 ^{ab}	14,80 ^a	23,40 ^{bc}	2,46 ^{cd}
Limón Meyer	48,66 ^{abc}	13,27 ^b	9,27 ^a	2,74 ^a	13,87 ^{cd}	12,20 ^{abc}
Pomelo	46,25 ^{abcd}	17,59 ^{ab}	4,10 ^{ab}	8,89 ^a	13,80 ^{cd}	9,37 ^{abcd}
Promedio	42,52^a	17,31^b	2,54^a	9,85^a	21,16^a	6,63^a

*Variedad de mandarina

En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente entre sí según el test de comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni ($P \leq 0,05$) para cada grupo y tipo de muestra. Para los valores promedio, el test de Bonferroni fue aplicado para diferenciar muestras resistentes de susceptibles dentro de cada grupo.

En el Grupo 1 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras resistentes y susceptibles para ninguna de las seis clases de compuestos analizados. Sin embargo, el análisis individual por variedad mostró diferencias relevantes. Las variedades resistentes M16 y B79 exhibieron los niveles más elevados de alcanos (58,2 y 62,6%, respectivamente), significativamente superiores a los de Satsuma owari (13,3%) y Willowleaf (14,9%), lo que sugiere una posible correlación entre la acumulación de alcanos y la resistencia al cancro cítrico en fruta madura. En contraste, la variedad susceptible Page presentó un contenido intermedio de estos compuestos (37,1%), sin diferenciarse estadísticamente del resto. El contenido de aldehídos fue alto en promedio en ambos grupos (37,6% en resistentes y 31,7% en susceptibles) sin presentar diferencias significativas. Las variedades resistentes Willowleaf y B475 presentaron los valores más altos (46,4 y 48,2%), lo que podría indicar también un posible rol protector de estos compuestos.

En cuanto al resto de las clases de compuestos (alcoholes, ácidos, isoalcanos y otros), no se observaron diferencias claras entre tipos ni se identificaron tendencias. Algunas variedades susceptibles como F2P3 y F7P3 mostraron valores elevados en la categoría

“otros” (7,3 y 5,2%, respectivamente), mientras que las resistentes tendieron a valores más bajos y homogéneos. Estos resultados en muestras maduras reflejan una alta variabilidad intragrupo que dificulta establecer asociaciones claras entre composición química y resistencia. Sin embargo, la alta proporción de alcanos en ciertas variedades resistentes podría estar relacionada con una mayor capacidad de formación de barreras físicas en la superficie del fruto.

En el Grupo 2 (muestras inmaduras) se observaron diferencias estadísticamente significativas para varias clases de compuestos entre variedades y mayor discriminación entre tipos resistentes y susceptibles. Los alcoholes fueron más abundantes en las muestras susceptibles (2,5%) en comparación con las resistentes (0,7%), con diferencias marcadas en las especies que no son mandarinas como limón Meyer (9,3%), naranja Navel (3,4%) y pomelo (4,1%). En cambio, las mandarinas resistentes presentaron contenidos muy bajos o nulos de estos compuestos (0,00–1,4%). Esto sugiere que una menor proporción de alcoholes en frutos inmaduros podría estar asociada a una mayor capacidad de resistencia, posiblemente por contribuir a una mayor rigidez o hidrofobicidad de la cáscara.

El grupo funcional “otros” también presentó valores mayores en variedades susceptibles (6,6%) respecto a las resistentes (7,3%), aunque con mayor dispersión. Las muestras susceptibles Page y F2P3 se destacan por sus valores altos de estos compuestos (17,2% y 18,0%, respectivamente), mientras que en las resistentes predominó una distribución más homogénea. Este patrón podría reflejar una mayor complejidad química en variedades susceptibles, aunque también puede deberse a que en este grupo hay una mayor variabilidad de especies. En cuanto a los aldehídos, los promedios fueron similares entre grupos, pero se observó una gran variabilidad individual. F7P3 (susceptible) presentó el valor más alto (38,5%), mientras que otras variedades como Page (9,4%) y Clementina (12,1%) mostraron niveles bajos.

En los perfiles de alcanos e isoalcanos se identificaron diferencias estadísticamente significativas a nivel grupal entre resistentes y susceptibles. En el caso de los alcanos se detectaron los valores más altos en naranja Valencia (60,8%) y lima (55,1%), seguidas por pomelo (46,3%) y limón Meyer (48,7%). Entre las mandarinas resistentes, se

observaron contenidos moderados a bajos, con Satsuma owari (45,3%) y Willowleaf (39,21%) como los más altos. Variedades resistentes como Ponkan (31,9%) y B475 (32,0%) presentaron niveles aún más bajos. Un caso particular es el del quinoto, una especie genéticamente resistente al cancro cítrico, que presentó el valor más bajo de alcanos del grupo a pesar de su resistencia (27,1%). Esto sugiere que una alta proporción de alcanos no es una condición necesaria para conferir resistencia en todas las especies cítricas, y que pueden existir mecanismos alternativos de defensa estructural o química.

Respecto a los isoalcanos, el quinoto presentó el valor más alto del conjunto (33,1%), significativamente superior al resto de las variedades analizadas. Esta acumulación sugiere una estrategia defensiva singular, posiblemente vinculada a su resistencia genética. La elevada proporción de isoalcanos podría conferirle propiedades físicas particulares, como mayor flexibilidad o mayor capacidad de recubrimiento superficial, que dificulten la penetración del patógeno. De cualquier manera, la mayoría de las mandarinas resistentes mostraron niveles moderados de isoalcanos (Willowleaf: 26,1%; B79: 20,5%; Ponkan: 21,1%), mientras que algunas susceptibles como Ellendale (20,4%) o Fremont (24,4%) también presentaron contenidos elevados. Esto indica que la acumulación de isoalcanos por sí sola no distingue claramente entre grupos, pero en ciertos genotipos podría formar parte de un perfil defensivo eficiente, como en el quinoto.

Estos resultados sugieren que, si bien los alcanos parecen tener un rol más generalizado como barrera física en la protección cuticular, los isoalcanos podrían estar implicados en mecanismos más específicos y dependientes del genotipo. La composición y estructura de estos compuestos, así como su distribución en la superficie del fruto, podrían influir en la resistencia de manera más compleja que lo que puede reflejar el análisis cuantitativo global. En etapas inmaduras (Grupo 2), la composición cerosa podría relacionarse con mecanismos de resistencia. En particular, la menor proporción de alcoholes y de compuestos de la fracción "otros" en variedades resistentes podría indicar una cutícula más uniforme y eficaz como barrera. La alta diversidad intra-grupo indica que la resistencia al cancro cítrico probablemente dependa de interacciones entre compuestos específicos, la estructura de la cera y el estadio de desarrollo del fruto, más que de la presencia aislada de una clase de compuesto en particular, por lo que se hace necesario el análisis multivariado de los compuestos individuales identificados.

4.2.3.3 Análisis multivariado de las ceras epicuticulares de frutas inmaduras

4.2.3.3.1 Caracterización metabolómica según especie

Se realizó un análisis multivariado de los extractos de cera utilizando los perfiles metabólicos de ceras epicuticulares de frutas inmaduras pertenecientes a diferentes especies cítricas con el objetivo de caracterizar su variabilidad, y explorar como estas diferencias en composición pueden estar asociadas a su función de protección. Si bien el PCA (**Figura 4.9**, izquierda) mostró una varianza explicada baja en las dos primeras componentes sin separación clara entre la mayoría de las especies (24,2% en total), las muestras de naranja se separan parcialmente de las demás. Las otras especies se agruparon indicando perfiles químicos más similares. Al analizar este mismo PCA pero considerando una tercera componente se puede ver que las mandarinas también forman un grupo diferenciado, y el resto de las especies se encuentra con características intermedias entre estas y las naranjas (**Figura 4.9**, derecha)

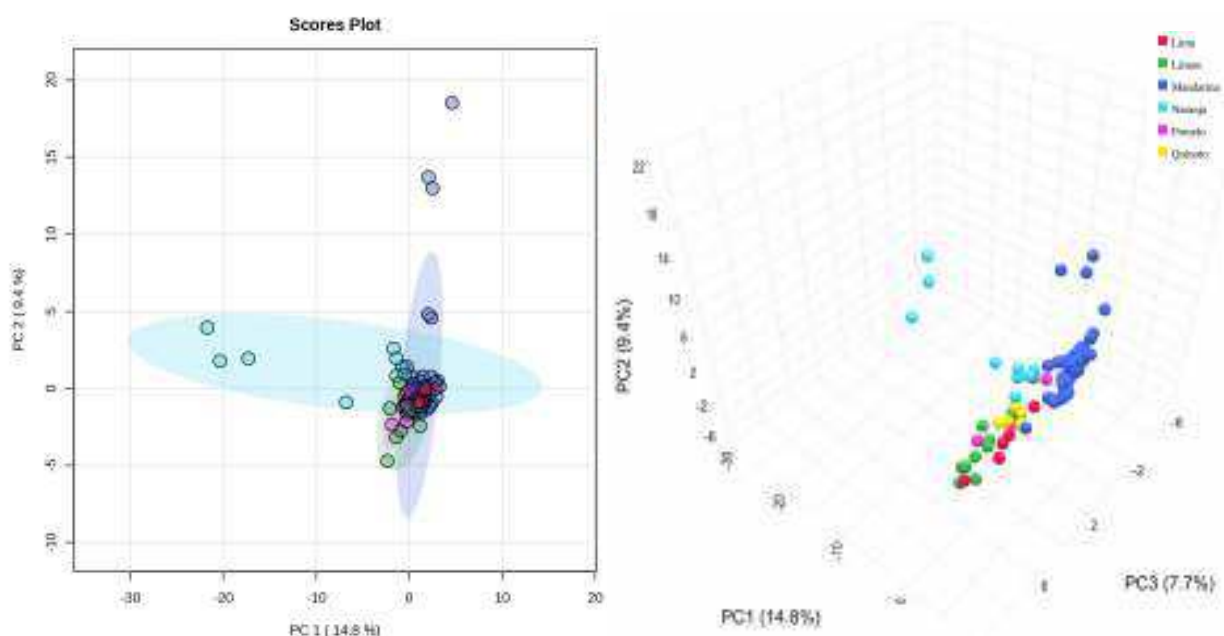


Figura 4.9 PCA de los extractos de ceras epicuticulares de las diferentes especies en estudio, dos componentes (izquierda) y tres componentes (derecha).

Para identificar marcadores de cada especie se realizó un PLS-DA y se analizaron las puntuaciones VIP correspondientes (**Figura 4.10**). En este caso, se observó

una separación más clara, particularmente para naranja y quinoto. El modelo presentó una precisión de clasificación del 90% con $R^2 = 0,75$ y $Q^2 = 0,34$ al usar tres componentes. Aunque el valor de Q^2 es moderado, el test de permutación ($p = 0,001$) confirmó la validez estadística del modelo.

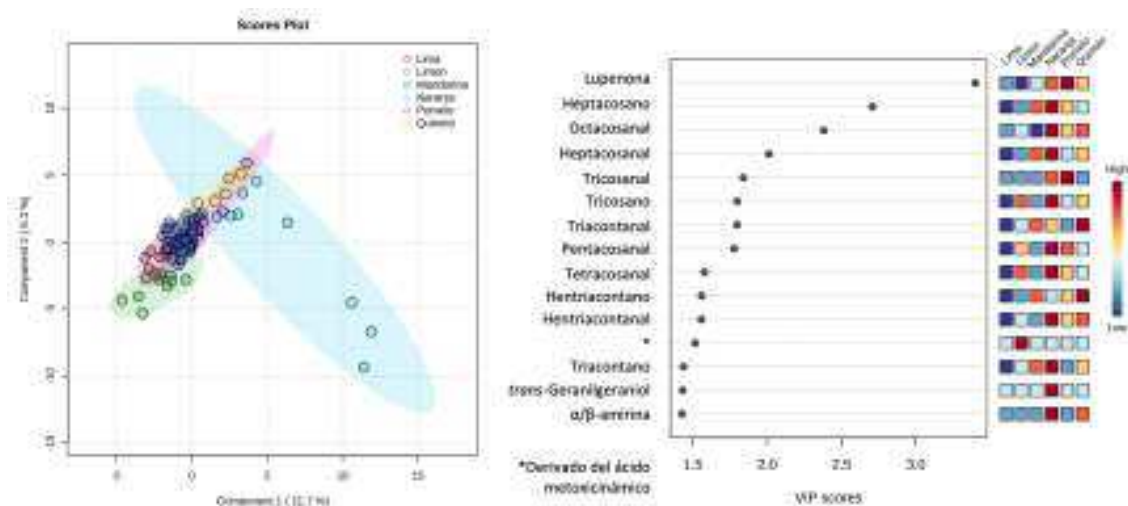


Figura 4.10 PLS-DA y puntuación VIP de diferentes especies de cítricos.

El perfil del quinoto estuvo definido por metabolitos como lupenona, triacontanal, hentriacontano, octacosanal y heptacosanal. Dado que el quinoto tiene resistencia genética a cancro, estos compuestos pueden, en principio, ser considerados marcadores de resistencia. Por otra parte, la naranja se diferenció del resto por la acumulación de triacontano, *trans*-geranylgeraniol y α/β -amirina, que podrían corresponder a compuestos más específicos de la naranja o reflejar una mayor actividad en ciertas ramas biosintéticas, como las asociadas a ceras cuticulares y terpenoides. El limón se caracterizó por su contenido de un derivado del ácido metoxicinámico. Estos resultados permiten concluir que la composición de las ceras epicuticulares en cítricos inmaduros está parcialmente condicionada por la especie, con perfiles bien diferenciados en naranja y quinoto, y un mayor solapamiento entre mandarina, limón, lima y pomelo. La composición de la cera de quinoto podría estar relacionada con su susceptibilidad reducida al cancro.

En una segunda instancia se comparó la composición de las ceras de mandarinas, incluyendo todas sus variedades, contra el resto de las muestras del análisis (naranjas,

limones, limas, pomelos y quinotos). En esta comparación no se tuvo en cuenta la clasificación de estos grupos en resistentes y susceptibles a la enfermedad de cancro.

En el PCA se observa una clara diferenciación de las muestras en el espacio, ubicándose de forma mucho más dispersa los puntos correspondientes a los frutos distintos de mandarinas. Por otro lado, estas se concentran en una pequeña región del gráfico, demostrando la similitud entre las muestras de este grupo. Las naranjas Navel son las que más se diferencian de las mandarinas, quedando inclusive apartadas del resto de las frutas. Del resto de las frutas, se observa que los quinotos son el grupo que más se diferencia de las mandarinas. Limones, limas y pomelos presentan suficiente similitud y se superponen con muestras de mandarinas (**Figura 4.11**).

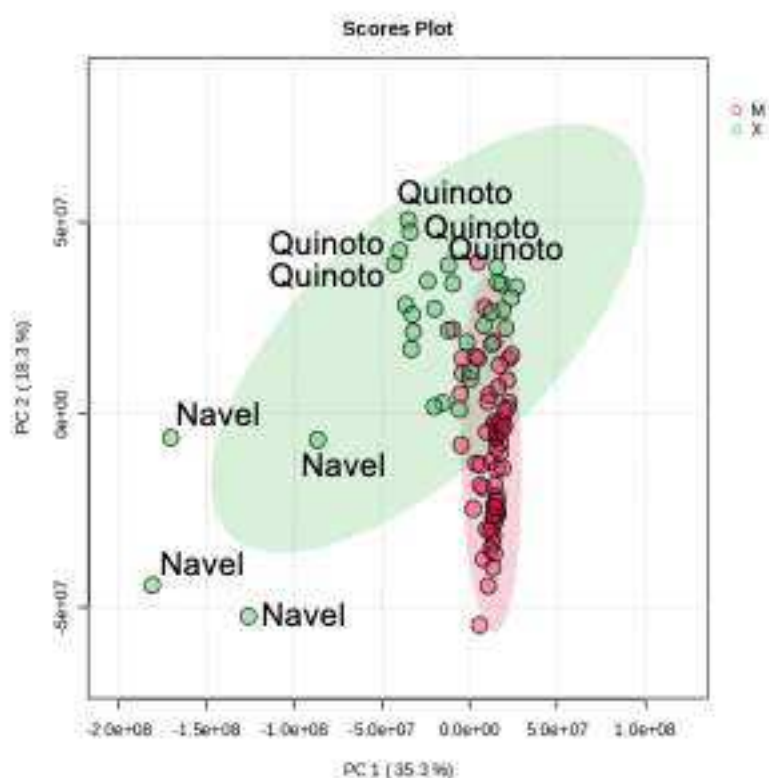


Figura 4.11 Análisis de componentes principales de todas las frutas, coloreadas según tipo de fruta; mandarinas (rojo, M) y otros citrus (verde, X).

El PLS-DA mostró la misma tendencia que el PCA (**Figura 4.12**), y cumple con la validación cruzada (Q^2 y $R^2 > 0,6$; precisión $> 0,9$) y test de permutaciones ($p < 0,001$). La puntuación VIP mostró que el octacosanal presenta niveles más elevados en los cítricos en comparación con las mandarinas. Otros compuestos que presentan esta tendencia pero en menos medida son la lupenona y la friedelan-3-ona (triterpenoides pentacíclicos

derivados del lupeol y friedelanol, respectivamente), el tetracosanal, y las α/β -amirinas (otros triterpenos pentacíclicos). En las mandarinas se identificó el 3-metiltriacontano, hexacosanal, heptacosano y octacosano como compuestos con mayor concentración relativa a los otros cítricos.

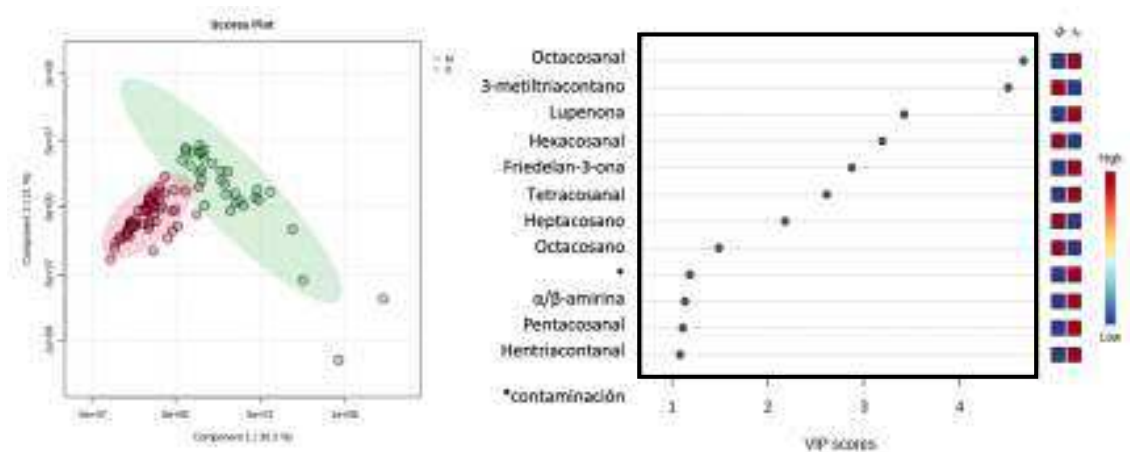


Figura 4.12 PLS-DA (izquierda) y puntuación VIP (derecha) de todas las frutas, coloreadas según tipo de fruta: mandarinas (rojo, M) y otros citrus (verde, X).

4.2.3.3.2 Mandarinas resistentes vs susceptibles

Con el objetivo de identificar metabolitos relacionados con la tolerancia al cancro en mandarinas, se realizó un análisis multivariado considerando únicamente las muestras de esta especie, clasificadas como tolerantes (R) o susceptibles (S). El PCA (**Figura 4.13**, izquierda) mostró que los dos primeros componentes explicaron el 29,8% de la varianza total (PC1: 17,4% y PC2: 12,4%). No se observó una separación clara entre los grupos, lo que sugiere que las principales fuentes de variabilidad dentro de las mandarinas no están relacionadas con la tolerancia al cancro o que las diferencias metabólicas asociadas a dicha tolerancia son sutiles en relación con la variabilidad biológica de las muestras. El modelo obtenido por PLS-DA permitió una mejor discriminación entre los grupos (**Figura 4.13**, derecha), con una separación visible en el gráfico de scores y con valores de desempeño aceptables: $R^2 = 0,87$, $Q^2 = 0,60$ y precisión = 0,88. La significancia estadística del modelo fue confirmada mediante test de permutaciones que dio un valor de $p = 0,002$, lo que descarta que la separación observada se deba al azar.

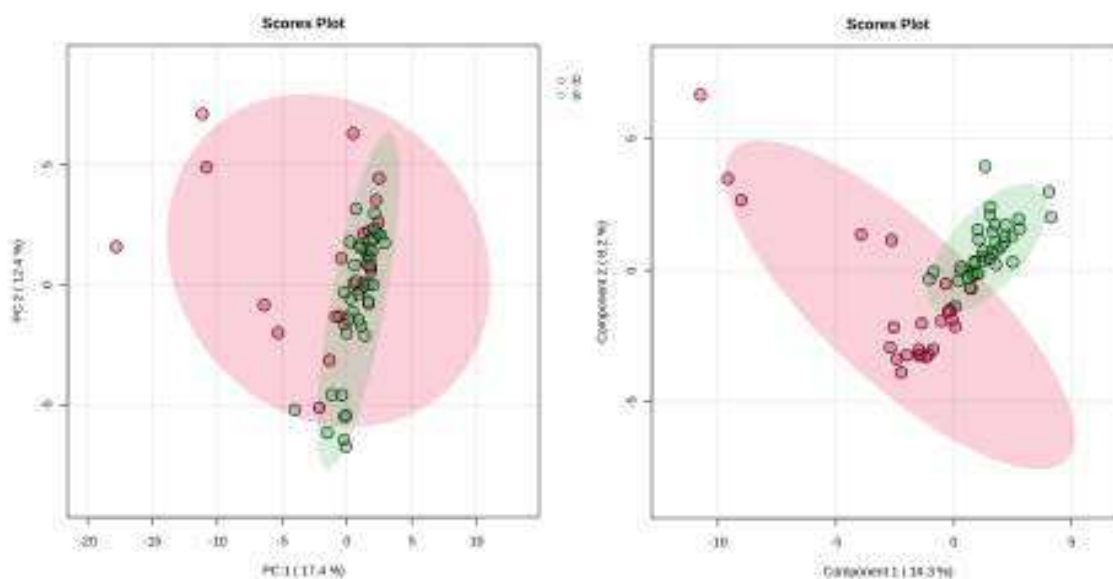


Figura 4.13 PCA y PLS-DA de las variedades de mandarinas clasificadas como resistentes (rojo) y susceptibles (verde).

El análisis de las puntuaciones VIP (**Figura 4.14**) permitió identificar como metabolitos discriminantes a los compuestos triacontanol, tricosano, 3-nonacosanona, heneicosano y docosano para las mandarinas resistentes. Estos son los mejores candidatos a biomarcadores de tolerancia al cancro presentes en el extracto de ceras de mandarinas.

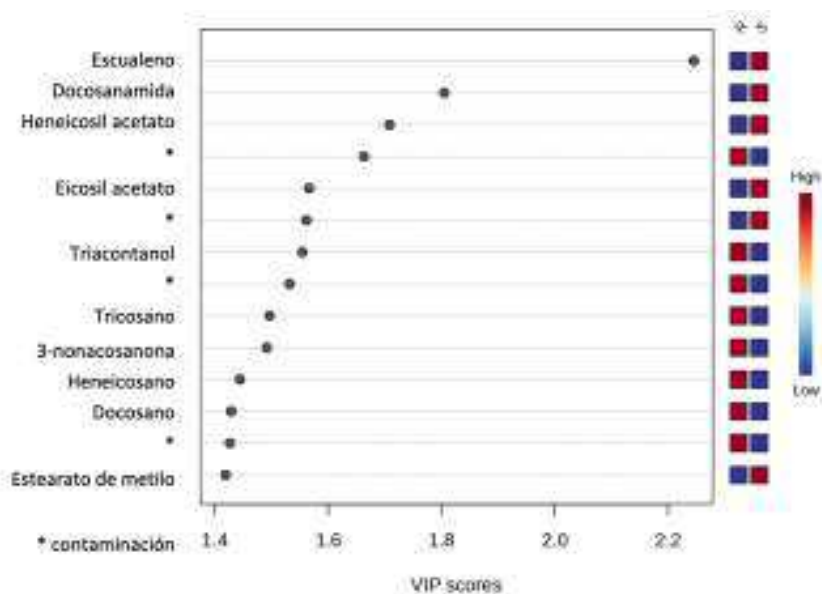


Figura 4.14 Puntuaciones VIP del PLS-DA de las mandarinas resistentes y susceptibles.

4.2.3.3.3 Comparación entre especies más resistentes y más susceptibles

Para realizar este estudio se seleccionaron las especies más resistentes (quinoto y mandarina Ponkan), y fueron comparadas con las especies más susceptibles a cancro (pomelo, limón criollo y Meyer, y naranja Navel). Al igual que en el caso de las mandarinas, el PCA no encontró una separación entre el grupo resistente y el susceptible (Figura 4.15).

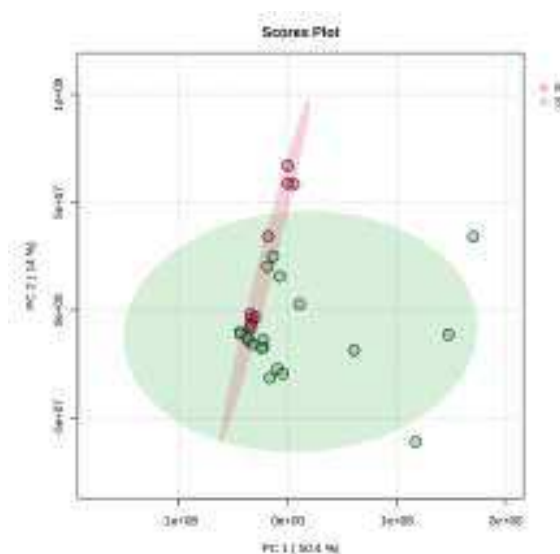


Figura 4.15 PCA de las especies que presentan mayor resistencia y mayor susceptibilidad a cancro.

Luego se construyó un modelo PLS-DA que mostró buena separación entre clases (**Figura 4.16**, izquierda), cuya validación cruzada indicó buen rendimiento predictivo al utilizar dos componentes, con valores de precisión = 0,86, $R^2 = 0,63$ y $Q^2 = 0,406$ y buena significancia estadística según el test de permutaciones ($p = 0,027$). El gráfico de puntuaciones VIP (**Figura 4.16**, derecha) permitió identificar una serie de metabolitos discriminantes, siendo la lupenona, 3-metiltriacontano, hentriacontano y hexacosanal los que caracterizaron a las especies resistentes. El tetracosanal, friedelan-3-ona y pentacosano se encontraban en mayor proporción en las especies susceptibles.

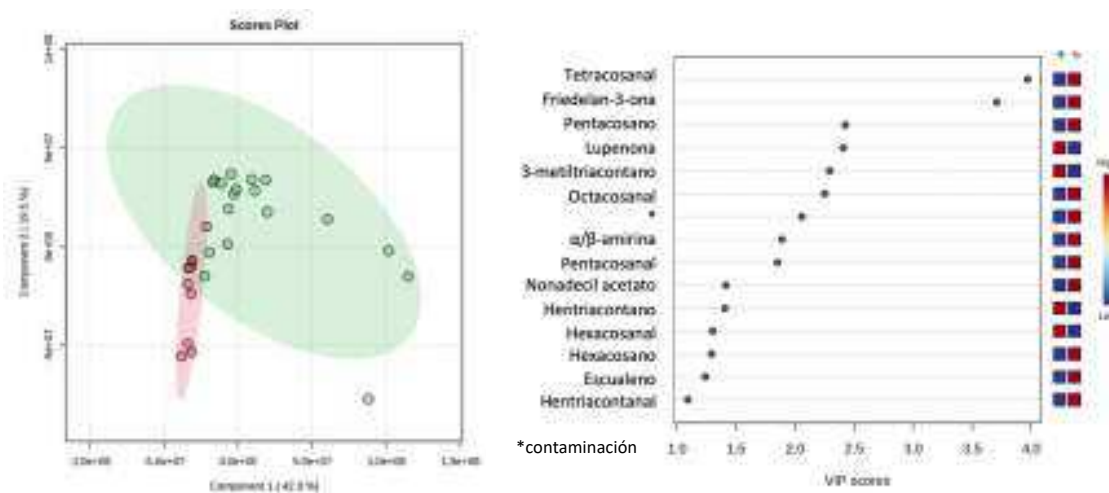


Figura 4.16 PLS-DA y su puntuación vip para las especies que presentan mayor resistencia y mayor susceptibilidad a cancro.

El análisis multivariado permitió discriminar entre las muestras más resistentes y más susceptibles, y destacó un conjunto de metabolitos potencialmente asociados a la resistencia. Es relevante destacar que muchas veces la resistencia/susceptibilidad a determinada enfermedad no solo viene dada por la presencia de un solo compuesto, sino que por un grupo de compuestos que de encontrarse presente en las proporciones adecuadas logra establecer una barrera de defensa contra el patógeno (Castro-Moretti, Gentzel, Mackey, & Alonso, 2020). Los modelos presentaron buena capacidad predictiva y todos fueron validados estadísticamente. Esta combinación analítico-estadística es una herramienta útil para la selección de materiales parentales y para la identificación de marcadores químicos de resistencia, y por ende de gran relevancia para los programas de mejoramiento genético y la fitosanidad en cítricos.

4.2.4 Conclusiones

Esta sección se centró en el análisis metabolómico dirigido de las ceras epicuticulares, motivado por las señales del estudio no dirigido que sugerían su papel en la defensa frente a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. En frutos maduros (Grupo 1) el contenido promedio de ceras fue ligeramente mayor en las variedades resistentes que en las susceptibles, sin diferencias estadísticamente significativas. La gran variabilidad individual observada

para, por ejemplo, Willowleaf (resistente) y Page (susceptible) (**Tabla 4.3**) indica que el contenido total no establece una relación lineal con la resistencia en la madurez.

En frutos inmaduros (Grupo 2), el contenido total de ceras fue menor en todos los casos y no mostró diferencias significativas entre tipos. Este patrón refuerza que la composición química de las ceras es determinante para la resistencia por encima del contenido total, especialmente en etapas tempranas del desarrollo.

La caracterización química de los extractos mostró diferencias en frutos inmaduros. Los alcoholes fueron, en promedio, más abundantes en las muestras susceptibles que en las resistentes, con valores altos en especies no mandarina como limón Meyer, naranja Navel y pomelo. En las mandarinas resistentes los alcoholes fueron muy bajos o nulos. Los isoalcanos mostraron patrones dependientes del genotipo, por ejemplo el quinoto, la única especie con resistencia genética a cancrrosis, presentó el valor más alto, sugiriendo una composición epicuticular que puede ser indicativa de resistencia. En cambio, en frutos maduros (Grupo 1) no se detectaron diferencias significativas a nivel de grupos funcionales, aunque algunas variedades resistentes (M16 y B79) exhibieron los mayores porcentajes de alcanos, compatibles con un posible refuerzo de la barrera física superficial. Los aldehídos fueron altos en ambos tipos, con valores destacados en resistentes (Willowleaf y B475), lo que sugiere un rol potencial que deberá corroborarse a nivel de compuestos individuales.

El análisis multivariado confirmó la capacidad de las ceras para discriminar taxonómicamente y para identificar compuestos asociados a la tolerancia. El quinoto se caracterizó por lupenona, triacontanal, hentriacontano, octacosanal y heptacosanal, la naranja por triacontano, trans-geranilgeraniol y α/β -amirinas, y el limón por un derivado de ácido metoxicinámico. Al comparar mandarinas con otros cítricos, los modelos mostraron mayores niveles de octacosanal, lupenona, friedelan-3-ona, tetracosanal y α/β -amirinas en las no-mandarinas, mientras que las mandarinas se enriquecieron en 3-metiltriacontano, hexacosanal, heptacosano y octacosano.

Restringiendo el análisis a mandarinas clasificadas como resistentes o susceptibles, el PLS-DA permitió una buena separación, y se identificaron como posibles biomarcadores

de tolerancia al triacontanol, tricosano, 3-nonacosanona, heneicosano y docosano. En la comparación entre especies más resistentes (quinoto y mandarina Ponkan) y más susceptibles (pomelo, limones, naranja Navel), el PLS-DA también discriminó los grupos asociando a las resistentes con lupenona, 3-metiltriacontano, hentriacontano y hexacosanal, y a las susceptibles con tetracosanal, friedelan-3-ona y pentacosano.

Estos resultados aportan evidencia de que la cáscara funciona como una interfaz física y química con incidencia en la resistencia, la susceptibilidad y la evolución de la infección. En términos productivos, esto permite identificar rasgos asociados a resistencia o menor susceptibilidad que podrían incorporarse como criterios complementarios en programas de selección varietal y en la elección de portainjertos. También ayuda a reconocer etapas fenológicas de mayor vulnerabilidad y a plantear variables de manejo agronómico que podrían reforzar la función de barrera, como la nutrición, la resistencia al estrés hídrico, y la carga del árbol.



Figura 4.17 Principales resultados del capítulo 4, creado con NotebookLM.

Resulta claro que la resistencia surge de interacciones sinérgicas entre múltiples metabolitos y de su adecuada proporción, más que de un único compuesto (He et al., 2018). La estrategia no dirigida empleada inicialmente permitió generar hipótesis para estudios dirigidos, los cuales generaron modelos estadísticos e identificaron potenciales

fitomarcadores de utilidade como insumos para programas de melhoramento y manejo fitosanitario orientados al desarrollo de variedades resistentes en cítricos.

4.3 Referencias bibliográficas

- Ali, S., Hameed, A., Muhae-Ud-Din, G., Ikhlaiq, M., Ashfaq, M., Atiq, M., ... Wang, Y. (2023). Citrus Canker: A Persistent Threat to the Worldwide Citrus Industry—An Analysis. *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy13041112>
- Borges, R. de S., & Pio, R. M. (2003, December 1). Comparative study of the mandarin hybrid fruit characteristics: Nova, Murcott and Ortanique in Capão Bonito SP, Brazil. Estudo comparativo das características dos frutos dos híbridos de tangerina: Nova, Murcott e Ortanique, na região de Capão Bonito, SP. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Sociedade Brasileira de Fruticultura. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452003000300022>
- Castro-Moretti, F. R., Gentzel, I. N., Mackey, D., & Alonso, A. P. (2020). Metabolomics as an Emerging Tool for the Study of Plant–Pathogen Interactions. *Metabolites*. <https://doi.org/10.3390/metabo10020052>
- Cesio, V., Dutra, C., Moyna, P., & Heinzen, H. (2006). Morphological and chemical diversity in the Type IV glandular trichomes of Solanaceae (S. sisymbriifolium and N. glauca) as germplasm resources for agricultural and food uses. *Electronic Journal of Biotechnology*. scielocl.
- Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., & Ollitrault, P. (2016). Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Annals of Botany*, 117(4), 565–583. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw005>
- de Carvalho, S. A., de Carvalho Nunes, W. M., Belasque, J., Machado, M. A., Croce-Filho, J., Bock, C. H., & Abdo, Z. (2014). Comparison of Resistance to Asiatic Citrus Canker Among Different Genotypes of Citrus in a Long-Term Canker-Resistance Field Screening Experiment in Brazil. *Plant Disease*, 99(2), 207–218. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0384-RE>
- Ding, S., Zhang, J., Yang, L., Wang, X., Fu, F., Wang, R., ... Shan, Y. (2020). Changes in Cuticle Components and Morphology of “Satsuma” Mandarin (Citrus unshiu) during Ambient Storage and Their Potential Role on Penicillium digitatum Infection. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(2). <https://doi.org/10.3390/molecules25020412>

- Duan, X., Zhu, Y., Shu, C., Gao, J., Liu, F., & Pan, S. (2022). Extraction of Pectin from Satsuma Mandarin Peel: A Comparison of High Hydrostatic Pressure and Conventional Extractions in Different Acids. *Molecules*, 27(12), 3747-N.PAG. <https://doi.org/10.3390/molecules27123747>
- Fujii, H., Ohta, S., Nonaka, K., Katayose, Y., Matsumoto, T., Endo, T., ... Shimada, T. (2016). Parental diagnosis of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) revealed by nuclear and cytoplasmic markers. *Breeding Science*, 66(5), 683–691. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.16060>
- Gaglianò, M., De Luca, G., Conidi, C., & Cassano, A. (2023). NMR-Based Characterization of Citrus Tacle Juice and Low-Level NMR and UV—Vis Data Fusion for Monitoring Its Fractions from Membrane-Based Operations. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox12010002>
- García, S., García, C., Heinzen, H., & Moyna, P. (1997). Chemical basis of the resistance of barley seeds to pathogenic fungi. *Phytochemistry*, 44(3), 415–418. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(96\)00511-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(96)00511-0)
- Gora, J. S., Kumar, R., Sharma, B. D., Ram, C., Berwal, M. K., Singh, D., ... Kumar, P. (2022). Performance evaluation of Fremont mandarin on different rootstocks under the hot arid environment of India. *South African Journal of Botany*, 144, 124–133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.037>
- He, Y., Han, J., Liu, R., Ding, Y., Wang, J., Sun, L., ... Cheng, Y. (2018). Integrated transcriptomic and metabolomic analyses of a wax deficient citrus mutant exhibiting jasmonic acid-mediated defense against fungal pathogens. *Horticulture Research*, 5. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0051-0>
- Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., & Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8), 1155–1166. <https://doi.org/10.1007/s001220051419>
- Ollitrault, P., Terol, J., Chen, C., Federici, C. T., Lotfy, S., Hippolyte, I., ... Brunel, D. (2012). A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics*, 13(1), 593. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-593>
- Peng, Q., Zhang, Y., Zhu, M., Bao, F., Deng, J., & Li, W. (2024). Polymethoxyflavones from citrus peel: advances in extraction methods, biological properties, and potential

- applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(16), 5618–5630.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2156476>
- Presidencia de la República Oriental del Uruguay. (2003). 23/12/03 – MGAP estructurará y ejecutará un programa de control de la plaga cancro cítrico. Retrieved July 24, 2025, from <https://archivo.presidencia.gub.uy/decretos/2003122306.htm>
- Romero, P., & Lafuente, M. T. (2021). The Combination of Absciscic Acid (ABA) and Water Stress Regulates the Epicuticular Wax Metabolism and Cuticle Properties of Detached Citrus Fruit. *International Journal of Molecular Sciences*.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910242>
- Ross, A. A. (1949). The origin of the Ellendale mandarin and its relatives. *Queensland Agricultural Journal*, 69, 224–224.
- Russo, M., Rigano, F., Arigò, A., Sciarrone, D., Calabrò, M. L., Farnetti, S., ... Mondello, L. (2016). Rapid isolation, reliable characterization, and water solubility improvement of polymethoxyflavones from cold-pressed mandarin essential oil. *Journal of Separation Science*, 39(11), 2018–2027.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jssc.201501366>
- Shimizu, T., Kitajima, A., Nonaka, K., Yoshioka, T., Ohta, S., Goto, S., ... Nakamura, Y. (2016). Hybrid Origins of Citrus Varieties Inferred from DNA Marker Analysis of Nuclear and Organelle Genomes. *PLOS ONE*, 11(11), e0166969. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166969>
- Silva, L. M. A., Alves Filho, E. G., Choze, R., Lião, L. M., & Alcantara, G. B. (2012, June 1). ¹H HRMAS NMR spectroscopy and chemometrics for evaluation of metabolic changes in citrus sinensis Caused by Xanthomonas axonopodis pv. citri. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Sociedade Brasileira de Química.
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000600009>
- Tamaki, Y., Konishi, T., & Tako, M. (2008). Isolation and Characterization of Pectin from Peel of Citrus tankan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(3), 896–899.
<https://doi.org/10.1271/bbb.70706>
- Tran, N. Y. T., Le, T. D., Dao, P. T., Bach, G. L., Huyn, P. X., & Tran, Q. N. (2022). Evaluation of different extraction methods on the polyphenols yield, flavonoids yield, and antioxidant activity of the pomelo flavedo extract from Da Xanh (Citrus maxima [burm] merr.) variety. *Food Science and Technology*, 42, e97021. Retrieved from <https://www.scielo.br/j/cta/a/8CsBvD3XsZRSxF5zQ8HPY7t/?lang=en#>

- Wu, G Albert, Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., ... Rokhsar, D. (2014). Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology*, 32(7), 656–662. <https://doi.org/10.1038/nbt.2906>
- Wu, Guohong Albert, Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., ... Talon, M. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*, 554(7692), 311–316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>
- Zhu, M., Ji, J., Wang, M., Zhao, M., Yin, Y., Kong, J., ... Li, Y.-F. (2020). Cuticular wax of mandarin fruit promotes conidial germination and germ tube elongation, and impairs colony expansion of the green mold pathogen, *Penicillium digitatum*. *Postharvest Biology and Technology*, 169, 111296. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111296>

5 Metabolómica en las hojas

Los cítricos representan uno de los principales cultivos frutales a nivel mundial, con más de 143 millones de toneladas producidas en 2019 (“FAOSTAT,” n.d.). La alternancia productiva en cítricos es uno de los principales factores limitantes que afectan la rentabilidad de la producción, restringiendo así el aprovechamiento del potencial máximo del sector cítrico a escala global. Por ello, la determinación genética, bioquímica y metabólica de este fenómeno ha sido ampliamente estudiada con el objetivo de comprender mejor los procesos regulatorios implicados en la transición entre árboles productivos y no productivos. Sin embargo, aún no se comprende completamente el mecanismo mediante el cual el cultivo en desarrollo influye sobre la floración y la producción de frutos del año siguiente. Una de las hipótesis sostiene que el retorno de la floración y la productividad está relacionado con el estado de carbohidratos del árbol; es decir, la carencia de carbohidratos durante el año “on” reduce directa o indirectamente la floración en la siguiente temporada (Shalom et al., 2012). Otros autores proponen que el fruto en desarrollo produce un inhibidor que reduce directa o indirectamente la floración en la primavera posterior al cultivo “on” (Agust, Almela, & Pons, 1992; Shalom et al., 2012). Aunque se han realizado numerosas investigaciones para dilucidar la regulación hormonal y genética de la inducción floral en cítricos (Bower, Cutting, Lovatt, & Blanke, 1990; Talon et al., 1998), aún se carece de información detallada sobre los cambios en el perfil de metabolitos (en calidad y cantidad) que ocurren durante los años “on” y “off”, los cuales podrían actuar como biomarcadores de dicha transición.

La floración representa una fase de transición del crecimiento vegetativo al reproductivo, siendo uno de los eventos más importantes en el ciclo de vida de las plantas. Durante esta transición, los cítricos experimentan una serie de regulaciones metabólicas que han sido ampliamente documentadas (Davenport, 2011). La floración está regulada por factores endógenos y exógenos. Entre los primeros, se ha destacado principalmente la modulación genética y hormonal del gen LFY y la vía metabólica de las giberelinas (Araki, 2001; Peña et al., 2001; Pillitteri, Lovatt, & Walling, 2004), señalándose la inhibición de la floración mediada por los frutos como la causa principal de la alternancia productiva en cítricos (Moss, 1971). De forma paralela, se ha reportado que el metabolismo del carbono

también participa en la inducción floral mediada por la presencia de frutos (Shalom et al., 2012). Por otro lado, la regulación exógena de la floración se ha atribuido mayoritariamente a factores de estrés ambiental como la intensidad y longitud de onda de la luz, temperatura, nutrición mineral y de carbono, sequía, baja disponibilidad de oxígeno, poda de raíces, estimulación mecánica, así como factores bióticos como infecciones por plagas y patógenos (Kazan & Lyons, 2016; Takeno, 2012; Wada & Takeno, 2010).

Una posible estrategia para estudiar los cambios metabólicos implicados en la alternancia productiva es el análisis del metaboloma de hojas en ambas etapas fisiológicas. Las estrategias de investigación metabolómica pueden abordarse desde dos enfoques distintos: no dirigido y dirigido, cada uno con ventajas y limitaciones propias. La metabolómica no dirigida implica el análisis integral de todos los analitos medibles en una muestra. Si bien permite descubrir nuevos compuestos, puede subestimarse la importancia de aquellos presentes en bajas concentraciones (Xi et al., 2014). En contraste, la metabolómica dirigida busca medir con precisión y de forma cuantitativa un grupo definido de metabolitos química y estructuralmente caracterizados. No obstante, su enfoque dirigido conlleva el riesgo de pasar por alto compuestos naturales relevantes para la propiedad biológica observada. En estos casos, la preparación de las muestras se optimiza específicamente para la obtención del grupo de metabolitos objetivo.

El presente capítulo aborda el estudio del perfil metabolómico foliar en mandarinas como herramienta para explorar los mecanismos bioquímicos asociados a la alternancia productiva, un fenómeno de alto impacto en la producción citrícola. A través de dos enfoques analíticos complementarios: uno no dirigido (*untargeted*) y otro dirigido (*targeted*), se propone estudiar las diferencias metabólicas entre hojas provenientes de distintas variedades de mandarina en diferentes etapas del desarrollo.

En la primera sección (5.1) se presenta una caracterización no dirigida mediante espectroscopía de RMN enfocada en el análisis de extractos acuosos y orgánicos de hoja. Esta estrategia permite detectar tendencias generales en la composición metabólica asociadas al estado reproductivo del árbol (vegetativo y productivo), revelando

diferencias en la composición de metabolitos primarios y secundarios sin enfocarse en compuestos predefinidos.

La segunda sección (5.2) se centra en una estrategia dirigida basada en LC-MS/MS orientada específicamente a la identificación y cuantificación de polifenoles y limonoides en hojas de ramas en estados fisiológicos diferentes de la alternancia productiva. Este enfoque más específico busca profundizar en la dinámica de compuestos clave y explorar su potencial como marcadores fisiológicos del estado reproductivo.

Ambas secciones se integran para proporcionar una visión más completa de los procesos metabólicos involucrados en el desarrollo de la planta y la alternancia productiva. La combinación de estas herramientas permite no solo avanzar en la comprensión de este fenómeno complejo, sino también sentar las bases para su aplicación para la selección temprana y el manejo agronómico en cítricos.

5.1 Análisis no dirigido en hojas

5.1.1 Introducción

En el Capítulo 3 se discutieron diferencias en la aceptabilidad de diversas variedades de mandarina, aspecto de gran relevancia para la selección y el desarrollo de nuevos cultivares. Sin embargo, la evaluación de la aceptabilidad requiere la disponibilidad del fruto, lo que limita su aplicabilidad temprana durante el desarrollo del árbol. Frente a esta restricción, el estudio de las hojas surge como una alternativa prometedora al estar presentes a lo largo de todo el ciclo vegetativo. Es por esto que podrían proporcionar información valiosa sobre el estado fisiológico del árbol y eventualmente permitir inferencias tempranas sobre características de interés, como la aceptabilidad del fruto.

En esta sección se explora el uso de un enfoque metabolómico no dirigido aplicado a hojas de mandarina para identificar perfiles químicos asociados al estado fisiológico de la planta (productiva o no productiva). Como no fue posible establecer correlaciones directas entre los perfiles de hoja y la aceptabilidad sensorial del fruto debido a la falta de material vegetal de híbridos en etapa no productiva, la caracterización de los metabolitos

presentes en hojas productivas y no productivas representa un paso fundamental hacia la identificación de biomarcadores relevantes para la selección varietal.

La metabolómica no dirigida, especialmente mediante espectroscopía de RMN combinada con análisis estadístico multivariado, ha demostrado ser una herramienta poderosa para la caracterización no dirigida de metabolitos en tejidos vegetales. En el caso de los cítricos, esta aproximación ha sido utilizada para estudiar efectos de portainjertos (Albrecht, Tripathi, Kim, & Bowman, 2019), respuestas a estreses bióticos y abióticos (Slisz, Breksa, Mishchuk, McCollum, & Slupsky, 2012), e incluso discriminación geográfica de cultivares (Villa-Ruano et al., 2019). El estudio del perfil metabolómico de hojas en diferentes estados fenológicos como indicador de alternancia productiva sigue siendo un área poco explorada, a pesar de su potencial utilidad en programas de mejora y manejo agronómico.

El objetivo principal de esta sección es caracterizar los perfiles metabolómicos de hojas de distintas variedades de mandarina mediante un enfoque no dirigido basado en espectroscopía de ^1H RMN, con énfasis en las diferencias entre árboles en estado productivo y no productivo. A partir de estos resultados, se busca identificar metabolitos diferenciales que puedan estar asociados al estado reproductivo del árbol y que sirvan como base para futuros análisis dirigidos (*targeted*) orientados a compuestos de interés.

5.1.2 Metodología

5.1.2.1 Material vegetal

El cultivo de las muestras se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) de Uruguay, en la estación experimental ubicada en el departamento de Salto (latitud: 31°16' S; longitud: 57°53' O; altitud: 47 m s. n. m.). Se trabajó con árboles adultos de las siguientes variedades de cítricos: Ellendale (*Citrus reticulata* Blanco), Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.), Willowleaf (*Citrus deliciosa* Ten.) y Page (*Citrus reticulata* Blanco $\times$ *Citrus paradisi* Macf.), todas injertadas sobre *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. como portainjerto. Los árboles fueron cultivados bajo condiciones controladas de manejo hortícola, incluyendo riego y control fitosanitario.

Para cada variedad, se seleccionaron cinco árboles en estado productivo (5 – 7 años) y cinco árboles en estado no productivo (sin generación de frutos, 3 – 5 años). Las hojas adultas (entre 6 y 12 meses) fueron recolectadas en ramas con frutos en la parte exterior de la copa cuando el fruto completó su coloración para los árboles productivos y en ubicación análoga en los árboles no productivos. Se recolectaron 5 hojas por rama y fueron muestreadas 10 ramas por árbol. La distancia entre las hojas y el pedúnculo del fruto fue de 5 a 20 cm. Las muestras fueron congeladas y almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

Todos los árboles se encontraban en el mismo huerto y bajo idénticas condiciones edafoclimáticas y de manejo. Por tanto, las diferencias en la composición química observadas entre variedades no pudieron atribuirse a factores ambientales, sino que reflejan diferencias genéticas y/o fisiológicas propias de cada genotipo.

5.1.2.2 Extracción

Se trituró por separado cada muestra compuesta de hojas de cada variedad de mandarinas utilizando un molino de corte (Skymssen, modelo TA-02-N, Brasil), se pesaron ($2,00 \pm 0,10$) g del material triturado en balanza analítica (Shimadzu ATX224, Japón), se colocó en tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mL y se adicionó 8,00 mL de CHCl_3 (LiChrosolv®, Merck, Alemania), 4,00 mL de MeOH (LiChrosolv®, Merck, Alemania), y 4,00 mL de agua ultrapura (Millipore Milli-Q® Ultrapure Water Solutions Type 1). Se sometió a agitación con vórtex (WiseMix VM-10, Wids, Alemania) a 110 rcf durante 30 segundos y a baño de ultrasonido (SB-120DT, Wollen Lab, China) durante 60 segundos. Se centrifugó (Eppendorf 5702, Alemania) durante 5 minutos a 1400 rcf, se retiró la capa orgánica y se agregaron 8,00 mL de CHCl_3 . Se repitió la etapa de vórtex, ultrasonido y centrifugado, se juntaron las fases orgánicas y se secaron con Na_2SO_4 anhidro. Se filtró el extracto orgánico seco mediante papel de filtro Whatman y se eliminó el solvente bajo corriente de nitrógeno gaseoso empleando un concentrador de fracciones (Turbovap LV, Biotage, Suecia). El extracto acuo-metanólico se filtró mediante papel, se eliminó el MeOH mediante destilación a presión reducida empleando rotavaporador (Büchi R-114, Suiza), y finalmente se liofilizó (BenchTop Pro, VirTis SP Scientific, Estados Unidos)

para eliminar el agua. Se realizaron 10 réplicas de cada extracción. Los extractos secos se almacenaron en desecador hasta su análisis instrumental.

5.1.2.3 Análisis instrumental

Los espectros de ^1H RMN de los extractos acuosos de hojas de mandarinas se obtuvieron utilizando los protocolos descritos en el Capítulo 3 ([3.2.5.1](#)). Por otro lado, los espectros de ^1H RMN de los extractos orgánicos de hojas se obtuvieron utilizando los mismos protocolos descritos para extractos clorofórmicos en el Capítulo 4 ([4.1.2.3](#)).

5.1.2.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos multivariados se realizaron utilizando la plataforma web MetaboAnalyst versión 4.0 (Chong et al., 2018; Chong & Xia, 2018). Se aplicó el método de escalado Pareto, adecuado para datos metabolómicos obtenidos mediante RMN, y se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para explorar los datos, clasificar variedades y detectar valores atípicos.

La identificación de fitomarcadores se llevó a cabo mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y su variante ortogonal (OPLS-DA), que optimizan la separación entre grupos predefinidos. La validez de los modelos se verificó con una prueba de permutación de 1000 iteraciones, y su desempeño se evaluó mediante los coeficientes de determinación (R^2) y de predicción cruzada (Q^2), garantizando la confiabilidad de los resultados.

5.1.3 Resultados y discusión

5.1.3.1 Clasificación de las variedades

Para evaluar la clasificación de las variedades, se realizaron análisis no supervisados (PCA) para los diferentes tipos de extractos. En la **figura 5.1** podemos ver que se obtiene una mejor separación entre las cuatro variedades al utilizar el extracto acuoso de hoja, por

lo que se selecciona este tipo de extracto para diferenciar las variedades. En la **figura 5.2** se ven los espectros de los extractos acuosos y orgánicos de las variedades parentales.

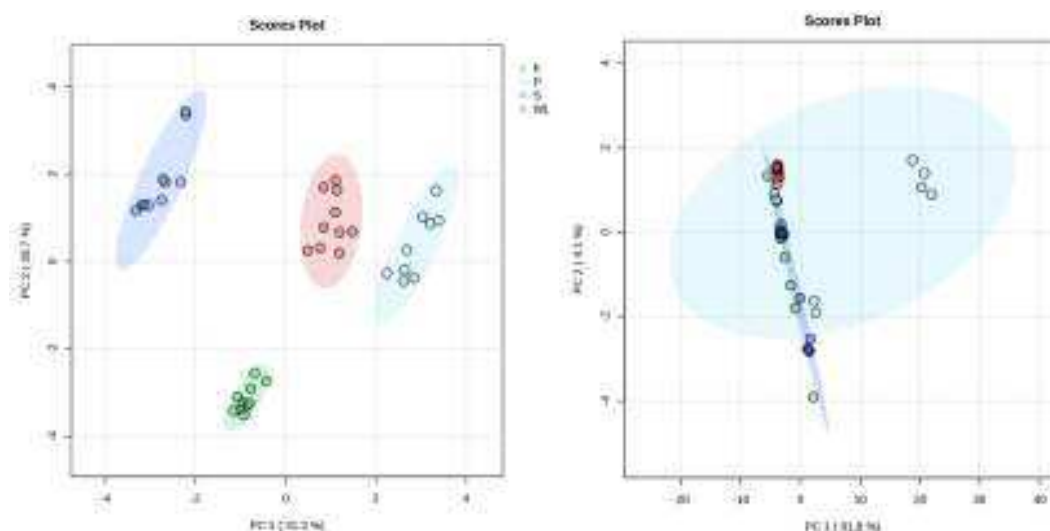


Figura 5.1 PCA de los cuatro parentales 2015 de los extractos de Hoja acuoso (izquierda) y Hoja orgánico (derecha). Willowleaf representada en rojo (A), Ellendale en verde (B), Satsuma en azul (C) y Page en celeste (D).

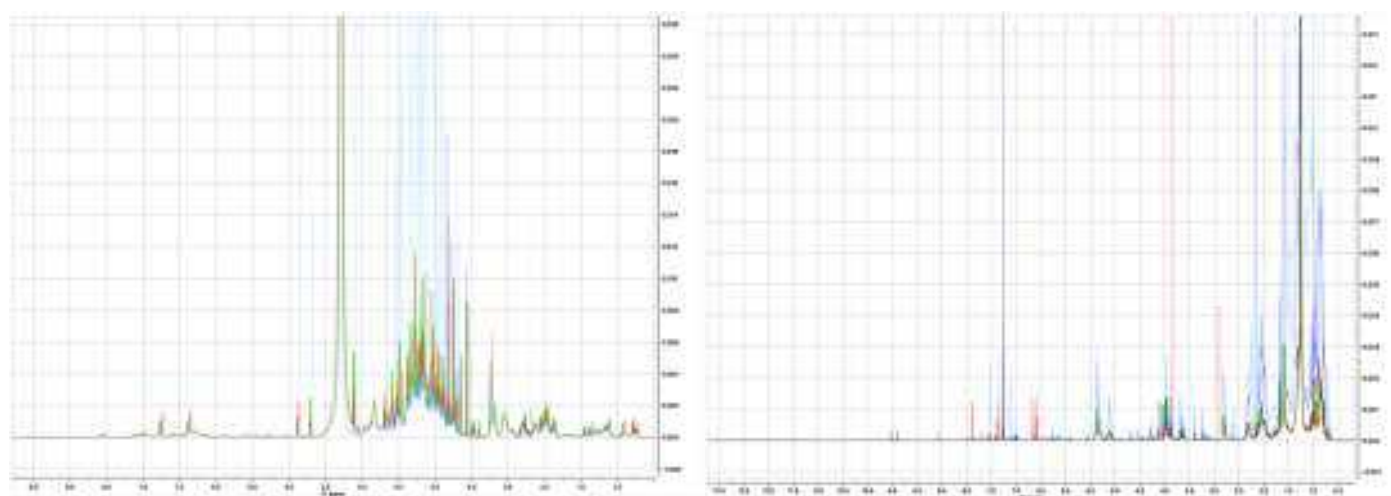


Figura 5.2 Espectro de los extractos de Hoja acuoso (izquierda) y orgánico (derecha) de los cuatro parentales 2015. Willowleaf (rojo), Ellendale (verde), Satsuma (azul) y Page (celeste).

La **figura 5.3** muestra los resultados del modelo PLS-DA y los puntajes VIP que permiten caracterizar las diferencias metabólicas entre las cuatro variedades de mandarinas estudiadas a partir de sus extractos acuosos de hojas. Se puede ver una clara separación entre las cuatro variedades, lo que indica perfiles químicos característicos para cada una

de ellas. Ellendale y Willowleaf se encuentran en extremos opuestos en el diagrama, lo que indica que son las variedades más distintas entre sí.

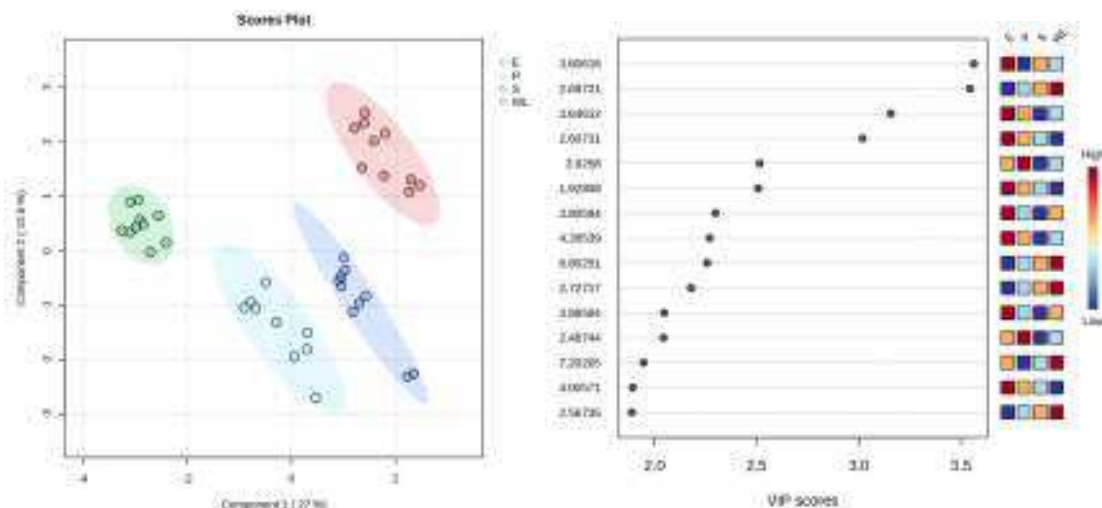


Figura 5.3 PLS-DA del extracto acuoso de hoja de los parentales (izquierda) y puntajes VIP de este análisis (derecha).

Se destaca una zona con señales estadísticamente relevantes en la región de 3,2 a 4,3 ppm, lo que sugiere la presencia de compuestos polares, posiblemente azúcares o ácidos orgánicos. Basándonos en los resultados descritos en capítulos anteriores (Capítulos 3 y 4) y en reportes previos de asignación espectral en frutas cítricas, especialmente mandarina (Sobolev et al., 2015), es posible proponer asignaciones a algunas de las señales más relevantes observadas. La región 3,2 – 4,3 ppm es característica de señales de carbohidratos como α - y β -glucosa, sacarosa y fructofuranosa (así como las áreas de las señales correspondientes a los protones anoméricos de α -glucosa a 5,20 ppm, β -glucosa a 4,60 ppm y fructosa a 4,05 ppm), compuestos típicos en extractos acuosos y con contribuciones importantes en hojas por su papel en el metabolismo energético. El mio-inositol, también reportado en mandarina, contribuye con señales en esta zona del espectro (Maciá-Vázquez, Núñez-Gómez, Martínez-Nicolás, Legua, & Melgarejo, 2024). En 2,6 – 2,7 ppm se encuentran las señales típicas de protones metilénicos del ácido cítrico y málico. La señal en 1,93 ppm podría corresponderse con prolina, marcador de estrés frecuente en cítricos, y las señales entre 6,8 y 7,2 se corresponden con compuestos aromáticos como los flavonoides hesperidina o naringina, también abundantes en hojas de mandarinas como se verá más adelante en este capítulo. La variedad Ellendale se

caracteriza por una mayor concentración de compuestos en la región de azúcares y algunos ácidos orgánicos, mientras que Willowleaf se destaca por la presencia de compuestos fenólicos y ácido cítrico. Page y Satsuma muestran niveles intermedios o bajos de estos marcadores.

5.1.3.2 Diferenciación entre hojas en etapa productiva y no productiva

5.1.3.2.1 Extractos acuosos de hoja de Ellendale productiva y no productiva

Para cada una de las variedades se realizó la misma secuencia de análisis estadísticos, en primer lugar un PCA para identificar outliers y evaluar la clasificación de las variedades. En segundo lugar se realizó un PLS-DA para identificar las señales responsables de dicha separación/clasificación. Este modelo fue validado utilizando un test de permutaciones para determinar si la separación se debe a motivos aleatorios o efectivamente a las diferencias entre las señales identificadas previamente.

En el caso de Ellendale podemos ver que en el PCA (**Figura 5.4**) las muestras productivas se separan de las no productivas, lo que indica una diferencia en la composición de los extractos estudiados. Sin embargo, en las muestras productivas vemos que existen dos subgrupos. Los mismos se corresponden con dos muestreos realizados en años consecutivos, siendo el segundo año el más próximo a las muestras no productivas.

En el PLS-DA, donde se incluye información sobre el tipo de muestra para obtener la mayor varianza entre ambos grupos, vemos un mejor agrupamiento de las muestras productivas (**Figura 5.4**).

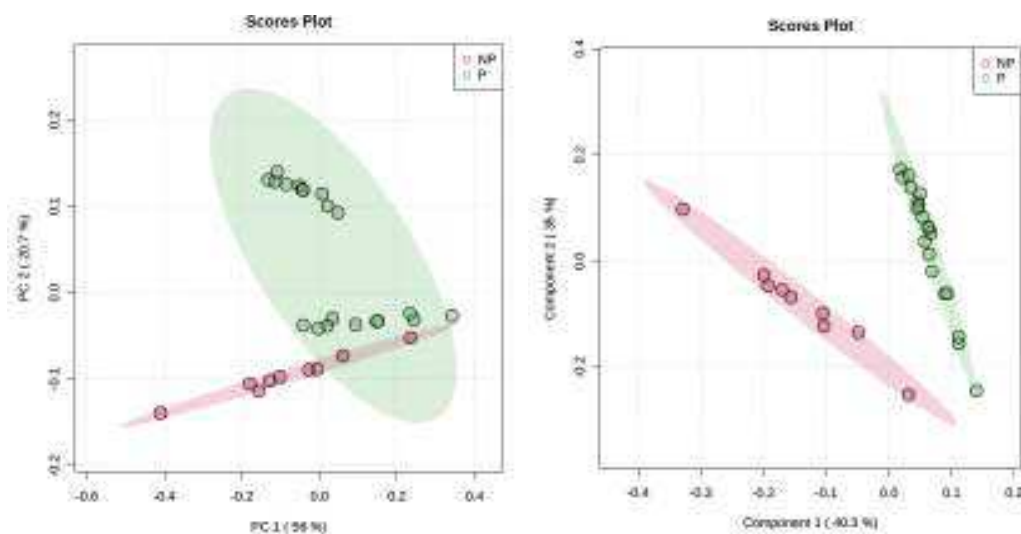


Figura 5.4 PCA (izquierda) y PLS-DA (derecha) de los extractos acuosos de hojas de Ellendale productiva (verde) y los no productiva (rojo).

En el modelo PCA, los dos primeros componentes explican un 76,7% de la variabilidad total, y ya permiten observar una tendencia de separación entre los grupos, aunque con cierto solapamiento. El modelo supervisado PLS-DA (Componentes 1 y 2: 40,3% y 35%) mejora la discriminación entre los grupos, lo que confirma que los metabolitos de las hojas se ven significativamente influenciados por la etapa productiva del árbol.

El VIP score plot muestra las variables de importancia en la proyección del PLS-DA realizado previamente (**Figura 5.5**). Se muestran en azul aquellas señales de menor intensidad y en rojo las de mayor intensidad. Podemos ver que las señales clasificatorias son mayoritariamente de azúcares en las muestras no productivas, probablemente debidas a una mayor tasa de fotosíntesis. La señal correspondiente al ácido cítrico (2,6 – 2,70 ppm) indica que este se encuentra en mayor proporción en las muestras productivas. Algo similar se observa para los ácidos málico (4,4 ppm y 2,5 ppm), tartárico (4,3 ppm) y succínico (2,5 – 2,6 ppm), todos reportados en mandarinas pero en menor proporción que el ácido cítrico (Fernandes et al., 2022; Sobolev et al., 2015).

Por otra parte, las muestras en estado no productivo se caracterizan por señales correspondientes a azúcares como sacarosa (protón anomérico en 5,35 – 5,38 ppm) y el resto de sus protones (3,2 – 4,0 ppm). Además se identifica el multiplete en el entorno 2,00 ppm ppm que se puede atribuir a los protones β -CH₂ del aminoácido prolina.

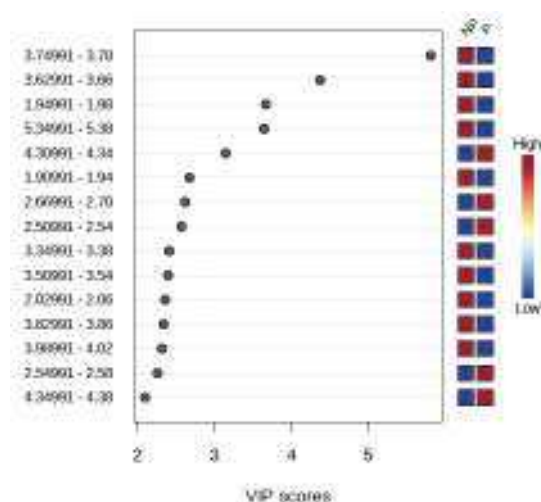


Figura 5.5 VIP scores del PLS-DA realizado con Ellendale productiva y no productiva.

5.1.3.2.2 Extractos acuosos de hoja de Page productiva y no productiva

En la **figura 5.6** se muestra el modelo de PLS-DA donde se ve una separación entre los grupos a lo largo del Componente 1 (56,4%) y el Componente 2 (40,2%), indicando diferencias significativas en el perfil metabólico asociado al estado fenológico. Es interesante destacar que dentro del grupo de muestras productivas se observa una subdivisión, al igual que en Ellendale, que podría reflejar diferencias entre los años de muestreo y estar vinculada a condiciones climáticas interanuales como temperatura, precipitaciones o radiación ultravioleta, las cuales afectan el metabolismo de las hojas. Una diferencia importante con Ellendale es que en Page las señales de azúcares productivas tienen menores puntajes VIP y alternan entre productivas y no productivas, evidenciando una menor variación entre las dos etapas.

Al igual que en Ellendale, el gráfico de puntuación VIP muestra que las señales correspondientes a la prolina diferencian entre hojas productivas y no productivas, teniendo mayores niveles en estas últimas.

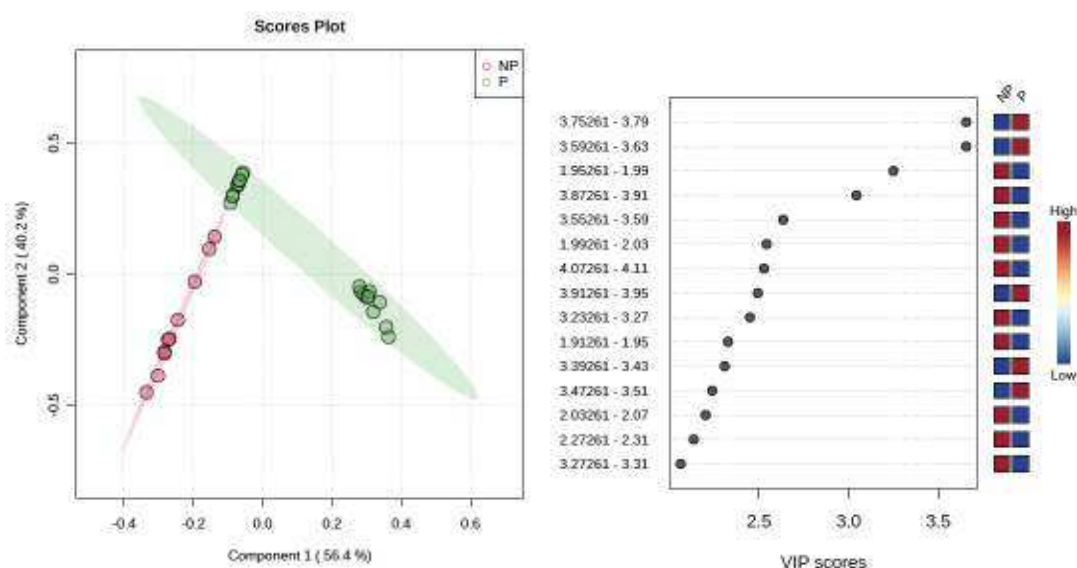


Figura 5.6 PLS-DA (izquierda) y VIP scores (derecha) de los extractos acuosos de hojas de Page productiva (verde) y no productiva (rojo).

5.1.3.2.3 Extractos acuosos de hoja de Satsuma productiva y no productiva

La **figura 5.7** muestra el gráfico de PLS-DA (izquierda) y su puntajes VIP (derecha) resultante del análisis de los espectros de RMN de extractos acuosos de hojas de mandarina Satsuma en estado productivo y no productivo. En este caso, la separación entre las clases no es tan marcada como en las variedades Ellendale y Page. No obstante, se mantiene un patrón similar, donde las muestras productivas del segundo muestreo se posicionan más cercanas a las no productivas que a las productivas del primer muestreo.

Dentro de los puntajes VIP se destacan varias señales en la región de 3,0 a 3,8 ppm, consistentes con azúcares solubles, como glucosa, fructosa y sacarosa, y que aparecen distribuidas entre hojas productivas y no productivas, al igual que en Page. Por otro lado, se repite la presencia de una señal intensa en torno a 2,0 – 2,1 ppm, más abundante en las hojas no productivas, la cual se corresponde con el multiplete de la prolina. En hojas no productivas también aparecen señales correspondientes a aminoácidos como treonina (2,34 – 2,38 y 4,10 – 4,14 ppm) y ácido γ -aminobutírico (GABA) (2,00 ppm). En hojas productivas se repiten señales de ácidos orgánicos como el cítrico o malónico al igual que en las variedades estudiadas anteriormente. En estas hojas productivas aparecen señales de compuestos fenólicos (6,86 – 6,90 ppm) y del H-1 perteneciente a β -glucosa lo que

sugiere la presencia de un glicósido de flavonoide (4,58 – 4,62 ppm, $J = 8$ Hz) como puede ser hesperidina o narirutina, flavonoides reportados en mandarinas.

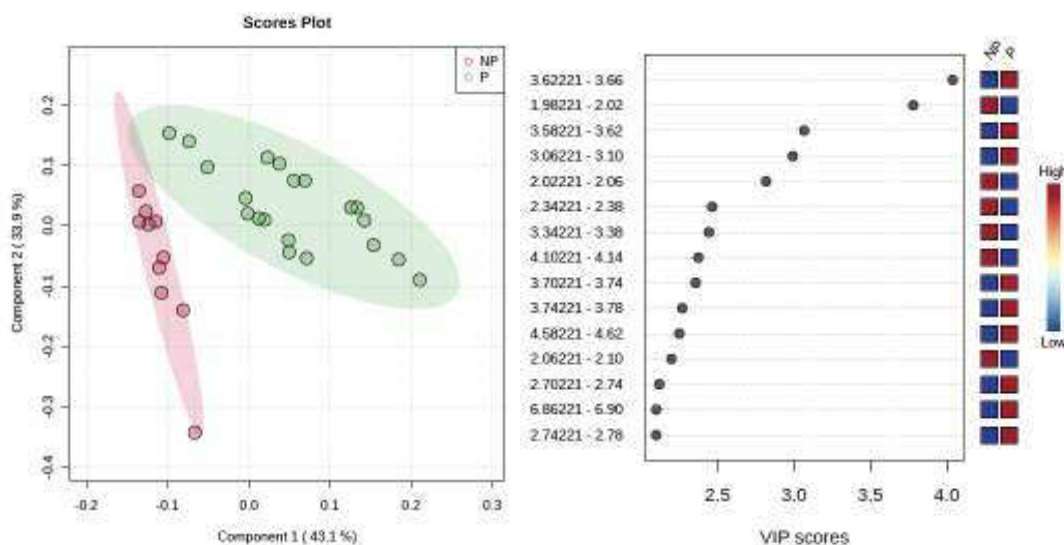


Figura 5.7. PLS-DA (izquierda) y VIP scores (derecha) de los extractos acuosos de hojas de Satsuma productiva (verde) y los no productiva (rojo).

5.1.3.2.4 Extractos acuosos de hoja de Willowleaf productiva y no productiva

El PLS-DA (**Figura 5.8**, izquierda) de Willowleaf muestra la separación entre los grupos a lo largo de la primera y segunda variable latente (81% de la varianza explicada). La distribución de los datos sugiere que, al igual que en las otras variedades analizadas, existen diferencias en el perfil metabolómico foliar según el estado fenológico del árbol. El análisis de los VIP scores del modelo (**Figura 5.8**, derecha) también se identifican señales de azúcares solubles (glucosa, fructosa, sacarosa), los cuales se acumulan mayormente en hojas no productivas, al igual que en Ellendale. En este grupo vuelven a aparecer aminoácidos como prolina y GABA, como en todas las variedades estudiadas anteriormente. En estas hojas además aparecen señales a campo más bajo que corresponden a compuestos fenólicos, en particular flavonoides. Estas señales son distintas a las importantes para Satsuma en hoja productiva, por lo que podría haber una expresión diferencial de flavonoides según la variedad y el estado fenológico de la misma.

Por otro lado, en hojas en etapa productiva de Willowleaf aparecen señales de ácido málico, tartárico y succínico, al igual que en Ellendale, en concordancia con la tendencia observada en las variedades estudiadas de una mayor acumulación de ácidos del ciclo de

Krebs en hojas productivas. Estos resultados confirman que en Willowleaf también ocurre un cambio en el metabolismo foliar asociado al estado reproductivo, caracterizado por una mayor acumulación de azúcares y aminoácidos en hojas no productivas y de ácidos orgánicos en la etapa productiva. Este patrón, compartido con las demás mandarinas analizadas, refuerza la idea de que ciertos metabolitos foliares pueden actuar como marcadores metabólicos del estado fenológico de la planta.

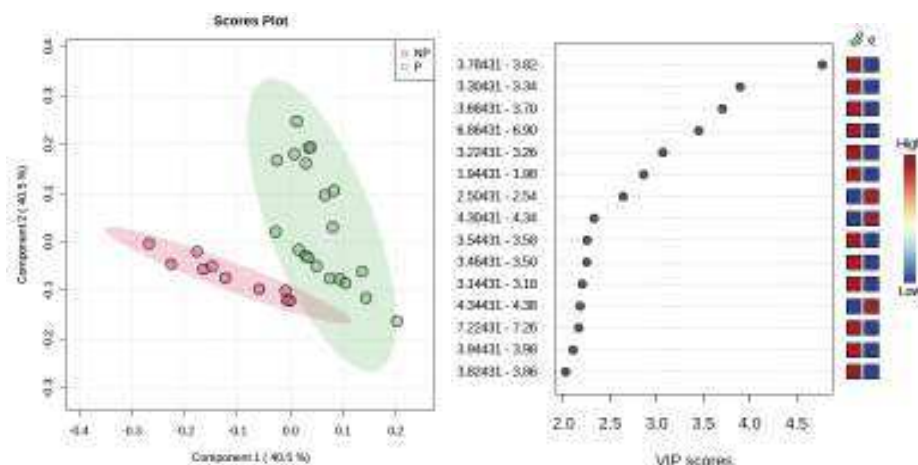


Figura 5.8 PLS-DA (izquierda) y VIP scores (derecha) de los extractos acuosos de hojas de Willowleaf productiva (verde) y los no productiva (rojo).

5.1.3.2.5 Extractos acuosos de hoja productiva y no productiva (Todas las variedades)

Con el objetivo de aumentar la robustez estadística del análisis, se integraron los datos correspondientes a las cuatro variedades de mandarina evaluadas (Ellendale, Page, Satsuma y Willowleaf), considerando tanto su estado productivo (P) como no productivo (NP). La **figura 5.9** muestra la representación bidimensional (izquierda) y tridimensional (derecha) del PCA realizado sobre los datos unificados. Como era de esperar, la mayor heterogeneidad de las muestras dificulta una separación clara entre los grupos al considerar solo dos componentes. Por ello, se incorporó un tercer componente principal que lleva a una mejor agrupación de las muestras según su estado fenológico, lo que indica que la diferencia entre clases se mantiene.

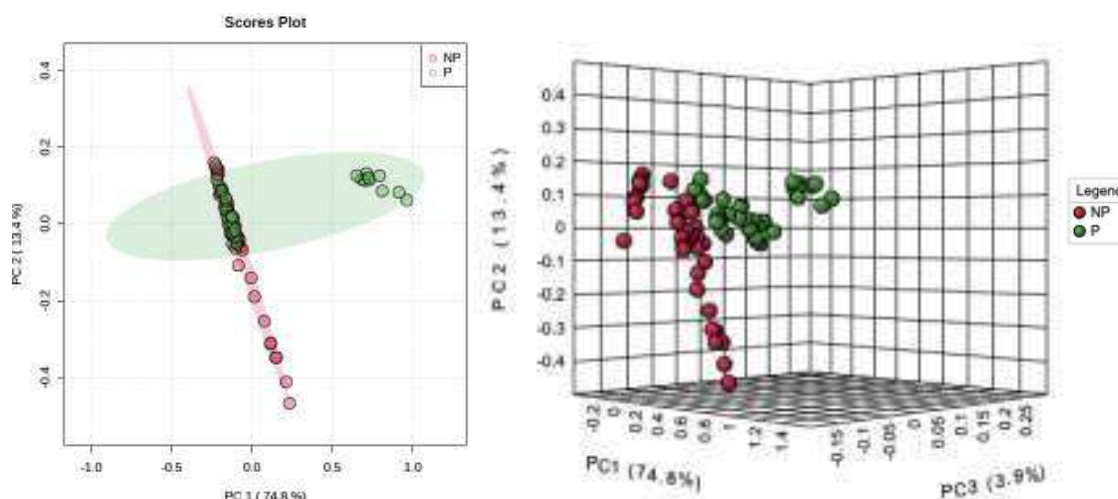


Figura 5.9 Representación del PCA de 2 componentes (izquierda) y de 3 componentes (derecha) de los extractos acuosos de hojas productivas (verde) y no productiva (rojo).

A partir de la observación realizada en Satsuma y Willowleaf, donde se identificaron señales atribuibles a flavonoides como variables clasificatorias, se decidió realizar un nuevo análisis enfocado exclusivamente en la región espectral superior a 5,5 ppm, correspondiente a compuestos polifenólicos. Dado que se restringió el conjunto de variables, el PCA no logró discriminar adecuadamente entre los grupos (no mostrado), lo cual sugiere una composición globalmente similar en esta fracción del espectro. Sin embargo, al aplicar un modelo PLS-DA sobre esta misma región espectral, se obtuvo una clara separación entre estados. El PLS-DA fue validado para 3 variables latentes presentando una precisión de 0,95, R^2 y Q^2 de 0,79 y 0,75 respectivamente, y pasando el test de permutaciones con un $p < 0,001$. Se identificaron, mediante los puntajes VIP (**Figura 5.10**), diferencias en la intensidad de las señales de protones de anillos aromáticos, siendo todas ellas más abundantes en las hojas de árboles no productivos. Esta tendencia sugiere que los polifenoles podrían estar asociados a mecanismos de defensa o protección más activos durante las fases vegetativas.

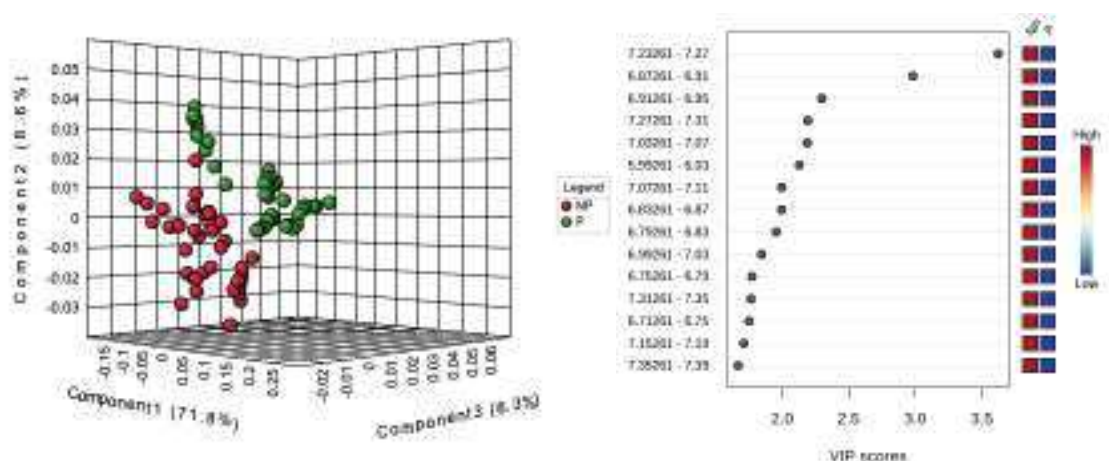


Figura 5.10 PLS-DA y VIP scores del PLS-DA realizado con las 4 variedades en estado productivo (verde) y no productivo (rojo) utilizando únicamente las señales superiores a 5,5 ppm.

5.1.3.2.6 Extractos orgánicos de hoja productiva y no productiva (Todas las variedades)

Como se vio en los resultados de clasificación de las variedades (5.1.3.1), se logra una mejor clasificación con los extractos acuosos de hoja que con los orgánicos. Esto indica que los perfiles obtenidos a partir de los extractos orgánicos de este órgano son muy similares entre las diferentes variedades. De todas formas, se realizó la comparación entre los extractos orgánicos de hoja para cada variedad en etapa productiva y no productiva. Los resultados de los PCA de cada variedad se muestran en la **figura 5.11**.

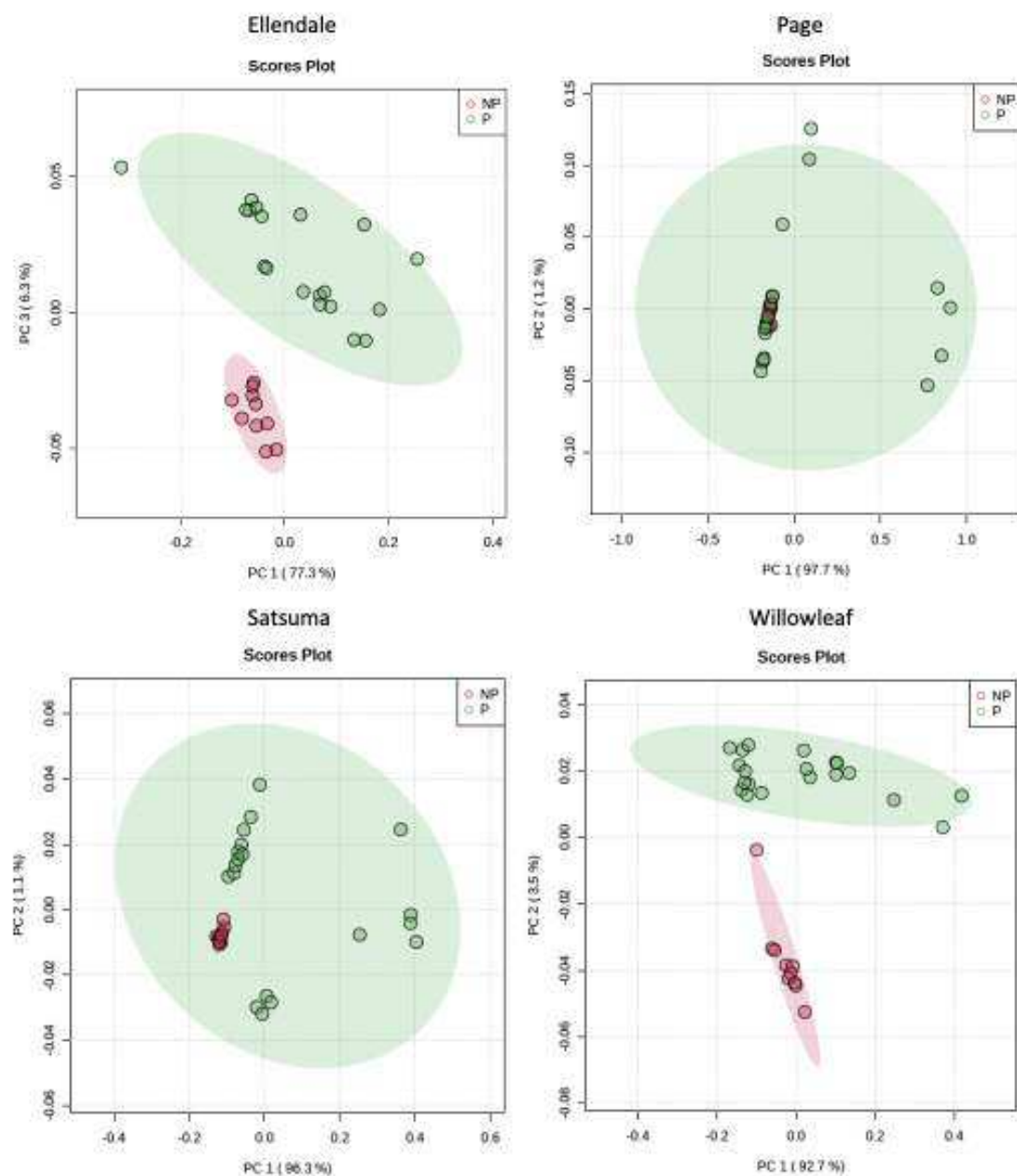


Figura 5.11 PCA de las 4 variedades parentales obtenidos a partir de los perfiles de ^1H RMN de los extractos orgánicos de hoja en etapa productiva (verde) y no productiva (rojo).

Las variedades que presentan diferencias entre la etapa P y NP son Ellendale, y Willowleaf. Page y Satsuma presentan una gran variabilidad en las muestras en etapa productiva, y a pesar de que las hojas en etapa no productiva se agrupan con muy poca dispersión, es imposible diferenciar ambos grupos. De todas formas, se realizó un PLS-DA

para cada variedad, los resultados se muestran en la **figura 5.12**. Mediante este análisis se logra una mejor clasificación en las cuatro variedades (es interesante notar que se explica mas del 90% de la varianza en todas ellas) ya que este tipo de análisis utiliza la información de clase de cada muestra, maximizando la varianza explicada.

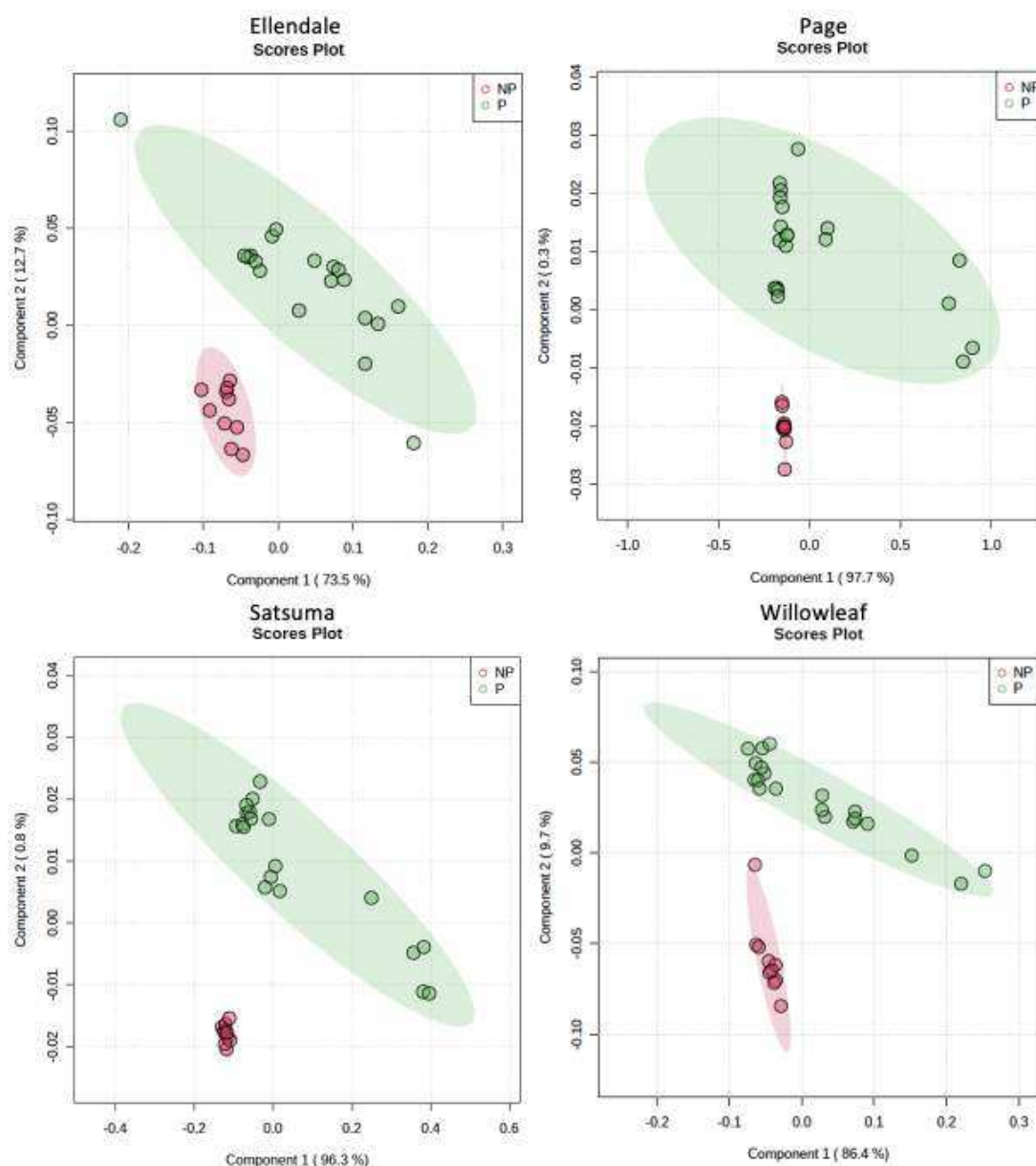


Figura 5.12 PLS-DA de las cuatro variedades parentales obtenidos a partir de los perfiles de ^1H RMN de los extractos orgánicos de hoja en etapa productiva (verde) y no productiva (rojo).

Los VIP scores de estos PLS-DA fueron realizados para las cuatro variedades, obteniendo resultados similares para todas ellas. En los cuatro casos, el grupo productivo presentaba

mayor cantidad de señales entre 0,8 - 1,5 ppm, las cuales corresponden con grupos CH_3 y CH_2 . Por otra parte, aparecen algunas señales importantes entre 2,3 - 2,5 ppm que se atribuyen los protones en C- α al carbonilo de ésteres de ácidos grasos, y en 3,9 - 4,0 ppm que se corresponden con los grupos CH_2 de alcoholes, que forman parte de ceras epicuticulares. Todas estas señales también son típicas en la etapa productiva. En la **figura 5.13** se muestra, a modo de ejemplo, el resultado de los VIP scores de Ellendale.

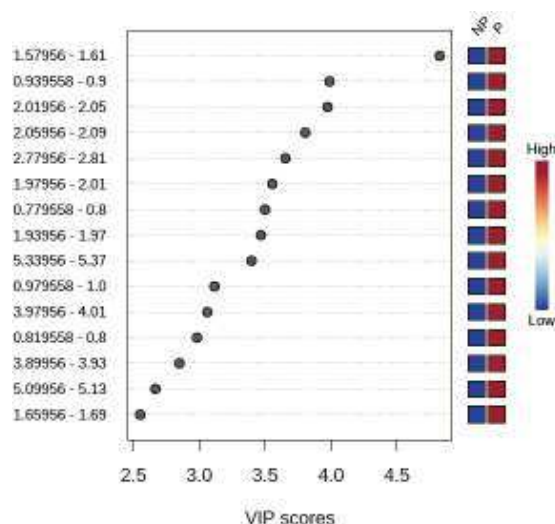


Figura 5.13 Puntajes VIP del PLS-DA realizado con Ellendale.

Las ceras cumplen una función protectora contra factores bióticos y abióticos en todas las superficies aéreas de las plantas. Esta capa de ceras epicuticulares es necesaria también para una transpiración controlada y para el intercambio gaseoso a través de los estomas. Durante el desarrollo de las hojas, el rendimiento y composición química de las ceras epicuticulares va cambiando, es por ello que observamos una mayor proporción de señales correspondientes a este tipo de metabolitos en diferentes estados productivos de la planta.

Estos metabolitos podrían utilizarse como marcadores del estado fenológico de la planta, para distinguir entre las etapas vegetativa (no productiva) y reproductiva (productiva) de los árboles de mandarinas. Sin embargo, la similitud entre los perfiles de las diferentes variedades dificulta la diferenciación entre las mismas. Por otro lado, los perfiles acuosos también ofrecen otras señales interesantes que sí pueden ser utilizadas como marcadores en hojas para determinar el estado P y NP de la planta y a la vez diferenciar las variedades estudiadas.

5.1.4 Conclusiones del estudio no dirigido

El análisis metabolómico no dirigido mediante RMN de ^1H de extractos de hojas de distintas variedades de mandarina permitió identificar patrones metabólicos conservados que reflejan tanto la identidad de las variedades como el estado fenológico de los árboles (productivo o no productivo). La aplicación combinada de técnicas de análisis multivariado no supervisado y supervisado mostró que los extractos acuosos tienen mayor capacidad discriminante respecto a los extractos orgánicos.

A nivel varietal, se logró una clara separación entre Ellendale, Willowleaf, Page y Satsuma utilizando extractos acuosos de hojas. En estos, se destacaron regiones espectrales asociadas a carbohidratos solubles (3,2 – 4,2 ppm) y ácidos orgánicos del ciclo de Krebs (2,1 – 2,7 ppm), lo que refleja diferencias metabólicas genotípicas posiblemente asociadas a variaciones en el metabolismo energético y secundario foliar. La región de azúcares, en particular, permitió detectar señales características de glucosa, sacarosa, fructosa y mio-inositol, metabolitos clave en procesos fisiológicos como la osmoregulación, la fotosíntesis y la señalización celular.

En relación con el estado fenológico, se observó un patrón metabolómico común entre variedades: las hojas de árboles en estado no productivo presentaron una mayor acumulación de azúcares solubles y aminoácidos como prolina, treonina y GABA, lo que sugiere una actividad orientada al crecimiento vegetativo y acumulación de reservas. En contraste, durante la etapa productiva se detectó un enriquecimiento relativo en ácidos orgánicos como el cítrico, málico, tartárico y succínico, componentes centrales del metabolismo energético en tejidos en alta demanda fisiológica. Este hallazgo es consistente con la intensificación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos durante etapas reproductivas y con el rol del ácido cítrico en la movilización de calcio y la regulación del pH en tejidos activos (Etienne, Génard, Lobit, Mbéguié-A-Mbéguié, & Bugaud, 2013; Wu et al., 2024; Zhang, Breksa, Mishchuk, & Slupsky, 2011).

La acumulación de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides en hojas no productivas, sugiere una activación de vías de defensa vegetal durante fases vegetativas,

posiblemente como preparación ante estrés biótico o abiótico (Khan et al., 2025; Zhang et al., 2014). También se identificaron señales compatibles con glicósidos flavonoides como hesperidina y narirutina, típicos de citrus, y de potencial utilidad como biomarcadores.

Los extractos orgánicos, si bien mostraron una menor capacidad discriminante entre variedades, permitieron identificar una acumulación de compuestos alifáticos como las ceras epicuticulares (0,8 – 1,5 ppm, 3,9 – 4,0 ppm) en hojas en estado productivo, por lo que su estudio en profundidad podría ser indicativo del estado vegetativo/productivo de la planta. Teniendo en cuenta las funciones protectoras de las ceras frente a la transpiración y el estrés ambiental, esta diferencia es esperable durante la maduración foliar (Jia et al., 2024).

Los resultados obtenidos permiten orientar futuras investigaciones hacia el desarrollo de análisis dirigidos (*targeted*) mediante técnicas de alta sensibilidad y especificidad como LC-MS/MS, aplicadas a extractos acuosos de hoja de mandarinas para estudiar específicamente el contenido de flavonoides. La validación de estos compuestos como posibles marcadores del estado reproductivo de la planta, especialmente en variedades con marcada alternancia productiva, podría constituir una herramienta valiosa tanto para el manejo agronómico como para la selección temprana de variedades con comportamiento reproductivo deseable.

5.2 Análisis dirigido de compuestos fenólicos y limonoides

5.2.1 Introducción

En el contexto del estudio metabolómico dirigido, los polifenoles y limonoides se seleccionaron como compuestos para identificar y cuantificar en las diferentes etapas fisiológicas del vegetal, pues cumplen funciones biológicas y ecológicas fundamentales en las plantas (Zagoskina, Kazantseva, Fesenko, & Shirokova, 2018). Por ejemplo, cuando la relación carbono/nutrientes es alta, la fotosíntesis se desvía hacia la producción de compuestos fenólicos (Coley, Bryant, & Chapin, 1985; Waterman & Mole, 1994), por lo que niveles elevados de estos suelen estar asociados a la acumulación excesiva de

carbohidratos en las hojas. Así, la biosíntesis de compuestos derivados del fenilpropano actúa como un mecanismo de “desborde energético”, desviando los fotosintatos y el poder reductor celular hacia la formación de productos estables (Grace & Logan, 2000), lo cual reduce los daños oxidativos adicionales durante la fotoinhibición inducida por el exceso de carbohidratos acumulados (Rivas, Fornes, & Agustí, 2008).

Los polifenoles constituyen un grupo extremadamente diverso de productos secundarios con múltiples funciones biológicas. Protegen a las plantas frente a diferentes estresores bióticos y abióticos, actúan como filtros UV, moléculas señalizadoras, compuestos alelopáticos, fitoalexinas, agentes detoxificantes y defensivos antimicrobianos (Panche, Diwan, & Chandra, 2016). Se clasifican en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides. Estos últimos incluyen moléculas estructuralmente simples como los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidrocínámicos) y los estilbenos, así como estructuras complejas como oligómeros de estilbeno, taninos y lignanos (Cheynier, 2005). Los flavonoides, por su parte, constituyen el grupo más estudiado, con una estructura general C6-C3-C6. Los más abundantes presentan un núcleo flavánico, compuesto por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un anillo de pirano (C). Las diferencias en la posición de unión entre los anillos B y C permiten distinguir entre flavonoides (2-fenilbenzopiranos), isoflavonoides (3-fenilbenzopiranos) y neoflavonoides (4-fenilbenzopiranos). Los flavonoides son por lejos el grupo más abundante, y pueden subdividirse en 3-hidroxiflavonoides (flavonoles, flavanoles, antocianidinas, dihidroflavonoles) y flavonoides sin sustituyentes en C3 (flavanonas y flavonas) (**Figura 5.14**). Se consideran algunos de los compuestos aromáticos más importantes, ya que son los polifenoles más antiguos y extendidos, sintetizados incluso por musgos y helechos, y poseen una amplia gama de actividades fisiológicas (McClure, 1975).

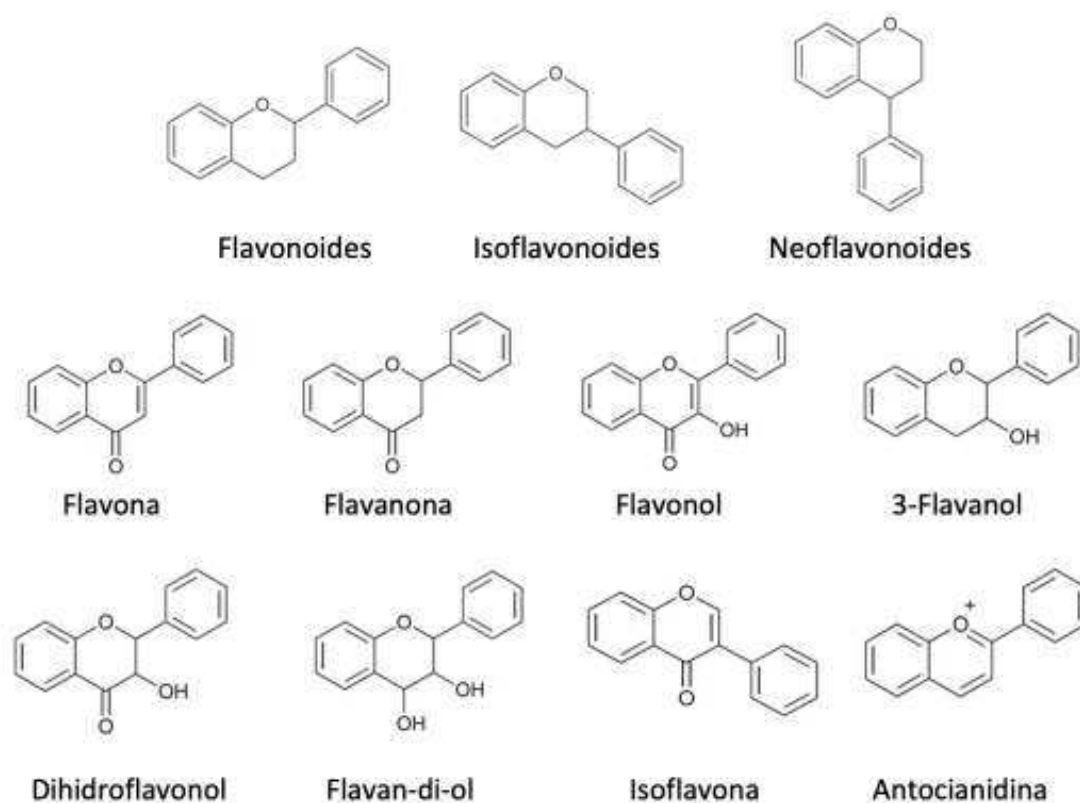


Figura 5.14 Estructura de los diferentes tipos de flavonoides.

Los limonoides cítricos (CLs) conforman una amplia familia de metabolitos secundarios policíclicos presentes principalmente en semillas, frutos y tejidos de la cáscara de cítricos como limones, limas, naranjas, pomelos, toronjas, bergamotas y mandarinas (Gualdani, Cavalluzzi, Lentini, & Habtemariam, 2016). Son triterpenos altamente oxigenados y modificados, clasificados como tetranotriterpenoides, presentes tanto como agliconas libres como en sus formas glucosiladas (β -D-glucósidos). Hasta la fecha, se han identificado aproximadamente 55 agliconas de limonoides y 18 limonoides glucosilados en cítricos. La limonina es la aglicona más abundante en la mayoría de las especies, seguida por la nomilina; el glucósido de limonina es el limonoide glucosilado más representativo (Shi et al., 2020). Los CLs presentan diversas actividades biológicas (Roy & Saraf, 2006), y se destacan por su potente actividad antiinsectos, tanto por su toxicidad como por su efecto antialimentario (Gualdani et al., 2016; Hafeez, Akram, & Shaalan, 2011; Hasegawa, Berhow, & Manners, 2000; Khan, Zill-E-Huma, & Dangles, 2014; Warikoo et al., 2012; Yu et al., 2015). Se ha sugerido que protegen los brotes jóvenes de los insectos durante su desarrollo, lo que explicaría su abundancia en hojas jóvenes y frutos (Celano et al., 2019). Los primeros estudios sobre limonoides se centraron en

identificar los compuestos responsables del sabor amargo en frutas cítricas (Roberts, Souza, Gerszten, & Clish, 2012; Russo et al., 2016; Wang et al., 2016), aunque existen pocos reportes sobre su presencia en hojas de árboles cítricos.

Con el fin de identificar posibles fitomarcadores representativos de la transición entre fases “on” (con frutos) y “off” (sin frutos), se estudió el perfil de polifenoles y limonoides en hojas de ramas productivas y no productivas mediante un análisis metabolómico dirigido.

5.2.2. Metodología

5.2.2.1 Material vegetal

Se emplearon las mismas variedades descritas en la sección 5.1.2.1. Para cada variedad, se seleccionaron cinco árboles con alternancia productiva (con fruto) y cinco árboles con alternancia no productiva (árbol adulto pero que no produce frutos en esa cosecha) para estudiar el fenómeno de alternancia. El muestreo foliar se realizó en ramas con alternancia productiva (B, por su sigla en inglés de Bearing, rama con fruta) y no productiva (NB, por su sigla en inglés de Non-Bearing, rama sin fruto), recolectando hojas adultas de entre 6 y 12 meses de edad. De cada árbol se seleccionaron 10 ramas (5 por cada condición), y de cada una se recolectaron 5 hojas, totalizando 50 hojas por condición y variedad. En ramas con fruto, las hojas se tomaron inmediatamente por debajo del fruto (entre 5 y 20 cm del pedúnculo) en el estadio de coloración completa del fruto. En las ramas sin fruto, se eligieron hojas con igual posición y características que las recolectadas en las ramas portadoras, con el fin de asegurar la comparabilidad.

Todos los árboles se encontraban en el mismo huerto y bajo idénticas condiciones edafoclimáticas y de manejo. Por tanto, las diferencias en la composición química observadas entre variedades no pudieron atribuirse a factores ambientales, sino que reflejan diferencias genéticas y/o fisiológicas propias de cada genotipo y condición de fructificación.

Las hojas seleccionadas fueron recolectadas aleatoriamente de la parte externa de la copa de cada árbol, con exposición directa al sol, y almacenadas inmediatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento para la extracción de los metabolitos.

5.2.2.2 Extracción

La extracción de compuestos fenólicos y limonoides presentes en hojas de mandarina se llevó a cabo utilizando una metodología basada en extracción asistida por ultrasonido (UAE), con modificaciones a partir del protocolo descrito por Safdar (Safdar et al., 2017). Para cada variedad analizada se colectaron aproximadamente 50 gramos de hojas previamente liofilizadas, que fueron molidas utilizando un molino de cuchillas hasta obtener un polvo homogéneo. Posteriormente, 1 g del material pulverizado fue sometido a extracción con una solución de metanol al 80% (v/v) (LiChrosolv®, Merck, Alemania), empleando una relación muestra:solvente de 1:10. Las muestras fueron extraídas durante 15 min en un baño de ultrasonido (Transsonic 460; Elma, Wetzikon, Suiza), operando a una frecuencia de 35 kHz. El procedimiento se repitió dos veces más usando solvente fresco para maximizar la extracción de los metabolitos. Los extractos obtenidos en las tres etapas fueron combinados y posteriormente sometidos a filtración por papel Whatman, seguida de evaporación del solvente bajo vacío y liofilización. Finalmente, los residuos secos fueron redissueltos en metanol (LiChrosolv®, Merck, Alemania) al 80% y filtrados mediante membranas de PVDF de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ con el objetivo de eliminar partículas en suspensión antes del análisis instrumental. Se realizaron 5 réplicas de cada extracción.

5.2.2.3 Análisis instrumental

La identificación y cuantificación de polifenoles y limonoides se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), utilizando un sistema Agilent 1200 LC (Agilent Technologies, Estados Unidos) acoplado a un espectrómetro de masas 4000 QTRAP® (AB SCIEX, Estados Unidos).

La separación cromatográfica se realizó empleando una columna Gold Aq-Hypersil ($5\text{ }\mu\text{m}$, $150 \times 4.6\text{ mm}$; Thermo Scientific, Estados Unidos), con un volumen de inyección de $5\text{ }\mu\text{L}$. Como fase móvil se utilizaron agua ultrapura con 0,1% de ácido fórmico (fase A)

y acetonitrilo (fase B), aplicándose el siguiente gradiente: condiciones iniciales con un 5% de fase B y 95% de fase A, aumento de fase B hasta alcanzar un 50% a los 23 minutos, aumento hasta llegar a 100% de fase B a los 26 minutos, se mantuvo esta composición durante 5 minutos y posteriormente se volvió a condiciones iniciales en 2 minutos. Las condiciones iniciales se mantuvieron durante 5 minutos más (tiempo total de corrida de 38 minutos). El flujo se mantuvo constante a 600 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La detección se efectuó en modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), utilizando una fuente de ionización por electrospray (ESI) operando en modos de ionización positiva y negativa según las características de los compuestos analizados. La fuente fue operada con un voltaje de ionización de 5000 V, y se empleó nitrógeno como gas nebulizador y de cortina, en ambos casos a 50 psi. La evaporación del solvente fue asistida por gas secante calentado (nitrógeno a 500 °C y 50 psi).

Para el desarrollo del método MRM se determinaron las transiciones específicas, energías de colisión (CE) y potenciales de declustering (DP) óptimos para cada analito mediante infusión directa de soluciones estándar (20 $\mu\text{g}/\text{L}$) a flujo constante utilizando una jeringa.

5.2.2.4 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos fue realizado empleando el software MetaboAnalyst 5.0 (Pang et al., 2021) en conjunto con el entorno estadístico R-Studio (versión 1.1.463). Cada compuesto identificado fue considerado como una variable independiente y se incluyó en todos los análisis posteriores.

Previamente al análisis, los datos fueron normalizados mediante escalamiento Pareto, a fin de reducir el efecto de la variabilidad extrema sin eliminar completamente la estructura original de los datos. Para evaluar diferencias significativas entre grupos, se aplicaron pruebas estadísticas univariadas como ANOVA, Wilcoxon/Mann-Whitney y comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni.

Con el objetivo de explorar patrones de agrupamiento y clasificación entre variedades, se realizaron PCA y PLS-DA. Este último fue validado para evitar sobreajuste, utilizando

validación cruzada y un test de permutaciones. Además, se generó un mapa de calor (heatmap) basado en los resultados del test-t de Student, con el fin de visualizar las diferencias en la abundancia relativa de los metabolitos más relevantes entre los distintos grupos.

5.2.3 Resultados y discusión

5.2.3.1 Optimización de los parámetros MS/MS de los analitos

Se optimizaron las condiciones de fraccionamiento de los analitos para crear un método de adquisición de MRM basado en ESI, utilizando el modo positivo para la detección de limonoides y polimetoxiflavonas, y el modo negativo para flavanonas, flavonas y flavonoles. Los resultados de optimización se muestran en la **tabla 5.1**.

Tabla 5.1 Resultados de la optimización de los parámetros de adquisición para cada compuesto evaluado.

Analito	[M-H] ⁻	[M-H] ⁻ → m/z	DW	DP	EP	CE	CXP	Tr (min)
Ác. protocatéquico	153	108,8	150	-40	-10	-22	-15	9,4
		90,7	150	-40	-10	-42	-1	
Ác. clorogénico	353,7	190,8	150	-50	-10	-24	-31	11,1
		84,7	150	-50	-10	-68	-9	
Ác. cafeico	179	133,3	150	-45	-10	-40,7	-21,1	12,7
		88,7	150	-45	-10	-48	-14,1	
Eriocitrina	595,2	286,6	150	-80	-10	-38	-9	14,5
		134,6	150	-80	-10	-90	-19	
Narirutina	579,2	150,5	150	-95	-10	-75	-20,3	15,9
		270,8	150	-95	-10	-39,9	-8,4	
Naringina	579,2	270,8	150	-105	-10	-54	-7	16,3
		150,7	150	-122,03	-10	-75,03	-21	
Quercitrina	447,1	300,5	150	-90	-10	-36	-11	16,3
		270,8	150	-90	-10	-66	-41	

Hesperidina	609,2	300,8	150	-85	-10	-46	-49	16,5
		285,8	150	-85	-10	-70	-41	
		163,5	150	-85	-10	-88	-25	
Neohesperidina	609,2	300,7	150	-115	-10	-56	-9,32	16,9
		285,7	150	-115	-10	-72,89	-42,3	
		150,5	150	-115	-10	-100	-21	
Didymina	593,2	284,8	150	-100	-10	-48	-45	19,8
		164	150	-100	-10	-92	-27	
Poncirina	593,3	284,8	150	-120	-10	-54	-9	20,0
		163,4	150	-120	-10	-92	-23	
Luteolina	285	150,6	150	-85	-10	-41,6	-20,9	20,5
		132,9	150	-85	-10	-54	-17	
Quercetina	301	150,8	150	-75	-10	-36	-21	20,7
		178,7	150	-75	-10	-28	-27	
		120,8	150	-75	-10	-44	-16,3	
Kaempferol	284,9	92,9	150	-80	-10	-51,4	-14,1	23,1
		116,88	150	-80	-10	-67	-18,8	
Naringenina	271	150,7	150	-60	-10	-28,87	-23,14	23,2
		118,7	150	-60	-10	-40,9	-16,7	
		106,6	150	-60	-10	-37,8	-16,9	

Analito	[M-H] ⁺	[M-H] ⁺ →m/z	DW	DP	EP	CE	CXP	Tr (min)
Bergapteno	217,2	202	150	64,1	10	30,9	10,9	25,8
		174,3	150	64,1	10	41,4	6,1	
		90,1	150	64,1	10	57,9	3,1	
Limonina	471,2	425,3	150	71	10	28,6	22	26,7
		161,1	150	71	10	37,7	12,7	
Nobiletina	403,1	373,1	150	61	10	41	14	26,7
		388,1	150	61	10	31	16	
Nomilina	515,2	469,3	150	44,9	10	20,18	11,4	27,9
		161,1	150	44,9	10	35,1	11,2	

Tangeretina	372,97	343	150	71	10	39	26	28,4
		297,1	150	71	10	47	10	
		211,1	150	71	10	60,87	7,3	

M: peso molecular, m/z: relación masa/carga monitoreada, DW: tiempo de permanencia en milisegundos (dwell time), DP: potencial de desaglomeración (declustering potential), EP: potencial de entrada (entrance potential), CE: energía de colisión (collision energy), CXP: potencial de salida de la celda de colisión (collision cell exit potential), Tr: tiempo de retención.

5.2.3.2 Identificación y cuantificación de analitos en hojas

Se identificaron y cuantificaron un total de 11 polifenoles entre los cuatro genotipos, junto con dos limonoides. Los analitos identificados fueron las flavanonas didymina, eriocitrina, naringenina, hesperidina y narirutina; dos polimetoxiflavonas, tangeretina y nobiletina; un flavonol, quercitrina; la flavona luteolina; los ácidos hidroxicinámicos ácido clorogénico y ácido cafeico; y los limonoides limonina y nomilina (**Figura 5.15**).

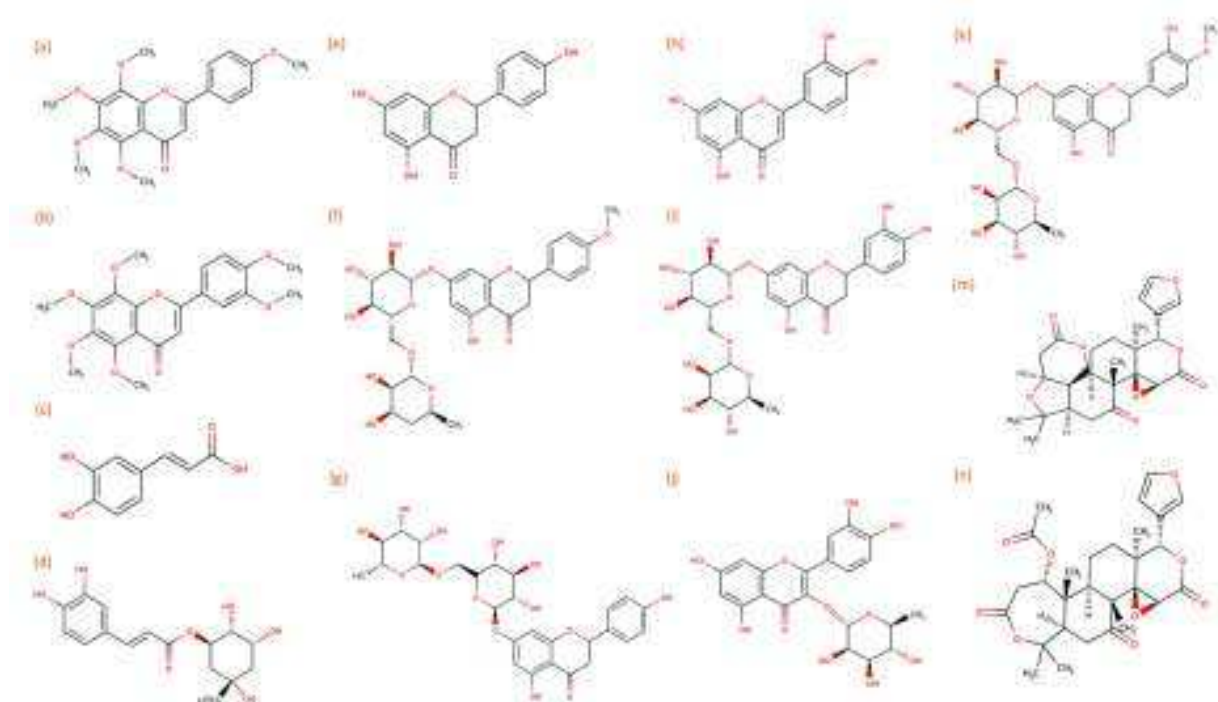


Figura 5.15 Estructura y clasificación de los polifenoles cuantificados en variedades comerciales de hojas de mandarina. Polimetoxiflavonas: tangeretina (a), nobiletina (b); Ácidos hidroxicinámicos: ácido cafeico (c) y ácido clorogénico (d); Flavanonas: naringenina (e), didymina (f), narirutina (g), eriocitrina (i), hesperidina (k); Flavona: luteolina (h); Flavonol: quercitrina (j); Limonoides: limonina (m), nomilina (n).

5.2.3.3 Caracterización quimiotaxonómica de ramas con frutos

Las hojas de las ramas con frutos de las cuatro variedades estudiadas contenían altas concentraciones de hesperidina (2824,43 µg/g), seguidas por nobiletina (583,71 µg/g), tangeretina (326,60 µg/g), narirutina (63,22 µg/g) y eriocitrina (37,23 µg/g). Por su parte, el limonoide más abundante fue la limonina (0,69 µg/g). Los resultados mostrados anteriormente corresponden al promedio de concentración obtenida en las cuatro variedades. La concentración de analitos encontrados en cada variedad se presenta en la **tabla 5.2**.

Tabla 5.2 Analitos identificados en hojas con frutos de Ellendale (B-END), Willowleaf (B-WL), Page (B-PG) y Satsuma (B-SAT), y su concentración expresada en µg/g de hoja seca.

Analito	B-SAT	B-END	B-WL	B-PG
Ác. clorogénico	3,88 ^b ± 0,40	3,53 ^b ± 0,37	6,70 ^a ± 0,78	5,04 ^b ± 1,39
Ác. cafeico	3,87 ^b ± 0,21	4,34 ^{ab} ± 0,23	5,38 ^a ± 1,05	5,18 ^a ± 0,51
Didymina	10,57 ^b ± 1,11	20,19 ^a ± 3,27	3,30 ^c ± 0,43	21,17 ^a ± 3,76
Hesperidina	3008,58 ^a ± 151,89	2512,39 ^b ± 182,61	2624,31 ^b ± 114,09	3152,43 ^a ± 298,13
Eriocitrina	47,93 ^a ± 6,42	13,90 ^c ± 1,19	29,85 ^b ± 2,44	57,24 ^a ± 8,02
Luteolina	1,45 ^a ± 0,05	1,21 ^a ± 0,08	1,81 ^a ± 0,28	2,31 ^a ± 1,26
Naringenina	0,38 ^b ± 0,02	0,57 ^a ± 0,01	0,34 ^b ± 0,01	0,63 ^a ± 0,15
Narirutina	87,03 ^a ± 12,68	50,08 ^b ± 7,58	17,58 ^c ± 7,58	98,20 ^a ± 14,35
Quercitrina	2,29 ^b ± 0,07	2,43 ^b ± 0,13	2,98 ^{ab} ± 0,55	3,69 ^a ± 0,61
Nobiletina	258,17 ^c ± 16,48	1121,36 ^a ± 34,94	747,15 ^b ± 55,16	208,17 ^c ± 13,63
Tangeretina	64,96 ^c ± 6,15	731,28 ^a ± 30,15	475,84 ^b ± 56,24	34,34 ^c ± 5,01
Limonina	0,45 ^c ± 0,04	0,88 ^a ± 0,08	0,72 ^b ± 0,12	0,76 ^{ab} ± 0,08

Nomilina	0,42 ^b ± 0,03	0,62 ^a ± 0,08	0,57 ^{ab} ± 0,13	0,52 ^{ab} ± 0,04

En cada fila, la media (5 réplicas) ± desviación estándar seguida por la misma letra no difiere significativamente según la prueba t de significancia con corrección de Bonferroni, $p \leq 0.05$.

Se realizó un PCA para evaluar el agrupamiento de las muestras y detectar similitudes y diferencias entre las cuatro variedades. La **figura 5.16a** muestra el gráfico bidimensional del PCA, donde los componentes principales PC1 y PC2 explican el 97,7% de la varianza total de los datos. Se observa una buena clasificación de todas las variedades, siendo Page y Satsuma los que presentan mayores similitudes entre sí. Luego de realizar un PLS-DA, los tres compuestos con mayor puntuación en los VIP scores fueron nobiletina para la diferenciación entre END y PG, tangeretina también para END y PG, y didymina para la diferenciación entre PG y WL (**Figura 5.16b**).

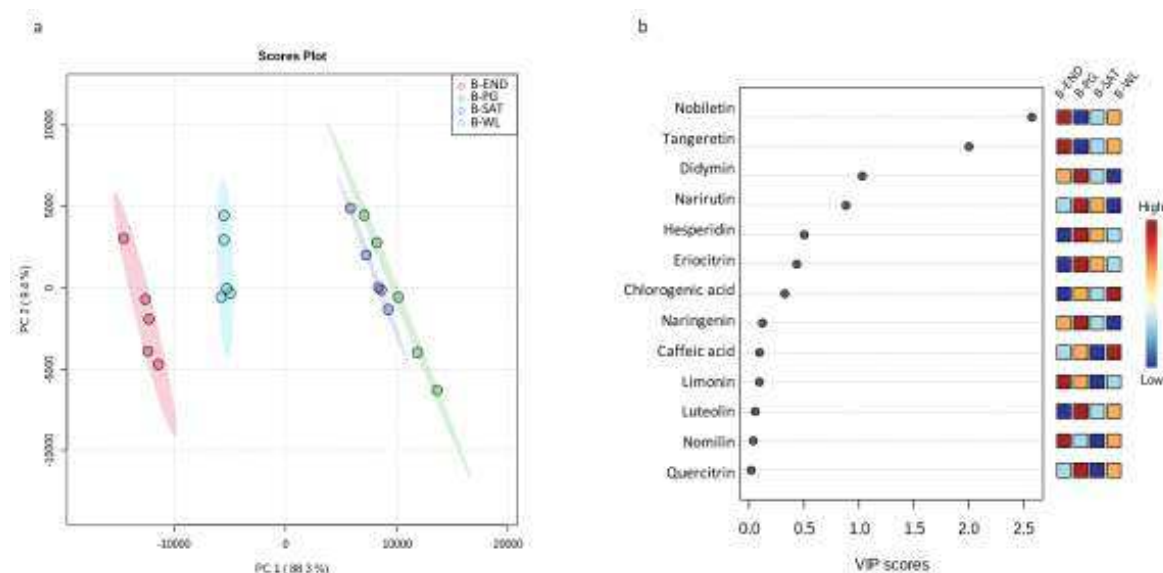


Figura 5.16 (a) Gráfico de PCA de las cuatro variedades de hojas de mandarina en etapa con frutos: Ellendale (B-END), Willowleaf (B-WL), Page (B-PG) y Satsuma (B-SAT); (b) VIP scores del PLS-DA realizado sobre las cuatro variedades de hojas de mandarina con frutos.

5.2.3.4 Caracterización quimiotaenómica de ramas sin frutos

Los mismos polifenoles y limonoides encontrados en las ramas con frutos fueron identificados en las hojas de ramas sin frutos, aunque con concentraciones diferentes (5. 3). La narirutina fue el flavonoide principal con la concentración más alta en las

variedades sin frutos Page y Willowleaf (42198,36 $\mu\text{g/g}$ y 10049,66 $\mu\text{g/g}$, respectivamente). La hesperidina fue el flavonoide más abundante en las variedades sin frutos Satsuma y Ellendale (2591,54 $\mu\text{g/g}$ y 2433,21 $\mu\text{g/g}$, respectivamente), tal como también se observó en las ramas con frutos.

Tabla 5.3 Analitos identificados en hojas de árboles no productivos de Ellendale (NB-END), Willowleaf (NB-WL), Page (NB-PG) y Satsuma (NB-SAT) y su respectiva concentración expresada en $\mu\text{g/g}$ de hoja seca.

Analito	NB-SAT	NB-END	NB-WL	NB-PG
Ác. clorogénico	126,02 ^a $\pm$ 6,40	11,31 ^b $\pm$ 0,62	6,75 ^b $\pm$ 1,41	6,35 ^b $\pm$ 1,50
Ác. Cafeico	2,32 ^a $\pm$ 0,12	2,00 ^b $\pm$ 0,09	0,12 ^c $\pm$ 0,04	0,04 ^c $\pm$ 0,02
Didymina	6,44 ^{bc} $\pm$ 0,47	17,40 ^a $\pm$ 2,97	5,03 ^c $\pm$ 2,56	14,07 ^{ab} $\pm$ 8,77
Hesperidina	2591,54 ^b $\pm$ 55,63	2433,21 ^b $\pm$ 179,79	4224,72 ^a $\pm$ 450,98	4270,21 ^a $\pm$ 400,09
Eriocitrina	132,39 ^a $\pm$ 15,01	17,09 ^d $\pm$ 1,82	39,62 ^c $\pm$ 5,34	69,98 ^b $\pm$ 17,91
Luteolina	3,16 ^c $\pm$ 0,60	2,13 ^c $\pm$ 0,15	2659,07 ^a $\pm$ 267,40	2023,38 ^b $\pm$ 121,10
Naringenina	0,32 ^b $\pm$ 0,02	0,68 ^b $\pm$ 0,12	509,61 ^a $\pm$ 100,14	574,03 ^a $\pm$ 101,15
Narirutina	97,45 ^c $\pm$ 8,08	62,85 ^c $\pm$ 5,04	10049,66 ^b $\pm$ 1005,64	42198,36 ^a $\pm$ 3700,22
Quercitrina	2,80 ^b $\pm$ 0,21	2,44 ^b $\pm$ 0,16	350,39 ^a $\pm$ 122,31	362,45 ^a $\pm$ 50,83
Nobiletina	290,48 ^c $\pm$ 24,07	1257,23 ^a $\pm$ 87,18	1028,88 ^b $\pm$ 151,80	228,71 ^c $\pm$ 12,86
Tangeretina	99,89 ^c $\pm$ 10,05	517,97 ^a $\pm$ 78,41	347,23 ^b $\pm$ 82,59	33,27 ^c $\pm$ 5,98
Limonina	3,40 ^a $\pm$ 0,44	0,77 ^c $\pm$ 0,05	1,30 ^b $\pm$ 0,09	1,28 ^b $\pm$ 0,03
Nomilina	0,6 ^{ab} $\pm$ 0,01	0,54 ^b $\pm$ 0,05	0,19 ^a $\pm$ 0,14	0,66 ^{ab} $\pm$ 0,03

En cada fila, la media (5 réplicas) $\pm$ desviación estándar seguida por la misma letra no difiere significativamente según la prueba t de significancia con corrección de Bonferroni, $p \leq 0.05$.

Las ramas sin frutos de la variedad Page se caracterizaron por presentar los niveles más altos de luteolina, narirutina y quercitrina, situación que también se observó en Willowleaf. En Satsuma, la eriocitrina y el ácido clorogénico fueron característicos,

mientras que en Ellendale, las polimetoxiflavonas tangeretina y nobiletina fueron los metabolitos que caracterizaron las hojas de las ramas sin frutos.

En el gráfico de PCA se puede observar que los cuatro genotipos se encuentran bien diferenciados entre sí. Los componentes principales PC1 y PC2 explicaron el 97,3% de la varianza observada (**Figura 5.17a**). Willowleaf y Page mostraron una mayor dispersión en comparación con las otras dos variedades, debido a la variabilidad en los niveles de algunos flavonoides.

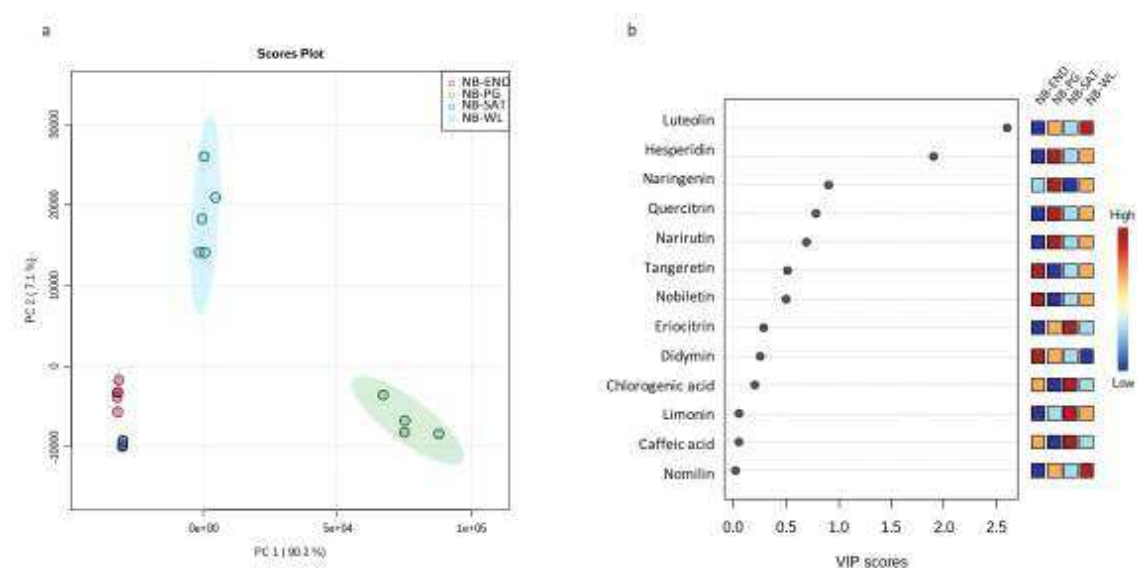


Figura 5.17 (a) Gráfico de PCA de las cuatro variedades de hojas de mandarina en etapa sin frutos: Ellendale (B-END), Willowleaf (B-WL), Page (B-PG) y Satsuma (B-SAT); (b) VIP scores del análisis PLS-DA realizado sobre las cuatro variedades de hojas de mandarina sin frutos.

La concentración de ambas polimetoxiflavonas fue diferente, siendo de mayor a menor en el siguiente orden: NB-END, NB-WL, NB-SAT y NB-PG. La flavanona hesperidina presentó su mayor diferencia entre Willowleaf y Page; este mismo comportamiento se observó para la flavanona naringenina, así como para flavonoles y flavonas. Didimina mostró valores elevados de concentración en NB-END y NB-PG, pero no en NB-WL ni en NB-SAT. Los ácidos hidroxicinámicos estuvieron presentes en su mayor concentración en la variedad NB-SAT (**Figura 5.17a, Tablas 5.2 y 5.3**).

Según los VIP scores, los compuestos más importantes incluyen luteolina, hesperidina y naringenina (**Figura 5.17b**). Willowleaf presentó la mayor concentración de luteolina, mientras que Page mostró las mayores concentraciones de hesperidina y naringenina.

5.2.3.5 Comparación del perfil de metabolitos entre hojas de ramas con y sin frutos

La caracterización quimiotaxonómica de los cuatro genotipos en ambas fases productivas (“on” y “off”) permitió identificar compuestos característicos que podrían diferenciar entre estas etapas. Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de ambos grupos, se realizó una prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney para cada compuesto entre hojas de ramas con y sin frutos, en cada genotipo.

La **figura 5.18** muestra que la nobiletina no resulta útil para diferenciar entre las fases con y sin frutos en ningún genotipo. Por el contrario, la hesperidina, luteolina, naringenina, narirutina y quercitrina son compuestos que podrían diferenciar entre etapas, aunque su utilidad depende del genotipo considerado. Por ejemplo, la narirutina es útil para diferenciar todas las variedades excepto Satsuma.

A partir de esta prueba, no fue posible seleccionar un conjunto universal de compuestos que clasificaran ambas etapas en todas las variedades, debido a su alta variabilidad. En su lugar, un estudio por pares entre las situaciones fisiológicas “on” y “off” de cada cultivar mostró diferencias significativas entre ellas. Estos resultados podrían atribuirse a los diferentes orígenes genéticos de cada genotipo. De forma interesante, la eriocitrina mostró diferencias significativas entre ambas fases fisiológicas en tres de los genotipos, con la excepción de Satsuma.



Figure 5.18 Representación visual de los resultados del test de Wilcoxon para la determinación de diferencias significativas entre etapas con y sin fruto para cada compuesto y variedad. Referencia: no difiere significativamente según el test de Wilcoxon, $p \leq 0,05$; y difiere significativamente según el test de Wilcoxon, $p \leq 0,05$.

Con el fin de identificar los compuestos responsables de la diferenciación entre etapas en todas las variedades, se aplicaron otros enfoques estadísticos. Así, se elaboró un mapa de calor (Heatmap) basado en una prueba t de Student, el cual se muestra en la **figura 5.19a**. Narirutina, hesperidina, luteolina, naringenina y quercitrina podrían utilizarse para diferenciar ambas etapas en las variedades Page y Willowleaf, ya que las muestras sin frutos presentaron las concentraciones más altas de estos compuestos. De manera interesante, el ácido cafeico aparece como un marcador común para las ramas con frutos de las otras variedades. En la **figura 5.19b** se presentan los valores de los VIP scores del PLS-DA realizado. Este análisis permitió identificar los compuestos responsables de la clasificación entre las fases “on” y “off”. Narirutina, junto con luteolina, fueron las variables con los VIP scores altos, por lo que podrían señalarse como marcadores candidatos de la alternancia productiva.

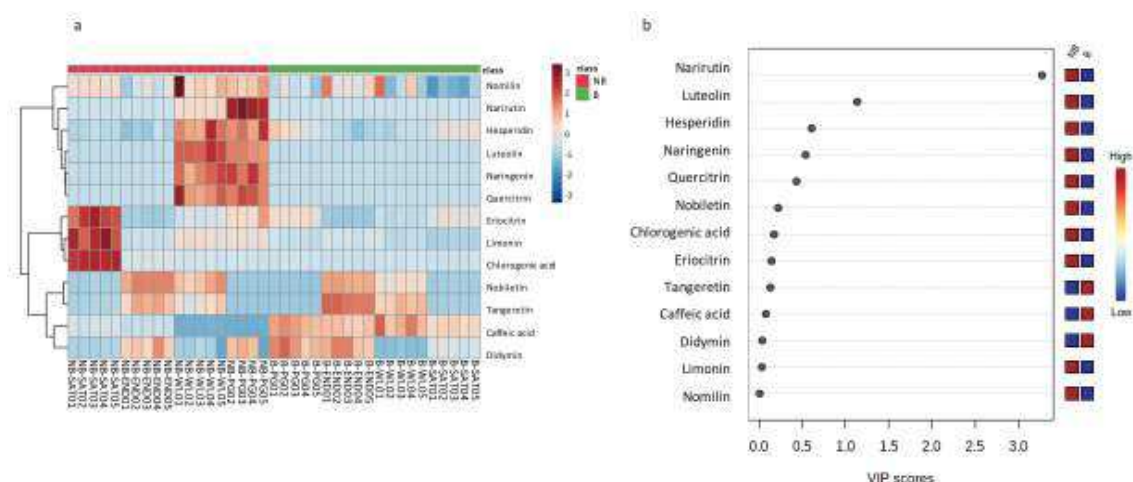


Figura 5.19 (a) Mapa de calor de muestras de hojas con y sin frutos de las cuatro variedades de mandarina: Ellendale (END), Willowleaf (WL), Page (PG) y Satsuma (SAT); (b) VIP scores del PLS-DA realizado para identificar los metabolitos que diferencian entre ambas etapas productivas.

Willowleaf y Page mostraron diferencias claras en los niveles de concentración de algunos metabolitos entre las fases “on” y “off”, lo que permitió distinguir fácilmente ambas etapas productivas. La quercitrina presentó concentraciones dos órdenes de magnitud mayores en la fase “off” que en la fase “on”. Similarmente, la relación hesperidina/narirutina podría ser indicativa del estado productivo de Willowleaf y Page: cuando es menor a 1, el árbol se encuentra en fase sin frutos, mientras que cuando el cociente es mayor a 10, el árbol está en fase con frutos.

Algunas de las diferencias observadas en el perfil de metabolitos entre ramas de mandarina en fase “on” y “off” se deben a la posición que ocupan los metabolitos predominantes dentro de las rutas biosintéticas. Por ejemplo, la nomilina es el precursor biosintético de la limonina (Berim & Gang, 2016; Gerolino et al., 2015). Los limonoides no han sido estudiados previamente como marcadores de la alternancia productiva en árboles de mandarina. En el caso de la ruta biosintética de los limonoides, la secuencia nomilina–limonina alcanza niveles de concentración más altos durante la fase sin frutos, lo que sugiere que el árbol podría estar preparándose para defenderse de plagas e insectos antes de la etapa de floración.

La naringenina, que constituye el primer esqueleto flavonoide policíclico, se encuentra en cantidades traza en hojas provenientes de ramas sin frutos de las variedades Satsuma y Ellendale, pero en niveles significativos en los cultivares Page y Willowleaf. En ramas con frutos, la naringenina se detectó en cantidades muy bajas en las cuatro variedades. En el primer caso, la ruta biosintética hacia flavanonas se ve favorecida por la 7-O-glicosilación con rutinosa, un disacárido [1→6] ramnosa-glucosa, que da lugar a la formación de narirutina, la flavanona predominante en hojas sin frutos de Page y Willowleaf (Abad-García, Garmón-Lobato, Berrueta, Gallo, & Vicente, 2012; Mou et al., 2021).

A partir de la naringenina se forman tanto hesperidina como narirutina. La narirutina parece ser un marcador de árboles sin frutos, ya que mostró diferencias significativas entre muestras “on” y “off”, particularmente en Page y Willowleaf. La biosíntesis de ambos hesperósidos (**Figura 5.20**) ocurre mediante la 7-O-glicosilación de la naringenina, la cual es posteriormente glicosilada específicamente en la posición 6-O del residuo de azúcar por una ramnosil transferasa. En la fase sin frutos, cuando el árbol se recupera del consumo energético generado por la fructificación, esta reacción de glicosilación produce niveles más elevados de glicosilados de naringenina. Durante el desarrollo del fruto, el metabolismo se encuentra plenamente activo y toda la naringenina es dirigida hacia la ruta de oxidación y metilación para formar hesperidina, el flavonoide cítrico más ubicuo.

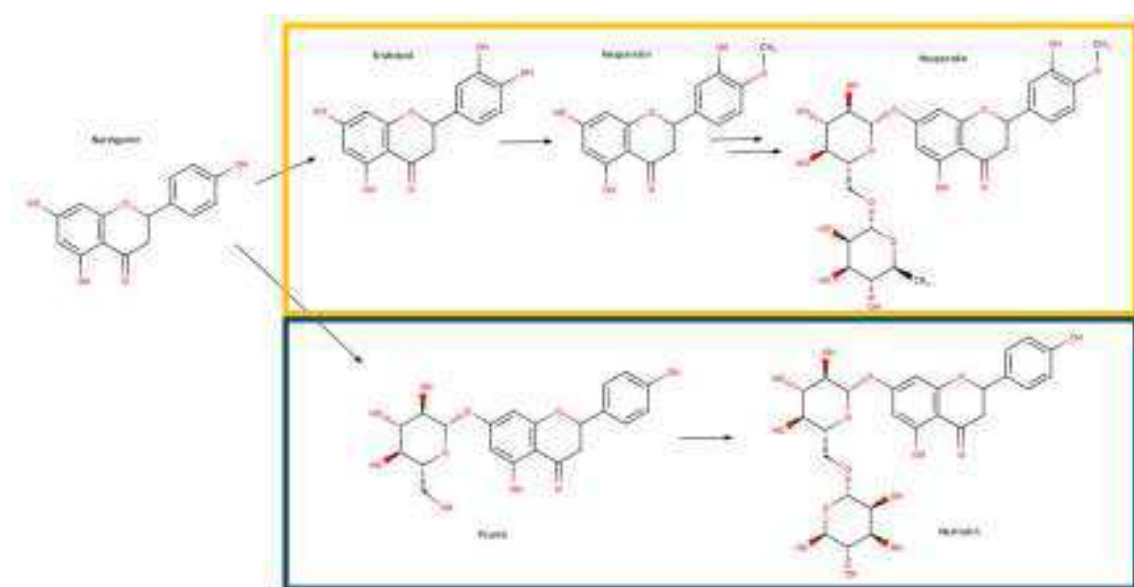


Figura 5.20 Ruta biosintética desde la naringenina hasta la hesperidina a través del eriodictiol y la hesperetina. La aglicona es luego glicosilada con glucosa y ramnosa. En una secuencia similar, la naringenina intacta es glicosilada dos veces: primero, para formar prunina, la cual es posteriormente glicosilada por la 6-O-ramnosil transferasa para formar narirutina.

Zhao *et al.* (Zhao, Wang, Lian, Xiao, & Zheng, 2020), en un intento por descifrar la ruta biosintética de flavonoides en *C. reticulata*, no describieron la vía que conduce a la narirutina, sino la ruta naringenina–naringina. Las especies de mandarina estudiadas producen la narirutina que no tiene sabor en lugar de la naringina que tiene sabor amargo. La diferencia entre ambos compuestos radica en la unión entre la ramnosa y la glucosa: en la narirutina el enlace es (1→6) (rutinosido), mientras que en la naringina es (1→2) (neohesperosido).

Otra ruta biosintética de los flavonoides en los árboles de mandarina conduce a la formación de polimetoxiflavonas (PMF), las cuales han sido propuestas como marcadores de las fases productivas (Chung *et al.*, 2019; Frydman *et al.*, 2004). La luteolina, reconocida como precursor de las PMF, también es un polifenol característico de la fase sin frutos.

La tendencia general discutida anteriormente permitió evaluar diferencias cualitativas y cuantitativas entre los cuatro genotipos, dependiendo del estado fisiológico de la planta. La biosíntesis de flavonoides en cítricos está regulada por una combinación de factores ambientales, genéticos y hormonales. Como los factores ambientales fueron comunes a todos los individuos en este estudio, se concluye que las variables genéticas y hormonales son responsables de las diferencias observadas.

Se ha aceptado que en las ramas “off”, las yemas se dirigen hacia el desarrollo de hojas en lugar de flores, lo que potencia el metabolismo primario y secundario. Esto confirma la tendencia general señalada por Shalom *et al.* (Shalom *et al.*, 2012), quienes demostraron que la biosíntesis de flavonoides se incrementa durante la fase “off” en mandarinas ‘Murcott’. Ellos encontraron que la expresión de todas las enzimas de la ruta de flavonoides era significativamente mayor en las ramas sin frutos, al igual que la expresión de ARNm de genes relacionados con la floración como *FT*, *API* y *LFY*, lo cual se correlacionó con el efecto de regulación positiva de estos genes en la fase “off”.

Los resultados obtenidos en este estudio, en cuatro cultivares diferentes de mandarina, concuerdan con la expresión génica descrita por Shalom *et al.* Además, se ha demostrado que los niveles elevados de ácido abscísico, que se acumulan en yemas, hojas y frutos durante el otoño en ‘Murcott’ (fase “on”) y en otras variedades cítricas alternantes, también pueden inducir la biosíntesis de flavonoides en otros frutos no climatéricos, como los arándanos y los tomates (Buran et al., 2012; Tao et al., 2020).

Asimismo, se destaca a la narirutina como un posible marcador de la alternancia “on/off”, ya que presenta niveles estadísticamente diferentes entre ambas etapas en todas las variedades estudiadas.

5.2.4 Conclusiones

Este trabajo constituye un aporte al conocimiento de los procesos metabólicos asociados a la alternancia productiva en mandarinas, un fenómeno que afecta de forma crítica la estabilidad y rentabilidad de la producción citrícola. A través de una aproximación metabolómica dirigida, basada en el análisis por LC-MS/MS, se logró identificar y cuantificar un conjunto de metabolitos secundarios clave presentes en hojas de ramas con y sin frutos de cuatro variedades comerciales cultivadas bajo condiciones controladas.

La comparación del perfil químico foliar entre ambas fases fisiológicas permitió detectar patrones consistentes de acumulación diferencial de flavonoides y limonoides, los cuales reflejan una regulación metabólica dependiente del estado productivo del árbol. Las hojas provenientes de ramas sin frutos mostraron una mayor acumulación de flavonoides como la narirutina y la quercitrina, mientras que en las ramas con frutos predominaron compuestos como la hesperidina y algunas PMF. Estos resultados sugieren que el árbol, durante la fase “off”, activa rutas biosintéticas orientadas al restablecimiento energético y a la preparación para una nueva etapa reproductiva.

Se observó que la narirutina podría constituirse como un marcador robusto del estado fisiológico de la rama, especialmente en los cultivares Page y Willowleaf, donde su concentración fue más alta durante la fase sin frutos. Asimismo, se identificaron otros

metabolitos con potencial valor diagnóstico de “on” y “off, como la quercitrina, la luteolina y la relación hesperidina/narirutina, cuya utilidad como indicadores varía según el genotipo. Las diferencias en la concentración de estos compuestos fueron consistentes con la clasificación obtenida mediante análisis multivariado que permitieron una separación clara entre estados productivos y entre variedades.

Desde el punto de vista bioquímico, los resultados permiten inferir que durante la fase “off” se favorecen rutas metabólicas específicas, como la glicosilación de la naringenina hacia narirutina, mientras que en la fase “on” predomina la conversión oxidativa hacia hesperidina. Por otro lado, la mayor acumulación de nomilina durante la fase sin frutos sugiere un rol defensivo anticipado, ya que este compuesto es precursor directo de la limonina. Estas observaciones concuerdan con reportes previos que indican una mayor actividad del metabolismo secundario y de la expresión génica asociada a la biosíntesis de flavonoides durante la fase “off” en cítricos con fenómeno de alternancia.

Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis de que el perfil metabolómico de la hoja refleja el estado productivo del árbol y que ciertos compuestos podrían emplearse como indicadores fisiológicos de la alternancia. La metodología aplicada permite no solo la caracterización quimiotaxonómica de variedades, sino también el desarrollo futuro de herramientas analíticas para el monitoreo del estado reproductivo en campo. Esto abre nuevas posibilidades para implementar estrategias de manejo agronómico más eficaces, que consideren la predicción y reducción de la alternancia productiva a través del seguimiento de marcadores bioquímicos [Apéndice 5: Flavonoids and Limonoids Profiles Variation in Leaves from Mandarin Cultivars and Its Relationship with Alternate Bearing] (Rodríguez Ceraolo *et al.*, 2022)].

Conclusiones generales del capítulo

La integración de enfoques metabolómicos no dirigidos (mediante RMN) y dirigidos (mediante LC-MS/MS) demostró ser una estrategia complementaria y eficaz para el estudio de la evolución productiva (pasaje de etapa vegetativa a reproductiva) y de la alternancia productiva en mandarinas. El análisis no dirigido por RMN permitió identificar diferencias globales en el metabolismo primario y secundario asociadas al estado reproductivo del

árbol, diferenciando de forma clara entre árboles en fase vegetativa y productiva. Por su parte, la aproximación dirigida mediante LC-MS/MS permitió profundizar en la caracterización de flavonoides y limonoides específicos, identificando metabolitos diferenciales con potencial valor diagnóstico en ambas fases del fenómeno de alternancia (“on” y “off”). El estudio sobre las hojas mostró que la alternancia no debe interpretarse únicamente como un efecto de carga, sino como una reorganización más amplia de la asignación de carbono, del balance energético y del metabolismo secundario, reflejada en la composición química foliar.

Ambos métodos demostraron su utilidad para la clasificación de los estados fenológicos, aunque lo hacen desde perspectivas metodológicas distintas. El enfoque por RMN permite, a partir de modelos previamente construidos, clasificar nuevos datos mediante herramientas estadísticas multivariadas. En contraste, el enfoque por LC-MS/MS se centra en la búsqueda y cuantificación de marcadores específicos, como la quercitrina y la narirutina, cuyos niveles permiten discriminar el estado fenológico. Cabe destacar que este análisis también puede realizarse mediante técnicas más accesibles económicamente como LC-DAD, lo que facilita su potencial aplicación práctica.

Esta articulación metodológica no solo refuerza la solidez de los resultados obtenidos, sino que sienta las bases para aplicaciones futuras en citricultura, aprovechando que las hojas constituyen una matriz de muestreo abundante y accesible para el monitoreo temprano y el seguimiento temporal del estado fisiológico del árbol, es posible anticipar escenarios productivos tipo “on/off”, y seleccionar genotipos con menor propensión a la alternancia. Los hallazgos del análisis metabolómico pueden transferirse a determinaciones más simples mediante el monitoreo rutinario de marcadores específicos, lo que resulta clave para su implementación en contextos productivos. Los resultados presentados en este capítulo (**Figura 5.21**) abren nuevas líneas de investigación orientadas al manejo integral del ciclo reproductivo en cítricos.



Figura 5.21 Principales resultados del capítulo 5, creado con NotebookLM.

5.3 Referencias bibliográficas

- Abad-García, B., Garmón-Lobato, S., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2012). On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 99, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.042>
- Agust, M., Almela, V., & Pons, J. (1992). Effects of girdling on alternate bearing in citrus. *Journal of Horticultural Science*, 67(2), 203–210. <https://doi.org/10.1080/00221589.1992.11516238>
- Albrecht, U., Tripathi, I., Kim, H., & Bowman, K. D. (2019). Rootstock effects on metabolite composition in leaves and roots of young navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) and pummelo (*C. grandis* L. Osbeck) trees. *Trees*, 33(1), 243–265. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1773-1>
- Araki, T. (2001, February). Transition from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00137-0)
- Berim, A., & Gang, D. R. (2016, June). Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*. Springer Netherlands.

- <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9426-0>
- Bower, J. P., Cutting, J. G. M., Lovatt, C. J., & Blanke, M. M. (1990). Interaction of plant growth regulator and carbohydrate in flowering and fruit set. *Acta Horticulturae*, (275), 425–434. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1990.275.52>
- Buran, T. J., Sandhu, A. K., Azeredo, A. M., Bent, A. H., Williamson, J. G., & Gu, L. (2012). Effects of exogenous abscisic acid on fruit quality, antioxidant capacities, and phytochemical contents of southern high bush blueberries. *Food Chemistry*, 132(3), 1375–1381. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.124>
- Celano, R., Campone, L., Pagano, I., Carabetta, S., Di Sanzo, R., Rastrelli, L., ... Russo, M. (2019). Characterisation of nutraceutical compounds from different parts of particular species of *Citrus sinensis* ‘Ovale Calabrese’ by UHPLC-UV-ESI-HRMS. *Natural Product Research*, 33(2), 244–251. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1443102>
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223s>. PMID: 15640485.
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., ... Xia, J. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486–W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Chong, J., & Xia, J. (2018). MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics*, 34(24), 4313–4314. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty528>
- Chung, S. W., Yu, D. J., Oh, H. D., Ahn, J. H., Huh, J. H., & Lee, H. J. (2019). Transcriptional regulation of abscisic acid biosynthesis and signal transduction, and anthocyanin biosynthesis in ‘Bluecrop’ highbush blueberry fruit during ripening. *PLOS ONE*, 14(7), e0220015. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220015>
- Coley, P. D., Bryant, J. P., & Chapin, F. S. (1985). Resource Availability and Plant Antiherbivore Defense. *Science*, 230(4728), 895–899. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.230.4728.895>
- Davenport, T. L. (2011). Citrus Flowering. In *Horticultural Reviews* (pp. 349–408). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118060858.ch8>

- Etienne, A., Génard, M., Lobit, P., Mbeguié-A-Mbéguié, D., & Bugaud, C. (2013). What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), 1451–1469. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert035>
- FAOSTAT. (n.d.).
- Fernandes, H. P., Salomé-Abarca, L. F., Gonçalves Pereira, R., Brandão Seibert, J., Silva-Junior, G. J., Das Graças Fernandes da Silva, M. F., & Choi, Y. H. (2022). Metabolomic Investigation of Citrus latifolia and the Putative Role of Coumarins in Resistance to Black Spot Disease. *Frontiers in Molecular Biosciences, Volume 9*. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-biosciences/articles/10.3389/fmolb.2022.934401>
- Frydman, A., Weisshaus, O., Bar-Peled, M., Huhman, D. V., Sumner, L. W., Marin, F. R., ... Eyal, Y. (2004). Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene Cm1,2RhaT encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *Plant Journal*, 40(1), 88–100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X>
- Gerolino, E., Chierrito, T., Santana-Filho, A., Rorigues, S., Gonçalves, R., & Oliveira, A. (2015). Evaluation of limonoid production in suspension cell culture of Citrus sinensis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 56. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.008>
- Grace, S. G., & Logan, B. A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 355, pp. 1499–1510). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0710>
- Gualdani, R., Cavalluzzi, M., Lentini, G., & Habtemariam, S. (2016). The Chemistry and Pharmacology of Citrus Limonoids. *Molecules*, 21(11), 1530. <https://doi.org/10.3390/molecules21111530>
- Hafeez, F., Akram, W., & Shaalan, E. A.-S. (2011). Mosquito larvicidal activity of citrus limonoids against Aedes albopictus. *Parasitology Research*, 109(1), 221–229. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2228-9>
- Hasegawa, S., Berhow, M. A., & Manners, G. D. (2000). Citrus limonoid research: An overview. *ACS Symposium Series*, 758, 1–8. <https://doi.org/10.1021/BK-2000-0758.CH001>

- Jia, J., Zhao, M., Liu, R., Xue, C., Xia, Z., Hu, B., & Rennenberg, H. (2024). Drought-mediated oxidative stress and its scavenging differ between citrus hybrids with medium and late fruit maturation. *Plant Stress*. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100670>
- Kazan, K., & Lyons, R. (2016). The link between flowering time and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 47–60. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv441>
- Khan, A., Kanwal, F., Ullah, S., Fahad, M., Tariq, L., Altaf, M. T., ... Zhang, G. (2025). Plant Secondary Metabolites—Central Regulators Against Abiotic and Biotic Stresses. *Metabolites*. <https://doi.org/10.3390/metabo15040276>
- Khan, M. K., Zill-E-Huma, & Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 85–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004>
- Maciá-Vázquez, A. A., Núñez-Gómez, D., Martínez-Nicolás, J. J., Legua, P., & Melgarejo, P. (2024). Mandarin Variety Significantly Affects the Metabolites Present in the Leaves. *Horticulturae*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/horticulturae10040359>
- McClure, J. W. (1975). Physiology and Functions of Flavonoids. In J. B. Harbone, T. J. Mabry, & H. Mabry (Eds.), *The Flavonoids* (pp. 970–1055). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2909-9_18
- Moss, G. I. (1971). Effect of fruit on flowering in relation to biennial bearing in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Journal of Horticultural Science*, 46(2), 177–184. <https://doi.org/10.1080/00221589.1971.11514396>
- Mou, J., Zhang, Z., Qiu, H., Lu, Y., Zhu, X., Fan, Z., ... Wen, W. (2021). Multiomics-based dissection of citrus flavonoid metabolism using a *Citrus reticulata* × *Poncirus trifoliata* population. *Horticulture Research*, 8(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00472-8>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., ... Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>
- Peña, L., Martín-Trillo, M., Juárez, J., Pina, J. A., Navarro, L., & Martínez-Zapater, J. M. (2001). Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology*, 19(3), 263–267.

<https://doi.org/10.1038/85719>

- Pillitteri, L. J., Lovatt, C. J., & Walling, L. L. (2004). Isolation and characterization of LEAFY and APETALA1 homologues from *Citrus sinensis* L. Osbeck "Washington." *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(6), 846–856. <https://doi.org/10.21273/jashs.129.6.0846>
- Rivas, F., Fornes, F., & Agustí, M. (2008). Girdling induces oxidative damage and triggers enzymatic and non-enzymatic antioxidative defences in *Citrus* leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 64(3), 256–263. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2008.07.006>
- Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1(SUPPL.98), 30.2.1–30.2.24. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>
- Rodríguez Ceraolo, C., Vázquez, V., Mígues, I., Cesio, M. V, Rivas, F., & Heinzen, H. (2022). Flavonoids and Limonoids Profiles Variation in Leaves from Mandarin Cultivars and Its Relationship with Alternate Bearing. *Agronomy* . <https://doi.org/10.3390/agronomy12010121>
- Roy, A., & Saraf, S. (2006). Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(2), 191–201. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.191>
- Russo, M., Arigò, A., Calabrò, M. L., Farnetti, S., Mondello, L., & Dugo, P. (2016). Bergamot (*Citrus bergamia* Risso) as a source of nutraceuticals: Limonoids and flavonoids. *Journal of Functional Foods*, 20, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.005>
- Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>
- Shalom, L., Samuels, S., Zur, N., Shlizerman, L., Zemach, H., Weissberg, M., ... Sadka, A. (2012). Alternate Bearing in *Citrus*: Changes in the Expression of Flowering Control Genes and in Global Gene Expression in ON- versus OFF-Crop Trees. *PLoS ONE*, 7(10), e46930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046930>
- Shi, Y. S., Zhang, Y., Li, H. T., Wu, C. H., El-Seedi, H. R., Ye, W. K., ... Kai, G. Y. (2020, December). Limonoids from *Citrus*: Chemistry, anti-tumor potential, and other

- bioactivities. *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104213>
- Slisz, A. M., Breksa, A. P. I. I., Mishchuk, D. O., McCollum, G., & Slupsky, C. M. (2012). Metabolomic Analysis of Citrus Infection by ‘Candidatus Liberibacter’ Reveals Insight into Pathogenicity. *Journal of Proteome Research*, 11(8), 4223–4230. <https://doi.org/10.1021/pr300350x>
- Sobolev, P. A., Mannina, L., Proietti, N., Carradori, S., Daglia, M., Giusti, M. A., ... Capitani, D. (2015). Untargeted NMR-Based Methodology in the Study of Fruit Metabolites. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules20034088>
- Takeno, K. (2012). Stress-Induced Flowering. *Abiotic Stress Responses in Plants*, 331–345. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0634-1_17
- Talon, M., Tadeo, F. R., Ben-Cheikh, W., Gomez-Cadenas, A., Mehouchi, J., Pérez-Botella, J., & Primo-Millo, E. (1998). Hormonal regulation of fruit set and abscission in citrus: Classical concepts and new Evidence. *Acta Horticulturae*, 463, 209–217. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1998.463.24>
- Tao, X., Wu, Q., Aalim, H., Li, L., Mao, L., Luo, Z., & Ying, T. (2020). Effects of Exogenous Absciscic Acid on Bioactive Components and Antioxidant Capacity of Postharvest Tomato during Ripening. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/molecules25061346>
- Villa-Ruano, N., Pérez-Hernández, N., Zepeda-Vallejo, L. G., Quiroz-Acosta, T., Mendieta-Moctezuma, A., Montoya-García, C., ... Becerra-Martínez, E. (2019). (1) H-NMR Based Metabolomics Profiling of Citrus Juices Produced in Veracruz, México. *Chemistry & Biodiversity*, 16(5), e1800479. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800479>
- Wada, K. C., & Takeno, K. (2010). Stress-induced flowering. *Https://Doi.Org/10.4161/Psb.5.8.11826*, 5(8), 944–947. <https://doi.org/10.4161/PSB.5.8.11826>
- Wang, F., Yu, X., Liu, X., Shen, W., Zhu, S., & Zhao, X. (2016). Temporal and spatial variations on accumulation of nomilin and limonin in the pummelos. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 23–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.039>
- Warikoo, R., Ray, A., Sandhu, J. K., Samal, R., Wahab, N., & Kumar, S. (2012). Larvicidal and irritant activities of hexane leaf extracts of Citrus sinensis against

- dengue vector *Aedes aegypti* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 152–155. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60211-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60211-6)
- Waterman, P., & Mole, S. (1994). *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Wu, S., Gao, G., Du, Y., Mo, X., Tan, Q., Sun, X., ... Hu, C. (2024). Low soil pH enhances fruit acidity by inhibiting citric acid degradation in lemon (*Citrus lemon* L.). *Horticulture Advances*, 2(1), 26. <https://doi.org/10.1007/s44281-024-00044-5>
- Xi, W., Zhang, Y., Sun, Y., Shen, Y., Ye, X., & Zhou, Z. (2014). Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Balnco.) pulps and their antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 52, 466–474. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.11.016>
- Yu, X., Shi, D., Zhi, X., Li, Q., Yao, X., & Xu, H. (2015). Synthesis and quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of C7-oxime ester derivatives of obacunone as insecticidal agents. *RSC Advances*, 5(40), 31700–31707. <https://doi.org/10.1039/c5ra01411e>
- Zagoskina, N. V., Kazantseva, V. V., Fesenko, A. N., & Shirokova, A. V. (2018). Accumulation of Phenolic Compounds at the Initial Steps of Ontogenesis of *Fagopyrum esculentum* Plants That Differ in Their Ploidy Levels. *Biology Bulletin* 2018 45:2, 45(2), 171–178. <https://doi.org/10.1134/S1062359018020140>
- Zhang, X., Breksa, A. P. 3rd, Mishchuk, D. O., & Slupsky, C. M. (2011). Elevation, rootstock, and soil depth affect the nutritional quality of mandarin oranges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2672–2679. <https://doi.org/10.1021/jf104335z>
- Zhang, Y., Sun, Y., Xi, W., Shen, Y., Qiao, L., Zhong, L., ... Zhou, Z. (2014). Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*, 145, 674–680. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.08.012>
- Zhao, C., Wang, F., Lian, Y., Xiao, H., & Zheng, J. (2020). Biosynthesis of citrus flavonoids and their health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(4), 566–583. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1544885>

6 Síntesis de la Parte I

Esta primera parte de la tesis ha presentado estudios centrados en el análisis metabolómico aplicado a mandarinas enfocándose en tres de sus órganos principales: la pulpa, la cáscara y las hojas.

La combinación de enfoques no dirigidos, que permiten una visión amplia y exploratoria, con estrategias dirigidas, diseñadas para validar hipótesis y cuantificar metabolitos específicos, ha mostrado la complejidad química de esta fruta. Estos enfoques buscan abordar desafíos importantes en el mejoramiento genético, la calidad del fruto, la resistencia a enfermedades y el manejo agronómico. Este capítulo integra los resultados clave de los capítulos 3, 4 y 5, discute su implicancia práctica y científica, y marca las futuras líneas de investigación que emergen de este trabajo.

6.1 Integración de resultados no dirigidos y dirigidos en los tres órganos

6.1.1 Pulpa (Capítulo 3): La aceptabilidad del consumidor y la ^1H RMN como predictor objetivo

El estudio de la pulpa se centró en uno de los mayores desafíos de la citricultura: la aceptabilidad del consumidor, un atributo sensorial muy complejo y determinante para el éxito comercial, pero que es muy difícil de evaluar de forma temprana y objetiva. La dificultad y el costo de la evaluación sensorial tradicional en los programas de mejoramiento genético son un factor influyente en la selección varietal, por lo tanto, se implementó un enfoque metabolómico no dirigido mediante espectroscopía de ^1H RMN. Esta técnica, aplicada en extractos acuosos, permitió identificar y cuantificar relativamente azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa) y ácido cítrico, cuya proporción es crucial para la percepción de dulzor y acidez.

El análisis no dirigido no solo reveló los perfiles generales, sino que, mediante un modelo quimiométrico robusto, demostró una alta correlación ($R^2 = 0,79$) entre el cociente poder edulcorante/ácido cítrico y la aceptabilidad determinada por consumidores. Esto permitió repetir la determinación utilizando un espectrómetro de mesada (60 MHz) manteniendo

una precisión comparable. Esto implica un hallazgo práctico significativo al facilitar el acceso a herramientas de predicción objetiva de la calidad, reduciendo costos y la necesidad de instalaciones especializadas. Este avance representa un aporte relevante a la transferencia tecnológica ya que brinda a programas de mejoramiento genético una herramienta objetiva, reproducible y de bajo costo para seleccionar genotipos con alta calidad organoléptica desde etapas tempranas, reduciendo dependencia de ensayos sensoriales extensos y costosos.

6.1.2 Cáscara (Capítulo 4): Identidad varietal, resistencia a enfermedades y el papel de las ceras epicuticulares

La cáscara fue investigada como una matriz fundamental para la identidad varietal y las defensas naturales del fruto. El análisis no dirigido con ^1H RMN de extractos acuosos y orgánicos de cáscara reveló diferencias significativas entre variedades, asociadas a la composición y metilación de pectinas, azúcares y compuestos lipofílicos como limoneno y lípidos.

El análisis no dirigido mostró que la composición de pectinas, azúcares y compuestos lipofílicos, como limoneno y lípidos, permite discriminar variedades. Además, se detectaron asociaciones entre señales de ácidos y alcoholes grasos con la resistencia al cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*), generando la hipótesis de que las ceras epicuticulares cumplen un papel central en la defensa contra este patógeno.

Esta hipótesis derivó en el análisis dirigido de ceras epicuticulares mediante GC-MS. La caracterización de estas ceras confirmó esta hipótesis: si bien la cantidad total de cera no se correlacionó linealmente con la resistencia, la composición cualitativa sí lo hizo, especialmente en frutos inmaduros. En variedades resistentes, predominaban alcanos e isoalcanos, sugiriendo una cutícula homogénea y protectora, mientras que en variedades susceptibles, abundaban los alcoholes grasos, asociados a una mayor permeabilidad cuticular.

Estos resultados posicionan a la metabolómica como una herramienta clave para identificar marcadores varietales de resistencia que puedan orientar programas

de mejoramiento genético y manejo fitosanitario sostenible, reduciendo la dependencia de agroquímicos y aumentando la resistencia del cultivo.

6.1.3 Hojas (Capítulo 5): Metabolismo foliar y la alternancia productiva

El análisis de las hojas se enfocó en la alternancia productiva, fenómeno fisiológico que limita la productividad citrícola a nivel global. A diferencia de la pulpa y la cáscara, las hojas están disponibles durante todo el ciclo vegetativo, lo que las convierte en una muestra importante para estudiar el metabolismo de la planta en sus diferentes etapas.

El análisis no dirigido mediante ^1H RMN de extractos acuosos y orgánicos permitió discriminar tanto entre variedades de mandarina como entre estados fisiológicos de hojas de árboles en estado productivo (árboles de 5 – 7 años) y vegetativo (árboles de 3 – 5 años). En extractos acuosos se observó una mejor separación varietal que al usarse los extractos orgánicos. En cuanto a la diferenciación de los estados fenológicos, en Ellendale, las hojas productivas presentaron mayor contenido de ácido cítrico, mientras que las no productivas mostraron mayor acumulación de azúcares y de prolina. En Page también se detectó la prolina como marcador de hojas no productivas, aunque las diferencias en azúcares fueron menos marcadas que en Ellendale.

Al considerar las cuatro variedades seleccionadas, en etapa no productiva se acumularon carbohidratos solubles y polifenoles junto con ácidos del ciclo de Krebs, mientras que en etapa productiva hubo un aumento en el contenido de ácido cítrico, lo que sugiere un rol central en el transporte de cationes y en la regulación energética vinculada a la formación de flores y frutos en esta etapa.

Esta hipótesis llevó al análisis dirigido de polifenoles y limonoides mediante LC-MS/MS. La investigación confirmó la acumulación diferencial de flavonoides glicosilados (como naringina y quercitrina) en árboles sin frutos (alternancia en “off”), y algunas polimetoxiflavonas (PMF) y hesperidina en ramas con frutos (alternancia en “on”). La naringina, junto con luteolina, se perfiló como un marcador candidato robusto para la alternancia “on/off” en algunas variedades. La mayor acumulación de nomilina, un precursor de la limonina, en la fase sin frutos, también sugirió un rol defensivo anticipado.

Este capítulo también muestra la eficacia de la combinación de enfoques no dirigidos y dirigidos para comprender fenómenos fisiológicos complejos y para la identificación de biomarcadores para el manejo agronómico y la selección de genotipos. Estos estudios muestran la potencia de la metabolómica como herramienta para estudiar la complejidad bioquímica de las mandarinas, proporcionando conocimientos profundos que tienen el potencial de transformar la selección varietal, la resistencia a enfermedades y el manejo agronómico en la industria citrícola. La complementariedad de los enfoques no dirigidos y dirigidos aportó una visión global de los perfiles metabólicos como la identificación y cuantificación precisa de metabolitos específicos de interés, validando las hipótesis generadas.

6.2 Conexión de los resultados con los objetivos de la tesis

Los hallazgos de esta primera parte de la tesis están intrínsecamente ligados a los objetivos generales planteados:

Se ha logrado una caracterización detallada de los perfiles metabolómicos de la pulpa, cáscara y hojas de diversas variedades de mandarina, abarcando tanto metabolitos primarios (azúcares, ácidos orgánicos) como secundarios (flavonoides, limonoides, ceras, terpenoides).

La tesis ha generado y validado modelos quimiométricos e identificado biomarcadores que permiten predecir de manera temprana y objetiva la aceptabilidad del fruto, así como identificar variedades con potencial resistencia a enfermedades y con un comportamiento deseable en términos de alternancia productiva. Estas herramientas son vitales para optimizar los procesos de selección varietal, reduciendo tiempo y recursos.

También se han estudiado mecanismos fisiológicos y de defensa. Los resultados muestran cómo la composición de las ceras epicuticulares contribuye a la resistencia al cancro cítrico, y cómo los perfiles de polifenoles y limonoides en hojas se correlacionan con la alternancia productiva. Estos conocimientos contribuyen a una comprensión más profunda de la fisiología de la planta y sus estrategias de adaptación.

Un aspecto muy importante surgido durante el desarrollo de la tesis es la transferencia de tecnología. La exitosa validación de la metodología de RMN de alto campo a equipos de mesada para la predicción de aceptabilidad demuestra un claro potencial para la transferencia de conocimiento a entornos productivos y de investigación con menores recursos instrumentales.

Esta primera parte de la tesis ha demostrado la riqueza y la complejidad bioquímica de las mandarinas desde diversas perspectivas, generando no solo conocimiento fundamental sino también herramientas que pueden ser directamente aplicadas para mejorar la eficiencia y la rentabilidad de la citricultura. La parte II de la tesis, centrada en la variedad Afourer y la producción de frutos sin semillas, representa una progresión natural y de alto impacto. En esta segunda parte se enfocarán las herramientas de análisis metabolómico establecidas para abordar desafíos agronómicos y comerciales, consolidando así el rol de esta disciplina en la transformación de la citricultura moderna.

7 Efecto del manejo de cultivo en ovarios de Afourer: metabolómica no dirigida por RMN

7.1 Introducción

En capítulos anteriores se analizaron determinantes sensoriales y productivas en mandarinas con miras a orientar la selección de cultivares. Entre estas, la presencia de semillas es una restricción clave para la aceptación del mercado y para la planificación agronómica. En numerosas variedades de mandarina con autoincompatibilidad y capacidad partenocárpica (es decir, formación de frutos sin necesidad de fecundación de los óvulos) como Afourer o Nadorcott la ausencia de polinización cruzada permite obtener frutos sin semillas (apirenos), pero la exposición al polen de otras variedades compatibles incrementa el número de semillas por fruto (Pereira Gonzatto et al., 2022).

Esta característica es de gran interés agronómico porque permite asegurar rendimientos más estables, incluso bajo condiciones ambientales desfavorables, y favorece la obtención de productos de mayor calidad comercial por su carácter “seedless” (sin semillas). La partenocarpia puede presentarse de manera natural (propia de ciertos cultivos que desarrollan frutos sin fecundación), ser estimulativa (cuando algún estímulo, como la polinización con polen no viable, desencadena el desarrollo del fruto) o inducirse artificialmente mediante la aplicación de reguladores del crecimiento vegetal, como auxinas, que promueven el cuajado y desarrollo del fruto en ausencia de fecundación (Maupilé, Chaib, Boualem, & Bendahmane, 2024).

Estas particularidades han impulsado la adopción de estrategias de manejo como el mallado (aislamiento físico de la canopia) (Gravina, Gambetta, Rey, & Guimaraes, 2016) y la gestión de polinizadores, así como el uso de reguladores de crecimiento, con el objetivo de modular el cuajado y la producción de frutos apirenos sin comprometer el rendimiento (CVVP, 2018; Davies, 1997; Jackson & Futch, 1997; Monasterolo et al., 2024).

Frente a estas necesidades, en este capítulo se evalúa el impacto combinado del mallado, la presencia de abejas y la aplicación foliar de ácido giberélico (GA3) sobre los procesos reproductivos tempranos en mandarinas Afourer, integrando datos productivos y perfiles

químicos de ovarios en cuatro etapas fenológicas. La literatura muestra que el GA3 es ampliamente utilizado para aumentar el cuajado y el tamaño en mandarinas, incluidas las apirenas (Gravina, 2007), y que el control de la polinización mediante barreras físicas reduce significativamente la polinización cruzada responsable de la formación de semillas. Empleadas de manera coordinada y con tiempos precisos, estas prácticas permiten orientar la producción hacia frutos comercialmente deseables (por ejemplo, apirenos) con impactos variables sobre el rendimiento y la calidad (Chao, Khuong, Zheng, & Lovatt, 2011; CVVP, 2018; Davies, 1997; Garmendia et al., 2019; Monasterolo et al., 2024). Por otra parte, la polinización por abejas es conocida por dar frutos de mayor porte, con mejor resistencia a enfermedades, pero con semillas (Ramos, Sáez, Aizen, & Morales, 2025; Santos et al., 2021).

Para entender los mecanismos bioquímicos implicados en estas técnicas de cultivo durante la floración se empleó un enfoque metabolómico no dirigido basado en espectroscopía de ^1H RMN acoplada a análisis estadístico multivariado.

Dado que el ovario en desarrollo integra señales de defensa, regulación osmótica y metabolismo energético, se prestó especial atención a metabolitos como azúcares solubles, ácidos orgánicos y osmoprotectores, cuyo rol en tolerancia a estrés y en procesos reproductivos ha sido reportado en distintos sistemas frutales (Basit et al., 2025; Castro-Moretti, Gentzel, Mackey, & Alonso, 2020; Khan et al., 2020; Ozturk et al., 2021). La dinámica de estos compuestos podría influir decisivamente en la transición desde el ovario hasta la formación del fruto.

El objetivo de esta sección es caracterizar, mediante ^1H RMN y metabolómica no dirigida, la evolución de los perfiles metabolómicos de ovarios bajo cinco condiciones de manejo (combinando mallado, abejas y aplicaciones de GA3) y cuatro fechas de muestreo, y relacionar estas huellas químicas con indicadores de productividad y presencia de semillas. Estas condiciones de manejo contemplan la polinización cruzada y la partenocarpia tanto natural como inducida. Esta aproximación busca identificar fitomarcadores asociados al éxito reproductivo temprano y a la formación de frutos sin semillas, para luego llevar a cabo estudios dirigidos (*targeted*) y para la optimización de prácticas de manejo en programas de mejora y producción comercial.

7.2 Metodología

7.2.1 Material vegetal

Los árboles pertenecientes a la variedad Afourer fueron cultivados en la colonia Gestido Salto, INIA Salto Grande (31°16'44.7"S 57°53'59.6"W). Todos los árboles tenían 12 años y se encontraban en edad productiva. Se seleccionó un diseño experimental de parcelas al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, siendo cada árbol una repetición biológica. Los tratamientos seleccionados fueron:

- Tratamiento 1 (T1): árboles mallados con colmenas intercaladas.
- Tratamiento 2 (T2): árboles mallados con una aplicación de ácido giberélico (GA3) foliar 30 ppm (14/10/2020).
- Tratamiento (T3): árboles mallados con dos aplicaciones de ácido giberélico (GA3) foliar 30 ppm (14/10/2020 y 27/10/2020).
- Tratamiento (T4): árboles mallados.
- Tratamiento (T5): árboles sin malla.

Cada tratamiento se llevó a cabo en parcelas de 80 m² (16 × 5 m) y se muestrearon ovarios de la zona media de cada árbol alrededor de la copa. Se realizaron los siguientes muestreos:

- Muestreo 1 (M1): apertura de la flor - antesis (05/10/2020). Estadío 61 según codificación BBCH (Agustí et al., 1995).
- Muestreo 2 (M2): flor sin pétalos y con estilos (09/10/2020). Estadío 67 BBCH.
- Muestreo 3 (M3): flor sin pétalos y sin estilos, fruto cuajado (16/10/2020). Estadío 71 BBCH.
- Muestreo 4 (M4): frutos formalmente cuajados de 4 a 5 mm de diámetro, en crecimiento (30/10/2020). Estadío 71 BBCH.

En la **figura 7.1** se puede ver un esquema de las fechas de muestreo y la aplicación de GA3 en los tratamientos 2 y 3, así como fotos de los ovarios en cada una de las etapas del muestreo.

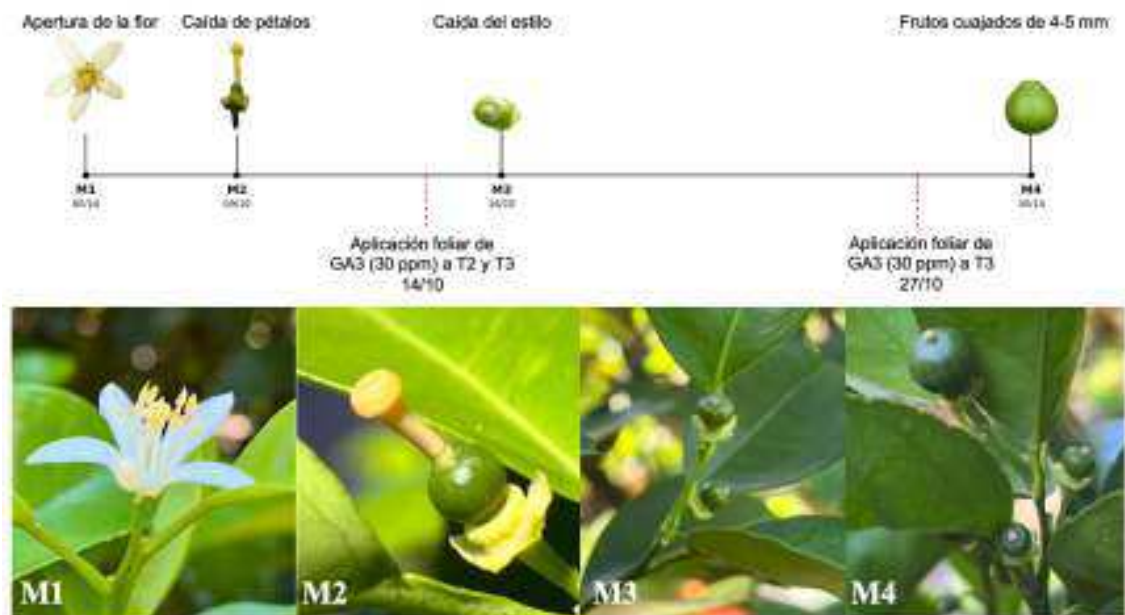


Figura 7.1. Esquema de las fechas de muestreo y aplicación de GA3 en los tratamientos 2 y 3 (arriba); desarrollo del ovario en cada una de estas etapas (abajo).

Las muestras fueron liofilizadas inmediatamente, molidas utilizando un molino de corte (AICOK Coffee Grinder HY-1403), y almacenadas en freezer hasta su posterior fraccionamiento previo a la extracción.

7.2.2 Datos de calidad productiva

Durante el período de cosecha (2020-2021), se registraron los siguientes parámetros para cada parcela experimental (tratamiento):

- Número total de frutas obtenidas: se contó el total de frutos cosechados por parcela.
- Masa total de fruta obtenida: se determinó la masa total de todos los frutos cosechados en cada parcela utilizando una balanza electrónica de plataforma modelo Hawk (Mettler Toledo, China).
- Número de frutas con semillas: las frutas se cortaron transversalmente y se identificaron manualmente las frutas con presencia de semillas.

- Número de semillas por fruto: se contó manualmente el número de semillas presentes en cada parcela.

Los datos obtenidos fueron evaluados estadísticamente para indicar diferencias entre los resultados para cada tratamiento.

7.2.3 Extracción

50 ± 5 mg de los ovarios de mandarina Afourer se pesaron en balanza analítica (Shimadzu ATX224, Japón) y fueron luego liofilizados y molidos en un tubo Ependorff de 2 mL. Se agregó 1,00 mL de buffer fosfato deuterado pD = 6,0 (Solución 4002600 R2, Farmacopea Europea 5.0) y se sonicó durante 30 minutos (ACP-150H, MRC Laboratory Equipment, Israel). Se centrifugó durante 5 minutos a 2400 × g (Sorvall Legend Micro 17, Thermo Scientific) y se filtró el sobrenadante (≈ 650 µL) mediante membrana de PVDF de 0,22 µm a un tubo de rmn de 5 mm (NE-HL5-7, New Era Enterprises, Nueva Jersey, USA). Se realizaron cinco réplicas de extracción de cada planta muestreada.

7.2.4 Análisis instrumental

7.2.4.1 Análisis general

Se adquirieron los espectros de RMN de cada muestra en un espectrómetro de 400,13 MHz (Bruker Avance III, Alemania) utilizando el experimento noesygppr1d (pulso de presaturación de agua: 4,7 ppm a -50 dBW) con 64 escaneos. Los espectros fueron procesados usando el software MestReNova (MestreLab Research, España) siguiendo el mismo protocolo para todos ellos. El protocolo incluyó el llenado de ceros hasta un tamaño de 64 K, apodización con una función ventana exponencial de 0,3 Hz antes de la transformada de Fourier, corrección manual de fase y línea de base, referenciado respecto a la señal correspondiente a alanina (doblete en 1,48 ppm) y posterior verificación de la señal residual de agua en 4,79 ppm, y finalmente la alineación utilizando el método de derivada tomando como referencia el espectro promedio para realizar la misma. Los espectros procesados se dividieron en fragmentos de 0,01 ppm de ancho sin tener en

cuenta la región correspondiente a la señal del solvente ni aquellas que no pudieron alinearse correctamente. La matriz de datos de las áreas de cada fragmento se exportó como un archivo de texto para su uso en análisis multivariados.

7.2.4.2 Experimentos adicionales

Se realizaron experimentos bidimensionales en muestras seleccionadas para la verificación de las señales de RMN identificadas mediante el análisis multivariado. Estos experimentos fueron llevados a cabo utilizando parámetros provistos con el espectrómetro e incluyeron COSY (para identificar correlaciones entre protones acoplados y obtener información sobre la conectividad vecinal de los átomos de hidrógeno), HSQC (para correlacionar protones y carbonos directamente acoplados, proporcionando información sobre los enlaces C-H) y HMBC (para detectar correlaciones entre protones y carbonos separados por dos o tres enlaces, permitiendo establecer conexiones a mayor distancia en la estructura molecular).

Se llevaron a cabo además experimentos de fortificación en muestras seleccionadas, añadiendo glicina betaína (CAS: 107-43-7) y adquiriendo los espectros de protón (secuencia de pulso zgpr con supresión de agua) con 64 escaneos antes y después de la fortificación.

Estos experimentos adicionales se adquirieron en un espectrómetro de RMN de 400,13 MHz (Bruker Avance III, Alemania). Los parámetros de adquisición, como el número de scans, el tiempo de relajación y las dimensiones espectrales, se ajustaron para optimizar la resolución y la sensibilidad de los experimentos.

7.2.5 Análisis estadístico

Los datos de calidad de la fruta obtenida en cada tratamiento se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de los tratamientos en cada uno de los parámetros evaluados. Cuando el ANOVA indicó diferencias significativas ($p < 0,05$), se utilizó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) para realizar comparaciones

múltiples entre las medias de los tratamientos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Infostat (versión 2020, Argentina).

Los análisis estadísticos multivariados se llevaron a cabo con la interfaz MetaboAnalyst (software libre online) como en los capítulos anteriores. En todos los casos, se aplicó el método de escalado Pareto. Para la clasificación de los tratamientos/fecha de muestreo e identificar valores atípicos dentro de cada clase, se empleó el análisis de componentes principales (PCA). Para la identificación de fitomarcadores, se realizó el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA). Los modelos obtenidos de los análisis PLS-DA y OPLS-DA se validaron utilizando la prueba de permutación.

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Datos de calidad productiva

Con el objetivo de evaluar el impacto de los distintos tratamientos sobre la productividad y la calidad de los frutos, se analizaron variables asociadas al rendimiento (número total de frutos y peso promedio) y a la reproducción (número y porcentaje de frutos con semillas, así como el número de semillas por fruto). En la **Tabla 7.1** se presentan los resultados obtenidos para cada condición experimental, lo que permite comparar el efecto de la utilización de malla, la presencia de abejas y la aplicación exógena de ácido giberélico (GA3) en la producción de frutos partenocárpicos y en la calidad global de la cosecha.

Tabla 7.1 Resultados de calidad de la fruta obtenida para cada tratamiento.

	Tratamiento	Nº fruta	Peso (Kg)	Peso/fruta (g)	Nº frutas con semillas	% Frutos con semilla	Nº semillas/fruto
1	Malla + Abejas	1372,8 ^a	149,5 ^a	109	625,0 ^a	46,0 ^a	4,4 ^a
2	Malla + GA3	1317,5 ^a	125,1 ^a	95	469,3 ^b	31,3 ^b	3,5 ^b
3	Malla + GA3 x2	1434,8 ^a	141,5 ^a	99	449,0 ^b	30,9 ^b	4,9 ^a
4	Malla	1104,3 ^a	115,6 ^a	105	325,3 ^b	31,5 ^b	3,5 ^b

5	Sin Malla	1571,5 ^a	155,3 ^a	99	1014,3 ^a	64,3 ^a	3,0 ^b
	Promedio general	1360,2	137,4	101	576,6	40,8	3,9

En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente entre sí según el test de comparaciones múltiples de diferencia mínima significativa (LSD) ($p \leq 0,05$).

Se tomaron dos situaciones extremas: la polinización cruzada (T5, sin malla) y la exclusivamente partenocárpica, sin auxilio hormonal.

La utilización de malla constituye una estrategia efectiva para reducir la polinización cruzada, lo que se traduce en una mayor proporción de frutos partenocárpicos. El tratamiento 4 (malla) se caracterizó por una disminución en el número de frutos con semillas, sin embargo, la cantidad total de frutos obtenidos fue inferior, dado que su formación dependió exclusivamente de la partenocarpia ya que *Afourer* es auto-incompatible.

Los resultados obtenidos indican que la implementación de mallas, la presencia de abejas polinizadoras y la aplicación exógena de ácido giberélico (GA3) inciden de manera significativa en el rendimiento frutal, tanto en términos cuantitativos (número y peso de los frutos) como cualitativos (presencia de semillas).

Sin embargo, ninguno de los tratamientos aseguró la ausencia de semillas. Se corroboró el hecho de que la polinización cruzada (T5) fue en la que se obtuvo una mayor cantidad de frutos y mayor peso de producción aunque los frutos fueron más pequeños y además con mayor proporción de frutos con semillas, seguido por el tratamiento con doble aplicación de GA3 (T3), que fue el tratamiento con el mayor número de semillas por fruto, pero con baja proporción de frutos con semillas en toda la producción. La polinización por abejas (T1) resultó en una situación intermedia, donde no hubo diferencias significativas en el peso total de la producción pero el peso del fruto individual fue el más alto, con un número de semillas aceptable y un porcentaje de frutos con semillas inferior a la polinización libre (T5).

El uso de mallas con colmenas intercaladas (T1) llevó a una elevada productividad, con un porcentaje intermedio de frutos sin semillas (54% en promedio). La acción de las abejas estimula la partenocarpia, contribuyendo a mejorar parámetros de calidad del fruto,

mientras que la malla actúa como barrera frente a insectos indeseados y minimiza la polinización cruzada.

El uso de mallas con una aplicación de GA3 a 30 ppm llevó también una buena productividad, con un porcentaje intermedio de frutos sin semillas (68,7% en promedio). La aplicación de dos dosis de GA3 favoreció la formación de frutos sin semillas, aunque el porcentaje de frutos con semillas resultó superior al observado en la condición de mallas en combinación con abejas.

Dado que no hubo diferencias significativas en el peso total producido, la elección de manejo puede basarse en calidad. T1 favoreció frutos más pesados y T2 logró una reducción significativa de frutos con semilla y de semillas por fruto, por lo que ambos tratamientos se perfilan como estrategias recomendables.

7.3.2 Análisis no dirigido mediante RMN

El análisis multivariado no supervisado de las muestras, realizado mediante PCA, mostró que las mismas se agrupan principalmente de acuerdo con la fecha de muestreo. Este patrón indica que, en cada etapa, los frutos presentaron diferencias en su composición global, lo que refleja la progresión fisiológica a lo largo del proceso de polinización y de los estadios iniciales de crecimiento.

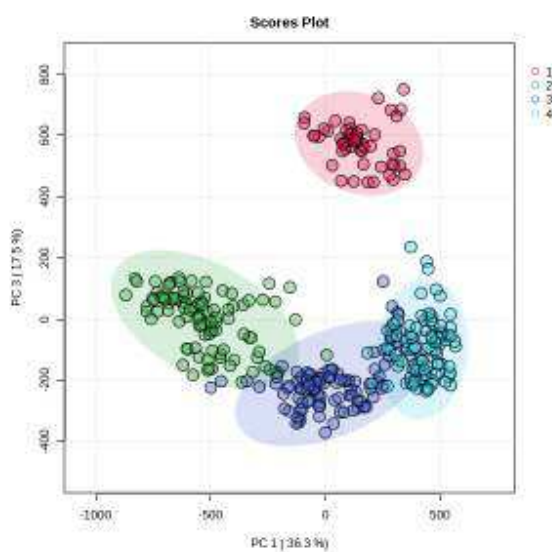


Figura 7.2 PCA de las muestras analizadas mediante RMN.

En la **figura 7.2** se observa la separación de las muestras correspondientes a los cuatro muestreos, lo que confirma la influencia del estado de desarrollo en la variación metabólica global. Con el fin de identificar las señales características de cada fecha de muestreo e identificar las vías metabólicas que se ven favorecidas durante el desarrollo del ovario, se realizó un PLS-DA y análisis de sus puntajes VIP (**Figura 7.3**). La calidad predictiva del modelo se evaluó mediante validación cruzada de tipo *5-fold*, obteniéndose los parámetros de precisión, R^2 y Q^2 . La robustez del modelo se corroboró mediante una prueba de permutación obteniendo un $p < 0,001$. En el modelo de 2 componentes, la precisión, R^2 y Q^2 fueron de 0,90; 0,86 y 0,86, respectivamente.

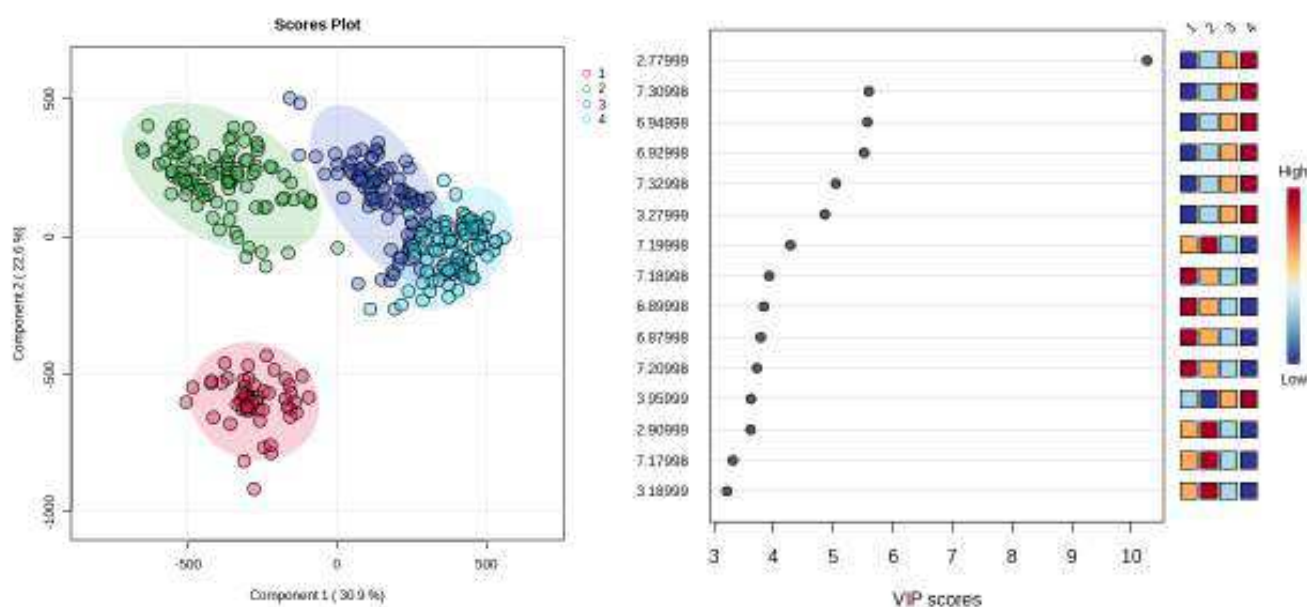


Figura 7.3 PLS-DA (izquierda) y puntajes VIP (derecha) del análisis realizado utilizando como variable clasificatoria la fecha de muestreo.

En los puntajes VIP se puede identificar un conjunto de señales espectrales para discriminar las distintas fechas de muestreo. En la primera fecha de muestreo se detectaron varias señales intensas en la región aromática, todas correspondientes a dobletes y agrupadas en dos conjuntos centrados en 7,19 y 6,88 ppm. Estas señales son características de flavonoides presentes en cítricos como hesperidina y quercetina, y sugieren una activación de la ruta de los fenilpropanoides en el momento de la polinización y cuajado. La acumulación temprana de metabolitos aromáticos indica que

el ovario activa mecanismos de defensa desde etapas iniciales del desarrollo. En la **figura 7.4** se pueden ver superpuestos los espectros de una de las plantas del T1 (abejas) a lo largo del proceso de muestreo. El perfil de las muestras es similar a lo largo del proceso de crecimiento del fruto, y se pueden observar señales que se intensifican/disminuyen a medida que el ovario comienza su etapa de transformación.

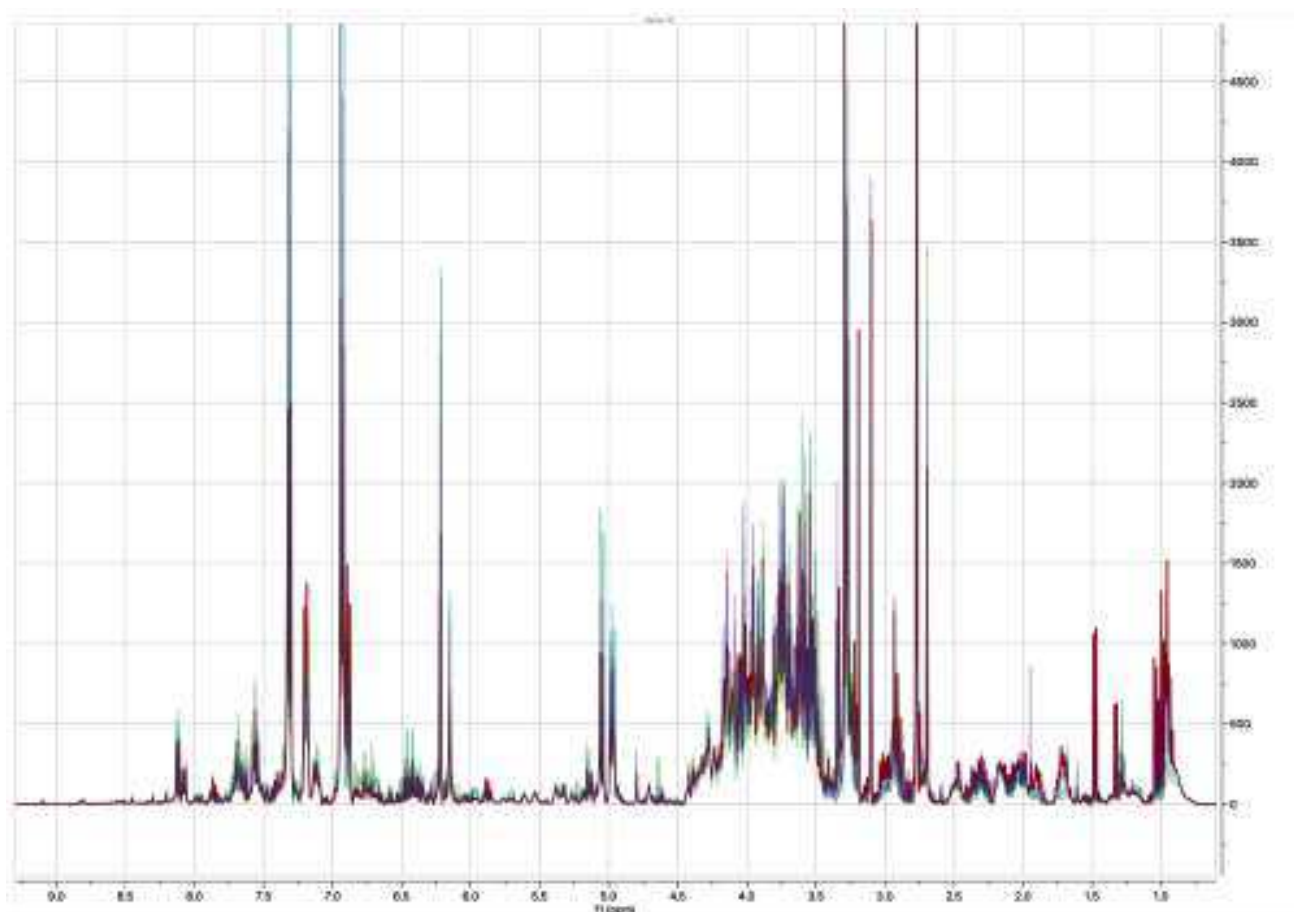


Figura 7.4 Espectros ^1H RMN superpuestos del tratamiento 1 (abejas) a lo largo del proceso de muestreo. M1 en rojo, M2 en verde, M3 en turquesa y M4 en violeta.

En la segunda fecha de muestreo se observaron tanto señales en la región aromática (7,19 ppm, d, coincidente con la señal identificada en el primer muestreo) como de colina (singulete en 3,19 ppm acoplado a carbono en 55 ppm) y otros compuestos *N*-metilados de aminas fenólicas como sinefrina (señales en 2,8 y 2,9 ppm, débilmente acopladas en COSY, sobre carbonos en 33 y 47 ppm respectivamente según HSQC). Esto indica que, además de mantenerse la síntesis de polifenoles, comienza a haber una mayor

contribución de metabolitos asociados a la osmoprotección de defensa, como ser alcaloides.

En la cuarta fecha se registraron nuevas señales distribuidas en diferentes regiones del espectro en 2,78 ppm y 3,28 ppm (s) posiblemente atribuibles a ácidos orgánicos (como el cítrico) y otros compuestos osmoprotectores como la glicina betaína. Las señales en 3,96 ppm, así como otras a campos más bajos, podrían corresponder a azúcares solubles como la glucosa o la fructosa. Esta señal también puede pertenecer al metoxilo de la hesperidina ya que en la región aromática se detectan señales de dobletes en 6,93 y 7,32 ppm. Para poder asignarlo sin ambigüedad, se estudió el HSQC y se encontraron correlaciones de esta señal en carbonos a 58 y 74 ppm, lo que sugiere la presencia de hesperidina por el acople del metoxilo como del glicósido. La persistencia de flavonoides en esta etapa, junto con la aparición de metabolitos de reserva, sugiere que el metabolismo del ovario integra tanto la defensa y regulación hormonal como la provisión de energía y precursores para sostener el crecimiento del fruto.

La evolución de estas señales indica que en las primeras etapas predomina la acumulación de compuestos fenólicos de defensa, en la segunda se inicia la acumulación de azúcares y otros metabolitos de defensa, y finalmente en la cuarta etapa se observa un patrón mixto en el que coexisten flavonoides y metabolitos primarios. Esto muestra la transición desde un metabolismo orientado a la protección y señalización durante la polinización, hacia uno más balanceado que incluye la provisión de energía y reservas en el desarrollo temprano del fruto.

El análisis de todas las muestras en conjunto no mostró diferencias significativas entre tratamientos cuando se consideraron todas las fechas del experimento. Por este motivo, se procedió a comparar los tratamientos de forma independiente en cada fecha de muestreo mediante PLS-DA.

Muestreo 1: apertura de la flor - antesis

Dado que el mallado no altera el microclima del cultivo, las diferencias entre el tratamiento 1 y el tratamiento 5 se atribuyen a la eficiencia de la comunidad de polinizadores (colmenas controladas vs polinización abierta).

En este muestreo, si bien se cuenta con las cinco parcelas (una para cada tratamiento), los tratamientos 2, 3 y 4 son equivalentes ya que no se ha aplicado GA3, por lo que corresponden a árboles cultivados bajo malla únicamente. En el PLS-DA de la **figura 7.5** se puede ver una separación parcial entre los diferentes tratamientos, siendo el tratamiento 1 (malla + abejas) el que más se distingue del resto de los tratamientos. Al analizar los puntajes VIP de dicho PLS-DA, la señal en 2,77 ppm se separa del resto de las señales clasificatorias por un amplio margen. Esta señal se corresponde con el ácido cítrico, que se encuentra en mayor proporción en el tratamiento 1 comparado con el resto de los tratamientos. El resto de las señales clasificatorias caracterizan a los otros tratamientos, pero tienen menor influencia en la separación. El T5 (polinización libre) se caracteriza principalmente por señales en la región de 4,0 – 3,4 ppm, asociadas a azúcares solubles, y en menor medida por una señal a 7,21 ppm (d), correspondiente a un protón aromático compatible con hesperidina. Este tratamiento también presenta una señal entre 3,7 – 3,9 ppm (s), asignada al grupo metoxilo de ese compuesto, como se discutió anteriormente. Los tratamientos 2, 3 y 4, que son equivalentes como se mencionó anteriormente, presentan niveles intermedios en las señales de mayor importancia en la clasificación para esta fecha de muestreo.

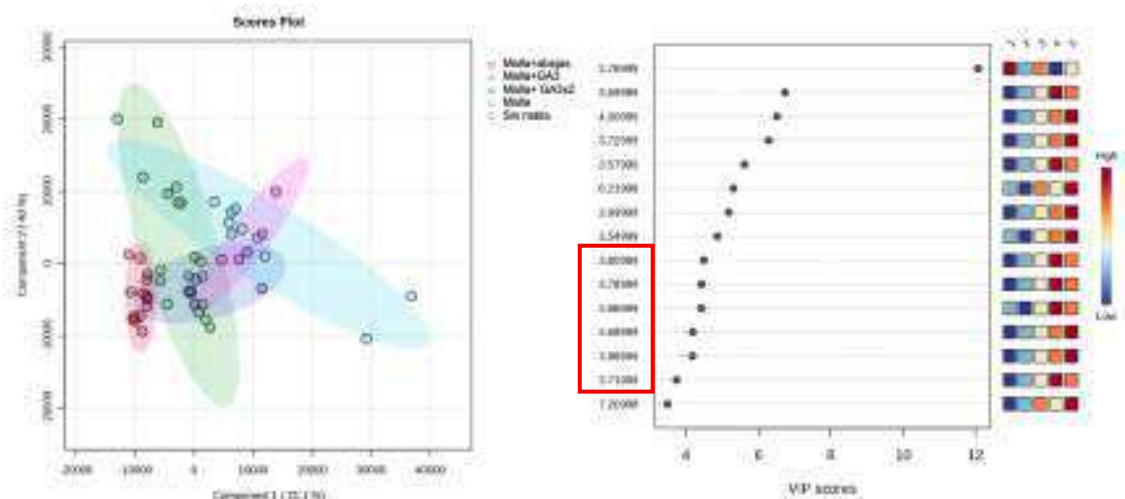


Figura 7.5 PLS-DA (izquierda) y puntajes VIP (derecha) del análisis realizado sobre los extractos del primer muestreo utilizando como variable clasificatoria los tratamientos.

Muestreo 2: flor sin pétalos y con estilos

En este muestreo los tratamientos 2, 3 y 4 también son equivalentes entre sí ya que no se ha aplicado GA3, por lo que corresponden a árboles cultivados bajo malla únicamente, con frutos desarrollados exclusivamente mediante partenocarpia. En el PLS-DA de la **figura 7.6** se puede ver un mayor solapamiento de los tratamientos aunque el tratamiento 1 y el 5 siguen siendo los más diferentes entre si. El análisis de los VIP scores muestra una mayor semejanza entre los niveles de las señales clasificatorias con relación al muestreo anterior. La señal correspondiente al ácido cítrico es mayoritaria en los tratamientos 1 y 2. Se observa una mayor influencia de señales correspondientes a compuestos fenólicos (8,1 – 5,8 ppm) como variables clasificatorias, tanto en el tratamiento 2 como el 5, lo que explica el mayor solapamiento de los grupos en el PLS-DA. La señal en 3,28 ppm (singulete) aparece como mayoritaria en el tratamiento 1. En base a su corrimiento químico, esta señal puede corresponderse al compuesto osmoprotector glicina betaina.

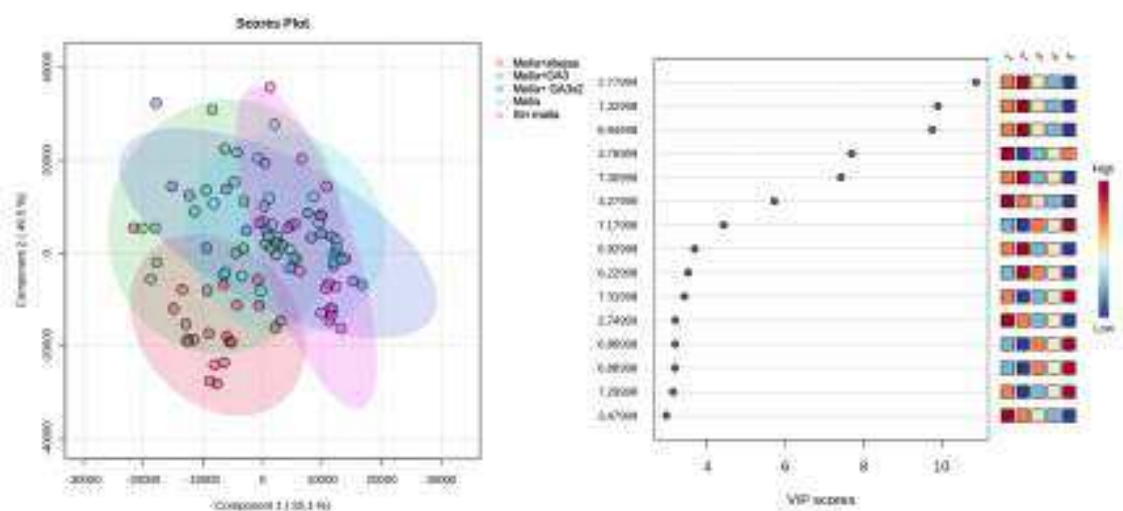


Figura 7.6 PLS-DA (izquierda) y puntajes VIP (derecha) del análisis realizado sobre los extractos del segundo muestreo utilizando como variable clasificatoria los tratamientos.

Para confirmar que la señal en 3,28 ppm corresponde con glicina betaína (**Figura 7.7**) se realizó un experimento de “spiking” con un estándar de este compuesto en uno de los extractos del tratamiento 1. La señal mantuvo su posición y aumentó su intensidad en el experimento de ^1H RMN, al igual que la señal en 3,9 ppm, lo que respalda su identidad. El experimento HSQC del extracto sin fortificar mostró únicamente dos correlaciones relevantes: la señal a 3,28 ppm correlacionó con un carbono a 54 ppm (CH_3 contiguo al nitrógeno cuaternario), mientras que la resonancia del metileno de la betaína a 3,9 ppm correlacionó con un carbono a 64 ppm (CH_2) (Hsieh et al., 2018; NCBI, 2025). El experimento HMBC del extracto mostró una correlación a larga distancia entre el CH_2 (3,9 ppm) y un carbono carbonílico en 170 ppm que se corresponde con el grupo carboxilo de la molécula. El COSY no mostró acoplamientos para estas señales, en concordancia con la ausencia de protones vecinales al CH_2 (ubicado entre el N^+ y el $\text{C}=\text{O}$) y con el carácter equivalente de los tres grupos metilo del nitrógeno cuaternario. Los resultados de estos experimentos permiten confirmar la presencia de glicina betaína en el extracto a partir de la señal de 3,28 ppm.

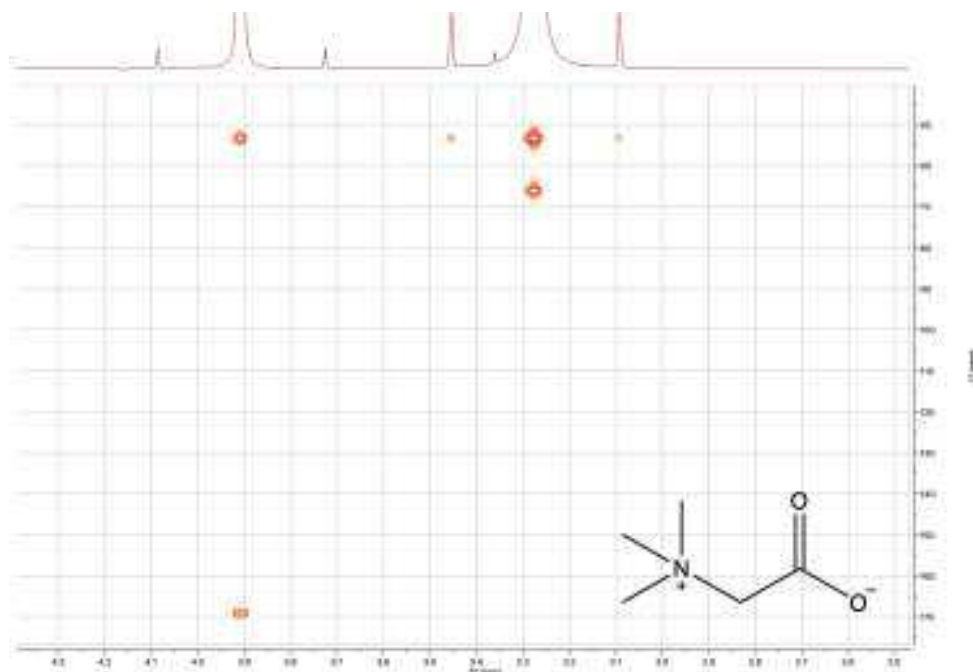


Figura 7.7 Estructura de la glicina betaína y su HMBC.

En este muestreo es posible distinguir las diferencias entre los diversos modos de polinización empleados durante el ensayo y sus efectos sobre la fisiología del desarrollo del ovario en los primeros estadios de formación del fruto.

De la comparación entre T1 y T4 es posible encontrar los efectos de la presencia de las abejas, ya que T1 corresponde a partenocarpia estimulada por estos polinizadores. Las señales diferenciales con T4, partenocarpia natural, pueden agruparse en tres grandes grupos: aquellas debidas a los grupos aromáticos, 5,8-8,5 ppm debidas a la presencia de polifenoles, las que se encuentran entre 3,0-3,8 ppm debidas a protones unidos a C-NHx como puede ser glicina betaina, prolina y otros osmoprotectores y el metoxilo de polifenoles como la hesperidina y por ultimo entre 2,5-3,0 ppm, donde se observan los protones adyacentes a ácidos orgánicos como como el citrico 2,6-2,7 ppm y protones debidos a la presencia de aminoácidos.

Por otro lado, la comparación entre T1 y T5 nos muestra las diferencias entre la polinización cruzada (T5) y la partenocarpia inducida por abejas (T1). En este caso, resulta interesante observar que la influencia de las abejas tiene un efecto significativo: promueve la presencia de una paleta de metabolitos secundarios característicos de etapas mas desarrolladas del fruto, como se vio en la **figura 7.3**.

Muestreo 3: flor sin pétalos y sin estilos

En esta etapa los tratamientos 2 y 3 recibieron la primer aplicación foliar de ácido giberélico (GA3) de 30 ppm 48 horas antes del muestreo. Esta aplicación sirve para mejorar el cuajado de la flor, aumentar el tamaño del fruto y reducir la caída prematura de frutos (Gravina, 2007). En la **figura 7.8** se puede ver el PLS-DA de esta fecha de muestreo, donde el solapamiento entre los tratamientos es todavía mayor que en el muestreo anterior. Esto indica que el cuajado del fruto influye más en este análisis que las diferencias entre los tratamientos. Los VIP scores muestran que el ácido cítrico predomina en el tratamiento con abejas, al igual que la señal correspondiente a la glicina betaína y polifenoles como la hesperidina. La mayoría de las señales relevantes diferencian la partenocarpia inducida por abejas (T1). Las señales de azúcares se alternan entre los diferentes tratamientos, lo que puede deberse a que todos los tratamientos se encuentran en una fase activa de crecimiento (cuajado del fruto) en el que se acumulan azúcares.

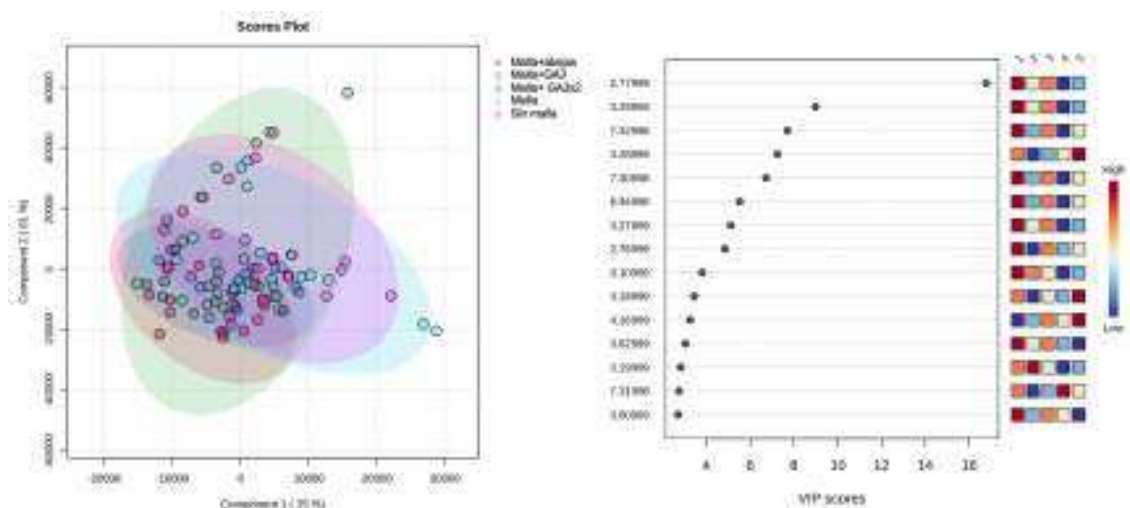


Figura 7.8 PLS-DA (izquierda) y VIP scores (derecha) del análisis realizado sobre los extractos del tercer muestreo utilizando como variable clasificatoria los tratamientos.

Muestreo 4: frutos formalmente cuajados de 4 a 5 mm de diámetro

En esta fecha el tratamiento 3 recibió su segunda aplicación foliar de ácido giberélico (GA3) 30 ppm 72 horas antes del muestreo. Si bien los grupos (tratamientos) se encuentran solapados en el PLS-DA (**Figura 7.9**), muestran una mayor separación comparada con el muestreo anterior. En este caso los tratamientos 1 y 5 se separan nuevamente. El análisis de los puntajes VIP muestra un aumento en la relevancia de las señales correspondientes a azúcares para los diferentes tratamientos, y la señal de la glicina betaína predomina en el T3 (doble aplicación de GA3). En este muestreo, la relevancia de la glicina betaína como regulador osmótico puede verse disminuida gracias a la gran acumulación de azúcares que favorecen la acumulación de agua durante el aumento del tamaño del fruto.

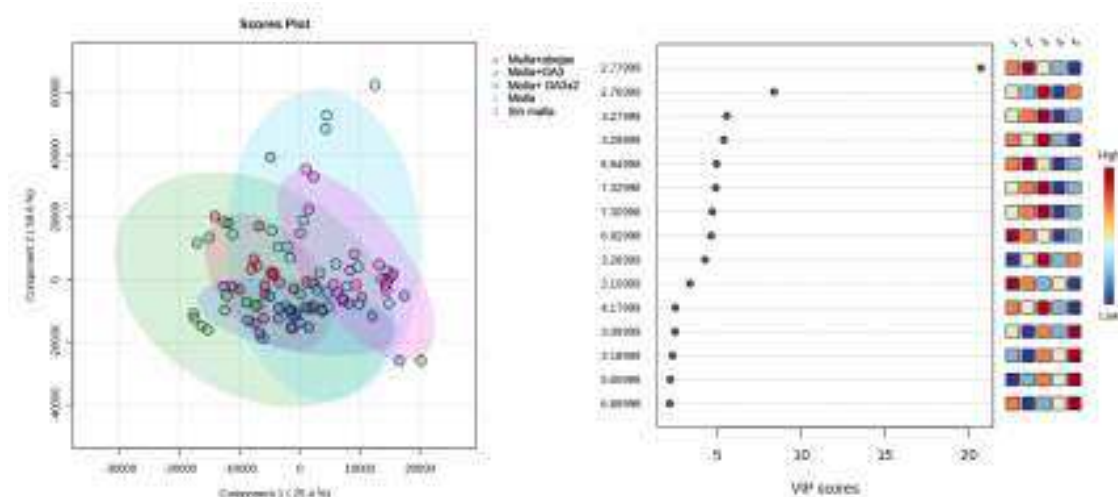


Figura 7.9 PLS-DA (izquierda) y puntajes VIP (derecha) del análisis realizado sobre los extractos del cuarto muestreo utilizando como variable clasificatoria los tratamientos.

La robustez de todos los modelos se confirmó mediante un test de permutaciones, el cual arrojó valores estadísticamente significativos ($p < 0,001$). En la validación cruzada, los modelos mostraron un buen coeficiente de ajuste (R^2) superior a 0,8 y poder predictivo (Q^2) alrededor de 0,7, lo que confirma la validez de la discriminación obtenida, a excepción del modelo correspondiente al muestreo 3 que presentó un poder predictivo inferior al resto Q^2 alrededor de 0,5 debido a la similitud de los diferentes tratamientos en esta etapa de crecimiento.

La diferenciación metabólica observada en las etapas tempranas del desarrollo del fruto sugiere que la glicina betaína cumple un rol central en la respuesta reproductiva de los cítricos frente a las condiciones de polinización. Este compuesto es ampliamente reconocido como un osmoprotector, cuya acumulación contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular bajo condiciones de estrés fisiológico. En el contexto de la formación del fruto, la glicina betaína puede favorecer la viabilidad del ovario y la correcta progresión de los eventos pospolinización, en particular en situaciones de limitada polinización cruzada, como ocurre en los tratamientos con malla.

Asimismo, la asociación de la glicina betaína con un incremento en señales de azúcares (que también funcionan como osmoprotectores) y metabolitos del ciclo de Krebs sugiere una interconexión entre la regulación osmótica y el metabolismo

energético. Los azúcares, además de su papel como fuente primaria de energía, participan como señales metabólicas que modulan procesos reproductivos, incluyendo el desarrollo del tubo polínico y la retención del fruto en sus primeras fases. El aumento de estas señales en los tratamientos con abejas desencadena una mayor demanda energética para sostener el crecimiento inicial del fruto.

En cítricos, la acumulación de osmoprotectores como la glicina betaína y otros aminoácidos como la prolina ha sido relacionada con mecanismos de tolerancia al estrés hídrico y salino. Sin embargo, en este estudio se destaca su posible implicancia en la estabilidad reproductiva, asegurando la formación del fruto aun bajo condiciones de polinización restringida. Este hallazgo es particularmente relevante si se considera que la producción de frutos sin semillas depende de una compleja interacción entre señales metabólicas y hormonales que determinan la retención o abscisión temprana del ovario.

7.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten establecer una visión integrada sobre el impacto de las prácticas de cultivo, la acción de polinizadores y la aplicación exógena de ácido giberélico en los procesos reproductivos y metabólicos iniciales de la mandarina Afourer, arrojando una primera imagen sobre la evolución del ovario fecundado hacia la formación del fruto. Desde una perspectiva productiva, el problema abordado consiste en maximizar la calidad comercial, obteniendo fruta con baja semillazón, sin sacrificar la productividad. En primer lugar, los datos productivos mostraron que el uso de mallas constituye una herramienta eficaz para reducir la polinización cruzada, promoviendo así la obtención de frutos partenocárpicos, aunque con un costo asociado en términos de rendimiento total. La incorporación de abejas bajo condiciones controladas de malla resultó en un escenario intermedio. Permitió la formación de frutos partenocárpicos más eficiente con un incremento en el número de frutos con semillas, pero mantuvo parámetros de calidad y productividad elevados. Por otro lado, la aplicación foliar de ácido giberélico (GA3) promovió un cambio en la dinámica de los ovarios, favoreciendo la formación de frutos sin semillas y adelantando la transición hacia un metabolismo característico de estadios posteriores de crecimiento. Estos resultados muestran que los manejos que modulan la polinización (aislamiento con malla, presencia o ausencia de

abejas y polinización abierta) inciden sobre la semillazón, mientras que la aplicación de GA3 y el uso de abejas confinadas generan señales fisiológicas asociadas al cuajado que desacoplan, al menos parcialmente, la relación entre formación de semillas y cuaje.

El análisis metabolómico no dirigido evidenció una variación en el metaboloma según la etapa de desarrollo, lo que refleja la progresión ontogénica del ovario desde la polinización hasta el cuajado. En las etapas más tempranas se observó una acumulación predominante de flavonoides, compuestos aromáticos y fenilpropanoides, todos ellos asociados a funciones de defensa y señalización. En este mismo período destacó la presencia de glicina betaína, cuya acumulación temprana sugiere un rol fundamental como osmoprotector en condiciones de polinización restringida. En etapas posteriores, la aparición de azúcares y metabolitos del ciclo de Krebs acompañó la transición hacia un metabolismo primario de crecimiento y generación de reservas. Esta evolución indica que el ovario, en su etapa inicial, prioriza la defensa y la señalización, para luego virar hacia la provisión de energía y la expansión celular una vez asegurado el cuajado. Esta secuencia refuerza que el ovario sigue un programa metabólico temporal, en el que las decisiones tempranas entre cuaje y abscisión comienzan a configurarse antes de que se estabilicen los perfiles asociados al crecimiento.

Al comparar los tratamientos, se vio que las diferencias son más evidentes en los muestreos iniciales. Este estudio permitió detectar diferencias en la evolución del ovario en partenocarpia inducida por abejas con relación a la partenocarpia natural. Se observa un metabolismo más activo en las dos primeras etapas del experimento del T1. La diferenciación entre este tratamiento y la polinización libre (T5) puede atribuirse a la distinta eficiencia de los polinizadores, lo que repercute en la fecundación y en las señales hormonales endógenas. La mayor proporción relativa de citrato observada en T1 durante los primeros muestreos indica que los tejidos en desarrollo funcionaron tempranamente acumulando recursos, con gran capacidad de captar compuestos fotoasimilados (carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos) y metabolitos derivados de las hojas. En los tratamientos con aplicaciones de GA3 (T2 y T3), el consumo más acelerado de citrato sugiere una transición más rápida hacia el metabolismo primario, lo que se vio como una homogeneización más temprana de los perfiles metabólicos entre los tratamientos. Los tratamientos 2, 3 y 4 (árboles mallados sin abejas ni GA3) representó una condición con

patrones menos definidos y menor robustez metabólica en etapas tempranas, lo que se tradujo en una productividad inferior (en etapas tempranas los tres tratamientos eran equivalentes) (**Figura 7.10**).

Se puede concluir que el metabolismo ovárico durante las fases iniciales de la polinización está fuertemente condicionado tanto por factores externos (tipo de polinización, presencia de abejas, restricción de polinización cruzada) como por modulaciones hormonales (aplicación de GA3). La similitud de los perfiles metabólicos en las etapas finales de muestreo, cuando se da el cuajado, muestra que una vez consolidado el fruto las rutas asociadas al crecimiento dominan el desarrollo metabólico, reduciendo las diferencias entre tratamientos. Sin embargo, las etapas iniciales y el uso de técnicas de cultivo resultan claves para el éxito reproductivo y para la determinación de la calidad final del fruto. La lectura integrada de los perfiles metabólicos y de las señales hormonales permite orientar decisiones productivas y anticipar sus consecuencias biológicas, al mostrar que la disponibilidad y el uso de carbono, junto con las señales de polinización, convergen en ventanas tempranas críticas para definir el destino reproductivo del ovario.

Este capítulo muestra que la etapa previa al cuajado constituye un momento crítico en la que las señales metabólicas y hormonales son decisivas para el destino reproductivo del ovario. La glicina betaína es uno de los metabolitos principales en la regulación osmótica en la etapa reproductiva inicial, mientras que el citrato y los azúcares permiten la transición entre la defensa inicial y el crecimiento temprano del fruto. La interacción de estas señales con la polinización y con el agregado exógeno de giberelinas muestra la importancia de comprender los mecanismos hormonales que se desarrollan en este período. Esta manera de interpretar el fenómeno coincide con trabajos que destacan la necesidad de integrar fisiología, datos ómicos y manejo para explicar los resultados agronómicos (Yang et al., 2021). En el siguiente capítulo, este trabajo deriva hacia un estudio dirigido de las giberelinas endógenas presentes en el ovario de mandarinas durante estas cuatro etapas de muestreo bajo los mismos tratamientos trabajados en este capítulo.



Figura 7.10 Principales resultados del capítulo 7, creado con NotebookLM.

7.5 Referencias bibliográficas

- Agustí, M., Zaragoza, S., Bleiholder, H., Buhr, L., Hack, H., Klose, R., & Stauss, R. (1995). *Escala BBCH para la descripción de los estadios fenológicos del desarrollo de los agrios (Gén. Citrus)*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/20.500.11939/7875>
- Basit, F., Alyafei, M., Hayat, F., Al-Zayadneh, W., El-Keblawy, A., Sulieman, S., & Sheteiwy, M. S. (2025). Deciphering the role of glycine betaine in enhancing plant performance and defense mechanisms against environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, Volume 16-2025. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2025.1582332>
- Castro-Moretti, F. R., Gentzel, I. N., Mackey, D., & Alonso, A. P. (2020). Metabolomics as an Emerging Tool for the Study of Plant–Pathogen Interactions. *Metabolites*. <https://doi.org/10.3390/metabo10020052>
- Chao, C.-C. T., Khuong, T., Zheng, Y., & Lovatt, C. J. (2011). Response of evergreen perennial tree crops to gibberellic acid is crop load-dependent. I: GA3 increases the yield of commercially valuable 'Nules' Clementine Mandarin fruit only in the off-crop year of an alternate bearing orchard. *Scientia Horticulturae*, 130(4), 743–752.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.036>
- CVVP. (2018). Nadorcott producers cover their crops with netting. Retrieved September 21, 2025, from <https://cvvpSpain.com/en/2018/09/20/nadorcott-producers-cover-their-crops-with-netting/>
- Davies, F. S. (1997). Growth regulators and fruit set of citrus. University of Florida. Retrieved from https://irrec.ifas.ufl.edu/postharvest/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Davies-Growth_Regulators_and_Fruit_Set.pdf
- Garmendia, A., Beltrán, R., Zornoza, C., García-Breijo, F. J., Reig, J., & Merle, H. (2019). Gibberellic acid in Citrus spp. flowering and fruiting: A systematic review. *PLOS ONE*, 14(9), e0223147. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223147>
- Gravina, A. (2007). Aplicación del ácido giberélico en Citrus: revisión de resultados experimentales en Uruguay. *Agrociencia*, 11, 57–66. Retrieved from <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:83720469>
- Gravina, A., Gambetta, G., Rey, F., & Guimaraes, N. (2016). Improvement of ‘Afourer’ Mandarin Productivity in Isolation of Cross- Pollination. *Agrociencia Uruguay*, 20(2), 22–28. <https://doi.org/10.31285/AGRO.20.2.4>
- Hsieh, L.-Y., Chan, H.-H., Kuo, P.-C., Hung, H.-Y., Li, Y.-C., Kuo, C.-L., ... Wu, T.-S. (2018). A feasible and practical ¹H NMR analytical method for the quality control and quantification of bioactive principles in Lycii Fructus. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 1105–1112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.001>
- Jackson, L. K., & Futch, S. H. (1997). Pollination and Fruit set: pollination requirement. University of Florida. Retrieved from https://irrec.ifas.ufl.edu/postharvest/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Jackson-Futch-Pollination_and_Fruit_Set.pdf
- Khan, N., Ali, S., Zandi, P., Mehmood, A., Ullah, S., Ismail, M. I., ... Babar, M. A. (2020). Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. *Pak. J. Bot.*, 52(2). [https://doi.org/10.30848/PJB2020-2\(24\)](https://doi.org/10.30848/PJB2020-2(24))
- Maupilé, L., Chaib, J., Boualem, A., & Bendahmane, A. (2024). Parthenocarpy, a pollination-independent fruit set mechanism to ensure yield stability. *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2024.06.007>

- Monasterolo, M., Ramírez-Mejía, A. F., Cavigliasso, P., Schliserman, P., Chavanne, V., Carro, C. M., & Chacoff, N. P. (2024). Animal pollination contributes to more than half of citrus production. *Scientific Reports*, 14(1), 22309. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-73591-6>
- NCBI. (2025). PubChem Compound Summary for CID 44584733. Retrieved September 22, 2025, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44584733>
- Ozturk, M., Turkyilmaz Unal, B., García-Caparrós, P., Khursheed, A., Gul, A., & Hasanuzzaman, M. (2021). Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1321–1335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppl.13297>
- Pereira Gonzatto, M., Griebeler, S. R., Klammer de Almeida, G., de Oliveira Munhoz, B., Sulzbach, M., & Schwarz, S. F. (2022). Parthenocarpy induction and reduction of seeds in fruits of “Nadorcott” mandarin. *Crop Production*, 69(2). <https://doi.org/0.1590/0034-737X202269020006>
- Ramos, L., Sáez, A., Aizen, M., & Morales, C. (2025). Bee pollination improves fruit quality in a crop with multi-pistillate flowers by increasing stigmatic pollen loads and the fraction of pistils receiving enough pollen. *Annals of Applied Biology*. <https://doi.org/10.1111/aab.70024>
- Santos, R. S. da, Carneiro, L. T., Peroba de Oliveira Santos, J., Silva, M. M. da, de Oliveira Milfont, M., & Castro, C. C. (2021). Bee pollination services and the enhancement of fruit yield associated with seed number in self-incompatible tangelos. *Scientia Horticulturae*, 276, 109743. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109743>
- Yang, Y., Saand, M., Huang, L., Abdelaal, W., Zhang, J., Wu, Y., ... Wang, F. (2021). Applications of Multi-Omics Technologies for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.563953>

8 Análisis dirigido de giberelinas por LC-MS/MS en ovarios de mandarina Afourer bajo diferentes técnicas de cultivo

8.1 Introducción

La transición del ovario a fruto en cítricos constituye uno de los procesos fisiológicos más determinantes para la productividad y la calidad comercial, particularmente en cultivares de mandarina con alta demanda de mercado por su bajo número de semillas o condición partenocárpica. Dentro de la variedad de frutas cítricas, los factores que influyen en el cuajado del fruto y la formación de semillas son variables y dependen de un balance entre señales de polinización, disponibilidad de recursos y regulación hormonal endógena, lo que explica la elevada variabilidad observada en campo cuando se modifican las condiciones de cultivo o el régimen de polinización. La horticultura moderna de cítricos busca, por un lado, sostener o incrementar el rendimiento bajo estrategias que reduzcan la producción de semillas (semillazón), y por otro, comprender los mecanismos fisiológicos de la respuesta del ovario a dichas estrategias de cultivo de manera de generar recomendaciones agronómicas sustentables y reproducibles.

Entre las fitohormonas involucradas, las giberelinas (GAs) ocupan un lugar central. Se trata de diterpenos tetracíclicos derivados de la vía del ácido mevalónico presentes en más de 130 formas estructurales, de las cuales sólo unas pocas son bioactivas (principalmente GA1, GA3, GA4 y GA7). Las GAs regulan el crecimiento vegetativo, la transición floral, la expansión celular y el desarrollo reproductivo, actuando en conjunto con auxinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico. Su biosíntesis y desactivación están reguladas por familias enzimáticas específicas (GA20ox, GA3ox, GA2ox), las cuales están sujetas a control por los niveles hormonales del órgano específico. En angiospermas, la rama 13-hidroxilada (GA12 → GA53 → GA20 → GA1 → GA8) suele aportar GA1 como forma activa dominante, mientras que la rama 13-no hidroxilada (GA12 → GA15 → GA24 → GA9 → GA4 → GA34) genera GA4 como giberelina

activa principal (**Figura 8.1**). La importancia relativa de cada rama varía entre tejidos, estadios y especies, reflejando una regulación de la señal giberelínica. Revisiones recientes muestran estos aspectos, destacando la plasticidad evolutiva y fisiológica del metabolismo de GAs en plantas con flor y su rol integrador en el desarrollo reproductivo (Hedden, 2020), así como la relevancia de las hidroxilaciones específicas (incluida C-13) para definir perfiles de GAs bioactivas y sus precursores inmediatos (J. He, Xin, Xueting, Chu, & Wang, 2020).

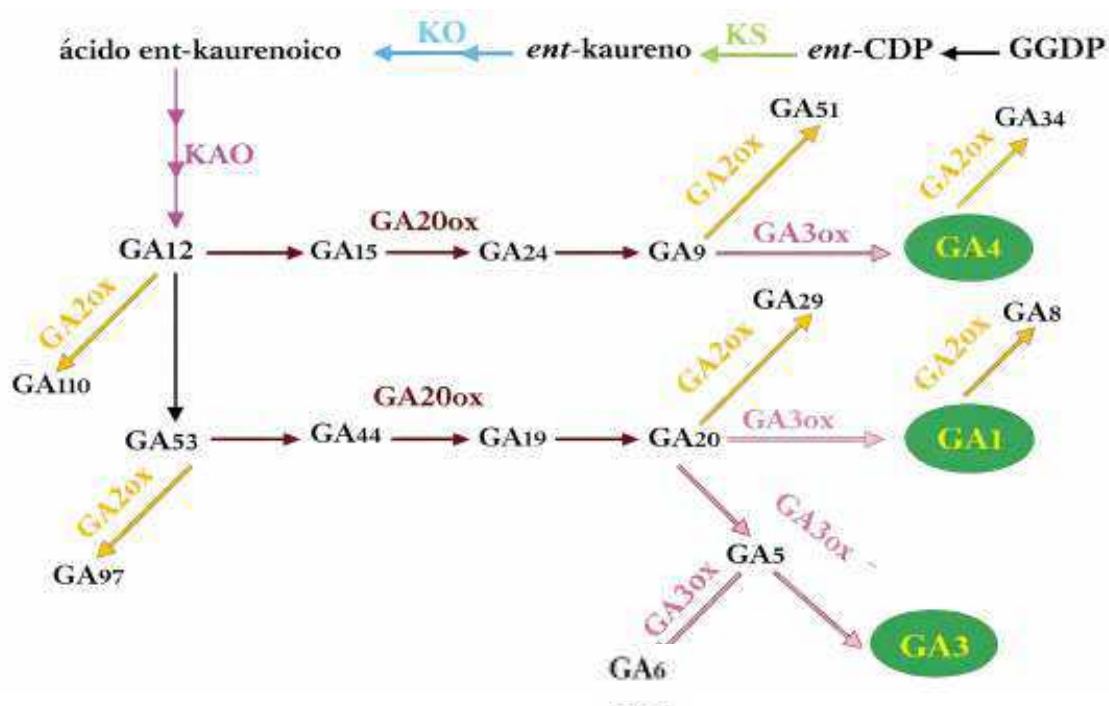


Figura 8.1 Biosíntesis de las principales giberelinas bioactivas (GA4, GA1 y GA3), derivadas de ramas hidroxilada (GA1/GA3) y no-hidroxilada (GA4), adaptada de (G.-L. Wang et al., 2015). Enzimas implicadas: KS (*ent*-kaureno sintasa), KO (*ent*-kaureno oxidasa), KAO (ácido *ent*-kaurenoico oxidasa), GA2ox (giberelina 2-oxidasa), GA20ox (giberelina 20-oxidasa) y GA3ox (giberelina 3-oxidasa).

En cítricos las giberelinas son imprescindibles para el establecimiento del fruto, incluso en contextos de cuajado sin fecundación (Bermejo et al., 2018). El factor genético responsable de la partenocarpia estimula altos contenidos de hormonas en los ovarios durante la antesis e inmediatamente después de ella. Estudios histológicos y fisiológicos en especies partenocárpicas demostraron que la señal giberelínica activa la división celular de la pared del ovario tras la antesis, promoviendo el crecimiento inicial del fruto inclusive en ausencia de semillas (Mesejo et al., 2016).

La polinización incrementa tempranamente el contenido de GAs en ovarios de variedades con semilla, reduciendo la abscisión y favoreciendo la transición a fruto. Las aplicaciones exógenas de GA3 pueden mimetizar parcialmente ese efecto en flores no polinizadas (Ben-Cheikh, Perez-Botella, Tadeo, Talon, & Primo-Millo, 1997). Estos antecedentes generan la hipótesis de que diferentes estrategias agronómicas, que alteran el éxito de polinización o el estado hormonal floral, inciden directamente sobre la dinámica de las giberelinas endógenas en el ovario, condicionando el cuajado y la semillazón.

La relevancia agronómica de estas características fisiológicas es muy importante en la producción de cítricos, y en particular para la variedad Afourer que presenta un alto valor comercial, especialmente para exportación. La producción comercial busca frutos de buena calidad con número mínimo de semillas, lo que hasta ahora se ha logrado mediante aislamiento parcial o total de polinización cruzada (mallas), manejo de polinizadores y/o aplicaciones hormonales a plena floración. En Uruguay y en otras zonas citrícolas, aplicar GA3 en forma foliar durante la floración, ya sea sola o junto con prácticas como el anillado, suele aumentar el cuajado y el número de frutos cuando los árboles están aislados de la polinización. La magnitud de este efecto varía según la carga de frutos del árbol, las condiciones ambientales y el momento fenológico en el que se aplica (Gravina, Gambetta, Rey, & Guimaraes, 2016). A escala global, una revisión sistemática ha mostrado que tratamientos con GA3 en plena floración suelen aumentar el cuajado, pero no siempre se traducen en mayor rendimiento final. Estudios en cítricos muestran que estos efectos son variables y fuertemente dependientes de la carga de cultivo y de las condiciones ambientales (Garmendia et al., 2019). Además, en mandarinas como Afourer se ha comprobado que tratamientos combinados GA3 + CuSO₄ reducen el número de semillas por fruto, aunque con eficiencias moderadas (reducciones del orden del 30–40 %) y con una respuesta dependiente del contexto productivo (Garmendia et al., 2019; Kheder, Elmenofy, & Rehan, 2019; Mohamed & Elgammal, 2018; Otero & Rivas, 2017). Estos antecedentes subrayan la necesidad de comprender la correlación hormonal endógena detrás de cada manejo.

Las giberelinas más relevantes en cítricos son GA1 (bioactiva endógena) y GA3 (ampliamente utilizada de forma exógena), junto con sus precursores y/o catabolitos

(GA19, GA20, GA29, GA8). Estas fitohormonas regulan la intensidad de la floración, el cuajado del fruto (incluida la partenocarpia), el crecimiento del fruto y de la cáscara, la maduración y la coloración, así como las respuestas al estrés abiótico y biótico (Gao & Chu, 2020). Esto convierte a las rutas de señalización y metabolismo de giberelinas en objetivos prioritarios tanto para la investigación básica como para el manejo agrícola (Alfárez, De Carvalho, & Boakye, 2021; Bermejo et al., 2018; Garmendia et al., 2019; Mesejo et al., 2016; Rahma, Budiarto, Mubarak, & Abdullakasim, 2024). La GA4 (bioactiva endógena) es importante para la floración y el crecimiento del fruto en cítricos, principalmente al promover la división celular del ovario/fruto y la resistencia a la abscisión. Sin embargo, un exceso de GAs antes de la inducción floral suprime la floración y no aumenta el rendimiento productivo (Garmendia et al., 2019; Mesejo et al., 2016). La mayoría de los tratamientos agronómicos en cítricos aplican GA3 de manera exógena, pero las GAs endógenas de tipo GA1/GA4 son las formas activas en el crecimiento del ovario y los brotes. En tomate, la sobreexpresión de la GA20-oxidasa cítrica desplazó la síntesis hacia GA4, aumentando sus niveles y demostrando que tiene una bioactividad similar a GA1 en la promoción del crecimiento del tallo y el desarrollo del fruto partenocárpico. Esto respalda que GA4 sea una potente GA activa en los tejidos del fruto (García-Hurtado et al., 2012).

La polinización por insectos es un factor productivo clave para cítricos. Modelos y simulaciones estiman que alrededor del 60% del rendimiento por hectárea puede atribuirse a la polinización por insectos, con probabilidad de cuajado más de dos veces mayor en flores polinizadas (Monasterolo et al., 2024). En mandarinas se ha observado que la presencia de abejas melíferas en exceso puede deteriorar atributos de calidad, mientras que polinizadores nativos aumentan el cuajado sin ese costo. Esto agrega un componente ecológico adicional a tener en cuenta al momento del diseño de esquemas de manejo (Monasterolo, Chacoff, Segura, Benavidez, & Schliserman, 2022), y refuerza la importancia de estudiar simultáneamente las técnicas agronómicas (tipo de malla, régimen de polinización, aplicaciones de GA3) y la variación metabólica/hormonal del ovario bajo estas condiciones.

La cuantificación de giberelinas endógenas en tejidos reproductivos presenta desafíos analíticos específicos, ya que las concentraciones de estos metabolitos son muy bajas

(ng/g o inferiores) y presentan una alta diversidad estructural. En efecto, estas matrices vegetales son complejas, ricas en azúcares, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. A su vez, la disponibilidad de muestra es limitada cuando se trabaja con ovarios en precuajado, lo que obliga a la miniaturización de los procedimientos analíticos. Las revisiones metodológicas muestran que la etapa de preparación de muestra es el paso más complejo en el estudio cuantitativo de fitohormonas, requiriendo estrategias de extracción y limpieza que maximicen la recuperación sin comprometer la selectividad (Vrobel & Tarkowski, 2023). Tradicionalmente, los protocolos para GAs en tejidos vegetales incorporan una etapa de extracción con solvente orgánico seguida de etapas de preconcentración y limpieza usando extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos poliméricos o de C18. Si bien la SPE mejora la pureza del extracto, aumenta costos, tiempo, consumo de solvente y pérdidas de analitos por retención diferencial, lo que es detrimental cuando la disponibilidad de muestra es reducida y el número de réplicas es alto (De La Serna Calleja, Bolado, Jiménez, & López-Serna, 2023).

El uso de metodologías alternativas tipo QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), que son variantes de dispersive-SPE (d-SPE), han ganado protagonismo para analitos polares y semipolares traza (Anastassiades, Lehotay, Štajnbaher, & Schenck, 2003), incluyendo reguladores del crecimiento vegetal (Lozano, Pérez-Parada, Heinzen, & Fernández-Alba, 2012). Estas estrategias emplean partición acetonitrilo/agua junto con sales (MgSO_4 y otras) y una limpieza posterior con sorbentes (C18, carbón grafitizado, PSA), permitiendo remover interferentes con mínima manipulación. Métodos QuEChERS-LC-MS/MS han mostrado recuperaciones adecuadas y límites de cuantificación bajos para múltiples hormonas y reguladores en matrices vegetales complejas, destacando su aplicabilidad para análisis de alto rendimiento sin usar la SPE convencional (Pu, Lin, Chuang, & Shyu, 2018) y para cuantificación simultánea de fitohormonas mediante LC-MS/MS en hojas u otros tejidos (W. Wang et al., 2024). En este marco, la adaptación y validación de estos enfoques en ovarios de cítricos adquieren gran importancia, ya que permitiría no solo disminuir los costos y tiempos de análisis, sino también analizar cantidades de tejido del orden de miligramos, preservando la representatividad biológica e incrementando el número de réplicas de extracción.

El análisis hormonal que se presenta en este capítulo sigue un enfoque de metabolómica dirigida, el cual se orienta a cuantificar con exactitud un conjunto definido de metabolitos pertenecientes a un sistema biológico o ruta metabólica específica. A diferencia de la metabolómica no dirigida, que busca una cobertura amplia del metaboloma, el abordaje dirigido maximiza la sensibilidad, linealidad y comparabilidad intermuestras, siendo particularmente apropiado para hormonas vegetales. Las plataformas actuales de análisis integral de fitohormonas (“plant hormonomics”) han mostrado que los enfoques dirigidos permiten seguir cómo varían esas hormonas en distintos tejidos y momentos del desarrollo con mucha precisión, incluso cuando se dispone de poca cantidad de muestra vegetal (Šimura et al., 2018). Además, la cuantificación dirigida por LC-MS/MS en modo MRM se ha consolidado como estándar para hormonas por su selectividad frente a isómeros, baja interferencia y gran capacidad multianalito (Jorge, Mata, & António, 2016).

Este capítulo plantea el análisis metabolómico dirigido de giberelinas pertenecientes a ambas ramas biosintéticas en ovarios de mandarina Afourer usando el mismo material vegetal y los tratamientos agronómicos empleados previamente, con el objetivo de estudiar la dinámica giberélica durante diferentes etapas de la floración/polinización. Para ello, se desarrolla y valida una metodología de extracción y purificación basada en un esquema de tipo QuEChERS/d-SPE que evita el uso de SPE convencional, manteniendo la sensibilidad y selectividad requeridas para su cuantificación por LC-MS/MS. A partir de esta estrategia analítica se cuantifican las giberelinas seleccionadas en ovarios recolectados en distintos momentos del desarrollo temprano del fruto, y se analiza cómo varían sus perfiles endógenos frente a diferentes combinaciones de manejo agronómico y formas de polinización.

8.2 Metodología

8.2.1 Material vegetal

Se trabajó con el mismo material vegetal descrito en el Capítulo 7 (7.2.1), correspondiente a 5 tratamientos: árboles mallados con colmenas intercaladas (tratamiento 1, T1), árboles mallados con una aplicación de ácido giberélico (GA3) foliar a 30 mg/kg (tratamiento 2,

T2), árboles mallados con dos aplicaciones de ácido giberélico (GA3) foliar a 30 mg/kg (tratamiento 3, T3), árboles mallados (partenocarpia natural, tratamiento 4, T4) y árboles sin malla (polinización cruzada, tratamiento 5, T5).

Los muestreos se realizaron en los siguientes momentos: apertura de la flor - antesis, estadio 61 según codificación BBCH (Agustí et al., 1995, muestreo 1, M1), flor sin pétalos y con estilos, estadio 67 BBCH (muestreo 2, M2), flor sin pétalos y sin estilos, fruto cuajado, estadio 71 BBCH (muestreo 3, M3), y frutos formalmente cuajados de 4 a 5 mm de diámetro, en crecimiento, estadio 71 BBCH (muestreo 4, M4).

8.2.2 Compuestos de referencia

Se seleccionaron giberelinas pertenecientes a ambas ramas de su biosíntesis. Las giberelinas GA20 (CAS 19143-87-4), GA1 (CAS 545-97-1) y GA8 (CAS 7044-72-6) pertenecen a la rama de giberelinas hidroxiladas C-13, y las GA9 (CAS 427-77-0), GA4 (CAS 468-44-0) y GA34 (CAS 32630-92-5) a la de giberelinas no hidroxiladas en C-13. Todos los compuestos se adquirieron en OlChemim Ltd (Olomouc, República Checa). En la **figura 8.2** se muestran las estructuras de las giberelinas estudiadas.

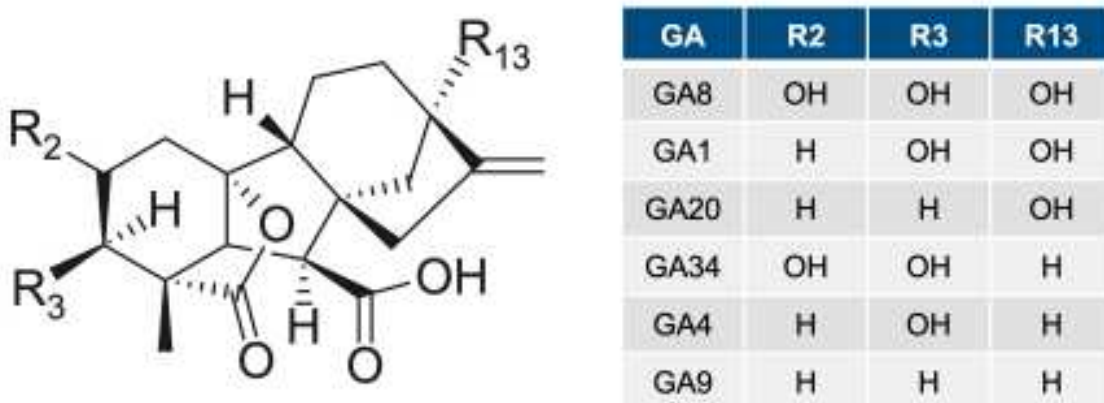


Figura 8.2 Estructura de las giberelinas seleccionadas para este estudio.

8.2.3 Extracción

Se pesaron 100 ± 5 mg de los ovarios de mandarina Afourer liofilizados y molidos en un tubo Eppendorf de 2 mL en balanza analítica (Shimadzu ATX224, Japón), se agregó 1,00

mL de buffer acético/acetato pH = 3,8 (0,1M, solución preparada según la sección 4.1.3 de la Farmacopea Europea 7.0), se homogeneizó manualmente y se dejó en reposo durante 10 min. Se agregó 1,00 mL de acetonitrilo calidad HPLC (J.T. Baker, Estados Unidos) y se agitó mecánicamente usando vórtex (MSV-3500, plataforma SV-8/15, BioSan, Letonia) durante 1 min a 1800 rpm. Se agregaron 400 mg de MgSO_4 (74 μm , Scharlab, España), se homogeneizó manualmente, se agitó mecánicamente en vórtex durante 5 min a 1800 rpm y se centrifugó (modelo y marca de centrífuga) durante 6 minutos a $3000 \times g$. Se tomó el sobrenadante ($\approx 900 \mu\text{L}$) y se trasvasó a tubo Eppendorf de 1,5 mL conteniendo 150 mg de MgSO_4 , 50 mg de C18 (40-60 μm , Scharlab, España) y 50 mg de carbón grafitizado (37-125 μm , Scharlab, España). Se homogeneizó manualmente, se agitó mecánicamente en vórtex durante 1 min a 1800 rpm y se centrifugó durante 6 min a $3000 \times g$. Se filtró el sobrenadante ($\approx 600 \mu\text{L}$) mediante membrana de PVDF de 0,22 μm a un vial de inyección para su posterior análisis por LC-MS/MS. Se realizaron cinco réplicas de extracción de cada planta muestreada.

8.2.4 Análisis instrumental

Los extractos filtrados fueron analizados empleando un sistema de cromatografía líquida Ultimate 3000 (Thermo, Estados Unidos), con loop de inyección de 130 μL , muestreador automático WPS-3000 SplitLoop (Thermo, Estados Unidos), bomba LPG-3400SD (Thermo, Estados Unidos) y compartimiento de columna TCC-3000 (Thermo, Estados Unidos) acoplado a un detector de masas de triple cuadrupolo TSQ Fortis (Thermo, Estados Unidos). Se utilizó una columna de separación de fase reversa Hypersil Gold aQ (Thermo, Estados Unidos) de 150 mm $\times$ 4,6 mm, con un tamaño de partícula de 5 μm y fase estacionaria C18 y los cromatogramas se analizaron utilizando el software Chromeleon versión 7.2.10 (Thermo, Estados Unidos). La fase móvil consistió en una mezcla de ácido fórmico (0,1 %, v/v) (FMA) y ácido fórmico en metanol (0,1%, v/v) (FM B) a un flujo de 0,6 mL/min a 25 °C durante toda la cromatografía. Las condiciones iniciales (previas a la inyección) fueron al flujo y temperatura indicados con una composición de fase móvil FMA/FM B (80:20). El gradiente empleado fue el siguiente: 1) se incrementó el componente orgánico (FM B) hasta alcanzar a los 20 min una composición de FMA/FM B (10:90); 2) se mantuvo esta composición hasta alcanzar los 24

min; 3) se volvió en 1 minuto a condiciones iniciales; 4) se mantuvo el sistema en condiciones iniciales durante 5 min. El volumen de inyección fue de 10 µL. La detección MS/MS se realizó en el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) utilizando una interfaz ESI en el modo de ionización negativa. El voltaje de ionización fue de 3500 V, el gas nebulizador y el gas de cortina fue nitrógeno a 60 y a 15 psi respectivamente. La evaporación del solvente en la fuente fue asistida por un gas de secado (nitrógeno calentado a 375 °C/50 psi). Se realizaron experimentos con soluciones de los analitos individuales para determinar las transiciones SRM óptimas, las energías de colisión (CE) y los potenciales de desagrupamiento (DP) para cada compuesto individual. Para ello, las soluciones estándar de las giberelinas seleccionadas (5 mg/kg en metanol) se infundieron directamente en el instrumento mediante una jeringa a flujo constante (Chemyx, modelo F100T2, China). Las transiciones obtenidas durante la optimización coincidieron con las reportadas en literatura (Urbanová, Tarkowská, Novák, Hedden, & Strnad, 2013).

8.2.5 Validación del método analítico

La linealidad del método se evaluó calculando el coeficiente de determinación (R^2) a partir de las áreas obtenidas al inyectar soluciones estándar de giberelinas en un rango de concentración de 0,5 a 100 µg/L. Se preparó una curva a los mismos niveles que en solvente pero utilizando como solvente un extracto de ovarios obtenido según la metodología descrita anteriormente (8.2.3 Extracción) y se evaluó el efecto matriz comparando las pendientes obtenidas en ambas curvas (solvente y matriz).

Se determinó la recuperación fortificando 100 mg del material vegetal seco y molido con 5 µL de un mix conteniendo los analitos a una concentración de 1 mg/L (recuperación a 50 µg/kg) y otro set de muestras con 5 µL de un mix conteniendo los analitos a una concentración de 10 µg/L (recuperación a 0,5 µg/kg). Este material fortificado fue sometido al procedimiento de extracción y análisis y el porcentaje de recuperación fue calculado para cada giberelina. La exactitud fue evaluada con 5 réplicas de la prueba de recuperación, y la precisión fue evaluada mediante el RSD de esta misma prueba. Se determinó la precisión intermedia mediante el RSD de la prueba de recuperación realizada en diferentes días.

Se determinaron los límites de cuantificación (LOQ) para cada giberelina como la concentración más baja en la curva de calibración en matriz donde la relación señal/ruido es mayor o igual a 10.

8.2.6 Análisis estadístico

Se emplearon métodos estadísticos paramétricos en el software libre RStudio Version 1.2.5033 (Estados Unidos) para analizar los datos bajo los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, los cuales se verificaron previamente mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente. Para comparar las medias de los grupos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). En caso de obtener resultados significativos, se llevó a cabo un análisis post-hoc utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey con corrección de Bonferroni, permitiendo identificar los pares de grupos con diferencias significativas con valores de significancia de $\alpha = 0,05$.

Se emplearon métodos estadísticos no paramétricos para la comparación de medias debido a la ausencia de supuestos de normalidad en los datos. Para dos grupos, se utilizó el test de Wilcoxon-Mann-Whitney, y para más de dos grupos, el test de Kruskal-Wallis, seguido por el test de Dunn con corrección de Bonferroni para comparaciones post-hoc significativas, interpretándose los valores de significancia con un umbral de $\alpha = 0,05$.

8.3 Resultados y discusión

La metodología empleada para el análisis por espectrometría de masas en tándem tipo tripe cuadrupolo, permite el análisis dirigido, esto implica que solo es posible el análisis de aquellos compuestos para los que se tienen estándares analíticos. En ese marco, se trabajó con los estándares disponibles en el mercado. Se seleccionaron aquellas GAs identificadas como relevantes en cítricos. La presencia de otras GAs en las muestras, por lo tanto, no fue investigada.

8.3.1 Validación

Luego de numerosos intentos para desarrollar un método miniaturizado, con precisión y exactitud adecuados dentro de lo exigible para el análisis de trazas, se logró el protocolo que se describe en el experimental.

Los parámetros utilizados para la validación del método se evaluaron para cada giberelina estudiada, considerando exactitud mediante porcentaje de recuperación y precisión mediante desviación estándar relativa (RSD). Para ello, se realizaron ensayos de fortificación sobre una muestra de ovarios correspondiente al muestreo 4 bajo polinización abierta (T5), seleccionada por ser el material vegetal disponible en mayor proporción. Las fortificaciones se efectuaron a 0,5 y 50 µg/kg para cada giberelina. En estas condiciones, las giberelinas cuantificadas presentaron recuperaciones comprendidas entre 81 y 105%, con RSD entre 4 y 12% (en todos los casos <20%), confirmando un desempeño adecuado en términos de exactitud y precisión al mínimo nivel ensayado: GA1 81% (RSD 12%), GA20 104% (RSD 4%), GA34 101% (RSD 9%), GA4 87% (RSD 11%) y GA9 105% (RSD 10%). La GA8 no se recuperó de manera consistente (recuperación no reproducible, RSD > 40%), por lo que fue excluida del alcance del estudio. La linealidad de la respuesta instrumental se verificó en el rango de trabajo considerado, cumpliendo los criterios de aceptación establecidos para el método.

Las curvas de calibración en solvente y en matriz se construyeron a partir de los estándares a 7 niveles de concentración entre 0,5 y 100 µg/L. El efecto matriz fue calculado comparando la pendiente de las curvas para cada analito y el mismo varió entre -18 y 5%, por lo que al ser inferior al 20% en valor absoluto para todos los casos (efecto matriz bajo), se procedió a cuantificar usando las curvas en solvente. La mayoría de los compuestos presentó supresión de la señal (efecto matriz negativo) salvo para GA8 y GA9. Esto se explica por el hecho de que el efecto matriz depende de si un analito coeluye con otros componentes de la matriz de la que fueron extraídos, afectando la eficiencia de ionización en la fuente (ESI), provocando una disminución de la señal en la mayoría de los casos. El rango lineal para todos los analitos estuvo entre 0,5 y 100 µg/L. Los límites de cuantificación (LOQ) fueron de 0,5 µg/L para todos los analitos. En la **figura 8.3** se

muestra el orden de elución y el factor de respuesta de los analitos estudiados evaluados a la misma concentración.

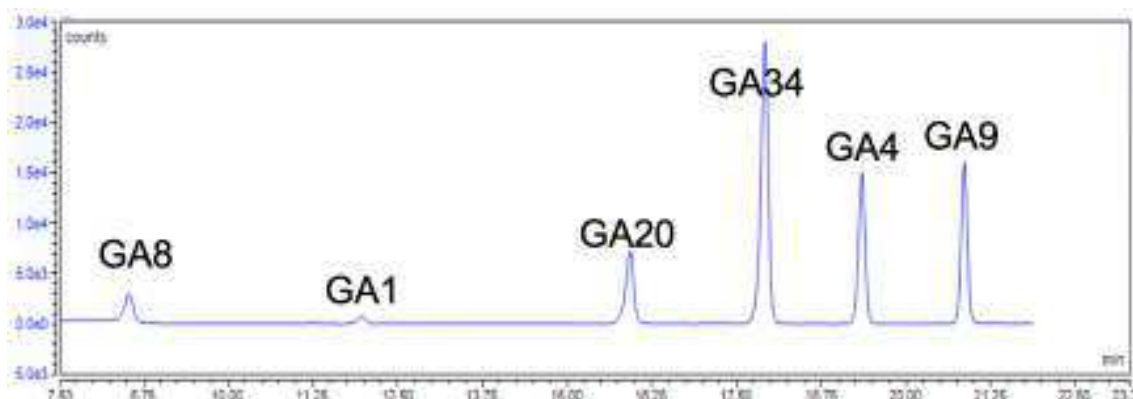


Figura 8.3 Cromatograma de un mix de las giberelinas seleccionados para el estudio.

8.3.2 Cuantificación de giberelinas en los distintos tratamientos y muestreos

Al igual que en el capítulo anterior, es importante destacar que durante los muestreos M1 y M2, los tratamientos T2, T3 y T4 son equivalentes ya que la primera aplicación de GA3 en los tratamientos T2 y T3 se realizó previo al muestreo M3, y la segunda aplicación de GA3 en el tratamiento T3 se realizó previo al muestreo M4 (**Figura 7.1**). Por otro lado, se estudia el flujo de giberelinas endógenas, si bien GA3 es endógena y es bioactiva, fue excluida del estudio de cuantificación en ovarios ya que fue aplicada en dos de los tratamientos.

A diferencia de GA1 y GA9, que se detectaron en todas las muestras analizadas, las giberelinas GA20, GA34 y GA4 fueron detectadas en algunas muestras dependiendo de la combinación fecha $\times$ tratamiento (**Figura 8.4**). GA20 se registró en 111 determinaciones (28 % del total), GA34 en 120 determinaciones (30 %) y GA4 sólo en 17 determinaciones (4 %). Dado que su presencia no fue uniforme entre tratamientos ni fechas de muestreo, se muestran únicamente los resultados generales y los casos en los que se observó algún comportamiento repetido dentro de una misma condición experimental.

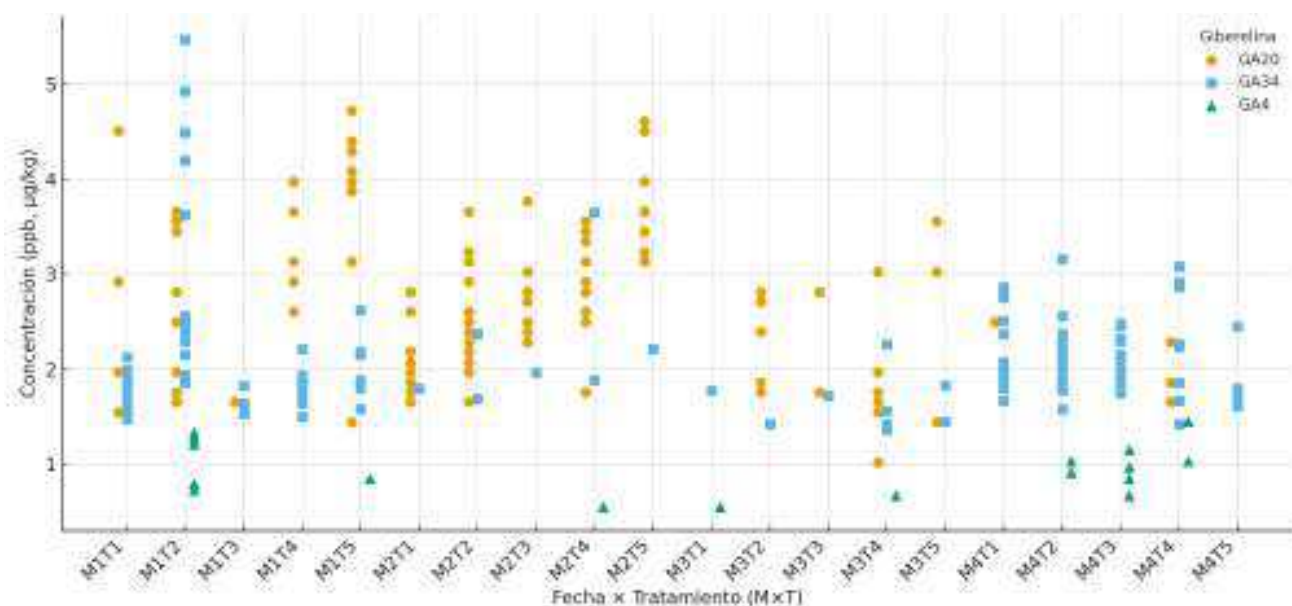


Figura 8.4 Concentración ($\mu\text{g/kg}$) de GA20, GA34 y GA4 por fecha (M1-M4) y tratamiento (T1-T5).

La detección de GA20, precursora biosintética de GA1, fue amplia pero heterogénea entre diferentes combinaciones fecha y tratamiento. En M1, se observó una gran dispersión con valores altos en el T5 ($3,75 \mu\text{g/kg}$) y el T4 ($3,38 \mu\text{g/kg}$), mientras que el resto de los tratamientos mostraron rangos intermedios (medias entre $1,65$ y $2,74 \mu\text{g/kg}$). En M2, GA20 volvió a detectarse en todos los tratamientos, destacando el T5 (sin malla) con valores altos (entre $3,13$ y $4,61 \mu\text{g/kg}$) y niveles moderados en el resto de los tratamientos (medias entre $2,11$ y $2,83 \mu\text{g/kg}$). En M3, la presencia fue más variable, el T5 mostró pocas detecciones con valores entre $1,44$ - $3,55 \mu\text{g/kg}$, y el T4 tuvo el valor más bajo ($1,85 \mu\text{g/kg}$). En M4, las detecciones fueron muy pocas, con valores puntuales en T1 de $2,50 \mu\text{g/kg}$ y T4 entre $1,65$ - $2,28 \mu\text{g/kg}$. Las detecciones de GA20 se concentraron en el T5 durante M1 y M2, sin mantenerse en M3 y M4.

GA4 se detectó en muy pocas muestras por encima del LOQ y en niveles bajos. En M1, apareció principalmente en el T2 con valores entre $0,73$ y $1,33 \mu\text{g/kg}$, y una detección aislada en el T5 de $0,85 \mu\text{g/kg}$. En M2, sólo se observó un valor puntual en el T4 de $0,55 \mu\text{g/kg}$. En M3, algunas muestras del T1 mostraron valores cercanos a $0,55 \mu\text{g/kg}$, mientras que algunas del T4 mostraron valores alrededor de $0,67 \mu\text{g/kg}$. En M4, GA4 fue más frecuente, con valores en el T2 entre $0,9$ y $1,0 \mu\text{g/kg}$, en el T3 entre $0,67$ y $1,15 \mu\text{g/kg}$

y en el T4 el valor máximo en 1,45 µg/kg. Tampoco hubo un patrón fecha × tratamiento definido, siendo lo más consistente el mayor número de detecciones en el M4 para los tratamientos 2, 3 y 4.

Talon demostró la rápida caída de GA4 luego de la antesis (Talon, Zacarias, & Primo-Millo, 1992). Una muestra de esto es que su catabolito, la especie inactiva GA34, fue detectada en varias combinaciones fecha × tratamiento. Los valores más altos fueron en el primer muestreo en el T2, donde varias determinaciones superaron las 4,00 µg/kg (con un máximo de 5,47 µg/kg), y en el resto de los tratamientos de M1 mostró valores medios entre 1,71-1,98 µg/kg. En M2, GA34 se detectó esporádicamente con niveles intermedios (entre 1,69-3,65 µg/kg), la frecuencia de detección no fue representativa, menor al 2% del total de determinaciones, al igual que en M3. Finalmente, en M4 se detectó en todos los tratamientos con valores entre 1,42 y 3,16 µg/kg sin diferencias significativas entre los mismos. Por lo tanto, GA34 mostró una acumulación temprana en M1, prácticamente ausente en M2 y M3, y nuevamente en M4 aparece en el momento del cuajado del fruto y comienzo de su crecimiento. Como la dependencia GA4-GA34 es directa, su presencia se puede asimilar a la de GA4, pero el resto de las concentraciones se mantuvieron similares entre tratamientos y fechas a menor concentración que el M1T2. Las bajas concentraciones detectadas en GA4 y la frecuencia de detecciones de GA34 serían indicativos de que la primera estuvo activa en los días previos al muestreo, dado que promueve la floración y el cuajado del fruto, por otro lado GA9 que es precursora de GA4, se detectó en todas las muestras, lo que indica un rápido metabolismo de GA4.

Los valores de las giberelinas GA1 y GA9 pueden verse en la tabla 8.1 y su distribución en la **figura 8.5**. Estas giberelinas fueron detectadas y cuantificadas en todas las muestras. Ambas pertenecen a diferentes ramas de la biosíntesis de giberelinas, ya que mientras que GA1 es la hormona activa que pertenece a la rama 13-hidroxilada, la GA9 es la precursora biosintética de la GA4 (hormona activa) perteneciente a la rama 13-no hidroxilada.

Tabla 8.1. Niveles de GA1 y GA9 detectados para cada tratamiento a lo largo del muestreo.

Muestreo	Tratamiento	GA1	GA9
M1	T1	23,99	0,98
	T2	22,14	1,70
	T3	17,26	1,16
	T4	13,18	0,72
	T5	12,67	0,77
M2	T1	4,74	0,19
	T2	4,96	0,48
	T3	4,16	0,41
	T4	5,20	0,52
	T5	3,66	0,44
M3	T1	7,15	0,34
	T2	7,04	0,28
	T3	7,36	0,26
	T4	7,56	0,47
	T5	7,98	0,34
M4	T1	10,90	0,49
	T2	10,33	0,62
	T3	21,71	0,72
	T4	19,87	0,68
	T5	20,04	0,69

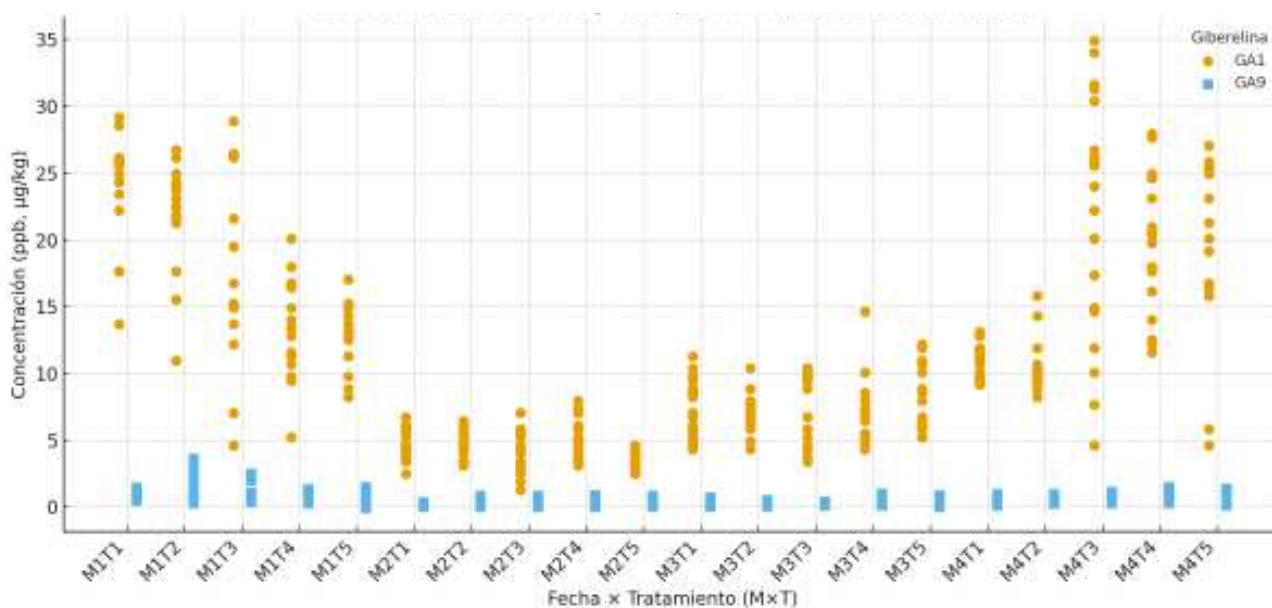


Figura 8.5 Concentración (µg/kg) de GA1 y GA9 por fecha (M1-M4) y tratamiento (T1-T5).

En comparación con las giberelinas minoritarias, GA1 mostró concentraciones altas y se detectó en todas las combinaciones $M \times T$. La evolución del perfil de los niveles de GA1 es similar para todos los tratamientos (M1 alto, M2 mínimo, M3 y M4 tendencia ascendente), aunque se observan diferencias entre ellos.

De manera general, en los T4 y T5, los niveles de GA1 siguen un patrón de concentración casi idéntico. Por otro lado, aquellos donde se utilizaron abejas bajo malla y los que tuvieron una aplicación de dosis simple de GA3 (partenocarpia inducida), mostraron, aunque con concentraciones más altas, el mismo comportamiento. Al duplicar los niveles de GA3, se obtienen niveles intermedios entre ambos casos.

En M1 se observaron los mayores niveles, con valores más elevados en los T1, T2 y T3 (23,99, 22,14 y 17,26 µg/kg respectivamente), mientras que los tratamientos T4 y T5 en valores intermedios (13,18 y 12,67 µg/kg respectivamente). En M2 se produjo una disminución marcada de la GA1 en todos los tratamientos (rango de valores entre 1,29 y 7,96 µg/kg), siendo el T4 el que presentó un media superior en 5,20 µg/kg mientras que el T5 mostró la inferior en 3,66 µg/kg. En M3, las concentraciones medias se ubicaron en rangos intermedios para los T1 a T4 (entre 7,04 y 7,56 µg/kg), mientras que el T5

presentó una media levemente superior (7,98 $\mu\text{g/kg}$). En M4 se vio un aumento generalizado con los mayores promedios en T3 (21,71 $\mu\text{g/kg}$), T4 (19,87 $\mu\text{g/kg}$) y T5 (20,04 $\mu\text{g/kg}$), mientras que el T1 (10,90 $\mu\text{g/kg}$) y el T2 (10,33 $\mu\text{g/kg}$) se mantuvieron más bajos. GA1 mostró un patrón temporal con picos claros al inicio (M1) y al final del período (M4), y una disminución marcada en el momento de la caída de los pétalos (M2). El efecto de T5 fue más marcado en M3, y en M4 los tratamientos 3, 4 y 5 mostraron los valores más elevados. La **figura 8.6** muestra los valores promedio de la GA1 en cada tratamiento a lo largo del proceso de muestreo.

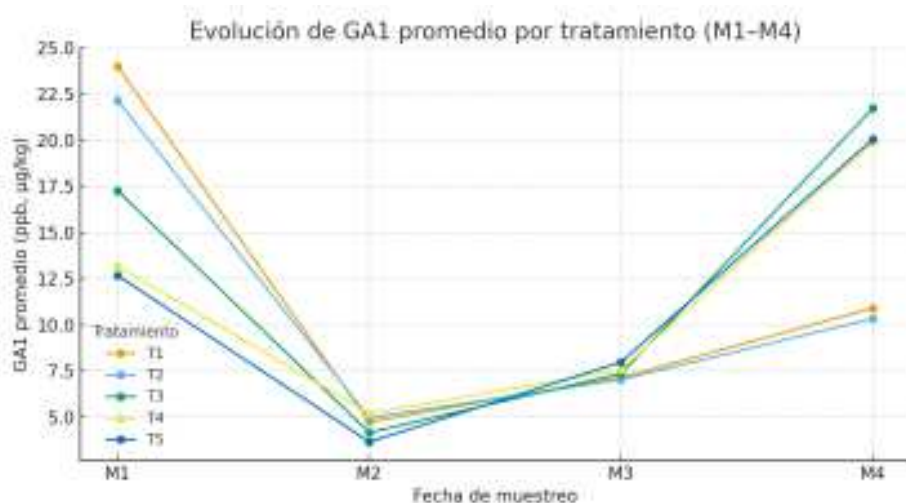


Figura 8.6 Concentración promedio ($\mu\text{g/kg}$) de GA1 a lo largo del proceso de muestreo para cada tratamiento.

Si se compara la evolución de los niveles de GA20, precursora de GA1, se observa que siguen un patrón complementario en cada muestreo en todos los casos.

La matriz post-hoc (Kruskal–Wallis) muestra qué pares de grupos $M \times T$ difieren significativamente (**Figura 8.7**). El color rojo indica que el tratamiento en la fila presentó mayor nivel que el tratamiento en la columna, mientras que el azul indica lo contrario. Se observan tres bloques claros: (i) en M1 los tratamientos T1-T2 (grupos 11-12) superan a T4-T5 (14-15), (ii) en M2 el tratamiento T5 (25) es menor que T2 y T4 (22 y 24), lo cual es coherente con el mínimo general de GA1 en esa fecha, y (iii) en M4 el tratamiento T3 (43) es mayor que T1, T2 y T5 (41, 42, 45).

El mapa de calor confirma estadísticamente el patrón ya descrito con los promedios: pico inicial en M1 favoreciendo T1-T2, descenso marcado en M2 con T5 particularmente bajo, y nuevo aumento en M4 donde T3, y en menor medida T4/T5, se sitúa por encima del resto. Las celdas en blanco indican pares sin diferencias significativas tras el ajuste por comparaciones múltiples, lo que indica que los tratamientos dentro de una misma fecha que presentan diferencias son aquellos resaltados por los bloques coloreados.

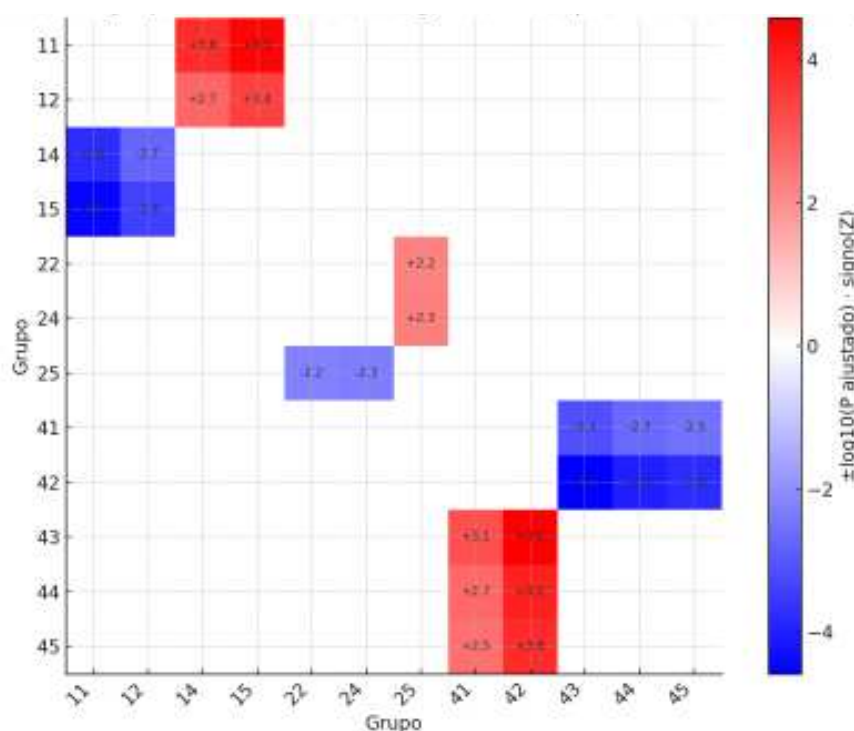


Figura 8.7 Matriz post-hoc de Kruskal-Wallis de los resultados de los niveles de GA1.

GA9 se detectó en todas las muestras al igual que GA1, aunque en niveles más bajos y con variabilidad según $M \times T$. En M1 se registraron concentraciones superiores en los T2 y T3, con valores medios de 1,70 y 1,16 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. Los T4 y T5 tuvieron los niveles más bajos de este precursor hormonal en un rango de 0,31 a 1,52 $\mu\text{g/kg}$. En M2 hubo una caída de los niveles de GA9 en todos los tratamientos, con los valores promedio en el rango de 0,19 a 0,52 $\mu\text{g/kg}$ sin un tratamiento destacado. En M3 se mantuvieron niveles bajos, con una menor dispersión de los valores medios (0,26-0,47 $\mu\text{g/kg}$). En M4 se vio un aumento con máximos en los tratamientos 3, 4 y 5 de 0,72, 0,68 y 0,69 respectivamente. GA9 mostró un comportamiento similar al de GA1, con mayor abundancia relativa en M1 y M4, pero en un rango de concentración menor. En la **figura**

8.8 se muestran los valores promedio de la GA9 en cada tratamiento a lo largo del proceso de muestreo.

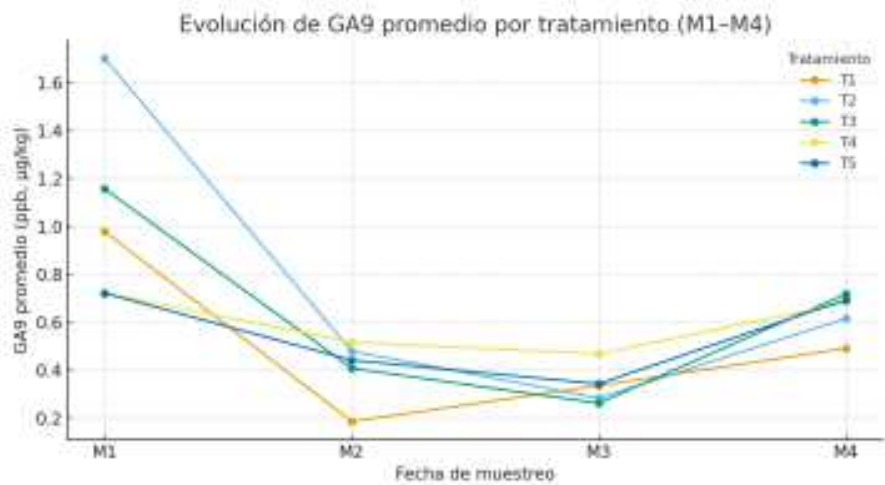


Figura 8.8. Concentración promedio (µg/kg) de GA9 a lo largo del proceso de muestreo para cada tratamiento.

La matriz post-hoc (Kruskal–Wallis) (**Figura 8.9**) de los niveles de GA9 muestra que solamente en M1 se detectaron diferencias significativas para el T2. Este tratamiento presentó mayores valores que los T5 y T4. No se observaron diferencias significativas que involucren al resto de los tratamientos en ninguna de las fechas evaluadas.

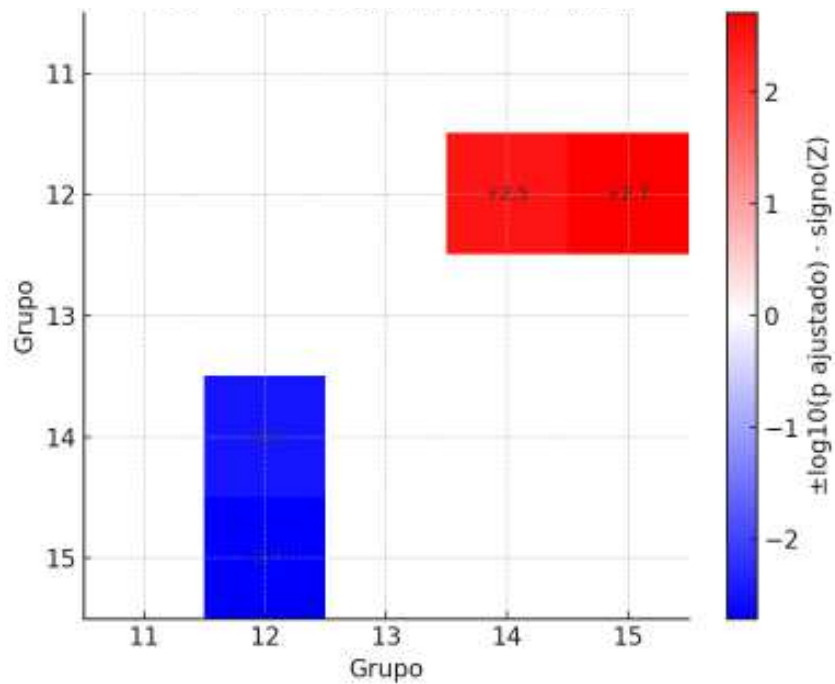


Figura 8.9. Matriz post-hoc de Kruskal-Wallis de los resultados de los niveles de GA9.

Este patrón confirma que al inicio del período GA9 presenta un enriquecimiento específico en T2, coherente con los promedios donde T2 mostró el mayor nivel en M1.

El análisis de giberelinas en ovarios de mandarina Afourer mostró que GA1 fue la giberelina predominante a lo largo del estudio, al detectarse de manera consistente en todas las combinaciones fecha $\times$ tratamiento. Sus mayores niveles se encontraron en el primer y cuarto muestreo, coincidiendo con etapas clave del desarrollo reproductivo, como la apertura floral y el cuajado del fruto. Esta variación temporal de GA1 podría estar asociada a mecanismos fisiológicos involucrados en el establecimiento del fruto, tanto cuando la partenocarpia es inducida por aplicación hormonal como cuando se controló la polinización.

Como tendencia general, las GAs precursoras de las hormonas activas en cítricos son de un orden menor, indicando una rápida conversión a las formas activas y, en el caso de la GA4, un rápido metabolismo a la forma inactiva (GA34).

El descenso de GA1 observado en los muestreos intermedios sugiere una regulación donde esta hormona impulsa la transición del ovario al fruto, mientras que en etapas intermedias su papel es menos dominante. Este patrón es coherente con lo descrito para ovarios de mandarinas y otros cítricos, donde aumentos transitorios de GA1 alrededor de la antesis se asocian con la reactivación de la división celular de la pared del ovario, el establecimiento del fruto partenocárpico y la aceleración del cuajado (Liu et al., 2018; Mesejo et al., 2016).

GA1 y GA9 se detectaron en todas las muestras, mientras que GA20, GA34 y GA4 fueron detectadas con menor frecuencia y dependiendo de la combinación fecha $\times$ tratamiento, con niveles generalmente menores. El hecho de que GA1 muestre variaciones marcadas y asociadas a fases reproductivas concretas, mientras que GA9 se mantiene en niveles más bajos y menor variabilidad, indica que la ruta hidroxilada (GA20 $\rightarrow$ GA1) es la principal vía funcional en el ovario de Afourer, y que la ruta no hidroxilada (GA9 $\rightarrow$ GA4) juega un papel complementario (J. He et al., 2020). Este comportamiento es consistente con la biosíntesis de giberelinas en cítricos, donde GA1, GA4 y sus precursores inmediatos (GA20 y GA9) pueden ser inactivados por GA 20-oxidasas y GA

2-oxidases, modulando los niveles finales de GAs bioactivas en el ovario (Huerta, Garcia-Lor, & Garcia-Martinez, 2009).

La diferencia entre los niveles de GA1 y GA9 puede deberse a la mayor potencia de la GA4 (derivada de GA9). La potencia relativa de las giberelinas GA1 y GA4 ha sido evaluada en distintos sistemas. Por ejemplo, en *Arabidopsis* GA4 se comporta como la principal GA bioactiva y muestra una actividad superior a GA1 (Eriksson, Böhlenius, Moritz, & Nilsson, 2006; J. He et al., 2020), mientras que en bioensayos de arroz se ha descrito actividad similar entre ambas (Hedden, 2020).

Como se dijo anteriormente, GA9 es precursor de GA4, una de las GAs más activas. El hecho de detectarla en todas las muestras indica la presencia inequívoca de esta ruta en mandarinas. En línea con este hallazgo, la presencia de GA34 en M1 confirma que GA4 sí estuvo presente. Talon y colaboradores describen el rápido descenso en el nivel de GA4 inmediatamente después de la floración en Clementinas (Talon et al., 1992). Este hecho se confirma con el hallazgo de GA34 en un 75% de las muestras analizadas en M1. Por otro lado, GA4 es más activa que GA1, lo que sugiere una rápida acción para desactivarse inmediatamente, actuando como disparador de cambios fisiológicos que la presencia de GA1 consolida y mantiene. GA34 vuelve a ser detectada en el M4 todas las muestras de T1, y los dos tratamientos con aplicación de GA3 (T2 y T3). Los tratamientos T4 y T5 tienen una frecuencia de detección del 50% en ambos casos, lo que muestra una similitud entre el efecto logrado por las abejas y la aplicación de GA3.

Nuestros resultados sugieren que estrategias que modulen la vía de GA1 (ya sea a través de la polinización controlada o del manejo hormonal) son más relevantes para controlar el cuajado y el desarrollo inicial del fruto en *A. aurantium* que aquellas centradas en la vía GA4/GA9 (Garmendia et al., 2019). Los patrones de GA1 y GA9 observados en este trabajo son coherentes con estudios clásicos y recientes que muestran que la polinización aumenta los niveles de giberelinas en ovarios de cítricos, reduce la abscisión del ovario y puede ser parcialmente mimetizada por la aplicación exógena de GA3 en flores no polinizadas (Ben-Cheikh et al., 1997; Gravina et al., 2016). Sin embargo, los niveles de GA1 detectados en todos los casos son mayores a los reportados en el momento de la antesis (Talon et al., 1992).

8.4 Conclusiones

Junto con la información agronómica mostrada en el capítulo anterior, los resultados de este capítulo indican que tanto el uso de mallas con abejas como el uso de mallas con aplicaciones de ácido giberélico son estrategias viables para obtener una buena productividad de frutos con baja o nula cantidad de semillas. Las giberelinas son determinantes para el cuajado partenocárpico en cítricos. Si bien la mayor parte de la evidencia detallada en el género *Citrus* se ha centrado en giberelinas 13-hidroxiladas, particularmente las asociadas a la vía de GA1 y en menor medida a la GA3, la GA4 constituye una giberelina bioactiva clave en numerosas especies frutales y resulta probable su contribución en mandarina por la conservación de rutas biosintéticas y de integración con la señalización hormonal (Ramakrishnan et al., 2025; Talon et al., 1992), lo que este estudio confirma, mas alla de las escasas detecciones de GA4, por la detección de los otros dos extremos de su biosíntesis (GA9 y GA34). Estos antecedentes son coherentes con los resultados obtenidos que identifican a la GA1 como la giberelina endógena más asociada al desarrollo del ovario, la más abundante y consistentemente detectada, con máximos en la antesis y en el cuajado temprano. Además, la comparación entre manejos mostró contrastes temporales entre tratamientos, con mayores niveles de GA1 en T1 y T2 que en T4 y T5 en M1, y con T3 por encima de varios tratamientos en M4, mientras que la GA9 se detectó de forma sostenida pero en niveles menores. Por lo tanto, es razonable proponer que parte del efecto agronómico de la aplicación exógena de GA3 estaría mediando la regulación de rutas metabólicas moduladas por los niveles de GA1 en el tejido ovárico (Gambetta et al., 2024). Estos resultados reafirman que en el ovario de *Afourer* predomina funcionalmente la vía 13-hidroxilada ($GA_{20} \rightarrow GA_1$), mientras que la rama $GA_9 \rightarrow GA_4$ tendría un rol complementario y de rápida metabolización.

La regulación de la presencia de semillas y el establecimiento de frutos partenocárpicos no puede atribuirse exclusivamente a las giberelinas. Si bien las GAs cumplen un rol central como promotoras del crecimiento del ovario y del cuajado, este proceso responde a una red hormonal en la que también participan activamente auxinas y citoquininas como iniciadoras del desarrollo del fruto. A su vez, otras fitohormonas modulan el resultado

final. El ácido abscísico suele asociarse a una menor probabilidad de cuajado cuando se mantiene elevado, mientras que picos de etileno se vinculan con abscisión y aborto del fruto, lo que sugiere una acción antagonista en etapas tempranas del desarrollo. Por lo tanto, la presencia o ausencia de semillas debe entenderse como el producto de interacciones y balances hormonales, más que como una consecuencia directa de la señalización por giberelinas en forma aislada (Guan et al., 2024; H. He & Yamamuro, 2022; Maupilé, Chaib, Boualem, & Bendahmane, 2024; Sharif, Su, Chen, & Qi, 2022).

La combinación de citricultura y apicultura surge como una estrategia con múltiples beneficios. Desde el punto de vista productivo, la polinización por insectos explica en promedio alrededor del 60 % del rendimiento por hectárea en cítricos, con probabilidades de cuajado significativamente mayores en flores polinizadas respecto a flores no polinizadas (Monasterolo et al., 2024). Ensayos específicos en naranjas dulces y otros cítricos muestran que la polinización por abejas e insectos incrementa tanto la producción (número de frutos y rendimiento) como parámetros de calidad (peso, diámetro, sólidos solubles, jugosidad) (Khalifa et al., 2021). Además, los montes de cítricos constituyen una fuente de néctar y polen de alta calidad para las abejas, favoreciendo la producción de miel cítrica con perfiles sensoriales característicos muy valorados comercialmente (Newstrom-Lloyd, Cowper, & McPherson, 2020). Sin embargo, estudios recientes señalan que una densidad excesiva de abejas melíferas puede afectar negativamente algunos atributos de calidad del fruto y desplazar a polinizadores nativos (Monasterolo et al., 2022). Esto resalta la importancia de manejar de manera integrada la carga de colmenas y la diversidad de polinizadores en los sistemas citrícolas.

En la transición del enfoque no dirigido al dirigido, este capítulo aporta además un protocolo miniaturizado de extracción y purificación tipo QuEChERS/d-SPE seguido de un análisis por LC-MS/MS. Este método permitió cuantificar giberelinas a nivel de traza en ovarios de mandarina. Además, mostró un desempeño analítico robusto, buena recuperación para la mayoría de las giberelinas (81 – 105 %), baja variabilidad (RSD entre 4 – 12 %), bajo efecto matriz y límites de cuantificación de 0,5 µg/L para todos los analitos. Esto permitió una cuantificación con alta sensibilidad para los diferentes tratamientos y fechas (**Figura 8.10**). El cambio de una etapa de SPE por una limpieza tipo QuEChERS con MgSO₄, C18 y carbón grafitizado, demuestra que es posible obtener

datos robustos en matrices de baja disponibilidad como los ovarios de cítricos sin procedimientos de pretratamiento excesivamente complejos, donde el riesgo de pérdida de analitos es muy alto. Este enfoque es especialmente útil para estudios donde el tamaño de muestra es limitante y es aplicable a futuros análisis de fitohormonas acoplados a estudios metabolómicos en cítricos con grandes cantidades de muestras y los costos de preparación por muestra suelen ser elevados.

El estudio de la dinámica de las giberelinas en el ovario empleando diferentes técnicas de polinización también permite diseñar estrategias de manejo más integrales y sostenibles, articulando la producción de mandarinas de calidad con la apicultura como actividad complementaria y sinérgica.



Figura 8.10 Principales resultados del capítulo 8, creado con NotebookLM.

8.5 Referencias bibliográficas

- Agustí, M., Zaragoza, S., Bleiholder, H., Buhr, L., Hack, H., Klose, R., & Stauss, R. (1995). *Escala BBCH para la descripción de los estadios fenológicos del desarrollo de los agrios (Gén. Citrus)*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/20.500.11939/7875>
- Alfárez, F., De Carvalho, D., & Boakye, D. (2021). Interplay between Absciscic Acid and Gibberellins, as Related to Ethylene and Sugars, in Regulating Maturation of Non-

- Climacteric Fruit. *International Journal of Molecular Sciences*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22020669>
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86(2), 412–431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Ben-Cheikh, W., Perez-Botella, J., Tadeo, F. R., Talon, M., & Primo-Millo, E. (1997). Pollination Increases Gibberellin Levels in Developing Ovaries of Seeded Varieties of Citrus. *Plant Physiology*, 114(2), 557–564. <https://doi.org/10.1104/pp.114.2.557>
- Bermejo, A., Granero, B., Mesejo, C., Reig, C., Tejedo, V., Agustí, M., ... Iglesias, D. J. (2018). Auxin and Gibberellin Interact in Citrus Fruit Set. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(2), 491–501. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9748-9>
- De La Serna Calleja, M. Á., Bolado, S., Jiménez, J., & López-Serna, R. (2023). Performance critical comparison of offline SPE, online SPE, and direct injection for the determination of CECs in complex liquid environmental matrices. *Microchemical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108395>
- Eriksson, S., Böhlenius, H., Moritz, T., & Nilsson, O. (2006). GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation. *The Plant Cell*, 18(9), 2172–2181. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.042317>
- Gambetta, G., Guimaraes, N., Rivas, F., Mautone, A. P., Hernández, F., Ramos, S., ... Gravina, A. (2024). *Reproductive Biology, Parthenocarpy and Fruit Set Improvement in Diploid and Triploid Seedless Mandarin Cultivars*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4901787>
- Gao, S., & Chu, C. (2020). Gibberellin Metabolism and Signaling: Targets for Improving Agronomic Performance of Crops. *Plant and Cell Physiology*, 61(11), 1902–1911. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa104>
- García-Hurtado, N., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., López-Gresa, M., Hedden, P., Gong, F., & García-Martínez, J. (2012). The characterization of transgenic tomato overexpressing gibberellin 20-oxidase reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 63 16, 5803–5813. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers229>
- Garmendia, A., Beltrán, R., Zornoza, C., García-Breijo, F. J., Reig, J., & Merle, H. (2019).

- Gibberellic acid in Citrus spp. flowering and fruiting: A systematic review. *PLOS ONE*, 14(9), e0223147. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223147>
- Gravina, A., Gambetta, G., Rey, F., & Guimaraes, N. (2016). Improvement of ‘Afourer’ Mandarin Productivity in Isolation of Cross- Pollination. *Agrociencia Uruguay*, 20(2), 22–28. <https://doi.org/10.31285/AGRO.20.2.4>
- Guan, H., Yang, X., Lin, Y., Xie, B., Zhang, X., Chongjian, ... Hao, Y. (2024). The hormone regulatory mechanism underlying parthenocarpic fruit formation in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1404980>
- He, H., & Yamamuro, C. (2022). Interplays between auxin and GA signaling coordinate early fruit development. *Horticulture Research*, 9. <https://doi.org/10.1093/hr/uhab078>
- He, J., Xin, P., Xueting, Chu, J., & Wang, G. (2020). Gibberellin Metabolism in Flowering Plants: An Update and Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00532>
- Hedden, P. (2020). The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis. *Plant & Cell Physiology*, 61(11), 1832–1849. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa092>
- Huerta, L., Garcia-Lor, A., & Garcia-Martinez, J. L. (2009). Characterization of gibberellin 20-oxidases in the citrus hybrid Carrizo citrange. *Tree Physiology*, 29(4), 569–577. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpn049>
- Jorge, T. F., Mata, A. T., & António, C. (2016). Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 374(20150370). <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0370>
- Khalifa, S. A. M., Elshafiey, E. H., Shetaia, A. A., El-Wahed, A. A. A., Algethami, A. F., Musharraf, S. G., ... El-Seedi, H. R. (2021). Overview of Bee Pollination and Its Economic Value for Crop Production. *Insects*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/insects12080688>
- Kheder, A., Elmenofy, H., & Rehan, M. (2019). Improving Fruit Quality and Marketability of ‘Balady’ mandarin Fruits by Gibberellin and Copper Sulphate. *Journal of Plant production*, 10(12), 1029–1035. <https://doi.org/10.21608/jpp.2019.71533>
- Liu, L., Wang, Z., Liu, J., Liu, F., Zhai, R., Zhu, C., ... Xu, L. (2018). Histological, hormonal and transcriptomic reveal the changes upon gibberellin-induced

- parthenocarpy in pear fruit. *Horticulture Research*, 5, 1. <https://doi.org/10.1038/s41438-017-0012-z>
- Lozano, A., Pérez-Parada, A., Heinzen, H., & Fernández-Alba, A. R. (2012). Inclusion of 1-Naphthylacetic Acid and 2-(1-Naphthyl)acetamide into Three Typical Multiresidue Methods for LC/MS/MS Analysis of Tomatoes and Zucchini. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 95(5), 1520–1527. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-509>
- Maupilé, L., Chaib, J., Boualem, A., & Bendahmane, A. (2024). Parthenocarpy, a pollination-independent fruit set mechanism to ensure yield stability. *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2024.06.007>
- Mesejo, C., Yuste, R., Reig, C., Martínez-Fuentes, A., Iglesias, D. J., Muñoz-Fambuena, N., ... Agustí, M. (2016). Gibberellin reactivates and maintains ovary-wall cell division causing fruit set in parthenocarpic Citrus species. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 247, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.018>
- Mohamed, H. M., & Elgammal, M. H. (2018). Reduction of seed number in Balady mandarin (Common mandarin) to improve fruit quality by using some growth regulators. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 8(4), 1375–1386.
- Monasterolo, M., Chacoff, N. P., Segura, Á. D., Benavidez, A., & Schliserman, P. (2022). Native pollinators increase fruit set while honeybees decrease the quality of mandarins in family farms. *Basic and Applied Ecology*, 64, 79–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.baae.2022.07.008>
- Monasterolo, M., Ramírez-Mejía, A. F., Cavigliasso, P., Schliserman, P., Chavanne, V., Carro, C. M., & Chacoff, N. P. (2024). Animal pollination contributes to more than half of citrus production. *Scientific Reports*, 14(1), 22309. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-73591-6>
- Newstrom-Lloyd, L., Cowper, B., & McPherson, A. (2020, February). Citrus for nectar and honey (Trees for Bees Corner: Star performers, Part 9). *New Zealand Beekeeper*, 18–23. Retrieved from https://roadrunner-plums-ab6b.squarespace.com/s/202002_Trees-for-Bees-Corner-Feb-2020-NZ-Beekeeper-Star-Performer-9_Citrus.pdf
- Otero, A., & Rivas, F. (2017). Field spatial pattern of seedy fruit and techniques to improve yield on ‘Afourer’ mandarin. *Scientia Horticulturae*, 225, 264–270.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.067>
- Pu, C.-H., Lin, S.-K., Chuang, W.-C., & Shyu, T.-H. (2018). Modified QuEChERS method for 24 plant growth regulators in grapes using LC-MS/MS. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 637–648. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.08.001>
- Rahma, S. A., Budiarto, R., Mubarak, S., & Abdullakasim, S. (2024). Impacts of gibberellin application on citrus: An overview from seed germination to fruit quality enhancement. *Kultivasi*. <https://doi.org/10.24198/kultivasi.v23i3.58796>
- Ramakrishnan, R., Zurgil, U., Kanna, S., Tarkowská, D., Novák, O., Strnad, M., ... Sitrit, Y. (2025). Gibberellin-induced parthenocarpy in fruits of a prickly pear mutant. *Plant Cell Reports*, 44. <https://doi.org/10.1007/s00299-025-03568-w>
- Sharif, R., Su, L., Chen, X., & Qi, X. (2022). Hormonal interactions underlying parthenocarpic fruit formation in horticultural crops. *Horticulture Research*, 9. <https://doi.org/10.1093/hr/uhab024>
- Šimura, J., Antoniadi, I., Šíroká, J., Tarkowská, D., Strnad, M., Ljung, K., & Novák, O. (2018). Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. *Plant Physiology*, 177(2), 476–489. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00293>
- Talon, M., Zacarias, L., & Primo-Millo, E. (1992). Gibberellins and parthenocarpic ability in developing ovaries of seedless mandarins. *Plant Physiology*, 99(4), 1575–1581. <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1575>
- Urbanová, T., Tarkowská, D., Novák, O., Hedden, P., & Strnad, M. (2013). Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 112, 85–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.068>
- Vrobel, O., & Tarkowski, P. (2023). Can plant hormonomics be built on simple analysis? A review. *Plant Methods*, 19(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13007-023-01090-2>
- Wang, G.-L., Xiong, F., Que, F., Xu, Z.-S., Wang, F., & Xiong, A.-S. (2015). Morphological characteristics, anatomical structure, and gene expression: novel insights into gibberellin biosynthesis and perception during carrot growth and development. *Horticulture Research*, 2, 15028. <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.28>
- Wang, W., Song, X., Wang, D., Ma, Y., Shan, Y., Ren, X., ... Ma, Y. (2024). Simultaneous

determination of five plant hormones in cotton leaves using QuEChERS combined with HPLC–MS/MS. *Journal of Cotton Research*, 7(1), 18.
<https://doi.org/10.1186/s42397-024-00179-w>

9 Síntesis de la Parte II

La mandarina Afourer es un cultivar de alto valor comercial por su calidad organoléptica y su potencial para producir frutos con baja semillazón, una condición muy demandada en mercados de exportación. Sin embargo, su comportamiento reproductivo es altamente sensible al régimen de polinización y a las prácticas agronómicas que lo modifican. En los capítulos 7 y 8 se abordó esta problemática desde dos puntos de vista: el resultado agronómico final (rendimiento y presencia de semillas) junto con el metaboloma global del ovario en desarrollo bajo distintas técnicas de cultivo se investigaron mediante una estrategia no dirigida basada en ^1H RMN, y la dinámica de giberelinas endógenas en el ovario bajo las mismas condiciones de cultivo se estudiaron empleando un enfoque metabolómico dirigido utilizando LC-MS/MS.

Este capítulo integra ambos análisis para discutir, por un lado, cómo las técnicas de cultivo modifican el perfil metabólico y hormonal temprano del ovario y cómo esas alteraciones se traducen posteriormente en diferencias de productividad y calidad final del fruto, y por otro, cuál es la relevancia de estos hallazgos para orientar el diseño de estrategias de manejo más eficientes y sostenibles dentro de la industria citrícola.

9.1 Relación entre técnicas de cultivo, productividad y semillazón

Los cinco tratamientos evaluados (T1: Malla+abejas; T2: Malla+GA3; T3: Malla+GA3×2; T4: Malla; T5: Sin malla/polinización abierta) generaron diferencias claras en la semillazón, pero no en el rendimiento global. En la [tabla 7.1](#) del Capítulo 7, el número total de frutos y el peso total cosechado no difirieron significativamente entre tratamientos, aunque el T4 mostró el menor valor numérico.

La semillazón sí estuvo fuertemente modulada por los tratamientos. La polinización abierta sin malla (T5) produjo el mayor porcentaje de frutos con semilla (64%), confirmando que la polinización cruzada es el principal determinante de semillazón en Afourer. La utilización de malla sola (T4) redujo el número de frutos con semillas (31%), aunque con la desventaja esperada de depender casi exclusivamente de la partenocarpia

natural para el cuajado. Por otro lado, la combinación de malla con aplicaciones de GA3 (tratamientos 2 y 3) permitió mantener un rendimiento comparable al de la polinización abierta (T5), pero con una semillazón baja (31%) y un menor número de semillas por fruto, lo que indica que la señal hormonal exógena puede compensar el déficit de polinización cruzada. Finalmente, el tratamiento malla + abejas (T1) mejoró el cuajado dentro de la barrera física, aunque dio lugar a una semillazón relativamente mayor que los T2 y T3.

Estos datos permiten diseñar escenarios útiles para el sector productivo. Por un lado, el aislamiento mediante malla combinado con aplicaciones de GA3 surge como una vía efectiva para alcanzar alta productividad con baja semillazón, y por otro, el aislamiento complementado con polinizadores manejados se presenta como una alternativa intermedia que permite sostener el rendimiento evitando alcanzar los niveles máximos de semillazón observados en la polinización abierta. Este patrón resulta coherente con estudios previos en Afourer y otras mandarinas apirenas, en los que el uso de barreras físicas y GA3 ha demostrado reducir el número de semillas sin necesariamente comprometer el rendimiento final (Gambetta et al., 2013; Garmendia, Beltrán, Zornoza, Breijo, et al., 2019; Otero & Rivas, 2017).

9.2 Metaboloma del ovario: cambios fenológicos y su significado funcional

El análisis no dirigido empleando ¹H RMN mostró que la principal fuente de variación metabólica fue el estado fenológico, con el PCA separando claramente los cuatro muestreos. Esta señal temporal indica que el ovario transita por cambios metabólicos diferenciados, en los que se integran defensa, regulación osmótica y provisión de carbono/energía para el desarrollo del fruto.

Los puntajes VIP del PLS-DA permitieron identificar metabolitos característicos para cada etapa fenológica evaluada. En M1 (antesis/polinización) se observó un enriquecimiento de señales aromáticas asignadas a flavonoides (tipo hesperidina/quercetina), lo que sugiere una activación temprana de la vía de los fenilpropanoides durante la transición de ovario a fruto. En cítricos, estos compuestos se asocian con funciones antioxidantes y de defensa, y su inducción temprana ha sido vinculada a respuestas frente a estrés biótico y

abiótico, así como a la protección de tejidos reproductivos en desarrollo (Ballester, Lafuente, de Vos, Bovy, & González-Candela, 2013). En M2 (caída de pétalos/posantes temprana) los flavonoides se mantienen, pero se detecta además la aparición de señales de colina y aminos *N*-metiladas (por ejemplo, sinefrina), lo que indica un desplazamiento hacia funciones de osmoregulación y defensa química en un momento crítico para el destino del ovario, donde se define el cuajado del fruto o la abscisión (Annunziata, Ciarmiello, Woodrow, dell'Aversana, & Carillo, 2019; Vriezen, Feron, Maretto, Keijman, & Mariani, 2007). Finalmente, en el cuajado temprano (M4) aparecen señales compatibles con ácidos orgánicos (principalmente cítrico), azúcares solubles (glucosa) y glicina betaína, junto con la persistencia de flavonoides. Estos compuestos han sido señalados como clave para sostener la expansión celular y la tolerancia al estrés en órganos jóvenes, incrementando la probabilidad de continuidad del fruto (Basit et al., 2025; Khan et al., 2020; Weifeng et al., 2022).

El ovario de Afourer sigue una secuencia metabólica lógica a lo largo de su desarrollo temprano. Sufre una transición desde una fase inicial dominada por mecanismos de defensa fenólica, pasa luego por una etapa de ajuste osmótico y defensa nitrogenada, y finalmente llega a una fase caracterizada por la provisión energética y la osmoprotección necesarias para sostener el crecimiento del fruto en formación.

9.3 Dinámica de giberelinas endógenas y su acoplamiento con el metaboloma

El Capítulo 8 mostró que la GA1 fue la giberelina mayoritaria en ovarios de mandarina Afourer, presente en todas las combinaciones tratamiento $\times$ fecha, con máximos en M1 y M4 y un mínimo pronunciado en M2. Este patrón coincide con el rol fisiológico conocido de las giberelinas en cítricos, donde se da un aumento alrededor de la antesis/polinización que favorece la reactivación mitótica del ovario, luego una caída tras la antesis que selecciona los ovarios que caen (abscisión), y un nuevo aumento en frutos cuajados para sostener el crecimiento del fruto (Ben-Cheikh, Perez-Botella, Tadeo, Talon, & Primo-Millo, 1997).

La GA9 (precursora de GA4) mostró menor variabilidad general pero a niveles más bajos que GA1. Este comportamiento indica que la ruta 13-hidroxilada (GA20 $\rightarrow$ GA1) es la vía

funcional principal en el ovario de *Afourer*, mientras que la ruta no 13-hidroxilada (GA9→GA4→GA34) cumple un papel complementario. Estos hallazgos coinciden con revisiones recientes sobre metabolismo de giberelinas en plantas con flor, las cuales destacan las diferencias entre rutas hidroxiladas y no hidroxiladas y el papel central de GA1/GA4 en el desarrollo reproductivo (Hedden, 2020).

Las GAs minoritarias (GA20, GA34, GA4) fueron detectadas por encima del LOQ del método con frecuencia variable y con diferencias entre ellas: GA34 se acumuló tempranamente en el M1, teniendo un 100% de detecciones positivas en T1 y T2 y un 60% en T3, T4 y T5. Durante M1 y M2, y como se explicó en el capítulo anterior, T2, T3 y T4 se encuentran en la misma situación a campo, esto es, desarrollándose bajo malla. La GA20 fue más frecuente en el T5 al inicio del muestreo, lo que podría indicar una regulación o ajuste más fino del balance de giberelinas activas/inactivas según el tipo de polinización en cada tratamiento. Las detecciones de GA20 en M2 y M3 luego de las aplicaciones de giberelinas son pocas, lo que parece indicar una regulación negativa de la síntesis de este metabolito precursor de GA3 y GA1. En M4 solo se detecta en un 20% de las muestras correspondientes al T4, lo que indica que la fase biosintética de las GA esta en declive ante la ausencia del precursor. Es de recordar que 48 horas antes a T3 se le aplicó GA3. Los efectos sobre el rendimiento productivo de esta aplicación se traducen en un peso total de fruta intermedio respecto al control con mallado (T4). Si bien las diferencias no son significativas, también son menores que el T5, pero con un peso/fruta mayor. El tratamiento malla + abejas (T1) resultó en fruta más grande, de mayor peso, pero menor número de kilos de fruta que T5.

La dinámica de GA1 se acopla a un programa metabólico secuencial evidenciado por la metabolómica no dirigida de ¹H RMN. En M1, coincidiendo con el primer pico de GA1, el ovario se caracteriza por una fuerte acumulación de flavonoides (señales aromáticas asignadas a hesperidina y quercetina) y otros fenilpropanoides, indicativos de una fase de defensa y señalización antioxidante durante la polinización y la reactivación de la división celular. En M2, momento en que GA1 cae a su mínimo, se mantienen los compuestos fenólicos que son productos de la activación metabólica y debido al aumento de GAs en M1, y además se incrementan metabolitos osmoprotectores como glicina betaína (confirmada por la fortificación y HSQC/HMBC) y compuestos *N*-metilados (colina, aminos

fenólicas tipo sinefrina). Esto configura una fase centrada en la osmorregulación y la supervivencia del ovario. En M3 y M4, a medida que GA1 se recupera y alcanza su segundo pico, el metaboloma ovárico evoluciona hacia un metabolismo primario de crecimiento. En estas etapas aumentan las señales de ácidos orgánicos del ciclo de Krebs (citrato) y azúcares solubles, que refleja la expansión celular y acumulación de reservas una vez formado el fruto, aunque también persisten los flavonoides y metabolitos osmoprotectores.

Esta coincidencia temporal entre GA1 y la composición del metaboloma coincide con observaciones de otros trabajos que muestran aumentos transitorios de GA1 alrededor de la antesis como disparadores de la división celular en la pared del ovario y del cuajado, tanto en cítricos partenocárpicos como en variedades con semilla (Mesejo et al., 2016).

En el T1 (malla + abejas), la polinización dirigida aumenta GA1 en M1 y se asocia a una mayor proporción relativa de citrato en las etapas tempranas, indicando una captación eficiente de productos de la fotosíntesis y un metabolismo energético robusto desde el inicio. Los tratamientos T2 y T3 (malla + GA3 con una y dos aplicaciones respectivamente) muestran un refuerzo hormonal similar, pero mediado por la aplicación exógena de GA3. Esta incrementa los niveles de GA1 y GA9 sobre todo hacia finales del muestreo, donde superan al T1 para favorecer la transición hacia un metaboloma típico de crecimiento con consumo más rápido de citrato y una homogeneización de los perfiles entre tratamientos. En el T4 (malla sola), la ausencia de abejas y de GA3 produce una señal de GA1 menor en el inicio del muestreo, que luego se traduce en menor productividad pues no se logra un aumento significativo de GA9 hacia final del muestreo. En el T5 (polinización abierta) se observa un aumento de la fecundación, con un aumento en la señal hormonal orientada al cuajado y menor absición. El metaboloma de este tratamiento refleja un mayor flujo de carbono (azúcares altos en M1) y compuestos fenólicos abundantes al inicio que se asocia al éxito reproductivo y en general a una mayor semillazón en la cosecha (Ylstra et al., 1992).

Estos resultados experimentales refuerzan el papel de la polinización y de las aplicaciones de GA3 como moduladores de las giberelinas endógenas en el ovario. Estudios clásicos en cítricos demostraron que la polinización aumenta los niveles de GAs en ovarios de

variedades con semilla y reduce la abscisión, mientras que GA3 exógena puede mimetizar este efecto en flores no polinizadas (Ben-Cheikh et al., 1997). Revisiones bibliográficas en cítricos confirman que GA3 aplicada en floración incrementa el cuajado, aunque sus efectos sobre rendimiento y calidad dependen fuertemente del contexto de manejo (Garmendia, Beltrán, Zornoza, García-Breijo, et al., 2019). Otros trabajos sobre “plant hormonomics” han mostrado que la integración de perfiles hormonales cuantitativos con metabolómica permite seguir con precisión cómo cambian giberelinas y otros reguladores en tejidos reproductivos a lo largo del desarrollo (Šimura et al., 2018).

La acumulación de glicina betaína en etapas críticas y su asociación con tratamientos que refuerzan la señal giberelínica conecta nuestros resultados con estudios en *Vicia faba* bajo estrés hídrico, donde GA3 exógena o miel de abeja diluida aumentaron GA3 endógena, mejoraron la eficiencia fotosintética y elevaron los niveles de osmoprotectores y antioxidantes (incluida la glicina betaína) (Rady et al., 2021; Talon et al., 1998).

Estos trabajos y los resultados de esta tesis sugieren un modelo en el que la dinámica de GA1 no sólo impulsa la transición ovario-fruto aumentando la fuerza de unión al pedúnculo floral (evitando la abscisión), lo que demanda carbono y energía (Ben-Cheikh et al., 1997), sino que se sincroniza con la activación de procesos metabólicos específicos (fenilpropanoides, osmoprotección, metabolismo energético) modulados por las prácticas de cultivo.

9.4 Del manejo agronómico a la calidad final

A partir de la integración de ambos capítulos, se plantea un esquema causal que conecta decisiones de manejo y sus resultados productivos con atributos de calidad y valor comercial. En primer lugar, la instalación de malla actúa reduciendo la polinización cruzada: al limitar el ingreso de polen externo, disminuye la probabilidad de fecundación y por ende la formación de semillas. Debe observarse que la característica comercial de Afurer es de tener 7 semillas por fruto y 20% de frutos sin semillas (Garcés, n.d.). Este mismo control del flujo de polen puede implicar una limitación en la producción, ya que la menor señal asociada a la polinización puede comprometer el cuajado si no se refuerza la señal hormonal inicial que activa la transición del ovario al fruto. Ese refuerzo puede

lograrse por dos vías funcionalmente equivalentes. Por un lado, mediante la aplicación exógena de GA3, y por otro, mediante el manejo de polinizadores dentro de la malla para no exponer el cultivo a polen externo. Ambos tratamientos aumentan los niveles hormonales que favorecen el inicio del desarrollo del fruto reduciendo el semillado (Ben-Cheikh et al., 1997). Una vez activada la transición ovario–fruto, el tejido expresa un programa metabólico secuencial de defensa fenólica (flavonoides), luego de osmoregulación (colina/aminas), y finalmente provisión de energía y osmoprotección (azúcares/ácido cítrico/glicina betaína), que aumenta la probabilidad de cuajado con bajo desarrollo de semillas dando como resultado fruta con mayor uniformidad y mayor valor comercial.

9.5 Importancia para la industria citrícola, limitaciones y perspectivas

Los resultados obtenidos presentan implicancias directas para la industria citrícola en tres planos complementarios: productividad, calidad y sostenibilidad. En términos de productividad rentable con control de semillas, las estrategias “malla + GA3” y “malla + abejas” ofrecen un mecanismo eficaz para evitar la semillazón masiva asociada a la polinización abierta sin penalizar el rendimiento, un punto crítico para sostener la competitividad exportadora de Afourer. En paralelo, los hallazgos habilitan el diseño de manejos más finos y predictivos: la evidencia de que GA1 constituye la vía dominante y que presenta máximos en etapas específicas (M1/M4) sugiere un indicador fisiológico útil para ajustar la dosis y momentos de aplicación de GA3 o la gestión de las colmenas, en línea con los antecedentes (Otero & Rivas, 2017). Desde una perspectiva de sustentabilidad y servicios ecosistémicos, la polinización animal puede explicar una fracción sustantiva del rendimiento potencial en cítricos, pero exige el desarrollo de estrategias de balance para evitar comprometer atributos de calidad comercial (Chao, 2005). El uso de mallas con polinizadores controlados permitiría sostener el servicio de polinización minimizando el costo asociado a la polinización cruzada externa, y abre oportunidades para esquemas integrados de citricultura–apicultura con gran valor agregado (por ejemplo, miel cítrica).

Estos resultados respaldan un cambio de enfoque operativo: pasar de manejar únicamente la “fruta final” a manejar “señales tempranas”, tanto de metabolitos como de giberelinas,

que funcionarán como predictores de la calidad comercial. Sin embargo, existen limitaciones que orientan las perspectivas de trabajo futuras. En primer lugar, la variabilidad natural campo-a-campo y año-a-año en giberelinas minoritarias sugiere la necesidad de incorporar más ciclos productivos y variables meteorológicas para robustecer modelos predictivos y mejorar la posibilidad de transferirlos entre ambientes. En segundo lugar, una ampliación del enfoque hacia una “hormonomics” más integral, incluyendo auxinas y citoquininas, permitiría modelar de forma más realista la red hormonal que acompaña los cambios detectados por RMN, fortaleciendo la interpretación de los mecanismos hormonales y el ajuste de los manejos agronómicos (Ahmad et al., 2024; Otero & Rivas, 2017).

9.6 Conclusiones

Del resumen de las secciones 7 y 8 presentado en este capítulo se desprende que las técnicas de cultivo evaluadas modifican de manera marcada la semillazón sin afectar el rendimiento total, lo que confirma la viabilidad de producir Afourer con alta calidad comercial (particularmente con baja presencia de semillas) sin sacrificar la productividad. El uso de mallas junto con aplicaciones foliares de GA3 o con polinizadores manejados dentro del sistema surge como una estrategia para desacoplar el control de semilla del desempeño productivo, alineándose con los requerimientos del mercado.

A nivel fisiológico, los resultados sugieren un modelo en el cual el ovario integra un programa metabólico temporal en tres fases que acompaña la transición a fruto: defensa fenólica, osmoregulación nitrogenada y provisión energética/osmoprotectora. En paralelo, GA1 se identifica como la señal hormonal endógena clave. De hecho, los manejos agronómicos efectivos son aquellos capaces de reforzar su pico temprano (M1) y sostener su recuperación en frutos que cuajan (M4), ofreciendo un criterio fisiológico para orientar decisiones de intervención. La integración de evidencia metabólica y hormonal provee una base para recomendaciones agronómicas más precisas y sostenibles, con relevancia directa para fortalecer la competitividad de la citricultura uruguaya y regional.

9.7 Referencias bibliográficas

- Ahmad, S., Lu, C., Gao, J., Wei, Y., Xie, Q., Jin, J., ... Yang, F. (2024). Integrated proteomic, transcriptomic, and metabolomic profiling reveals that the gibberellin–abscisic acid hub runs flower development in the Chinese orchid *Cymbidium sinense*. *Horticulture Research*, *11*. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae073>
- Annunziata, M., Ciarmiello, L., Woodrow, P., dell’Aversana, E., & Carillo, P. (2019). Spatial and Temporal Profile of Glycine Betaine Accumulation in Plants Under Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00230>
- Ballester, A.-R., Lafuente, M. T., de Vos, R. C. H., Bovy, A. G., & González-Candelas, L. (2013). Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: metabolic profiling in elicited fruits. *Food Chemistry*, *136*(1), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.114>
- Basit, F., Alyafei, M., Hayat, F., Al-Zayadneh, W., El-Keblawy, A., Sulieman, S., & Sheteiwy, M. S. (2025). Deciphering the role of glycine betaine in enhancing plant performance and defense mechanisms against environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, *Volume 16-2025*. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2025.1582332>
- Ben-Cheikh, W., Perez-Botella, J., Tadeo, F. R., Talon, M., & Primo-Millo, E. (1997). Pollination Increases Gibberellin Levels in Developing Ovaries of Seeded Varieties of Citrus. *Plant Physiology*, *114*(2), 557–564. <https://doi.org/10.1104/pp.114.2.557>
- Chao, C.-C. (2005). Pollination Study of Mandarins and the Effect on Seediness and Fruit Size: Implications for Seedless Mandarin Production. *HortScience*, *40*, 362–365. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.2.362>
- Gambetta, G., Gravina, A., Fasiolo, C., Fornero, C., Galiger, S., Inzaurrealde, C., & Rey, F. (2013). Self-incompatibility, parthenocarpy and reduction of seed presence in ‘Afourer’ mandarin. *Scientia Horticulturae*, *164*, 183–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.002>
- Garcés, A. (n.d.). Mandarinas - Clementina Nadorcott. Retrieved from

- <https://www.naranjasalbagarces.com/mandarinas-clementina-nadorcott.php>
- Garmendia, A., Beltrán, R., Zornoza, C., Breijo, F., Reig, J., Bayona, I., & Merle, H. (2019). Insect repellent and chemical agronomic treatments to reduce seed number in ‘Afourer’ mandarin. Effect on yield and fruit diameter. *Scientia Horticulturae*, 246, 437–447. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.025>
- Garmendia, A., Beltrán, R., Zornoza, C., García-Breijo, F. J., Reig, J., & Merle, H. (2019). Gibberellic acid in Citrus spp. flowering and fruiting: A systematic review. *PLOS ONE*, 14(9), e0223147. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223147>
- Hedden, P. (2020). The Current Status of Research on Gibberellin Biosynthesis. *Plant & Cell Physiology*, 61(11), 1832–1849. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa092>
- Khan, N., Ali, S., Zandi, P., Mehmood, A., Ullah, S., Ismail, M. I., ... Babar, M. A. (2020). Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. *Pak. J. Bot.*, 52(2). [https://doi.org/10.30848/PJB2020-2\(24\)](https://doi.org/10.30848/PJB2020-2(24))
- Mesejo, C., Yuste, R., Reig, C., Martínez-Fuentes, A., Iglesias, D. J., Muñoz-Fambuena, N., ... Agustí, M. (2016). Gibberellin reactivates and maintains ovary-wall cell division causing fruit set in parthenocarpic Citrus species. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 247, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.018>
- Otero, A., & Rivas, F. (2017). Field spatial pattern of seedy fruit and techniques to improve yield on ‘Afourer’ mandarin. *Scientia Horticulturae*, 225, 264–270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.067>
- Rady, M., Boriek, S., El-Mageed, T. A., El-Yazal, M. S., Ali, E., Hassan, F., & Abdelkhalik, A. (2021). Exogenous Gibberellic Acid or Dilute Bee Honey Boosts Drought Stress Tolerance in Vicia faba by Rebalancing Osmoprotectants, Antioxidants, Nutrients, and Phytohormones. *Plants*, 10. <https://doi.org/10.3390/plants10040748>
- Šimura, J., Antoniadi, I., Široká, J., Tarkowská, D., Strnad, M., Ljung, K., & Novák, O. (2018). Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. *Plant Physiology*, 177(2), 476–489. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00293>
- Talon, M., Tadeo, F. R., Ben-Cheikh, W., Gomez-Cadenas, A., Mehouchi, J., Pérez-Botella, J., & Primo-Millo, E. (1998). Hormonal regulation of fruit set and

- abscission in citrus: Classical concepts and new Evidence. *Acta Horticulturae*, 463, 209–217. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1998.463.24>
- Vriezen, W., Feron, R., Maretto, F., Keijman, J., & Mariani, C. (2007). Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *The New Phytologist*, 177 1, 60–76. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02254.x>
- Weifeng, Li, Y.-B., Nai, G., Liang, G., Zonghuan, Chen, B., & Mao, J. (2022). Changes and response mechanism of sugar and organic acids in fruits under water deficit stress. *PeerJ*, 10. <https://doi.org/10.7717/peerj.13691>
- Ylstra, B., Touraev, A., Moreno, R. M., Stöger, E., van Tunen, A. J., Vicente, O., ... Heberle-Bors, E. (1992). Flavonols stimulate development, germination, and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiology*, 100(2), 902–907. <https://doi.org/10.1104/pp.100.2.902>

10 Conclusiones generales y perspectivas

Este capítulo final integra y discute los principales hallazgos de la tesis en pos de lograr el objetivo general y de los objetivos específicos. Se discute sobre la combinación de enfoques dirigidos y no dirigidos, que tienen una aplicación amplia en sistemas productivos agrícolas, destacándose consideraciones metodológicas que permiten llegar a una visión globalizadora de fenómenos fisiológicos que impactan en los rendimientos del cultivo. Se hace hincapié en la difusa frontera entre la ciencia básica y aplicada, poniendo la generación de conocimiento como piedra angular para desarrollos sustentables. Se incluyen consideraciones prácticas para su implementación, incluyendo costos y recomendaciones operativas, y se proponen perspectivas futuras y oportunidades de investigación y transferencia orientadas a fortalecer la toma de decisiones en el sector citrícola y a abordar problemáticas que condicionan la producción y la calidad del fruto.

10.1 Alcance y aporte global de la tesis

Esta tesis se propuso aplicar el análisis metabolómico de manera transversal al sistema productivo de diferentes variedades de mandarinas, abordando problemáticas relevantes para la citricultura: calidad sensorial y valor comercial del fruto, sanidad y estabilidad productiva (alternancia), así como el estudio de un problema de impacto comercial como es la semillazón inducida por polinización cruzada en la variedad de mandarinas premium Afourer.

Se generaron dos aportes principales sustentados en estudios del metabolismo que explican fenómenos de interés productivo que amplían el conocimiento básico sobre la materia, así como desarrollos metodológicos que fortalecen la aplicabilidad de los resultados:

1. Generación de conocimiento fisiológico, químico y metodológico vinculado a decisiones productivas concretas, incluyendo manejos de cultivo, selección varietal e interpretación de marcadores tempranos de calidad. Este aporte se apoya

en el desarrollo de metodologías objetivas para evaluar y comparar estados metabólicos y respaldar decisiones con criterios reproducibles y cuantificables.

2. Demostración de la complementariedad entre enfoques no dirigidos y dirigidos como una estrategia integrada para ir desde el descubrimiento de señales relevantes, hacia su explicación mecanística y finalmente su validación, en línea con recomendaciones ampliamente aceptadas en metabolómica moderna (Bingol, 2018). En este marco, la tesis aporta además:

- La conexión entre el enfoque no dirigido y el dirigido, mostrando cómo los hallazgos exploratorios se traducen en hipótesis y métricas verificables.
- La evolución de las metodologías de análisis no dirigido entre la primera y la segunda parte de la tesis, evidenciando los conocimientos y capacidades adquiridos durante el doctorado (mejoras en criterios de procesamiento, modelado, validación e interpretación).
- La equivalencia y transferibilidad de modelos entre distintos sistemas instrumentales, orientada a favorecer su implementación en equipos de menor costo sin perder desempeño analítico, ampliando así el alcance potencial de aplicación y adopción en contextos productivos.

Se han abarcado problemas representativos y conectados del sistema productivo de las mandarinas: calidad del fruto, sanidad, estabilidad productiva y semillazón en un cultivar de gran importancia en Uruguay demostrando la viabilidad y especificidad de las herramientas metabolómicas para afrontar problemas de base interdisciplinaria de claro impacto en el sector productivo.

Este trabajo aporta evidencia consistente de que la variabilidad química relevante para el sistema productivo puede capturarse en matrices complementarias (pulpa, cáscara, hoja y ovario) y traducirse en conclusiones útiles para desarrolladores de variedades y manejos productivos.

En pulpa, se ha logrado vincular la composición química y la calidad/aceptación por el consumidor al mostrar que las diferencias metabólicas explican el balance asociado a la percepción sensorial y permiten construir criterios de clasificación y predicción con potencial aplicabilidad en selección varietal temprana.

En cáscara, se han identificado señales químicas asociadas a respuestas diferenciales de la fruta frente a cancro cítrico en diversas etapas de su desarrollo y al evidenciar que la discriminación varietal se sostiene, en particular, en diferencias cualitativas de compuestos superficiales, compatibles con el rol de la cáscara como interfaz funcional de defensa.

En hojas, se demuestran etapas metabólicas que explican la alternancia al describir perfiles de polifenoles y limonoides diferenciales entre estados productivo y no productivo donde ha sido posible proponer metabolitos candidatos a indicadores del estado productivo, reforzados por el análisis dirigido de compuestos secundarios.

En mandarina Afourer, se logra estudiar la evolución de la transición flor-polinización-cuajado del fruto bajo diversos manejos productivos buscando la generación de frutos partenocárpicos, de bajo contenido en semillas. Se han podido correlacionar estadios fisiológicos y niveles hormonales con marcadores químicos específicos. Se logra dar un marco racional a las observaciones agronómicas y productivas observadas. La regulación temprana del cuajado a través de diversos manejos a campo, permite mostrar que, al modular la polinización la presencia de semillas se ve drásticamente alterada. mientras que intervenciones con GA3 o abejas pueden favorecer escenarios de baja semillazón sin afectar la productividad.

10.2 Aprendizajes sobre el encare metabolómico

La metabolómica aplicada al agro requiere un equilibrio entre amplitud y trazabilidad. Los enfoques no dirigidos aportan una visión amplia al encontrar cambios fisiológicos sistemáticos, detectar señales clasificatorias y permitir la construcción de huellas y, a partir de ellos, modelos de clasificación o predicción, mientras que los enfoques dirigidos

cuantifican metabolitos clave y facilitan la traducción de los hallazgos a indicadores para la toma de decisiones.

Esta complementariedad entre enfoques dirigido y no dirigido debe sustentarse con criterios estrictos de calidad y validación. Es fundamental reportar y documentar de manera completa la preparación de muestras, el control de calidad, la identificación, el preprocesamiento y los criterios de aceptación, además, cuando se trabaja en metabolómica no dirigida y se busca comparabilidad entre corridas, campañas o laboratorios, se recomienda incorporar muestras de control (tipo pooled QC), estándares internos y verificación de aptitud del sistema para monitorear desempeño y corregir deriva instrumental (Broadhurst et al., 2018). Dado que la interpretación multivariada es particularmente sensible al sobreajuste, es indispensable aplicar estrategias robustas de validación quimiométrica, como validación cruzada y pruebas de permutación a modelos supervisados como PLS-DA (Westerhuis et al., 2008).

10.3 Aspectos prácticos importantes

En la práctica, los costos recurrentes de un encare metabolómico suelen concentrarse en dos rubros. Por un lado, en estudios dirigidos, los solventes deuterados que se requieren para asegurar condiciones adecuadas de adquisición y estabilidad de la señal en RMN, su uso, además, obliga a estandarizar cuidadosamente parámetros y condiciones para mantener comparabilidad entre corridas, como señalan guías específicas para metabolómica mediante RMN (Haslauer, Hemmler, Schmitt-Kopplin, & Heinzmann, 2019). Por otro lado, en la transición hacia cuantificaciones dirigidas, el principal limitante económico suele ser la compra de estándares, especialmente cuando se incorporan estándares isotópicamente marcados para controlar variabilidad y fortalecer el aseguramiento de calidad, aspecto discutido en guías de QA/QC para ensayos metabolómicos.

A partir de lo aprendido en esta tesis y de recomendaciones ampliamente aceptadas en el área, resulta conveniente pensar el trabajo futuro enfocado en eficiencia y reproducibilidad. Cuando el objetivo implique el uso de RMN, es importante minimizar la manipulación y evitar pasos innecesarios de intercambio de solvente, preparando los

extractos directamente en solvente o buffer deuterado (tal como se implementó en la Parte II), esto reduce variabilidad por manipulación, tiempos de preparación y pérdidas diferenciales, aunque exige muchas veces el uso de volúmenes mayores de solvente deuterado (Beckonert et al., 2007). En caso de extractos acuosos, el uso de un buffer apropiado es recomendable para simplificar el procesamiento de espectros de RMN en la etapa de alineado ya que aquellos metabolitos en los que cambios de pH modifican su desplazamiento químico uniformizan y afinan las señales. En paralelo, conviene optimizar los pasos de homogeneización de la muestra para lograr una miniaturización representativa de la misma, volúmenes y formatos de adquisición (cuando el equipamiento lo permita) para disminuir el costo por muestra. Para estudios dirigidos, una estrategia realista es avanzar primero en etapas exploratorias, trabajar con un set mínimo de estándares de referencia y luego reservar la incorporación de estándares isotópicos y curvas completas para la fase de validación, cuando ya se cuenta con avances en la definición de los métodos de extracción. Finalmente, dado que en matrices vegetales la variabilidad biológica es alta, la reproducibilidad depende fuertemente del diseño experimental y del registro de metadatos (etapa fenológica, tipo/edad del tejido, hora de muestreo, condiciones ambientales, estado hídrico y nutricional), junto con un plan de QA/QC definido desde el inicio que incluya blancos, QCs, randomización, monitoreo de deriva y criterios de aceptación antes de interpretar datos biológicos (Salem et al., 2020).

10.4 Perspectivas a futuro

Por ser el metabolismo la expresión final de la cascada genómica-proteómica, donde es posible observar las características diferenciales entre variedades de una misma especie, la metodología desarrollada en el presente estudio sirve como modelo para enfrentar escenarios y problemáticas productivas, no solo de mandarinas sino de otros cultivos de interés. Los aspectos metodológicos permiten estudiar de una manera holística e interdisciplinaria los fenómenos productivos variados, donde el sesgo muchas veces no permite ver la totalidad y complejidad del fenómeno. Este nuevo enfoque se basa en la definición clara del problema a estudiar, la identificación de cómo las variables ambientales obligan a una expresión metabólica diferencial entre individuos y la determinación de la misma. La identificación de esa expresión metabólica se traduce en la caracterización de compuestos y perfiles que se pueden asociar a diferentes condiciones

de calidad, de resistencia a estrés biótico y abiótico que ayudan a la selección de nuevos cultivares y a la adopción de estrategias productivas basadas en hechos objetivos. Por lo tanto, el campo de aplicación de la metabolómica a la producción agrícola dirigida o no, es inmenso.

Como se vio en los resultados de pulpa, la aceptabilidad es multifactorial e involucra aroma, textura y balance del sabor. Estos aspectos abren oportunidades de profundizar la investigación y continuar la selección varietal empleando RMN cuantitativo, que es una tendencia actual en el estudio de productos naturales, para determinar metabolitos que aportan turgencia y color, y el estudio de volátiles mediante GC-MS, correlacionando con datos de textura, color y sensoriales. Este trabajo sería una continuación natural con el grupo de evaluación sensorial de la facultad de química y el INIA Salto Grande. El estudio de compuestos con capacidad nutracéutica en pulpa es otra de las posibilidades de trabajo y desarrollos, el análisis dirigido a compuestos de importancia como los flavonoides y vitaminas pueden promover la selección varietal y aportar valor comercial a las variedades desarrolladas. Por otro lado, las transferencias del modelo de aceptabilidad entre diferentes sistemas instrumentales, laboratorios y campañas podrían ser ampliadas y reforzadas siguiendo buenas prácticas quimiométricas, estandarizando procedimientos y controles internos.

Con relación a los estudios de cáscara, se debe profundizar en el estudio de las señales discriminantes en las regiones de pectinas, terpenos y otros componentes con posible actividad biológica. Para ello se podían usar experimentos bidimensionales y fortificaciones (Salvino, Colella, & De Luca, 2021), al igual que se hizo con la glicina betaina en capítulos posteriores, complementando con estudios específicos que empleen espectrometría de masas acoplados a cromatografía de alta resolución, como LC-MS/MS o GC-MS Y así encontrar posibles marcadores químicos de resistencia. Por otro lado, dado que las mandarinas presentan susceptibilidad variable al cancro, una línea de investigación interesante sería en conjunto con el grupo de fitopatología tanto de INIA como de Facultad de Agronomía, para hacer una correlación más adecuada con valores medibles de susceptibilidad y la composición química de la cáscara (Favaro et al., 2020). Este tipo de estudios podrían involucrar la evaluación microscópica (SEM, actualmente

disponible en Facultad de Química) de la estructura epicuticular de la cáscara y cuantificación de compuestos con estándares de referencia (análisis dirigido por GC-MS).

Relacionado con la susceptibilidad al cancro, pero en el estudio de la hoja, surge la posibilidad de evaluar contenido de linalol en las diferentes variedades (Li et al., 2023; Shimada et al., 2014). En hoja se puede estudiar además factores de tolerancia a estrés hídrico y la evaluación del efecto de diferentes porta-injertos y ploidía de las plantas frente a situaciones de estrés biótico y abiótico. Continuando con el fenómeno de alternancia, la incorporación del estudio de diferentes hormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas), aportaría a entender la mecánica de la señalización que ocurre por estos cultivos para regular la producción de frutos entre una cosecha y otra. Este conocimiento podría ayudar a proponer estrategias de manejo de la floración entre cosechas.

En cuanto a la semillazón, la optimización de las condiciones que favorezcan la producción de frutas apirenas requiere una evaluación más detallada que considere diferentes combinaciones de colmenas y/o distancia a las fuentes de polen, dosis y momento de aplicación de GA3, y la proximidad de un cultivar donante para cuantificar su efecto conjunto sobre la semillazón y el rendimiento. Para entender la dinámica de la polinización, se podría estudiar el polen mediante marcadores moleculares. Como oportunidad de colaboración, el INIA Salto grande cuenta con infraestructura y experiencia en el tema, que complementada con estudios quimiométricos aportarían a la propuesta de condiciones óptimas de cultivo sin semillas. El conocimiento generado con el estudio dirigido de giberelinas podría ser mejorado ampliando el espectro de giberelinas estudiadas, e incluyendo otros tipos de hormonas vegetales que tienen acción conjunta y complementaria a las giberelinas.

10.5 Conclusión

Esta tesis demuestra que la metabolómica a partir de ciencia básica, puede operar como herramienta transversal para mejoradores y productores. Permite comprender y gestionar problemas productivos complejos en mandarinas y estas herramientas pueden aplicarse transversalmente a diversos sistemas productivos. Se ha logrado aplicarla para distintas características de su producción trabajando en condiciones reales de campo,

vinculando: calidad, sanidad, estabilidad productiva y semillazón como manifestaciones integradas del funcionamiento del sistema árbol–ambiente–manejo, ayudando a la identificación de etapas claves del cultivo. La contribución más sólida es haber podido conectar descubrimientos (huellas y patrones) relacionados a las transformaciones metabólicas, identificando marcadores que permiten diseñar modelos y comprender escenarios productivos, aptos para su transferencia. En ese marco, es de resaltar que la obtención de resultados confiables, se basa en tres condiciones: robustez metodológica, validación estadística y diseño orientado a decisión, pilares fundamentales en el encare metodológico metabolómico.

10.6 Referencias bibliográficas

- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M. D., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C., & Nicholson, J. K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, 2(11), 2692–2703. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>
- Bingol, K. (2018). Recent Advances in Targeted and Untargeted Metabolomics by NMR and MS/NMR Methods. *High-Throughput*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/ht7020009>
- Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S. N., Kuligowski, J., Wilson, I. D., Lewis, M. R., & Dunn, W. B. (2018). Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society*, 14(6), 72. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>
- Favaro, M. A., Molina, M. C., Roeschlin, R. A., Gadea, J., Gariglio, N., & Marano, M. R. (2020). Different Responses in Mandarin Cultivars Uncover a Role of Cuticular Waxes in the Resistance to Citrus Canker. *Phytopathology*, 110(11), 1791–1801. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-20-0053-R>
- Gertsman, I., & Barshop, B. (2018). Promises and pitfalls of untargeted metabolomics. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41, 355–366.

<https://doi.org/10.1007/s10545-017-0130-7>

Haslauer, K. E., Hemmler, D., Schmitt-Kopplin, P., & Heinzmann, S. S. (2019).

Guidelines for the Use of Deuterium Oxide (D₂O) in ¹H NMR Metabolomics.

Analytical Chemistry, 91(17), 11063–11069.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01580>

He, Y., Han, J., Liu, R., Ding, Y., Wang, J., Sun, L., ... Cheng, Y. (2018). Integrated

transcriptomic and metabolomic analyses of a wax deficient citrus mutant exhibiting

jasmonic acid-mediated defense against fungal pathogens. *Horticulture Research*, 5.

<https://doi.org/10.1038/s41438-018-0051-0>

Li, X., Wang, Q., Li, H., Wang, X., Zhang, R., Yang, X., ... Shi, Q. (2023). Revealing the

Mechanisms for Linalool Antifungal Activity against *Fusarium oxysporum* and Its

Efficient Control of Fusarium Wilt in Tomato Plants. *International Journal of*

Molecular Sciences. <https://doi.org/10.3390/ijms24010458>

Salem, M. A., Perez de Souza, L., Serag, A., Fernie, A. R., Farag, M. A., Ezzat, S. M., &

Alseekh, S. (2020). Metabolomics in the Context of Plant Natural Products

Research: From Sample Preparation to Metabolite Analysis. *Metabolites*, 10(1).

<https://doi.org/10.3390/metabo10010037>

Salvino, R. A., Colella, M. F., & De Luca, G. (2021). NMR-based metabolomics analysis

of Calabrian citrus fruit juices and its application to industrial process quality

control. *Food Control*, 121, 107619.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107619>

Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Rodríguez, A., Peña, L., & Omura, M. (2014).

Characterization of three linalool synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. and

analysis of linalool-mediated resistance against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and

Penicillium italicum in citrus leaves and fruits. *Plant Science*, 229, 154–166.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.008>

Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., ... Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics : Official Journal of the Metabolomic Society*, 3(3), 211–221.

<https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>

Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C. J., Smit, S., Vis, D. J., Smilde, A. K., van Velzen, E. J. J., ... van Dorsten, F. A. (2008). Assessment of PLSDA cross validation. *Metabolomics*, 4(1), 81–89. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0099-6>

Yang, Y., Saand, M., Huang, L., Abdelaal, W., Zhang, J., Wu, Y., ... Wang, F. (2021). Applications of Multi-Omics Technologies for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.563953>

Apéndices

Apéndice 1: The impact of sensory attributes of mandarins on consumer perception and preferences (Gámbaro et al., 2021)

Journal of Agriculture and Food Research (2021) 100136



The impact of sensory attributes of mandarins on consumer perception and preferences

Adriana Gámbaro^{a,*}, Antonella Roascio^a, Natalia Hodos^a, Ignacio Miguez^c, Joanna Lado^b, Horacio Heinzen^c, Fernando Rivas^b

^a Sensory Evaluation Laboratory, Department of Food Science and Technology, School of Chemistry, Universidad de la República (UDelar), General Flores, 2124, Montevideo, Uruguay

^b National Institute of Agricultural Research (INIA), Uruguay

^c Pharmacognosy and Natural Products Laboratory, School of Chemistry, Universidad de la República (UDelar), Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:
Mandarin
Sensory profile
Consumer
CATA questionnaire

ABSTRACT

Although the sensory characterization of mandarins has usually been performed by trained assessors, in recent years, the methodologies that depict sensory descriptions from the perception of consumers, such as the check-all-that-apply (CATA) questionnaires have become very popular. In this work, an exploratory study was first carried out using a focus group (FG) technique to determine attributes and aspects that influence the decision to purchase mandarins. Secondly, the consumer panel recruited 100 regular mandarin consumers that were randomly divided into two groups. Group "A" received segments of 15 mandarins. Group "B", instead of receiving the same mandarins in segments, they received them as a whole fruit having to peel them by themselves. Both groups evaluated the total acceptability with a 4-point hedonic scale and answered a CATA questionnaire composed of 38 items for Group "A" and 52 items for Group "B". Although the consumers in the FG described an "ideal" mandarin as easy-to-peel, no significant difference ($p > 0.05$) was found in the acceptability between groups "A" and "B". Characteristics such as sweet, very sweet, fresh smell, sweet smell, bright, fruity taste, fresh flavor, typical flavor, balanced taste and nice flavor were strongly and positively correlated with overall consumers' acceptance.

These descriptors could be considered the sensory drivers of the liking of mandarins.

1. Introduction

Mandarins are generally considered a sweeter and less bitter fruit than oranges [1]. The perceived flavor of mandarins is composed by aroma, tactile sensations and taste, among which sweetness, acidity and the relationship between these two parameters, are the so-called "fruit ripening ratio" [2]. In addition, bitterness can also be perceived, resulting from the presence of compounds such as limonin, naringin and neohesperidin [3]. The aroma of a mandarin results from a mixture of various aromatic compounds, including alcohols, aldehydes, ketones, terpenes, and esters [4,5]. Limonene is one of these characteristic compounds, being part of the group of monoterpenes together with linalool and 4-terpineol [6]. Each citrus cultivar presents a different combination of volatiles in the peel, usually named as essential oils [7]. These compounds are present in oil glands in the skin and are rapidly released during fruit peeling, infusing consumer's hand with the typical

flavours of mandarins. According to researchers, the mouthfeel perception during consumption is due to the chewiness / gumminess of the mandarin segments and their juiciness [2].

The sensory characterization of mandarins has usually been obtained by performing descriptive analysis with panels of trained judges in order to measure specific variables concerning fruit quality [8,9] or to study the effects of storage conditions [10–16]. In particular, Carbonell et al. [17], developed a list of 21 descriptors for fresh juice and 29 descriptors for processed juice of Spanish mandarins with a panel of 20 trained assessors. Besides, other authors have studied the relationship between physico-chemical analytical data and sensory data obtained by trained panels [10,19].

For many years, consumers have been considered only capable of making hedonic judgments. Thus, to identify the critical flavor attributes and the key factors determining the acceptability of a product, the descriptive sensory analysis data obtained with trained assessors was

* Corresponding author. General Flores, 2124, Uruguay.
E-mail address: agambaro@fq.edu.uy (A. Gámbaro).

<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100136>

Received 20 November 2020; Received in revised form 28 June 2021; Accepted 14 August 2021

Available online 19 August 2021

2666-1543/© 2021 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

related to the preferences of consumers [30]. For example, Goldenberg et al., [31], conducted a sensory quality study with 42 different mandarin varieties from Israel where a trained panel measured the intensity of sweetness, acidity, bitterness, fruitiness, mandarin flavor, juiciness and gumminess of mandarin samples and explored their correlation with consumers acceptance. Simons et al. [22], performed a generic descriptive analysis of 8 commercially available California mandarins and a tangelo (hybrids between tangelines and grapefruit) with a panel of trained assessors. The same samples were evaluated by adults as well as children consumers. They all showed liking for its appearance, internal color, flavor, texture and general liking with hedonic scales. Also, the adequacy of sweetness, acidity, firmness and juiciness with JAR (just-about-right) scales. Adults as well as children also scored the difficulty to peel the fruit. Consumer preferences were modeled with the descriptive analysis measurements using a PLS2 regression model.

Other authors have only used the consumers in order to explain the preferences for varieties of mandarins. House et al. [32] performed sensory studies in 3 cities of USA in order to research the preferences of adults and children for new and existing varieties of mandarins and tangelos. From four to six different mandarins and tangelos were presented to the participants (a whole fruit as well as a segment without peeling). They were asked to score the color of the whole mandarin, the color of the fruit pulp, the sweetness, acidity, juiciness, the ease of peeling, the amount of seeds, size and shape, using scales of adequacy JAR (just-about-right). The appearance and flavor were evaluated with 9 score hedonic scales. Bi et al., [24], explored the preferences of Atlanta (USA) consumers for internal sensory factors (ease of peeling, number of seeds and taste) and external factors (appearance).

Existing literature suggests that all the available sensory studies reported to have been done on mandarin segments or juice. However, there is little information about the real influence of fruit external appearance (peel color and texture) and the ease of peeling in reference to the acceptability of consumers and the perception of other sensory aspects such as smell, texture and flavor. For instance Ref. [25], performed experimental auctions in which participants were asked to present offers for five different mandarins in three stages: after looking at the fruit, after peeling the fruit and after tasting the fruit.

In the last decade, the methodology "Check all that apply" (CATA) has been proposed as a method to obtain accurate information of sensory characteristics of various products, being the results reliable and stable [26]. The CATA questionnaire provides the evaluators with a list of terms to select those that are considered appropriate to describe the evaluated product. Considering both qualitative and quantitative aspects, a measure of the consumers' sensory reaction to a product is obtained. Therefore, there is an identification of indirect associations made by consumers [27].

Compared with the data obtained with the descriptive sensory analysis from panels of trained judges [28,29], several authors have reported that CATA is an easy and fast methodology, due to have a similar characterization of products from consumers. There are precedents about the use of CATA questionnaires to determine how consumers perceive the sensory characteristics of fruits, in particular strawberries [26,30], kiwis and black currant juices [28].

The objectives of the present work were: (a) to obtain the sensory profile of mandarins generated by consumers using CATA questions and (b) to investigate the relative importance of different sensory attributes in the acceptability and selection of the terms of the CATA questionnaire to describe samples.

To achieve this objective, the study was organized in two stages: a qualitative exploratory study using the Focus Group technique and a quantitative investigation with mandarin samples evaluated by regular consumers.

2. Materials and methods

2.1. Focus Groups: exploratory study

Focus Groups (FGs) are one of the most used qualitative research tools in the study of food sciences [31] and have been defined by Ref. [32] as "a carefully planned discussion designed to obtain perceptions on a defined area of interest in a permissive, nonthreatening environment". In the present study, FGs were used in order to explore the most important attributes for consumers when choosing and purchasing mandarins.

Three FGs were held in March 2019 in Montevideo city (Uruguay). The number of participants in each FG varied between 7 and 8 ($N = 24$), and groups were carried out in a space which was suitable for that purpose at the Chemistry Faculty. The participants were recruited taking into account their age (between 20 and 50 years old), their gender (50% men and 50% women) and their consumption of mandarins (once a week or more). The FGs were supervised by the same trained moderator and an observer was also present in each session. The sessions were audio recorded to facilitate qualitative analysis.

FG sessions lasted approximately 1 h and were divided into three stages (a) generic discussion on fruit consumption (frequency, habits) (b) drawing of an ideal mandarin with a description of it and (c) discussion on the consumption of mandarins (relevant aspects at the time of purchase, advantages / disadvantages of mandarin consumption). The attributes and the most important aspects that determine the consumption of mandarins were identified and formed the basis for the design of the evaluation report of the quantitative study.

3. Consumer study

3.1. Data collection

Fifteen 2019 harvest samples of mandarins were evaluated, corresponding to different hybrid developed by the Citrus Genetic Improvement Program of the National Institute of Agricultural Research (INIA) and the Faculty of Agronomy of Universidad de la República (Udelar), Uruguay. The hybrids were generated from crossbreeding between the varieties Ellendale (*Citrus reticulata* Blanco), Satsuma cv 'Owari' (*Citrus unshiu*), Willowleaf mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) and the 'Page' (*Citrus clementina* x [*Citrus mandarin* x *Citrus paradisi*]). All cultivars were grown under the same environmental and agronomical conditions. Fruits were harvested at full commercial maturity stage (Citric Acid <1.2% and >0.7%; TSS >9) between May and September, depending on the cultivar. The sensory tests were carried out between one and five days after harvest, storing the fruits at 5–6 °C and allowing them to reach room temperature before carrying out the study.

It should be noted, that the main objective of this study was to investigate the relative importance of different sensory attributes in the acceptability of mandarins instead of characterizing the flavor of different varieties, due to the quality and flavor of the fruit can be highly influenced by climatic conditions, horticultural practices, etc., as several authors have shown [4,33,34].

The study was conducted in Montevideo (Uruguay). A total of 100 regular mandarin consumers (once a week or more), aged between 20 and 64 years (46% men and 54% women, 61% professionals or university students) evaluated the samples over 6 sessions, between March and September 2019. This number of consumers is suggested for sensory acceptance according to Hough et al. [35]. Participants were recruited from a consumer database for their interest in tasting mandarins and for their availability for the study. In each session, 2 to 3 samples were studied, according to the optimum commercial harvest for each variety.

Consumers were randomly divided into two groups of 50 consumers each (Group "A" and Group "B") without significant differences ($p > 0.05$) in sociodemographic data (age, gender, education) according to the chi-square test. One mandarin sample was presented to each

consumer. Group "A" evaluated peeled mandarin segments while group "B" evaluated mandarins with skin and they had to peel the fruit before eating. All samples were presented in odor-free plastic containers labeled with 3-digit random codes. Presentation order was monadic in accordance with designs that were balanced for presentation order and carry-over effects (Williams design). Still mineral water was available for rinsing. Testing took place in a sensory laboratory in standard sensory booths that were designed in accordance with ISO 8589 [36], under artificial daylight and temperature control (22 °C).

Respondents scored their overall liking for each of the samples on a nine-point hedonic scale bearing the Spanish legends reported by Cui et al. [37]. The description of the samples was also requested by means of a check-all-that-apply (CATA) questionnaire, composed for group "A" with 38 terms: 7 of texture (*soft, fibrous, firm, dry, with little juice, juicy, with little pulp*), 8 of odor (*with a lot of smell, with little smell, sweet smell, strange smell, fresh smell, natural smell, green smell, no smell*), 18 of flavor (*acidic, very acidic, bitter, very bitter, a little sweet, sweet, very sweet, balanced flavor, orange taste, fermented taste, fresh flavor, fruity taste, intense flavor, without flavor, typical flavor, bad taste, nice flavor*) and 5 referred to seeds (*with many seeds, with few seeds, without seeds, with small seeds, with large seeds*). For group "B", 14 terms related to the peel characteristics were added (*bright peel, brightly colored peel, peel with wrinkles, peel with spots, peel with ridges, thin peel, thick peel, smooth peel, very sticky peel, easy to peel, orange peel, porous peel, uniform peel, green peel*).

The terms were selected from the results of the qualitative exploratory study. Terms were presented in a different order for each participant according to recommendations [38], following a design balanced for presentation order (Williams Latin Square). The test was carried out in a sensory laboratory compliant with ISO 8589 [36].

3.2. Data analysis

Analysis of variance (ANOVA) was conducted on the overall liking data considering sample, consumer group and the double interaction as variation sources. Tukey's test was used to determine statistically significant ($p \leq 0.05$) differences between samples.

Data analysis of frequency of use of CATA terms was performed according to Cadena et al. [39] using Cochran's Q test and correspondence analysis (CA).

For the internal preference maps, a Multiple Factor Analysis (MFA) was performed on the liking scores table and the frequency table of CATA terms according to Bécue-Bertaut & Pagès [40], considering liking scores as active variables and CATA counts as supplementary variables [41]. Statistical analyses were performed using XLStat 2016 (Addinsoft, NY).

4. Results

4.1. Focus Group: exploratory study

The textual transcriptions of what was expressed by consumers are presented between quotation marks in italics. Consumers stated that citrus fruits, especially mandarins, are seasonal fruits, and thus, this is the perception during their consumption.

"There were good mandarins a couple of weeks ago." "It is time for beautiful mandarins." "At this moment, I consume citrus."

Fruits, in general, including mandarins, are preferably purchased in places where the participants are allowed to touch and smell the fruit. Therefore, the places to purchase fruits are the supermarket or neighborhood markets. "I use to touch a lot, much more than look." "I buy in places where they let me touch; if they do not let me get my hands on the fruit, I do not buy." In addition, there are other requirements when choosing the fruit in the place of purchase that are summarized in the following

sentences. "The fruit can be touched. What I strongly notice is the smell of the fruit: I put it close to my nose, and I associate the smell with whether it is ripe or not. If it has no smell, it has no flavor for me."

Most of the participants refer to the smell as a characteristic of the ideal mandarin; it is an attribute that must be present, i.e., "It should have a good aroma." Consumers think that they can predict taste through smell: "You can perceive its sweetness by its aroma."

All participants agreed that mandarins should be "juicy", with a balanced flavor between sweetness and sourness. It must have "an exquisite balance between sourness and sweetness". Some participants prefer a sweet taste: "Balance between sweet and sour but inclined to sweet". All participants said they prefer brightly colored mandarins. As for the taste, half of them prefer orange peel, and the other half, orange and green peel. Regarding peeling, there was consensus that an ideal mandarin should be "easy to peel".

As for seeds, their presence or absence is not an attribute that participants considered, although they did point out "sometimes when they have a lot of bothersome seeds, especially if they are very small, your mouth is full of seeds". No participant indicated any variety of their preference; they simply did not remember specific cultivar names. Either shape, size or price was mentioned.

Mandarins can be consumed in various ways, as a juice, smoothie or as a fresh whole fruit. Participants agreed that they are "easy to eat", "they are practical to eat and, despite the smell, you can eat it on the bus". It is a "fruit to share".

5. Consumer study

Table 1 shows the mean of overall liking scores based on sample and group. Among the variables considered, the sample factor was found to have a significant influence on overall liking scores ($p < 0.0001$); unlike the group ($p = 0.6130$) and the sample*group interaction ($p = 0.6261$).

Significantly different acceptability scores were observed among the samples, indicating that evaluated mandarins showed differences in their sensory characteristics that affected consumers' preferences (see Table 1).

Average values within a column with different letters were significantly different according to Tukey's test ($p \leq 0.05$). No significant differences were found ($p > 0.05$) between the acceptability of the samples evaluated without and with skin (Group "A" vs Group "B").

The 15 samples were clearly different from the sensory terms selected by consumers to describe the samples using CATA questionnaire. The most used descriptors by consumers of the Group "A" were: juicy, sweet and with a little odor, with 332, 324 and 313 total mentions, respectively. The most used descriptors by consumers of Group "B" were: juicy, orange peel, thin peel and sweet (with 506, 459, 319 and

Table 1
Average overall liking scores (evaluated in a 9-point structured scale) for consumers who evaluated mandarin samples.

Sample	Group "A"	Group "B"	F
M1	6.4 ^{abc}	6.3 ^{abc1,d}	0.7904
M2	5.9 ^{bcd}	6.4 ^{abc1,d}	0.2889
M3	7.4 ^a	7.2 ^{ab}	0.5277
M4	6.1 ^{abc}	5.6 ^{cd}	0.1928
M5	6.1 ^{abc}	6.3 ^{abc1,d}	0.5994
M6	5.8 ^{cd}	6.1 ^{abc1,d}	0.4340
M7	4.7 ^{de}	4.9 ^{ef}	0.5491
M8	5.7 ^{cd}	5.3 ^{cd}	0.2570
M9	6.1 ^{abc}	6.5 ^{abc1,d}	0.4066
M10	5.7 ^{cd}	7.4 ^a	0.6088
M11	7.2 ^{ab}	7.5 ^a	0.3197
M12	6.3 ^{abc}	6.9 ^{abc1,d}	0.1672
M13	3.4 ^e	3.6 ^e	0.3919
M14	7.0 ^{ab}	6.8 ^{abc1,d}	0.5291
M15	6.5 ^{abc}	6.6 ^{abc1,d}	0.4881
F	< 0.001	< 0.001	

310 total mentions, respectively).

Of the 30 terms evaluated by both groups, 5 were eliminated (with little pulp, very bitter, fermented taste, dry and without taste) because they did not reach a minimum of 10% in the number of mentions in at least one sample. Of the 14 terms evaluated only by Group "B", the term peel with wrinkles was eliminated for the same reason.

In Group "A", significant differences were found in 28 of the 33 terms of the CATA questionnaire, according to the Cochran Q test. No significant differences were found ($p > 0.05$) in the number of mentions of the terms fresh smell, natural smell, little taste, fresh taste and no smell. In Group "B", a significant difference was found in 41 of the 46 terms used, according to the Cochran Q test. No significant difference was found ($p > 0.05$) in the number of mentions of the terms very sweet, green smell, strange taste, fresh taste and no smell.

To analyze the influence of the peeling process on the perception of these terms, a Chi-square test was performed between the number of total terms used to describe the samples with and without peel. When mandarins without peel were evaluated, the total number of the following attributes increased significantly ($p \leq 0.05$) according to the Chi-square test: with little smell, and no smell, while decrease significantly ($p \leq 0.05$) the number of the following attributes: with much smell, sweet smell, strange smell, fresh smell, natural smell and green smell (see Table 2).

For a better visualization of the relationship between the terms of the CATA questionnaire and the mandarin samples, a correspondence analysis was made with common terms to both groups of consumers (not linked to peel) and for identifying the samples that were evaluated with and without peel (Fig. 1). The first two factors explained almost 47% of the variability of the experimental data obtained. Fig. 3 shows that the samples evaluated with and without peel are in very close zones in the space. This means that the description of the samples through terms of texture, odor, taste and seeds were not affected for most of the samples by peel presence.

In Fig. 1, it is also observed that the samples with higher acceptability (M3, M11 and M14) are found in the upper left quadrant, associated with odor terms (natural, fresh, sweet, with much smell) and flavor (rich taste, intense, typical, fruity, fresh, balanced, sweet and very sweet). The sample with lower acceptability (M13) is to the right of the F1 associated with the terms very acidic, strange smell and ugly taste.

In parallel, another AC was made only with terms related to peel and evaluated by Group "B". The results are presented in Fig. 2. In this case, the first two factors explained almost 60% of the variability of the experimental data obtained. It is worth to note that one of the samples which showed high acceptability (M3) was associated with the term very sticky peel.

The results of the internal preference analysis of the mandarin study (generated from the global individual liking scores) are shown in Fig. 3. For each individual, the end point of a linear vector is shown, which represents the highest acceptance. The first two dimensions of preference explained 39.9% of the variability, representing 27.0% and 12.9% of the total variance, respectively. Third and fourth dimensions did not add useful information to understand the consumers' perception of the

mandarins evaluated. For this reason, a two component solution was selected.

According to the space of preference defined by the first two dimensions (Fig. 3 a, b), mandarin cultivars were distributed in the four sectors of the space. Most of the consumers liking scores were located in the right sector. In order to understand which attributes determine acceptance, the correlation between the preferred directions and the characteristics of the products must be studied by combining Fig. 3 a, b with Fig. 4.

Characteristics such as acidic, no smell, strange taste, little taste, bitter, green smell, strange smell, ugly taste, green peel, with little juice, very sticky peel, very acidic, not very sweet, with large seeds, soft, with many seeds, peel with spots and porous peel were negatively correlated with the overall liking direction.

Characteristics such as sweet, very sweet, fresh smell, sweet smell, bright, fruity taste, fresh flavor, typical flavor, balanced taste and rich flavor were the ones that positively correlated with the overall liking direction, being able to induce feelings of liking.

6. Discussion

The FG sessions provided valuable information on consumer perceptions of mandarins and their consumption patterns. Unlike other citrus fruits that are consumed throughout the year, the fact that consumers consider mandarins as a seasonal fruit, could give more relevance to its "hedonist" properties such as: size, color and flavor [42].

Although many participants would prefer to purchase mandarins at places where they can touch and look at them, the sensory attributes assessed during consumption such as: smell, juiciness, balance between sweet and acidity and the ease of peeling, emerge as key descriptors of an "ideal mandarin". Di Vita et al., [42], performed surveys to determine which are the citrus' attributes that Italian consumers consider the most important and which are the main boosters for purchasing different citrus, mandarins among them. The results of our study coincide with the results of these authors, who reported that sweetness, flavor and smell were important attributes as well as predictors of the frequency of mandarin purchases. Also, Gao et al. [43], through surveys performed in USA, reported that more than 60% of the surveyed considered: freshness, flavor, appearance, juiciness of citrus as extremely essential attributes. These results are slightly different from Poole and Baron (1996) studies who studied the importance of ten attributes of citrus and found that more than the 50% of the surveyed scored: juiciness, peel quality, sweetness and texture as the most important attributes.

Regarding peeling, there was consensus that an ideal mandarin should be "easy to peel". This result is consistent with the statement by Goldenberg et al. [44]. These authors stated that the easy-to-peel mandarin market has increased steadily against other hard-to-peel citrus fruits. However, other authors such as Poole and Baron (1996) and Gao et al. [43], found that the easy-to-peel was a little important factor in the decision of purchase citrus.

The presence or absence of seeds was not an attribute that participants considered. Gao et al. [43], also showed that seeds were less important attributes in consumer preferences for fresh citrus. These results do not coincide with those of Campbell et al., [45]. These authors, through surveys together with the analysis methodology, evaluated the preferences of consumers in 9 cities of USA for seven external attributes of Satsuma mandarin, finding a segment of consumers which was named "no-seed" (41% of the sample) and whose preference for these mandarins was linked to the absence of seeds in the fruit. This group of consumers considered the absence of seeds from two to three times more important in their purchase decision than the color, size, price or mandarins' imperfections. This study showed that the preferences of consumers are heterogeneous, thus, it is essential the identification of groups of specific consumers who have similar attitudes towards the product attributes.

Although in other countries, the main concern of consumers is the

Table 2

Total number of mentions of CATA terms questionnaire. Only the terms with significant difference is shown according to Chi-square test between the number of mentions of both groups of consumers.

CATA questionnaire	Group A	Group B	P (Chi-square)
With a lot of smell	220	356	<0.0001
With little smell	628	350	<0.0001
Sweet smell	175	236	0.036
Strange smell	49	78	0.012
Fresh smell	278	374	0.008
Natural smell	304	454	<0.0001
Green smell	72	162	<0.0001
No smell	164	74	<0.0001

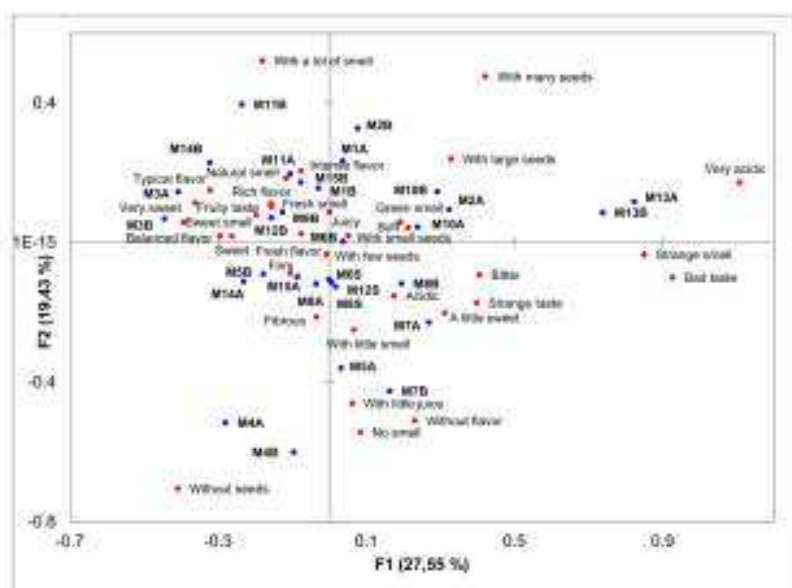


Fig. 1. Representation of the samples and attributes in the first two factors of the correspondence analysis of sensory data obtained using common terms used by both groups of consumer. The letter "A" indicates that the sample that was evaluated by Group A, and the letter "B" indicates that the sample was evaluated by Group B.

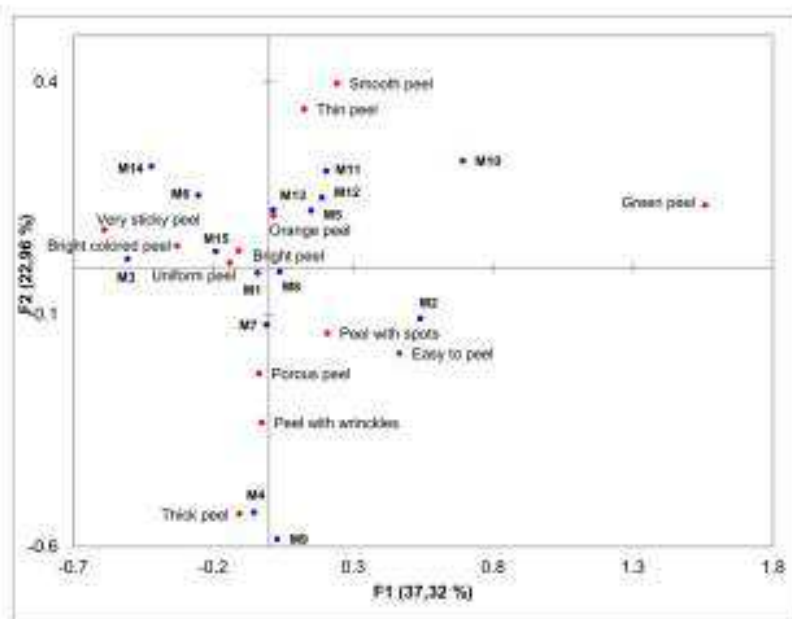


Fig. 2. Representation of the samples and attributes in the first two factors of the correspondence analysis of sensory data obtained using only the terms associated with peel (evaluated by Group B).

absence of seeds, at the same time as the consumption of varieties of mandarins with fewer seeds increases, the number of seeds of a mandarin at the time of purchase cannot be observed (Huose et al., 2011). The participants in our study could not name varieties of mandarins, so identifying a fruit by its variety would imply a consumer learning about varieties with fewer seeds, although variations can occur from one fruit

to another.

Neither our participants mentioned about the fruit size nor shape, being the result different from that stated by Goldenberg et al., [44]. However, our results coincide with what Gao et al. [43], and House et al. [23] who reported that the size was a less important factor in the disposal to purchase citrus.

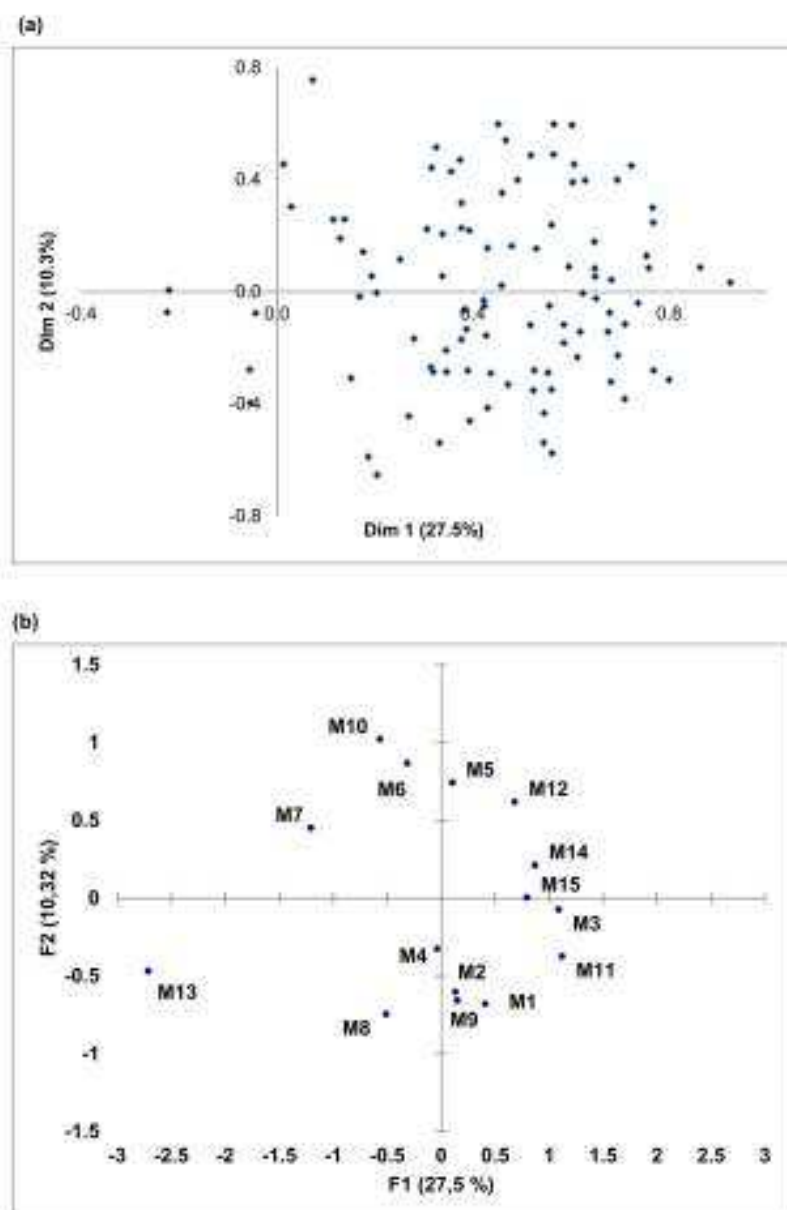


Fig. 3. Internal Preference Mapping on the first two dimensions of the Multiple Factor Analysis. (a) Loading vectors and (b) samples' representation.

For most of consumers the price of the product is usually important. Previous studies of food products, showed that the importance of the price in the decision of purchase is of relative and variable importance. Campbell et al. [40], found a segment of consumers sensitive to the price of mandarins that represented the 23% of the sample. Di Vita et al. [46], applied a conjoint analysis to estimate the mean relative importance of different clementine attributes. Results revealed that price was the most important attribute. In spite of the background, the price was not mentioned by the participants of the Focus Group, maybe due to mandarins are an economic seasonal product in Uruguay.

7. Consumer study

The acceptability of the samples evaluated with or without peel (Group "A" vs. Group "B") was similar. This might suggest that when a consumer is asked to describe an "ideal" mandarin, although it refers to external aspects such as peel color, peel brightness and the ease of peeling, these attributes do not weigh on the total acceptability of mandarins compared to other sensory attributes such as taste and texture. Therefore, taste and texture are determinant attributes in mandarin perception and acceptance by consumer, according to Goldemberg et al., [44].

The CATA questionnaire was able to detect differences in consumer

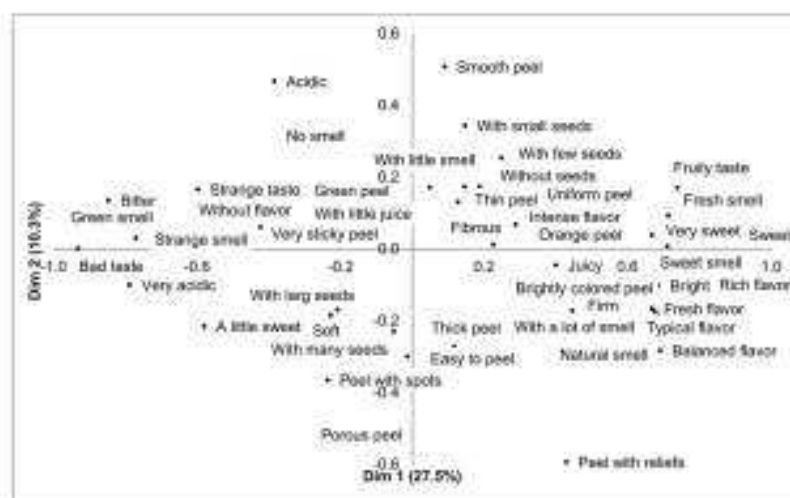


Fig. 4. Representation of the CAT questionnaire on the first two dimensions of the multiple factor analysis considering overall liking scores as active data and product characteristics as supplementary variables.

perception of the sensory characteristics of the varieties of mandarins evaluated, which could explain the wide range in consumers' scores. The act of peeling a mandarin, as Group "B" had to do, influenced the odor perception, since this group of consumers used a significantly greater number of odor-related terms to describe the sample. However, the greatest perception of odors by peeling process did not influence the acceptability scores of the samples, being very similar to those assigned by group "A".

Characteristics such as sweet, very sweet, fresh smell, sweet smell, bright, fruity taste, fresh flavor, typical flavor, balanced taste and rich flavor were the ones that positively correlated with the overall liking direction, being able to induce feelings of liking. These results coincide with that reported by other authors in mandarin studies [21,34,44] and for other fruits, such as strawberries [30] and pomegranates [47].

The samples with higher acceptability were associated with odor terms (natural, fresh, sweet, with much smell) and flavor (rich taste, intense, typical, fruity, fresh, balanced, sweet and very sweet). These results coincide with what other authors reported on the potential impact of aromatic volatile compounds in navel oranges 'flavor' [48], Kinokuni and Satsuma mandarin [4], tangerine [5] and mandarin [9]. Oberland et al. [49], who postulated that it is very likely that aroma plays an important role in determining the liking of grapefruit, which was corroborated in our mandarin study.

The relationship found between sweetness and acceptability also coincides with what other authors reported for other citrus fruits. Oberland et al. [49], reported that for grapefruit, as the sweetness perceived in a sample increased, the hedonic score linearly increased. According to House et al. [23], the sensory attribute with the strongest effect in acceptability of adult mandarins' consumers was the sweetness thus, increasing the likelihood to show that it was very likely or extremely likely to purchase the fruit. Other sensory variables which significantly increased the likelihood that can make adults indicate why they are very likely and extremely likely to purchase mandarins included: juiciness, acidity, and flavor.

In our study, the acidity did not have a positive correlation with the acceptability. On the contrary, acceptability was negatively influenced by characteristics such as acidic, no smell, strange taste, little taste, bitter, green smell, strange smell, ugly taste, green peel, with little juice, very sticky peel, very acidic, not very sweet, with large seeds, soft, with many seeds, peel with spots and porous peel were negatively correlated with the overall liking direction. The sample with lower acceptability

(M13) was associated with the terms very acidic, strange smell and ugly taste.

Regarding acidity, it was negatively correlated with the direction of the acceptability of the samples, but the acidity had a much lower impact on the hedonic score unless the fruit became extremely sour, as found in this study. In the case of mandarins, consumers seem to prefer low sourness, unlike other citrus fruits such as grapefruit, in which the consumers expect a high degree of acidity and if it is not excessive, it is not unpleasant for many consumers [50]. However, Simoes et al. [22], performed a sensory acceptability study of mandarins as well as adequacy of attributes with JAR scales and found a group of consumers (23%) who would clearly prefer the sour samples. This result remarks the importance of studying the preference patterns of different groups of consumers.

Although the term very sticky peel appears to be negatively correlated with the acceptability of the samples, it is not critical, since it was used by 35% of consumers to describe sample M3, which was one of the samples with the highest acceptability. This confirms the previously expressed fact that the ease of peeling of a mandarin, although considered an "ideal" characteristic, does not score higher than other attributes of mandarins, such as flavor and smell, which directly determine the acceptability of this type of product.

The perceived bitterness of mandarin samples was an attribute negatively related to the hedonic score (Fig. 3 and 4), which coincides with what other authors reported in other citrus fruits [49].

Thirty-seven percent of the fruit tested in this study received a hedonic score of less than 6, which indicates that a considerable portion of the evaluated cultivars were not enjoyed by the consumers. The sensory terms used to describe these samples by consumers (acidic, no smell, strange taste, little taste, bitter, green smell, strange smell, ugly taste, green peel, very sticky peel, with little juice, very acidic, slightly sweet, with large seeds, soft, with many seeds, peel with spots and porous peel) are similar in all these samples and could be a good guide for the selection of new cultivars.

As the attitudes of consumers are usually shaped by their past experience and by their experience with the use of products, it is reasonable that the expectations of purchasers pre-consumption can differ from their post-consumption perceptions. In our case, for instance, it is possible that consumers do not think that the absence of seeds are important attributes of pre-consumption of mandarins, due to, Uruguayan consumer regularly expect to find seeds in that fruit. However,

the opinion post-consumption can vary according to the size (very large) or a very high amount of seeds. Therefore, the opinion can change due to the experience the consumer had had with the fruit. In this case, the indication is that the experience of consumption can have had negative information which is important for the next opportunity of purchase.

Additional studies should be done in order to investigate the knowledge consumers have regarding the different varieties of mandarins and how this knowledge affects their preference for the sensory characteristics of these fruits. It is evident that the ignorance of the consumers regarding the product attributes at the time of purchase can lead to a disarrangement between the purchases and consumption preferences. Studies with a greater number of consumers with different demographic and behavioral characteristics are also necessary in order to establish segments with different preferences. Previous studies [45, 46, 51]; Simons et al., 2008) have shown that consumers' preferences are heterogeneous. Therefore, the identification of groups of specific consumers with similar attitudes towards the product attributes is essential.

This study has some important limitations; such as its lack of external validity due to the convenience sample adopted. Conducting a survey on a national representative sample is certainly a recommendation for future research. Additionally, sensory test results can be misleading in predicting consumer's purchasing behaviors, as flavor tests can focus the surveyed attention on the characteristics being tested, which can be ignored in a real purchase (particularly when many sensory attributes are not experienced at the time of purchase). However, following the example of today's increased awareness of the health benefits regarding the consumption of fresh fruits, this research has provided additional information upon the preferences of consumers as well as the boosters of mandarins' purchase.

8. Conclusions

This research adds to the previous literature by distinguishing consumer reaction on sensory characteristics of fruit either when it is tasted peeled or when it has to be peeled in order to taste it. Driven by evidence supporting the adoption of citrus fruits to achieve healthier diets and based on a convenience sample of Uruguayan consumers, the study provides new insights into the motivations to purchase mandarins. This study has confirmed that Uruguayan consumers react similarly to consumers of other countries. The results suggest that sweetness and smell are the most important factors to increase the disposal to eat a mandarin. On the other hand, factors such as the presence of seeds or the ease of peeling are less important.

When describing an "ideal mandarin," consumers preferred the fruit to be easy to peel, but the term very sticky peel was used by more than a third of consumers to describe one of the mandarins that received one of the highest scores of acceptability, suggesting that easy to peeling is not the only determinant for consumer liking. Thus, it can be concluded that fruit flavor prevails as a consumer liking factor over peel characteristics in mandarins.

In most of the sensory studies the real consumption is not simulated as the fruits are presented already peeled or in segments. Our study showed that the preferences of consumers were not modified when the fruit had to be peeled.

Hedonistic properties seem to have a significant potential to be used to exploit mandarin consumption and purchases. Determining the importance of product attributes is of particular relevance for producers as they are interested in understanding and perhaps influencing on the consumer's information environment when it comes to purchasing decisions. For the industry, a marketing strategy for mandarins would be to allow consumers to taste a sample when purchasing in grocery stores.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100196>.

References

- [1] E.Y.R. Riancho, V.E. Gortázar, S. Eugenia, Citrus fruits—varieties, chemistry, technology, and quality evaluation. Part 1: varieties, production, handling and storage, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15 (1981) 360–411.
- [2] S. Tietel, A. Bloch, E. Felik, E. Lewinstein, R. Puri, Taste and aroma of fresh and stored mandarin, *J. Sci. Food Agric.* 91 (2011) 14–23.
- [3] M. Puri, S.S. Mandalay, R.M. Kottari, J.F. Kennedy, Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juice and kinetic approaches for de-bittering, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36 (1998) 145–167.
- [4] T. Miyazaki, A. Patten, E. Goodier, E.A. Gaultier, Distribution of volatile compounds in orange hybrids and grapefruit intermediates, *J. Sci. Food Agric.* 91 (2011) 449–460.
- [5] T. Miyazaki, A. Patten, E.A. Gaultier, J.I. Reyes-Inchaurra, E.A. Goodier, Aroma characterization of orange hybrids by gas-chromatography/olfactometry and sensory evaluation, *J. Sci. Food Agric.* 92 (2012) 747–753.
- [6] A. Vermeir, A. Topp, A. Gagnon, D. Lacroix, E. Delamare, Uruguayan essential oil: Composition of aroma and sensory attributes, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2900–2905.
- [7] M.C. González-Muñoz, J.L. Hernández, M.F. López-García, M.A. Blázquez, A. Gómez, Volatile compounds in citrus essential oils: a comprehensive review, *Food. Pharm. Sci.* 10 (2019) 1–14.
- [8] L. Palou, J.A. Jover, A. Martínez, B. Alonso, M.A. del Río, Physico-chemical and sensory quality of 'Chenopio' mandarins and survival of the Mediterranean fruit fly as affected by complementary cold and carbon dioxide quarantine treatments, *Postharvest Biol. Technol.* 48 (2008) 442–450.
- [9] I. Goldschberg, F. Yoon, H.J. Choi, A. Doron-Fajgenboim, N. Guriel, B. Puri, Elucidating the biochemical factors governing off-flavor perception in mandarins, *Postharvest Biol. Technol.* 120 (2016) 167–179.
- [10] B.H. Hagmann, The flavor of Mandarin hybrids with different coatings, *Postharvest Biol. Technol.* 24 (2002) 79–87.
- [11] M. Alonso, L. Palou, M.A. del Río, J.A. Jover, Effect of a 90% saturation in fruit quality of 'Chenopio' mandarins, *Chemosens. Percept. and Chemistry* 76 (2007) 1631–1635.
- [12] K.L. Dang, H.L. Lee, D. Kim, Effect of hot water treatment on the storage stability of mandarin (Citrus reticulata) in a postharvest storage context, *Postharvest Biol. Technol.* 42 (2007) 221–229.
- [13] S. Tietel, R. Weiss, E. Lewinstein, E. Felik, R. Puri, Improving taste and peel color of early season mandarin mandarin by combining high temperature conditioning and degreasing treatments, *Postharvest Biol. Technol.* 57 (2010) 1–5.
- [14] D. Oberbauer, A. Gallo, S. Mackay, J. Nover, M.L. Arpaiz, Storage temperature and fruit influence sensory quality of mandarins by altering volatile acids, acidity and aroma volatile composition, *Postharvest Biol. Technol.* 59 (2011) 187–193.
- [15] S. Tietel, E. Lewinstein, E. Felik, R. Puri, Importance of storage temperature in maintaining flavor and quality of mandarins, *Postharvest Biol. Technol.* 64 (2012) 175–182.
- [16] D. Oberbauer, A. Gallo, J. Nover, M.L. Arpaiz, Mandarin flavor and aroma volatile composition is strongly influenced by holding temperature, *Postharvest Biol. Technol.* 82 (2013) 6–15.
- [17] L. Carlucci, L. Angeli, A. Carlucci, Sensory analysis of Spanish Mandarin: prices, selection of attributes and post-harvest losses, *Food Qual. Prefer.* 18 (2007) 129–141.
- [18] A. Neri, M. Martini, J.M. García, L. Palou, M.A. del Río, Relationship between sensory and physical-chemical quality parameters of cold-stored 'Chenopio' mandarins coated with two commercial waxes, *Spanish J. Agric. Res.* 7 (2009) 181–18.
- [19] R.Q. Alvarez, C.G. Pizarro, C.G. Lora, J.A. Lardone, Relationship between chromatographic profiling by SPSPME and sensory quality of Mandarin peels: effect of storage technology, *Food Res. Int.* (2011) 1394–1401.
- [20] C. Delgado, G.M. Crisanto, H. Poyrazoglu, C.M. Gómez, Determining the primary drivers of liking to predict consumers' acceptance of fresh vegetables and produce, *J. Food Sci.* 78 (2013) 865–874.
- [21] I. Goldschberg, F. Yoon, T. Kishimoto, A. Doron-Fajgenboim, N. Guriel, B. Puri, Diversity in sensory quality and identifying factors influencing Mandarin flavor liking, *J. Food Sci.* 86 (2015) 8478–8485.
- [22] T. Saito, H. Shiohara, J. Gaurant, G.S. Arpaiz, Mapping the preferences of adult and child consumers for California grown mandarin, *HortScience* 52 (2016) 1029–1037.
- [23] L.A. Howe, X. Guo, T.H. Shum, F.J. Guzmán, M.F. Valera, A. Patten, E.A. Gaultier, Consumer preference for mandarin: implications of a sensory analysis, *Agriculture* 27 (2011) 450–461.
- [24] E. H. L. Howe, Z. Guo, E. Gaultier, Estimating Willingness to Pay for New Mandarin Cultivars: A Revealed Preference Approach. EDPS Document ED07, a publication of the Food and Resource Economics Department, UT-IFAS Extension, Gainesville, FL 32611, 2014.

- [25] N. Fiechi, L. Martínez-Gómez, Information and WTP: Food Quality Perception and Consumer Satisfaction, Paper presented at the 1st Mediterranean Conference on Agro-Food Social Sciences, Barcelona, Spain, 2007.
- [26] S.R. Jaeger, D. Gaudreau, C.M. Bignard, B. Piquet, L. Vidal, A. Gimeux, M. B. Fird, G. Ares, Investigation of bias of hedonic scales when evaluating product attribute information using CATA questions, *Food Qual. Prefer.* 30 (2015) 262–269.
- [27] D. Varela, G. Ares, Sensory profiling: the licensed line between sensory and numerical anchors: A review of recent methods for product characterization, *Food Res. Int.* 98 (2017) 970–988.
- [28] G. Ares, S.R. Jaeger, Examination of sensory product characterization bias when check-all-that-apply (CATA) questions are used concurrently with hedonic assessments, *Food Qual. Prefer.* 40 (2015) 199–208.
- [29] L. Dooley, Y.A. Lee, J.F. Meullenet, The application of check-all that apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its correlation to classical sensory preference mapping, *Food Qual. Prefer.* 21 (2010) 399–401.
- [30] J. León, E. Vercini, A. Muruzábal, G. Ares, Application of a check-all that apply question for the evaluation of strawberry cultivars from a breeding program, *J. Sci. Food Agric.* 90 (2010) 2268–2276.
- [31] M.G. Arvin, M.A. Drake, The use of qualitative research methods in quantitative sciences: a review, *J. Sensory Stud.* 29 (2014) 234–247.
- [32] R.A. Krueger, M.A. Casey, *Focus Groups: A Practical Guide for Applied Research*, 2d Ed., Sage Publications, 1999 (Chapter 1).
- [33] F. Bellini, A.J. Perez Lopez, J.M. Lopez Nicolas, A.A. Corbelli-Bonvicini, Effect of Monahan cultivar on quality of Monahan juice, *Food Sci. Technol.* 33 (2010) 207–213.
- [34] L. Corbelli, A. Bignard, S. Nazzari, L. Corbelli, L. Caporaso, Sensory profile and acceptability of juices from Monahan varieties and hybrids, *Food Sci. Technol.* 36 (2013) 370–386.
- [35] G. Hough, I. Wakeling, A. Mucci, I.Y.E. Chaffee, J. Mendez-Galvado, L. Jorgel Añez, Number of consumers necessary for sensory acceptability tests, *Food Qual. Prefer.* 17 (2006) 522–526.
- [36] ISO, *Sensory Analysis: General Guidelines for the Design of Test Rooms*, ISO 8589, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1988.
- [37] A.V. García, G. Hough, M.G. Martínez, M.J. Margalef, How Argentine consumers understand the Spanish translation of the 9 point hedonic scale, *Food Qual. Prefer.* 22 (2009) 217–226.
- [38] G. Ares, E. Benvenuti, L. Ardoise, L. Vidal, A. Gimeux, S.R. Jaeger, Visual attention by consumers to check-all that apply questions: insights to support methodological development, *Food Qual. Prefer.* 32 (2014) 210–220.
- [39] R.S. Gaudreau, D. Gaudreau, L. Janssens, L. Lorette, L. Vidal, G. Ares, B. Fird, A. Gimeux, Comparison of rapid sensory characterization methodologies for the development of functional products, *Food Res. Int.* 68 (2014) 486–495.
- [40] M. Hervé-Mercier, J. Pagès, Multiple factor analysis and clustering of a matrix of qualitative, categorical and frequency data, *Comput. Stat. Data Anal.* 32 (2000) 1295–1286.
- [41] B. Piquet, F. Bignard, G. Ares, J. Alcala-Marral, J.A. Diego-Mas, Comparing older and younger users' perceptions of apple phones and watches using CATA questions and Preference Mapping on the design characteristics, *J. Sensory Anal.* 20 (2011) 5–12.
- [42] G. Di Vita, M. Bonello, R. Vecchio, G. Gullone, M. D'Amico, Purchasing drivers of fresh citrus fruits in urban Italy: is it all about water? *Nutrients* 12 (2020) 1–13 (2020).
- [43] J. Guo, L.G. Harris, F.G. Gullone, M.F. Velaz, A. Potho, Y.A. Bellini, Consumer preferences for fresh citrus: impacts of demographics and behavioral characteristics, *Int. Food Agribus. Manag. Rev.* 14 (2011) 23–40.
- [44] L. Goldberger, Y. Yano, R. Puri, S. Cerna, Mandarin fruit quality: a review, *J. Sci. Food Agric.* 96 (2016) 25–26.
- [45] R.L. Goughell, R.A. Nelson, R.C. Ebel, W.A. Danner, J.L. Adams, B.R. Buckner, Fruit quality characteristics that affect consumer preferences for satsuma mandarin, *HortScience* 39 (2004) 1664–1669.
- [46] G. Di Vita, R. Vecchio, M. Bonello, R. Zanchini, G. Muesano, G. Gullone, P. Rini, M. D'Amico, On my darling Clementine: heterogeneous preferences for sustainable citrus fruits, *Renew. Agric. Food Syst.* 1–12 (2021), <https://doi.org/10.1017/S1742759220000175>.
- [47] L. Moyano-Kudskubova, L. Bao-Yu, K. Bello, G. Bellini, R. Puri, Genetic diversity and sensory preference in Pomegranate Fruits, 2013, <https://doi.org/10.1017/S1742759220000175>.
- [48] D. Hirschfeld, S. Gatti, B. Mackay, J. Sirois, R. Fiedt, M.L. Nappa, Determinants of flavor acceptability during the maturation of sweet oranges, *Postharvest Biol. Technol.* 52 (2009) 156–163.
- [49] D. Hirschfeld, S. Gatti, R. Fiedt, M.L. Nappa, Determinants of sensory acceptability in grapefruit, *Scientia Horticulturae* 230 (2018) 151–157.
- [50] P.J. Fellens, The relationship between the ratio of degrees of unsaturation and sensory flavor in grapefruit juice, *Food Technol.* 45 (1991) 68–75.
- [51] J. Lee, T.C. Schroeder, Effects of label information on consumer willingness to pay for food attributes, *Am. J. Agric. Econ.* 91 (2009) 795–809.

Apéndice 2: ^1H NMR metabolic profiles as selection tools of new mandarin cultivars based on fruit acceptability (Migues et al., 2021)

Scientia Horticulturae 287 (2021) 110262



Contents lists available at ScienceDirect

Scientia Horticulturae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scihorti



^1H NMR metabolic profiles as selection tools of new mandarin cultivars based on fruit acceptability

Ignacio Migues^a, Natalia Hodos^b, Ana Inés Moltini^c, Adriana Gámbaro^b, Fernando Rivas^c, Guillermo Moyna^d, Horacio Heinzen^{a,d,*}

^a Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Avenida General Flores 2124, Montevideo 11800, Uruguay

^b Área Evaluación Sensorial, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Avenida General Flores 2124, Montevideo 11800, Uruguay

^c Programa Nacional de Citricultura, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) - Salto Grande, Camino al Tornillo, Salto 50000, Uruguay

^d Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Ruta 3 Km 363, Paysandú 60000, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

Citrus reticulata
Citric acid
Flavor
Fruit acceptability
Mandarins
NMR-based metabolomics
Sugars

ABSTRACT

Aqueous pulp extracts of 8 mandarin cultivars produced in Uruguay, including four commercial lines and four of their crosslinks under development, were characterized through untargeted ^1H NMR-based metabolomics. The spectral features identified through this approach proved the uniqueness of each mandarin metabolome. The stability of the chemical make-up through different harvests, the evolution of the metabolome towards full fruit maturity, and the character transference from parents to their hybrids were evaluated using multivariate analysis, with the ^1H NMR signals of sugars and tricarboxylic acids being the most relevant ones. The relationship between sugar sweetness power and citric acid content found in each variety correlated well with independent consumer preference tests of the mandarin cultivars under investigation. Since it is based on readily measurable chemical parameters, this chemometric model could be employed to reduce the number of samples presented to sensory panels during the early and time-consuming selection stages of new mandarin cultivars.

1. Introduction

The advent of metabolomics in food science has brought the possibility of gathering large amounts of chemical information that can be objectively linked with food properties, either desirable or not. Metabolomic profiling allows a simultaneous multicomponent analysis of all compounds contained in a single fraction or extract of an organism, yielding a representative “fingerprint” of its metabolome (Turuntay et al., 2016). Furthermore, it allows for the determination of changes caused by specific environmental conditions (Dunn et al., 2011; Kumar et al., 2017; Lankadurai et al., 2013). Thus, judicious analysis of metabolic profiles can lead to the discovery of specific markers associated with changes in properties of the biological product, particularly in the case of foodstuffs (Bhinderwala et al., 2018).

Breeding of perennial fruit trees is a long-term endeavor with uncertain returns. Indeed, an investment of many years is needed to obtain a new variety from thousands of candidates (van Nocker and Gardiner,

2014). There are numerous variables that need to be monitored over time before a new variety reaches the market, such as the productivity of the tree and its resistance to pathogens and plagues, as well as climate-related abiotic factors (Singh and Rajam, 2009). However, as the goal is to produce edible fruits, the most relevant property to be considered for a new variety is its acceptability in the market. In the case of citrus fruit breeding, up to 15 years are required to properly assess the suitability of a new variety (Omura and Shimada, 2016; van Nocker and Gardiner, 2014). The reward for such an effort is an exclusive market niche if the new fruit is well accepted among consumers. To narrow the number of suitable candidates not only based on routine parameters and agronomical experience but on objective chemometric data has always been a dilemma. Citrus breeding programs are slowly incorporating new “omics” approaches, such as genomics and proteomics, but up to date there is little work on citrus metabolomics (Feng et al., 2018). Most reports on the subject have focused mostly on food authenticity or cultivation techniques (Le Gall et al., 2001; Salazar et al., 2019; Zhang

* Corresponding author at: Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Avenida General Flores 2124, Montevideo 11800, Uruguay.

E-mail address: heinzen@fq.edu.uy (H. Heinzen).

<https://doi.org/10.1016/j.scihorti.2021.110262>

Received 26 June 2020; Received in revised form 11 March 2021; Accepted 3 May 2021

Available online 21 May 2021

0304-4238/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

et al., 2012). Metabolomic approaches have also been employed to investigate valuable agronomic properties such as citrus illnesses, like Huanglongbing (Cevallos-Cevallos et al., 2012, 2009; Freitas et al., 2015) and citrus puffing disorder (Bañez et al., 2014). Metabolomic analysis, either targeted or untargeted, offers a unique opportunity for an unbiased evaluation of the major characteristics of the quality and chemical uniformity of the fruit produced by new varieties through the years (Cuthbertson et al., 2012; Fernandez et al., 2016). More recently, metabolomics has been employed to distinguish organic from conventional cropping and for food authenticity (Cubero-Leon et al., 2018; Díaz et al., 2014; Vachlavik et al., 2012; Vallverdú-Queralt et al., 2011). One of the most interesting areas where metabolomics can be applied is to link consumer preferences with the phytochemical composition responsible for the flavor of fresh fruits and vegetables (Cuthbertson et al., 2012). In such cases, no post-harvest process has been applied, and the metabolome is that of the harvested food. Generally, metabolomics studies have been performed on yearly crops, such as strawberries (Zhang et al., 2010), eggplant (Hanifsh et al., 2016), and tomatoes (Lemaire-Chamley et al., 2019), but little research has been performed on fruiting trees (Zhang et al., 2012).

Herein we show that untargeted NMR-based metabolomics can be employed to adequately characterize mandarin hybrids and their parents, allowing for the evaluation of chemical make-up stability through different harvests, metabolome evolution towards full fruit maturity, and character transference from parents to their hybrids. The study also reveals that the sugar sweetness power and citric acid content found in each variety correlate with independent consumer preference tests of the mandarin cultivars, and the development of a simple and accurate chemometric model relating these parameters with fruit acceptability is described.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The citrus samples were bred at Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) - Salto Grande (S 31°16'18" W 57°53'26") in two consecutive harvesting seasons during 2015 and 2016. Hybrid varieties were obtained by crossing four parental cultivars, including "Ellendale" (E; *Citrus reticulata* Blanco), "Page" (P; *Citrus reticulata* Blanco), "Willowleaf" (WL; *Citrus deliciosa* Tenore), and "Satsuma" cv "Owari" (S; *Citrus usshiu* Marcovitch). The selected hybrids, including "B475" (E × WL), "B79" (E × S), "F7P3" (E × P), and "M16" (E × WL), cover a wide range of acceptability after sensory evaluation (Tables 1 and 2). Fruits were collected at their optimal harvest time (i.e., juice higher than 35% of the total fruit and soluble solids / total acidity ratio above 7) (Bello et al., 2016; Hanly et al., n.d.), and stored at -20 °C until processed. Two subsamples of cv. "B475", "B475A" and "B475B", and another two of cv. "Page", "Page M" and "Page J", were picked up at two different stages of maturity, in order to test the evolution of chemical profiles with fruit development.

2.2. Plant extract preparation

Ten biological replicates of each variety were analyzed. Frozen crushed pulp, 2.0 ± 0.1 g, was placed in a 50 mL polypropylene centrifuge tube together with 8 mL of CHCl_3 (LiChrosolv®, Merck, Germany), 4 mL of MeOH (LiChrosolv®, Merck, Germany), and 4 mL of ultrapure water (Millipore Milli-Q® Ultrapure Water Solutions Type 1). The resulting suspension was vortexed for 30 s and sonicated for 60 s. It was then centrifuged for 5 min at 1400 xg, the phases were separated, and 8 mL of CHCl_3 was added to the aqueous phase. The whole process was repeated, and the organic phases were combined and stored for future analysis. The aqueous extract was filtered, distilled under reduced pressure to remove the MeOH, and then lyophilized to remove the water.

Table 1
Description of the assayed mandarins.

Parental lines	Scientific Name	Parentage	References
Ellendale	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Unknown. Probably a cross between mandarin and sweet orange	(Ranz, 1949)
Page	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Mintello tangelo (Duncan grapefruit × Dancy mandarin) × Clementina mandarin	(Shanizu et al., 2016)
Willowleaf	<i>Citrus deliciosa</i> Tenore	Unknown	
Satsuma cv 'Owari'	<i>Citrus usshiu</i> Marcovitch	Unknown. Probably a cross between Kishu nikan and 'Kumesho' mandarin	(Freije et al., 2016)
Hybrid code	Parentage	Origin	
B475	Ellendale (♀) × Willowleaf (♂)	National Citrus Breeding Program-Uruguay	
B79	Ellendale (♀) × Satsuma cv. 'Owari' (♂)	National Citrus Breeding Program-Uruguay	
F7P3	Ellendale (♀) × Page (♂)	National Citrus Breeding Program-Uruguay	
M16	Ellendale (♀) × Willowleaf (♂)	National Citrus Breeding Program-Uruguay	

2.3. ^1H NMR data acquisition and processing

The freeze-dried aqueous extracts were dissolved in 600 µL of deuterium oxide (MagniSolv™, 99.9% D, Merck, Germany) and transferred to 5 mm NMR tubes (NE-HL5-7, New Era Enterprises, New Jersey, USA). All ^1H NMR spectra were obtained at 298 K on a Bruker Avance III 400 spectrometer operating at a ^1H frequency of 400.13 MHz, using a z-gradient BBFO-Plus probe. A spectral width of 8 KHz, a data size of 32 K, and a total of 64 scans were used to record each spectrum, using a 30° pulse and a relaxation delay of 1 s between scans.

Free induction decays were zero-filled to 64 K points and apodized with a 0.3 Hz exponential window function prior to Fourier transformation. ^1H NMR spectra were manually phased, their baselines corrected by segments using MNOVA (version 11.0, MestreLab Research, S. L., Santiago de Compostela, Spain), and initially referenced to the residual H₂O signal at 4.70 ppm. Manually-selected regions of the spectra were then aligned based on their derivative and using their average as reference, and the data was normalized by mass of dried extract. The processed spectra were then segmented into bins of 0.04 ppm, not taking into account regions corresponding to solvent signals nor those that could not be aligned. The resulting data matrix was exported as a text file for use in multivariate analyses.

2.4. Statistical analysis

Multivariate statistical analyses were carried out with MetaboAnalyst (version 4.0) (Chong et al., 2018; Chong and Xin, 2018). In all cases, Pareto scaling, which involves dividing each variable by the square root of its standard deviation, was applied to minimize the weight of large values while maintaining data structure partially intact (van den Berg et al., 2006). For the classification of mandarin varieties, to evaluate their diversity, and to identify outliers within each class, principal component analysis (PCA) was employed. For the identification of phytochemicals, discriminant analysis of partial least squares (PLS-DA) and discriminant analysis of orthogonal partial least squares (OPLS-DA) were performed (Worley and Powers, 2013). The models derived from PLS-DA and OPLS-DA analyses were validated using permutation tests, which consisted of 100 iterations where the classes were randomly reassigned, two thirds of the data was used as training data to build a classifier, and the remaining third of the data was used to test it. The results from these validations are provided as supplementary

Table 2
Chemical, physicochemical and sensory data of mandarin cultivars.

	B475B	Page	F7P3	Elisendale	W. Leaf	B475A	B79	M16	Satsuma
Sucrose	3.38 ^{ab}	2.83 ^{ab}	3.02 ^{ab}	3.40 ^{ab}	2.03 ^a	3.46 ^{ab}	2.17 ^a	4.36 ^a	4.15 ^a
Glucose (α-β)	2.98 ^a	3.11 ^{ab}	3.60 ^b	3.24 ^b	1.50 ^a	2.76 ^{ab}	1.76 ^a	5.53 ^a	3.64 ^a
Fructose	1.40 ^{ab}	1.46 ^{ab}	1.76 ^{ab}	1.60 ^{ab}	0.76 ^a	1.36 ^{ab}	0.95 ^a	3.05 ^a	1.97 ^a
Citric acid	0.94 ^{ab}	0.67 ^a	0.96 ^{ab}	1.27 ^{ab}	0.69 ^a	1.11 ^{ab}	0.89 ^{ab}	3.72 ^a	1.28 ^a
Acceptability	7.4 ^a	7.3 ^a	6.9 ^{ab}	6.6 ^a	6.2 ^a	5.7 ^a	4.8 ^a	3.6 ^a	—
Brix / acidity ratio	12.1	15.5	14.5	10.2	8.3	9.9	10.4	5.2	10.9
Sweetening power / citric acid	7.43	9.88	7.86	5.93	5.69	6.20	5.01	3.13	6.93

material.

Levene, Shapiro-Wilk, ANOVA, and multiple comparison tests were carried out on sensory analysis and sugar / citric acid content data to evaluate differences between samples, using for this purpose the RStudio software package (version 1.1.463).

2.5. Sugar and citric acid content estimation

The estimation of the relative sugar and citric acid content of each sample was carried out based on the area of the sucrose glucosyl anomeric proton signal at 5.40 ppm, which was assigned an arbitrary value of 1.00. The areas of the signals corresponding to the anomeric protons of α-glucose at 5.20 ppm, β-glucose at 4.60 ppm, and fructose at 4.05 ppm, as well as the four citric acid methylene protons at 2.70 ppm, were estimated relative to the sucrose signal. Using these values and the sweetness scale of Schiffman and coworkers (1995), where the sweetness power of sucrose is taken as 1.0, fructose 1.3, and glucose 0.6 (Schiffman et al., 1995; Stumpanoni, 1993), the total sweetness due to sugars in the sample was determined as:

$$\text{Sweetening power} = \sum (\text{Sugar sweetness} \times \text{Sugar content}),$$

The sweetening power / citric acid ratio was calculated as the quotient between the total sugar content expressed as sucrose equivalents, and the citric acid content.

Traditional physicochemical parameters were measured to assess fruit maturity and determine optimal harvest time. Soluble solids were estimated with an Atago DBX-55 table refractometer using fresh juice extracted with a household juice maker and filtered, and expressed as °Brix at 20 °C. The titratable acidity was determined volumetrically using phenolphthalein as an indicator and expressed as % citric acid / 100 mL of juice. This data was used to compute the °Brix / acidity ratio.

2.6. Sensory evaluation

Fruits were stored at 4 °C until evaluated. The test was performed in a sensory evaluation laboratory compliant with ISO 8589 (Technical Committee, 1988) under artificial daylight and controlled temperature (22 °C). One hundred consumers scored the acceptability of the samples (peeled mandarin segment) on a 9-point hedonic scale (1 = "I dislike it a lot", 5 = "I neither like nor dislike it", 9 = "I like it a lot") (Eserici, 2009). Consumers also described the varieties with qualifiers that represent not only flavor characteristics but also odor and appearance using a check-all-that-apply (CATA) questionnaire (Ares and Jaeger, 2015). The questionnaire for sample characterization included 38 terms: 7 related to texture ("soft", "fibrous", "firm", "dry", "with little juice", "juicy", "with little pulp"), 8 to odor ("with a lot of smell", "with little smell", "sweet smell", "strange smell", "fresh smell", "natural smell", "green smell", "no smell"), 18 of flavor ("acidic", "very acidic", "bitter", "very bitter", "a little sweet", "sweet", "very sweet", "balanced flavor", "strange taste", "fermented taste", "fresh flavor", "fruity taste", "intense flavor", "without flavor", "typical flavor", "bad taste", "nice flavor") and five to seeds presence ("with many seeds", "with few seeds", "without seeds", "with small seeds", "with large seeds").

3. Results and discussion

The INIA in Uruguay has developed and registered new mandarin cultivars that are now in the evaluation phase. Many factors weigh on the final selection, but one of the most important criteria is the taste and flavor of the fruit. Normally, 100 to 400 new hybrids can be produced every year in a breeding program, and therefore carrying out sensory evaluations of all possible varieties is unattainable. A small trial using CATA methodology with the 8 varieties under study is shown in Table 2, according to the hedonic scale described in 2.6. The most accepted variety was the new hybrid "B475B" followed by cv. "Page". The least accepted one was the hybrid "M16". These trials are effective but time-consuming and require a lot of manpower.

A shortcut is to find the chemical descriptors responsible for the consumer preferences. Breeders commonly use the ratio between °Brix and titratable acidity for harvesting the fruit. This relationship has also been used to predict consumer preferences. However, this and other approximations usually fail (Hardy et al., n.d.; Mugwaza and Opara, 2015). A previous report tried to determine if consumers could differentiate fruit juices with different °Brix using commercial orange juices modified by the addition of different levels of sucrose (Zhang et al., 2012). This study is rather limited, as only this type of relationship was explored, it used orange instead of mandarin juice, and only the contribution of sucrose to the global sweetness of the sample was considered.

Means on the same row followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$) according to Bonferroni test, except for the acceptability results that were evaluated using Tukey's test.

Seeking for a more holistic approach, we investigated the fitness of the ¹H NMR spectra of the aqueous fruit pulp extract as a global descriptor of fruit characteristics and quality, looking for chemical biomarkers indicative of specific fruit properties. Given their lipophilicity, compounds linked to fruit aroma are unlikely to be present in the aqueous extracts.

3.1. Pulp mandarin ¹H NMR profile characterization

Fig. 1 shows the typical ¹H NMR spectrum of the aqueous extract of mandarin pulp, in this case cv. "B475", which is dominated by signals between 3.1 and 5.4 ppm corresponding to protons of the sucrose, fructose and glucose ring moieties. Taking into account the areas of the anomeric protons of the three sugars, a simple relationship of their levels in mandarin pulp can be made. In all the evaluated cultivars, sucrose is the prevailing sugar. A straightforward differentiation between glucose and sucrose can be made in the pulp spectra, besides the already mentioned anomeric protons signals. The signals of the H-2 protons in β-glucose are observed at 3.20 ppm ($J = 9.0$ Hz), whereas they appear at lower fields in the α-anomer and overlap with those from the H-2 protons of the sucrose glucosyl residue. Signals due to carboxylate α-protons can also be distinguished in the 2.3 to 3.0 ppm range, indicating the presence of citrate and other organic acids from the Krebs cycle. Aromatic signals between 6.1 and 7.6 ppm and at lower fields hint to polyphenols and aldehydes.

Although somewhat complex, the ¹H NMR profiles allows to differentiate between the commercial cultivars. The PCA of these four

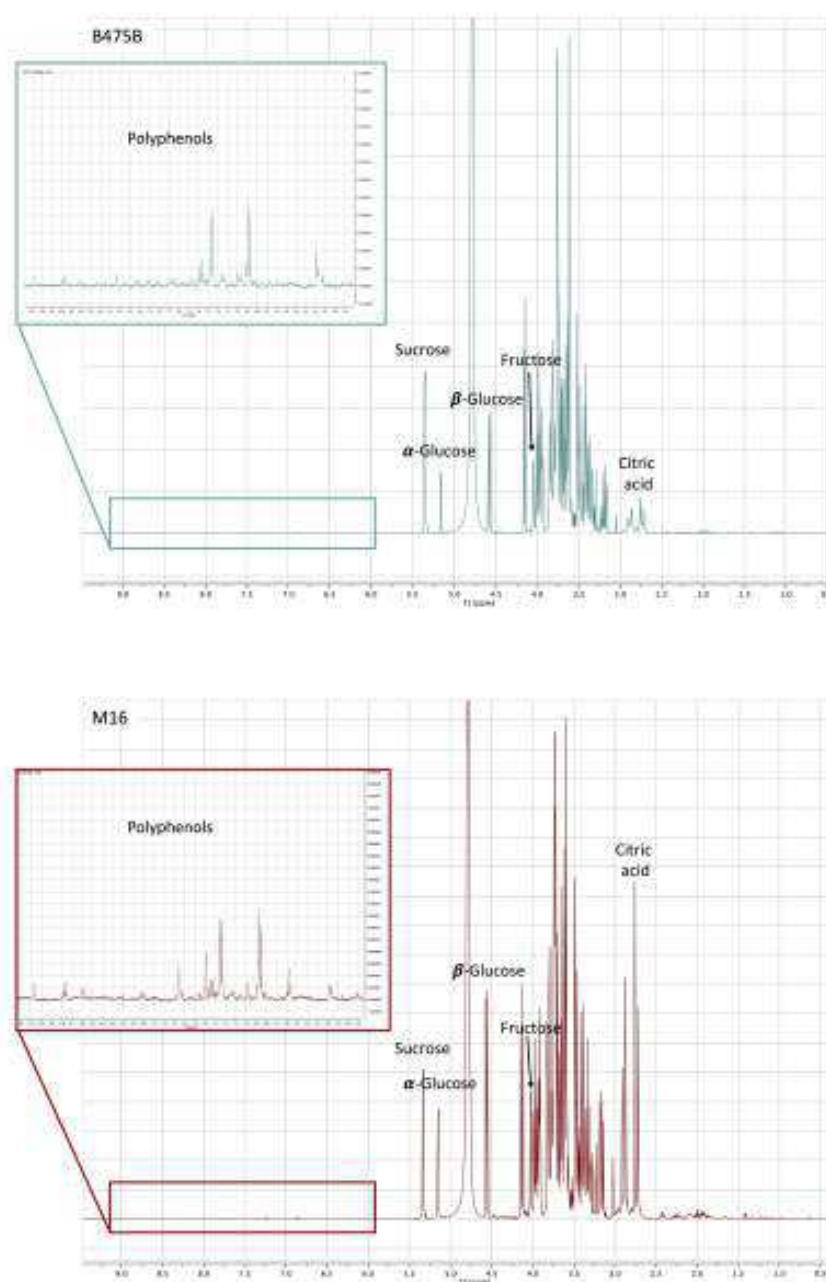


Fig. 1. Representative ^1H NMR spectrum of 2 ("B475B" and "M16") mandarin pulp aqueous extracts. Regions corresponding to organic acids, sugars and polyphenols are indicated.

varieties explained 84% of the total variance of the data and differentiate "Satsuma", "Ellendale", and "Willowleaf", while "Page" could not be distinguished from the others. A PLS analysis confirms this classification (Figure S1).

On the other hand, the PCA based on data from the four hybrids did not lead to a clear classification. In this evaluation, the varieties "B475" and "M16" were not differentiated, but were separated from the others; perhaps due to their common ancestry ($E \times WL$). The rest of the cultivars

were well classified in this analysis, showing 80% of the total variance of the data in two components. The PLS analysis confirmed this trend (Figure S2).

3.2. Relationship between hybrids and their parents

The transfer of phenotypic characters from parents to hybrids was evaluated comparing the ^1H NMR profiles of the two parents and their

hybrids through simple PCA score plots. The four diagrams have some common features. In all these cases, two components explained near 80% of the variance. The group of signals from the hybrid lies between those of the parents. At many times, it overlaps to some extent with one or the two groups of signals from the parents (Figure S3). The comparison between the ^1H NMR profiles of the most accepted variety ("B475") with those of its parents (WL and E) exemplifies this fact. No outliers for any of the classes are seen, and the hybrid variety does not separate well from its parents (Fig. 2a). "B475" presents low dispersion and is located at the intersection between "Ellendale" and "Willowleaf". Furthermore, the VIP scores study based on loadings from the PLS analysis shows that, in general, the hybrid presents intermediate VIP scores for the ^1H NMR signals that contribute to the separation and differentiation of the analyzed varieties (Fig. 2 and S4). An interesting case was cv. "M16" (WL $\times$ E), the least accepted variety which also had the lowest "Brix and highest acidity. In the PCA score plot, where PC1 and PC2 accounted for the 98% of the variance, little overlap is seen with "Ellendale" and none with "Willowleaf", showing that the hybrid has different metabolite levels than its parents (Figure S3a).

3.3. Stability of the varieties

A PCA was performed with the data obtained for each variety in consecutive harvesting seasons (2015 and 2016). The metabolic fingerprint for most varieties showed no variations, indicating a stable metabolome composition between one year and the next (Fig. 3 shows an example with cv. "B475"). Some differences between both harvests can be observed in the S-plot signals of the OPLS-DA (Figure S5). The characteristic signals of 2015 harvest are in the range 3.6 - 3.7 ppm and the ones of 2016 in the 3.2 - 3.3 ppm region, pointing a slight difference between the sugar composition where in the latter the difference lies in the glucose content while in the former in the sucrose levels.

These slight variations found between harvests can be expected, as the metabolome is highly dependent on environmental factors. Even though the climate undoubtedly changes from one season to the other, the varieties have, in general, a similar profile and some specific changes could be detected.

3.4. Assessing the ripening of the varieties

In line with the previous observation, two cultivars were evaluated

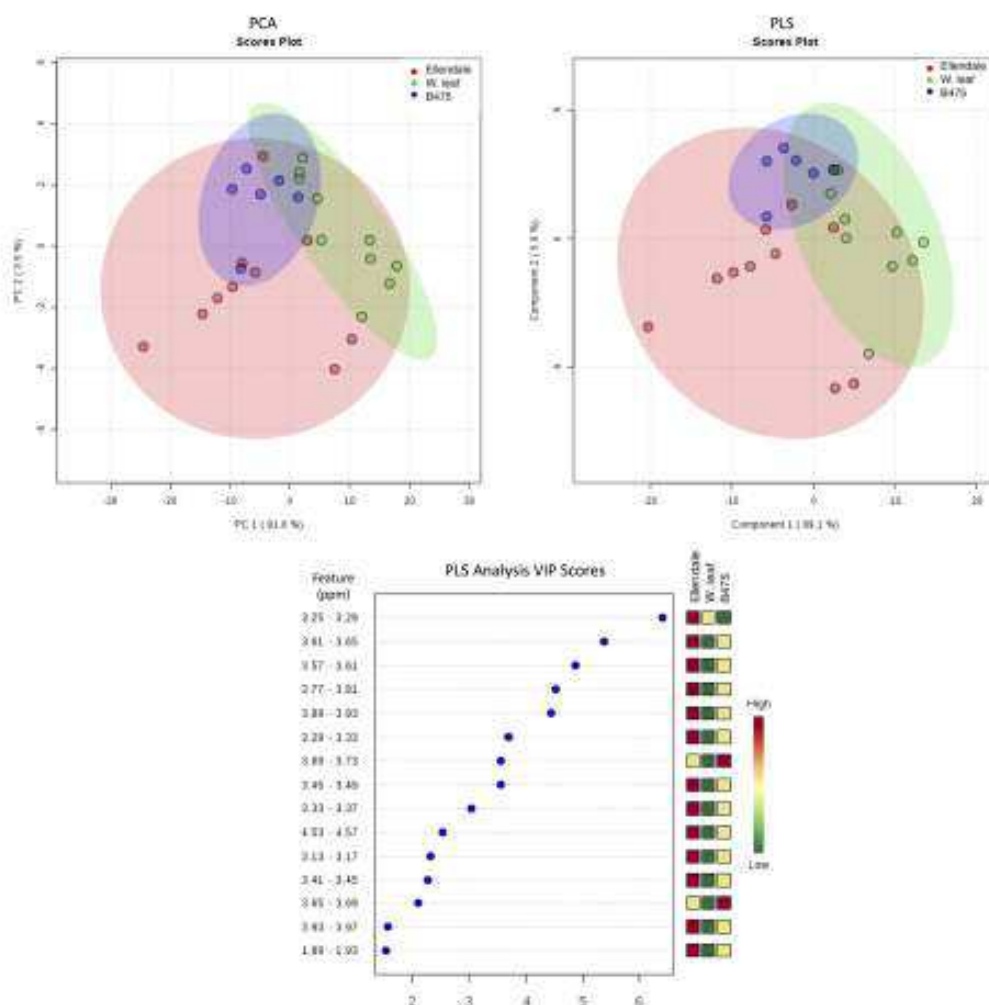


Fig. 2. (A) PCA and (B) PLS score plot, and VIP score plot (C) of the PLS analysis performed on "B475" and its parentals.

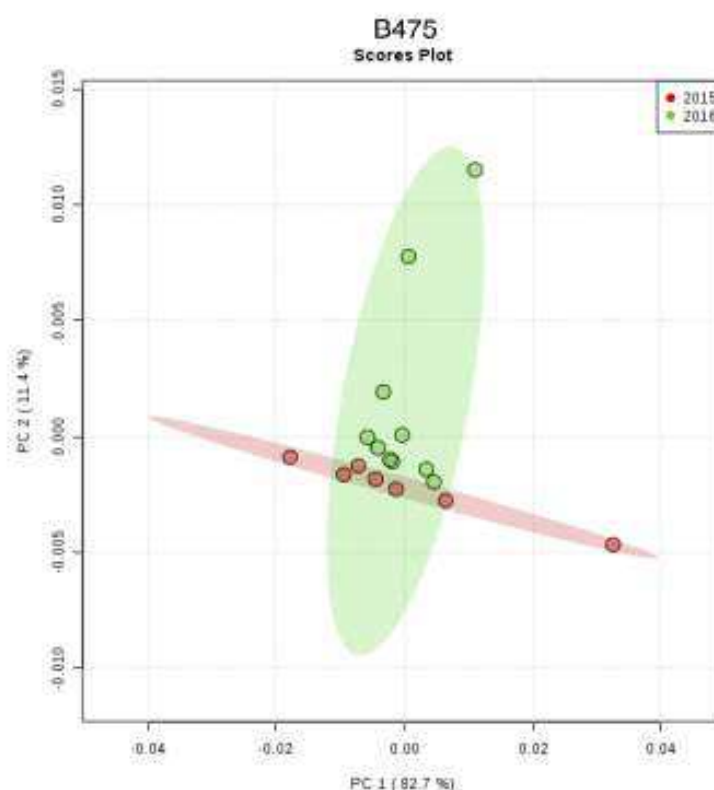


Fig. 3. PCA score plot of "B475" harvested in 2015 and 2016.

for changes during ripening. "Page" was harvested two months before the optimal time of fruit maturity (i.e., May instead of July). Although homogeneous in composition, the *S*-plot point for differences in the sugar content, particularly in sucrose content. Interestingly, the acid signals do not weigh at all in the classification during the ripening process, mainly because the increase of the sugar levels is higher than the declining change in the citric acid levels (Sañudo et al., 2019) (Figure S6). "B475" was evaluated before and at the optimal ripening point, both chemometrically and by consumers. In the case of the unripe fruit, although it had acceptable "Brix" and "Brix / acidity" ratio, the fruit received lower preference levels than the fully mature one. The difference could be explained as the ^1H NMR spectrum of the ripe sample showed an increase in glucose and fructose content, and a slight reduction in the acid values compared to the unripe harvest (Table 2 and Figure S7). These cases show the sensibility and potential of the method to define the optimal harvest time.

3.5. Most and least accepted varieties

The most valued varieties were described mainly by taste and flavor as well as odor descriptors ("balanced taste", "sweet taste", "fruity flavor", "nice flavor", "fresh flavor", "natural odor", "intense odor", "sweet odor", "typical odor"), whereas the least accepted ones were characterized as "very acidic", "bad taste" and "strange smell". Despite the complexity of mandarin flavor, the discriminating factors of acceptance were those associated with a balanced and sweet taste, and for rejection, the acid taste was the most relevant. The results of the acceptability determined by consumers are shown in Table 2.

The most accepted variety was "B475B" and the least accepted one, "M16". A PLS analysis based on ^1H NMR data of "B475B" and "M16"

clearly separated both varieties. The VIP scores showed that in the most accepted variety ("B475"), the characteristic signals of sugars weighted the most in the differentiation, while for "M16" a strong influence of signals that are characteristic of organic acids can be seen (Fig. 4). In this case, the measured acidity of the "M16" samples was 2.5, consistent with the data obtained through NMR analysis. The OPLS-DA showed that both varieties have a comparable dispersion, and the *S*-plot associated to this analysis confirmed that ^1H NMR signals corresponding to sugars and organic acids, respectively, are responsible for the discrimination between "B475" and "M16" (Fig. 4 and S6). Similar results were obtained when considering the three top rated and three least rated varieties from 2015 (Figures S9 and S10).

3.6. Development of a chemometric acceptability model

The results reported in this study indicate that the concentrations of sucrose, fructose, and glucose are the most important contributors to consumers acceptance, whereas high organic acid levels lead the fruit to be rejected. In citrus, the combination of sweet and sour flavors plays a crucial role, and thus the relationship between these two antagonistic flavors has been extensively studied (Spence et al., 2014; Veldhuizen et al., 2017). Whereas sweetness suppression is a function of citric acid concentration, variations in sourness perception is a function of both sugar and acid content. Small quantities of citric acid in sugar solutions enhances freshness and most of the positive sensory properties of fruits. Therefore, the balance between sugars and acids has a strong influence on the characterization of mandarin varieties and the relationship with their acceptability by consumers. This makes sugars and organic acids ideal phytochemicals in the development of simple chemometric models for the early prediction of mandarin acceptability. As stated above, the

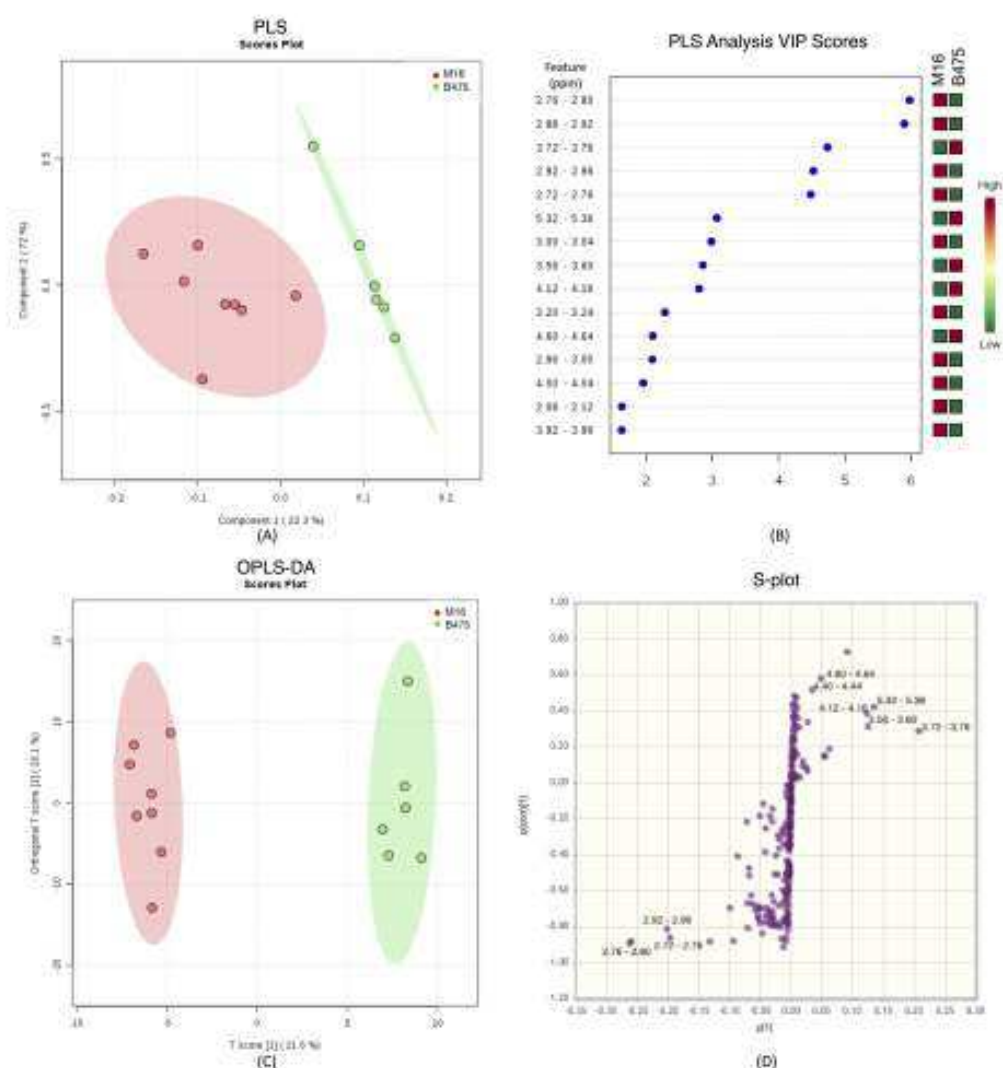


Fig. 4. (A) PLS score plot of the most accepted ("B475B") and least accepted ("M16") varieties. (B) VIP scores of PLS analysis. (C) OPLS-DA score plot of the most accepted ("B475B") and the least accepted ("M16") varieties and (D) S-plot of the same analysis.

Brix / acid ratio has been employed by breeders as a rough approximation of the palatability of citrus fruits, and in particular mandarins. In line with this traditional approach, the results from the untargeted metabolomic studies corroborate the strong correlation between these markers and acceptability.

As established by Moskowitz (1970) and Moskowitz (1970), different sugars have specific sweetness power and therefore, their contribution to the sweetness of a sample is differential. This contribution is also concentration dependent, and sometimes, a synergistic contribution to the global sweetness has been reported. There are several models that try to explain sweetness in sugar mixtures. The most reliable one corresponds to the linear combination of the individual contribution of each sugar weighed by its sweetening power, where sucrose is given a reference value of 1.0 (Schiffman et al., 1995; Stamppanini, 1993). Based on this simple model, we calculated the sweetening power of each mandarin variety by considering the individual content of sucrose, fructose, and glucose, and divided it by the citric acid content value in an

attempt to take into account the contribution of sourness to acceptability (Table 2). These estimates, together with consumers acceptability data, were employed to build a linear correlation model relating the two variables. As shown in Fig. 5, the model has a good correlation factor ($R^2 = 0.79$), making it a potentially straightforward tool to assess mandarin acceptability based on unbiased chemical parameters.

The model was further tested with a new mandarin variety obtained from the same germoplasm bank, "A30", which was grown, harvested, and analyzed analogously as with the rest of the hybrids. Based on a sweetening power / citric acid ratio value of 5.9 determined by ^1H NMR, the regression model predicted an acceptability of 6.1 for this variety. On the other hand, the consumer acceptability for this hybrid estimated through sensory evaluation was 6.6. This shows a deviation of only 7% and indicates the good adjustment of this simple chemometric model.

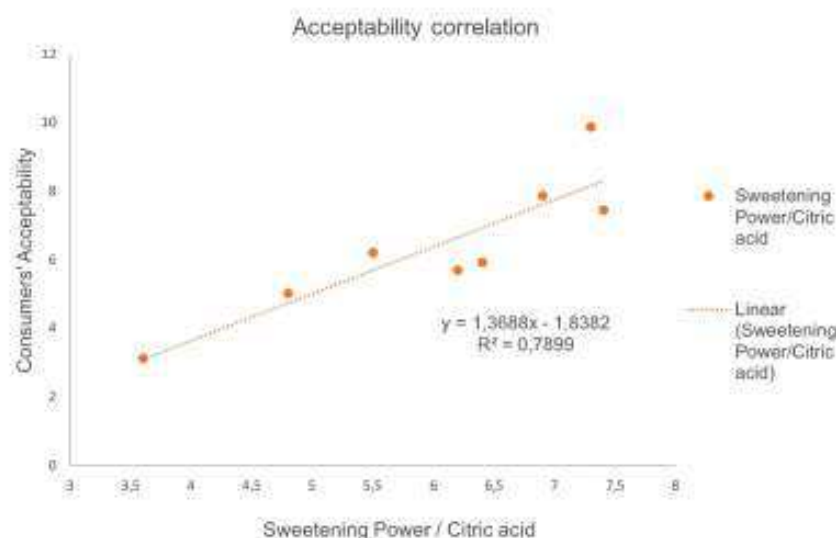


Fig. 5. Correlation between sweetening power / citric acid and consumer acceptability.

4. Conclusions

Untargeted ^1H NMR profiling of aqueous extracts of citrus fruit pulps proved to be a powerful tool for the classification and characterization of mandarin varieties. Signals for sugars and organic acids, which are critical in defining the taste and flavor of the fruit, dominate the ^1H NMR spectra of mandarin pulp and made them ideal phytomarkers for cultivar characterization. Both the stability between years and the differences in fruit maturity could be assessed by means of multivariate analysis of the data. The crossing of varieties yielded new cultivars whose chemical traits were intermediate to those of the parents, but at the same time were unique. Interestingly, crossing "Ellendale" with "Willowleaf" varieties yielded both the most ("B475") and least accepted cultivars ("M16"). The defined phytomarkers allowed the development of a straightforward chemometric model of consumer acceptability. Indeed, this proposed variation of the traditional "Brix / acid ratio model allowed us to properly classify consumers acceptability with a new mandarin hybrid.

There are many other natural products that could influence mandarin taste, including essential oils and limonoids. However, the proposed unbiased model represents a valuable tool to perform preliminary cultivar selection in mandarin breeding programs based on consumer acceptability and could have an important impact on the time a new variety reaches the market and is commercialized. Furthermore, ^1H NMR profiles of citrus fruits such as the ones presented here could also be helpful during the process of registering new varieties, a trend that is gaining ground throughout the world for other fruits and vegetables.

CRediT authorship contribution statement

Ignacio Míguez: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Visualization. **Natalia Hodós:** Validation, Formal analysis, Investigation. **Ana Inés Moltini:** Formal analysis, Investigation, Data curation. **Adriana Gámbaro:** Methodology, Formal analysis. **Fernando Rivas:** Conceptualization, Resources, Project administration, Funding acquisition. **Guillermo Moyna:** Methodology, Writing – review & editing. **Horacio Heinzen:** Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Supervision, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

Acknowledgments

We wish to thank Andrés López for his help with the NMR measurements and useful discussions, Cecilia Rodríguez Ceresolo for her assistance in sample preparation, and Joanna Lado for sampling the mandarins and supervising the routine physicochemical studies. Financial support from INIA through the L4 funding program, the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (award POS-NAC.2017.1.140316), and the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas is also acknowledged.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.scienta.2021.110282.

References

- Ares, G., Jaeger, S.R., 2015. Examination of sensory product characterization bias when check-all-that-apply (CATA) questions are used concurrently with hedonic assessments. *Food Qual. Prefer.* 40, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.10.004>.
- Bello, P., Vasquez, D., Nanci, A., 2016. Momento De Gosecha 5-7.
- Bhinderwala, P., Wane, N., DiRusso, C., Powers, R., 2018. Combining mass spectrometry and NMR improves metabolite detection and annotation. *J. Proteome Res.* 17, 4017–4022. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00567>.
- Cevallos-Cevallos, J.M., Finckh, D.B., Shula, T., Folmanova, S.V., Reyes-De-Corcuera, J.I., 2012. GC-MS metabolomic differentiation of selected citrus varieties with different sensitivity to citrus Huanglongbing. *Plant Physiol. Biochem.* 53, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.010>.
- Cevallos-Cevallos, J.M., Rouseff, R., Reyes-De-Corcuera, J.I., 2009. Untargeted metabolite analysis of healthy and Huanglongbing-infected orange leaves by CE-DAD. *Electrophoresis* 30, 1240–1247. <https://doi.org/10.1002/elps.200900594>.
- Cheng, J., Soufin, O., Li, C., Caruso, L., Li, S., Bourque, G., Wishart, D.S., Xia, J., 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* 46, W486–W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>.
- Cheng, J., Xia, J., 2013. MetaboAnalyst: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics* 34, 4313–4314. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty328>.

- Cubero-León, E., De Rudder, O., Maquet, A., 2018. Metabolomics for organic food authentication: results from a long-term field study in carrots. *Food Chem.* 239, 760–770. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.161>.
- Cuthbertson, D., Andrews, P.K., Reganold, J.P., Davies, N.M., Lange, B.M., 2012. Utility of metabolomics toward assessing the metabolic basis of quality traits in apple fruit with an emphasis on antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8552–8560. <https://doi.org/10.1021/jf3011000>.
- Díaz, R., Pozo, O.J., Sancho, J.V., Hernández, F., 2014. Metabolomic approaches for orange origin discrimination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem.* 157, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.009>.
- Dunn, W.B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowler, J.D., Halsall, A., Hogg, J.N., Nicholls, A.W., Wilson, I.D., Kell, D.B., Goodacre, R., 2011. Procedures for large-scale metabolite profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 6, 1060.
- Everitt, M., 2009. CHAPTER 5. In: Barboza-Cinova, U., Mortimer, A., Linaback, D., Spiess, W., Buckle, K., Colonna, P.B.T. (Eds.), *Consumer-Targeted Sensory Quality*. Academic Press, San Diego, pp. 117–128. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-074124-0.00006-9>. R.S. and T.
- Feng, S., Niu, L., Shi, J.H., Hung, W.-L., Wang, Y., 2018. Comprehensive metabolomics analysis of mandarin (*Citrus reticulata*) as a tool for variety, rootstock, and grove discrimination. *J. Agric. Food Chem.* 66, 10317–10326. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03577>.
- Fernandez, O., Urcio, M., Benillon, S., Glauffier, C., Tardieu, F., Le Gouis, J., Langlade, N., Chiriac, A., Moing, A., Gibon, Y., 2016. Fortune telling: metabolic markers of plant performance. *Metabolomics* 12, 158. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1099-1>.
- Ferreira, D.dos S., Carlos, E.F., Gil, M.C.S.d.S., Vieira, L.G.E., Alcantara, G.B., 2015. NMR-based metabolomic analysis of Huanglongbing-asymptomatic and -symptomatic citrus trees. *J. Agric. Food Chem.* 63, 7582–7588. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03590>.
- Fujii, H., Ohta, S., Nonaka, K., Katayama, Y., Matsumoto, T., Endo, T., Yoshida, T., Omura, M., Shimada, T., 2016. Parental diagnosis of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) revealed by nuclear and cytoplasmic markers. *Breed. Sci.* 66, 683–691. <https://doi.org/10.1270/jbbs.16060>.
- Hanifali, A., Mahapatra, A., Putri, P.S., Lavista, A.W., Sobir, 2018. Untargeted metabolomics analysis of eggplant (*Solanum melongena* L.) fruit and its correlation to fruit morphology. *Metab.* doi:10.3390/metab8030049.
- Hardy, A.S., Barkley, P., Treeby, M., Smith, M., Sanderson, G., Hardy, S., Barkley, P., 2013. Treeby, M., Smith, M., n.d. Australian mandarin production manual. Australian mandarin production manual. 2020.
- Ibarra, A.M., Martinelli, F., Rengas, R.L., Urcio, S.L., Vo, A., Tinoco, M.A., Phu, M.L., Chen, Y., Focke, D.M., Dandekar, A.M., 2014. Transcriptome and metabolome analysis of Citrus fruit to elucidate puffing disorder. *Plant Sci.* 217–218, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.003>.
- Kumar, R., Bhatia, A., Pandey, A.K., Pandey, M.K., Kumar, A., 2017. Metabolomics for plant improvement: status and prospects. *Front. Plant Sci.*
- Lankadurai, B.G., Nagata, E., Simpson, M., 2013. Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stresses. *Environ. Rev.* <https://doi.org/10.1139/er-2013-0011>.
- Le Gall, G., Purnell, M., Colquhoun, J.A., 2001. Discrimination between orange juice and pulp wash by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy: identification of marker compounds. *J. Agric. Food Chem.* 49, 560–568. <https://doi.org/10.1021/jf001046e>.
- Lemaire-Chandley, M., Mounet, F., Daboussi, C., Maudouret, M., Jacob, D., Molay, A., 2019. NMR-based tissue and developmental metabolomics of tomato fruit. *Metab.* doi:10.3390/metab9050093.
- Magwaza, L., Opira, U., 2015. Analytical methods for determination of sugar and sweetness of horticultural products—a review. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 184. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.001>.
- Modkowitz, H.R., 1970. Ratio scales of sugar sweetness. *Percept. Psychophys.* 7, 315–320. <https://doi.org/10.3758/BF0310175>.
- Omura, M., Shimada, T., 2016. Citrus breeding, genetics and genomics in Japan. *Breed. Sci.* 66, 3–17. <https://doi.org/10.1270/jbbs.66.3>.
- Ross, A.A., 1949. The origin of the Eildon mandarin and its relatives. *Queensl. Agric. J.* 69, 224.
- Sedra, A., Rabinowitz, L., Kanner, I., Blumwald, E., 2019. Primary metabolism in citrus fruit as affected by its unique structure. *Front. Plant Sci.*
- Solano, M.O., Picano, P.L., González Sierra, M., Furlan, R.L.E., 2018. NMR and multivariate data analysis to assess traceability of Argentine citrus. *Microchem. J.* 141, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.037>.
- Schiffman, S.S., Booth, B.J., Loser, M.L., Pecore, S.D., Warwick, Z.S., 1995. Bitterness of sweetness as a function of concentration. *Brain Res. Bull.* 36, 505–513. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)00255-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)00255-9).
- Shanlin, T., Kitajima, A., Nataka, K., Yoshida, T., Ohta, S., Goto, K., Torada, A., Fujiyama, A., Machizuki, T., Nagasaki, H., Kaminuma, E., Nakamura, Y., 2016. Hybrid origin of citrus varieties inferred from DNA marker analysis of nuclear and organelle genomes. *PLoS ONE* 11, e0160869.
- Singh, S., Rajan, M.V., 2009. Citrus biotechnology: achievements, limitations and future directions. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 15, 3–22. <https://doi.org/10.1007/s12298-009-0001-2>.
- Spence, C., Smith, B., Auvray, M., 2014. Confusing tastes and flavours: Perception and its Modulation, pp. 247–274.
- Stampoulou, C.R., 1993. Influence of acid and sugar content on sweetness, sourness and the flavour profile of beverages and sherbets. *Food Qual. Prefer.* 4, 169–176. [https://doi.org/10.1016/0950-3293\(93\)90159-4](https://doi.org/10.1016/0950-3293(93)90159-4).
- Technical Committee, 1988. 1.34/88 I.S.S.A. Sensory Analysis: General Guidance for the Design of Test Rooms. ISO, p. 8589.
- Turuntay, H., Sandalli, C., Turuntay, E.A., 2016. Plant metabolomics and strategies. In: Hakeem, K.R. (Ed.), *Plant Omics: Trends and Applications*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 399–406. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31703-8_17.
- Vaclavik, L., Schreiber, A., Lucins, O., Cajka, T., Hajkova, J., 2012. Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics for authenticity assessment of fruit juices. *Metabolomics* 8, 793–803. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0571-7>.
- Vallverdú-Quesada, A., Medina-Romero, A., Casado-Ribes, I., Amor, M., Llamas-Raventós, R.M., 2011. A metabolomic approach differentiates between conventional and organic lemons. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11703–11710. <https://doi.org/10.1021/jf202322a>.
- van den Berg, R.A., Hoefloot, H.C.J., Westhuis, J.A., Smilde, A.K., van der Weij, M.J., 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7, 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>.
- van Noeren, S., Gardiner, S.E., 2014. Breeding better cultivars, faster: applications of new technologies for the rapid deployment of superior horticultural tree crops. *Hortic. Res.* 1, 14022.
- Vekhuizen, M., Siddique, A., Rosenthal, S., Marks, L., 2017. Interactions of lemon, sucrose and citric acid in enhancing citrus, sweet and sour flavors. *Chem. Senses* 43, 17–26. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjw063>.
- Worley, S., Powers, R., 2013. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr. Metabolomics* 1, 92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235511301010092>.
- Zhang, J., Wang, X., Yu, O., Tang, J., Gu, X., Wan, X., Fang, C., 2016. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. *J. Exp. Bot.* 62, 1103–1118. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq343>.
- Zhang, X., Breake, A.P.I.I., Mischak, D.O., Fahn, C.E., O'Mahony, M.A., Shipley, C.M., 2012. Fertilization and pesticides affect mandarin orange nutrient composition. *Food Chem.* 134, 1020–1024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.210>.

Apéndice 3: Predicting Mandarin Fruit Acceptability: From High-Field to Benchtop NMR Spectroscopy (Migues, Rivas, Moyna, Kelly, & Heinzen, 2022)



Article

Predicting Mandarin Fruit Acceptability: From High-Field to Benchtop NMR Spectroscopy

Ignacio Migues ^{1,2}, Fernando Rivas ³, Guillermo Moyna ⁴, Simon D. Kelly ⁵ and Horacio Heinzen ^{1,*}

- ¹ Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay
- ² Programa de Posgrados de la Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay
- ³ Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Salto 50000, Uruguay
- ⁴ Laboratorio de Espectroscopia y Físicoquímica Orgánica, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Paysandú 60000, Uruguay
- ⁵ Food Safety Control Laboratory, Joint FAO/IAEA Centre of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Department of Nuclear Sciences and Applications, International Atomic Energy Agency, 1400 Vienna, Austria
- * Correspondence: heinzen@fq.edu.uy; Tel.: +598-2924-4068

Abstract: Recent advances in nuclear magnetic resonance (NMR) have led to the development of low-field benchtop NMR systems with improved sensitivity and resolution suitable for use in research and quality-control laboratories. Compared to their high-resolution counterparts, their lower purchase and running costs make them a good alternative for routine use. In this article, we show the adaptation of a method for predicting the consumer acceptability of mandarins, originally reported using a high-field 400 MHz NMR spectrometer, to benchtop 60 MHz NMR systems. Our findings reveal that both instruments yield comparable results regarding sugar and citric acid levels, leading to the development of virtually identical predictive linear models. However, the lower cost of benchtop NMR systems would allow cultivators to implement this chemometric-based method as an additional tool for the selection of new cultivars.

Keywords: acceptability; benchtop NMR; mandarins; NMR



Citation: Migues, I.; Rivas, F.; Moyna, G.; Kelly, S.D.; Heinzen, H. Predicting Mandarin Fruit Acceptability: From High-Field to Benchtop NMR Spectroscopy. *Foods* **2022**, *11*, 2384. <https://doi.org/10.3390/foods11162384>

Academic Editors: Zhiming Guo, Zhao Zhang and Dong Hu

Received: 24 June 2022

Accepted: 1 August 2022

Published: 9 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Since the early days of nuclear magnetic resonance (NMR), considerable efforts have been invested to increase sensitivity and spectral resolution through the use of magnets with stronger fields. These endeavors have gone hand in hand with the development of novel superconducting materials and cryogenic technologies [1]. However, these systems are generally expensive and have high running and maintenance costs, driving many NMR spectrometer manufacturers to develop smaller and more accessible systems based on cryogen-free permanent magnets. These low-field instruments have magnetic fields below 2.3 T (i.e., ¹H resonance frequencies under 100 MHz), fit on a regular laboratory benchtop, and are even suitable for use in field experiments [2,3]. The basis of these instruments is the use of rare-earth ring-shaped magnets that produce relatively strong and homogeneous fields [3]. Their lower sensitivity can sometimes be offset by concentrating the samples or using a variety of methodologies for the enhancement of Boltzmann polarization [4]. Similarly, issues with chemical shift resolution can be addressed through the application of different signal acquisition and processing techniques, including solvent suppression and gradient-based pulse sequences [3,5].

Although low-field benchtop NMR spectrometers may not be suitable for natural product research due to their lower sensitivity and resolution, they have been used successfully in the quality control of phytopharmaceuticals and in food analysis, to mention a few examples [6]. In academia, the use of benchtop NMR is increasing progressively.

The low operating costs and ease of use of these instruments allow students not only to control their research products, but to follow chemical reactions in real time or even perform quantitative analyses [6–9]. Indeed, the quantitation of natural products using benchtop NMR has been employed in the quality control of drugs [10] and for the detection of adulterations in pharmaceutical products [11,12]. The use of low-field NMR in routine quality control of foods has also been demonstrated [6]. Examples of such applications include the determination of alcohol content in beverages [13] and the study of food authenticity and food fraud by targeted and untargeted analysis, where wine, coffee, oils, or even meat are examples [14–18]. For certain products, subdisciplines have been developed to study metabolomic profiles. For example, the term “MEATabolomics” refers to the application of metabolomic analysis to correlate the composition of meat with its sensory attributes [19,20].

In food analysis, untargeted approaches are preferred when trying to discover flavor-related compounds, which are followed with targeted analyses to measure the content of specific compounds or study metabolic pathways of interest [21,22]. Citrus metabolomics has been emerging in the last few years to control industrial processes or to evaluate flavor traits that influence consumer preferences [23–25]. However, little research has been conducted to adapt high-field NMR techniques to low-field systems. As stated by Castaing-Cordier and coworkers [26], benchtop instruments can be used in many applications due to recent advances in terms of sensitivity and resolution. Recently, we proved the usefulness of high-field NMR to predict consumer preferences in mandarins. Although interesting from an academic point of view, the high cost of the 400 MHz spectrometer employed in the study hampers its application by the local citrus industry [25]. The aim of the present work is to show an updated protocol for the analysis of mandarin consumer preferences using benchtop NMR systems that could be accessible to citrus fruit cultivators. As shown herein, our results indicate that chemometric-based consumer acceptability models of identical quality can be obtained regardless of magnetic field.

2. Materials and Methods

The samples used in the comparisons were a selection of aqueous mandarin extracts obtained during the development of the original method at 400 MHz [25]. Five extract replicates for each mandarin variety were lyophilized and stored under nitrogen in sealed containers until analysis. They were then dissolved in 600 μ L of deuterium oxide (Magni-Solv™, 99.9% D, Merck, Darmstadt, Germany), transferred to 5 mm NMR tubes (Norell® Standard Series™ Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and analyzed immediately.

A Bruker Avance III 400 spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany) was used to perform the high-field NMR experiments, while a Magritek Spinsolve 60 benchtop NMR spectrometer (Magritek GmbH, Aachen, Germany) was used to obtain the data at the low field. The 400 MHz spectra were obtained at a ^1H frequency of 400.13 MHz using a z-gradient BBFO-Plus probe (298 K). Spectra were recorded using a spectral width of 8 KHz, a data size of 32 K, and using a 30° excitation pulse. A total 64 scans with a relaxation delay of 1 s between scans were averaged, leading to an analysis time of 4.1 min per sample. The 60 MHz data were obtained at room temperature using a ^1H frequency of 62.32 MHz, a spectral width of 5 KHz, a data size of 32 K, and using a 90° excitation pulse. A total of 256 scans with a relaxation delay of 1 s between scans were averaged in this case, resulting in a total analysis time of 64.0 min per sample.

All spectra were processed using MNova (version 11.0, MestreLab Research, S.L., Santiago de Compostela, Spain) following an identical protocol, which included zero filling to 64 K and apodization with a 0.3 Hz exponential window function prior to Fourier transformation, manual phase and baseline correction, and referencing to the signal of the anomeric proton of α -glucose at 5.22 ppm. The spectra were then aligned using the derivative method and the average spectrum as a reference [27].

Once all spectra were aligned, the integral of the signal belonging to the sucrose glucosyl anomeric proton at 5.40 ppm was given an arbitrary value of 1.00. Then, the areas

of the signals corresponding to the anomeric protons of α -glucose at 5.22 ppm, β -glucose at 4.63 ppm, and the multiplet arising from the H-3 and H-4 protons of the β -furanose form of fructose at 4.09 ppm, together with the four citric acid methylene protons centered at approximately 2.8 ppm, were scaled to that of the sucrose signal. The integration ranges for the sugar signals mentioned above were, respectively, 5.54 to 5.32, 5.29 to 5.16, 4.63 to 4.53, and 4.10 to 4.07 ppm in both instruments. Due to slight differences in the temperature of the experiments, the citrate signals were integrated from 3.02 to 2.73 ppm in the high-field spectrometer, and between 2.81 and 2.54 ppm on the benchtop instrument.

The relative area values were corrected using the sweetness scale of Schiffman and coworkers [28,29], being 1.0 for sucrose, 1.3 for fructose and 0.6 for α - and β -glucose. The ratio sweetening power/citric acid was calculated as follows, where n represents each of the sugars considered:

$$\frac{\sum_n (\text{Sugar sweetness} \times \text{Sugar content})_n}{\text{Citric acid content}} \quad (1)$$

The correlation between the mandarin acceptability and the sweetening power/citric acid ratio was determined using the same mandarin varieties for both spectrometer systems, the R^2 of the regressions was determined and the root mean square error (RMSE) of each model was calculated.

3. Results and Discussion

Figure 1 shows spectra obtained at 400 and 60 MHz for the same aqueous extract, respectively. Given its higher resolution, the spectrum obtained at 400 MHz allows for the identification of most protons from the species of interest. On the other hand, several of these signals appear overlapped at 60 MHz, making the initial assignment of resonances a harder task that requires technical know-how.

However, the signals corresponding to the sugar anomeric protons and citric acid methylene protons of interest are in relatively uncluttered regions of the spectrum, and therefore their identification and quantitation is achievable. Indeed, if the selection of the integration ranges is rigorous and consistent with those employed at the high field, the integration of the signals corresponding to anomeric protons of sucrose, glucose, and fructose, as well as the citric acid methylene protons, allows us to apply the methodology developed previously [25] to predict the acceptability of the mandarin samples (Table 1).

Table 1. Results of the sensory evaluation (acceptability), sweetening power/citric acid ratio, predicted acceptability using the model and RMSE of the prediction of each model (60 and 400 MHz data).

Variety	Acceptability	60 MHz			400 MHz		
		Sweetening Power/Citric Acid *	Predicted Acceptability	RMSE	Sweetening Power/Citric Acid *	Predicted Acceptability	RMSE
B475B	7.4	10.85	6.88	0.29	9.31	6.76	0.35
F7P3	6.9	11.53	7.21		10.12	7.27	
B475A	5.5	8.45	5.72		7.70	5.75	
B79	4.8	6.75	4.89		6.34	4.90	
M16	3.6	3.88	3.50		4.16	3.53	

* The reported values correspond to the average of 5 replicates. The RSD was less than 20% for all the varieties analyzed.

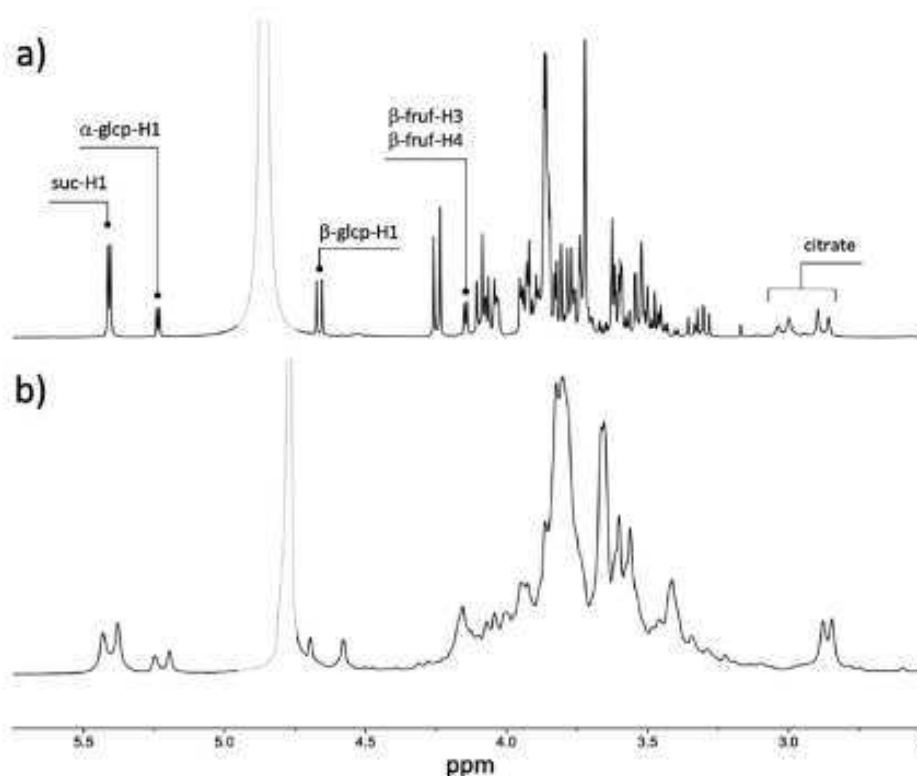


Figure 1. Comparison of ^1H spectra of the aqueous extract of mandarin variety B475B obtained with 400 and 60 MHz spectrometers ((a) and (b), respectively). Resonances employed in the estimations are annotated in the 400 MHz spectrum. The grayed-out region in both spectra corresponds to the residual H₂O peak.

The sweetness/citric acid ratio of the samples determined at the two frequencies considered had high correlation ($R^2 > 0.99$, Figure 2), showing the equivalence of both systems and their fitness for the intended purpose of the method.

It is then possible to study the correlation between the acceptability of the mandarin samples determined by consumers and the sweetening power/citric acid ratio obtained using the 60 and 400 MHz systems (Figure 3). Using this set of data, a linear regression model with an R^2 of 0.94 and an RMSE of 0.35 was obtained using data recorded at 400 MHz. The corresponding regression parameters of the linear model derived using sugar and citric acid concentrations determined with the 60 MHz instrument were 0.96 and 0.29, indicating that acceptability prediction models of similar quality were obtained regardless of the instrument employed in their development.

In addition, the correlation between the predicted acceptability using both models was very high ($R^2 > 0.99$), further proving the equivalence of the models derived from the two instrumental systems (Figure 4).

It is worth pointing out that although models derived from data at 400 and 60 MHz are of the same predictive quality, special attention is needed when identifying and integrating data in the low-field instrument. As stated earlier and shown in Figure 1, there is considerable signal overlap in the 3.00 to 4.30 ppm region and expertise is required to assign peaks and process these spectra accurately.

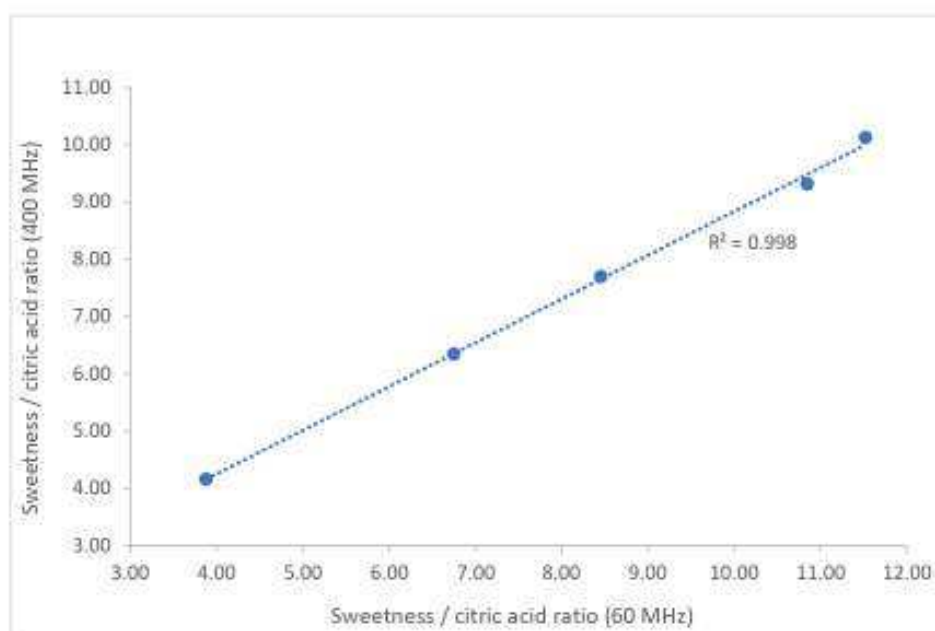


Figure 2. Correlation between the measurement of the sweetness/citric acid ratio of the samples obtained at 400 and 60 MHz.

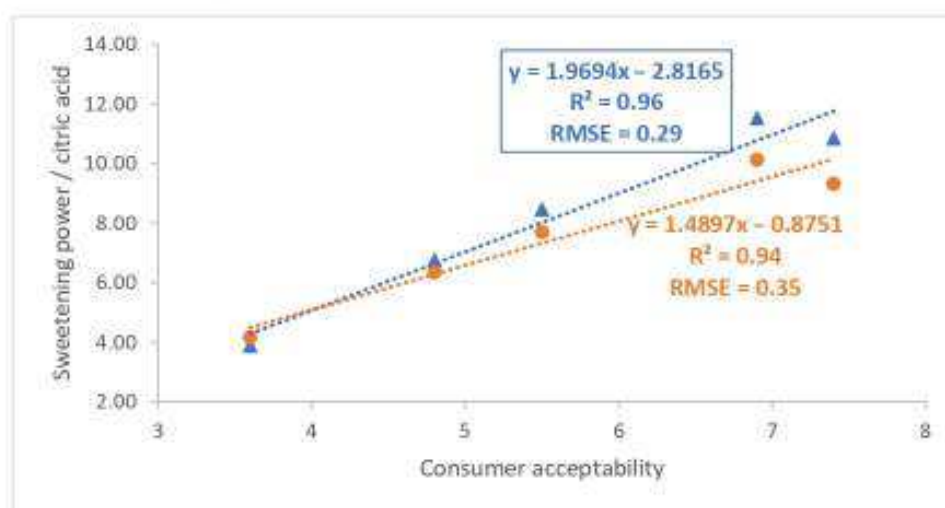


Figure 3. Correlation between consumer acceptability and sweetening power/citric acid determined using 60 and 400 MHz data (blue triangles and orange circles, respectively).

Conversely, and due to the lower resolution of low-field instruments, the variations in the chemical shifts of sugar signals with pH have less impact on spectra recorded at 60 MHz [30]. This makes spectral referencing and alignment simpler in these instruments.

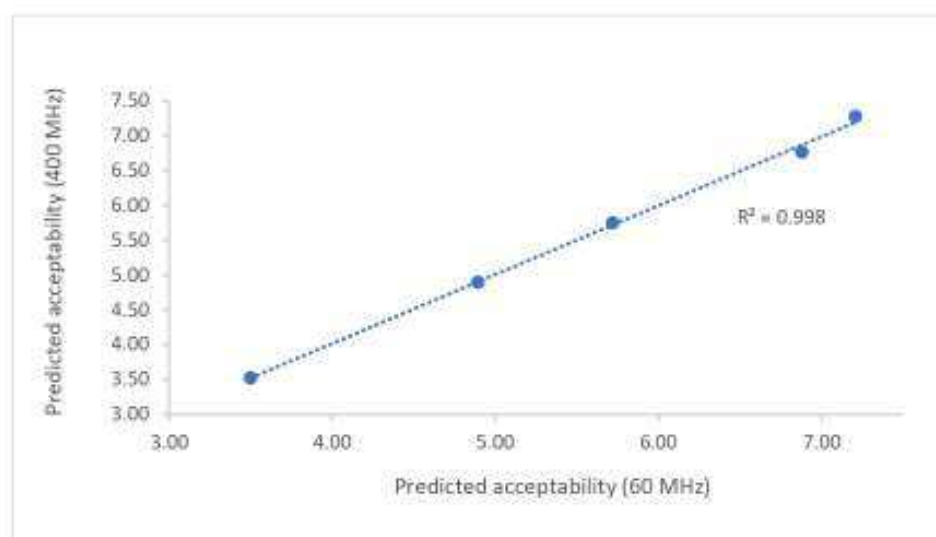


Figure 4. Correlation of the predicted acceptability using the models obtained with both instruments.

4. Conclusions

As demonstrated above, low-field NMR systems can be employed in the development of consumer acceptability prediction models that have identical quality to those derived from high-field NMR data. The lower purchase and running costs of benchtop spectrometers makes these chemometric-based tools more accessible for routine inclusion in fruit breeding programs, such as the Uruguayan Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Furthermore, the continuing advances in benchtop NMR instruments, which include the implementation pure shift pulse sequences, solvent suppression techniques, and multidimensional and multinuclear methods, will facilitate their application to other fields of food analysis and metabolomics.

Author Contributions: Conceptualization, S.D.K. and H.H.; methodology, I.M.; formal analysis, I.M.; investigation, I.M.; resources, F.R. and S.D.K.; data curation, I.M.; writing—original draft preparation, I.M.; writing—review and editing, G.M., S.D.K. and H.H.; visualization, I.M.; supervision, G.M., S.D.K., H.H.; project administration, S.D.K. and H.H.; funding acquisition, S.D.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the International Atomic Energy Agency (IAEA, award CRP D52042, “Implementation of Nuclear Techniques for Authentication of Foods with High-Value Labelling Claims”) and the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, award POS_NAC_2020_1_164240, “Estudio de Perfiles Metabólicos como Herramienta para la Caracterización de Mezclas de Compuestos Bioactivos”). The APC was covered by IAEA and the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the staff at INIA Salto Grande and Área de Evaluación Sensorial (Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL), Facultad de Química, Universidad de la República).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Freeman, R.; Robert, J.B. *A Brief History of High Resolution NMR*; Robert, J.B., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1991; pp. 1–16.
- Blümich, B. Low-field and benchtop NMR. *J. Magn. Reson.* **2019**, *306*, 27–35. [\[CrossRef\]](#)
- Giberson, J.; Scicluna, J.; Legge, N.; Longstaffe, J. Chapter Three—Developments in benchtop NMR spectroscopy 2015–2020. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2021**, *102*, 153–246.
- Halse, M.E. Perspectives for hyperpolarisation in compact NMR. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *83*, 76–83. [\[CrossRef\]](#)
- Kunjir, S.; Rodriguez-Zubiri, M.; Coeffard, V.; Felpin, F.-X.; Giraudeau, P.; Farjon, J. Merging Gradient-Based Methods to Improve Benchtop NMR Spectroscopy: A New Tool for Flow Reaction Optimization. *ChemPhysChem* **2020**, *21*, 2311–2319. [\[CrossRef\]](#)
- van Beek, T.A. Low-field benchtop NMR spectroscopy: Status and prospects in natural product analysis. *Phytochem. Anal.* **2021**, *32*, 24–37. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kent, J.E.; Bell, N.G.A. Molecular Properties of Caffeine Explored by NMR: A Benchtop NMR Experiment for Undergraduate Physical-Chemistry Laboratories. *J. Chem. Educ.* **2019**, *96*, 786–791. [\[CrossRef\]](#)
- Lee, Y.; Matviychuk, Y.; Holland, D.J. Quantitative analysis using external standards with a benchtop NMR spectrometer. *J. Magn. Reson.* **2020**, *320*, 106826. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Araneda, J.F.; Mendonça Barbosa, T.; Hui, P.; Leclerc, M.C.; Ma, J.; Maier, A.F.G.; Riegel, S.D. Incorporating Benchtop NMR Spectrometers in the Undergraduate Lab: Understanding Resolution and Circumventing Second-Order Effects. *J. Chem. Educ.* **2021**, *98*, 1227–1232. [\[CrossRef\]](#)
- Araneda, J.F.; Chu, T.; Leclerc, M.C.; Riegel, S.D.; Spingarn, N. Quantitative analysis of cannabinoids using benchtop NMR instruments. *Anal. Methods* **2020**, *12*, 4853–4857. [\[CrossRef\]](#)
- Assemat, G.; Balayssac, S.; Gerdova, A.; Gilard, V.; Caillet, C.; Williamson, D.; Malet-Martino, M. Benchtop low-field ¹H Nuclear Magnetic Resonance for detecting falsified medicines. *Talanta* **2019**, *196*, 163–173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Keizers, P.H.J.; Bakker, F.; Ferreira, J.; Wackers, P.F.K.; van Kollenburg, D.; van der Aa, E.; van Beers, A. Benchtop NMR spectroscopy in the analysis of substandard and falsified medicines as well as illegal drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *178*, 112939. [\[CrossRef\]](#)
- Isaac-Lam, M.F. Determination of alcohol content in alcoholic beverages using 45 MHz benchtop NMR spectrometer. *Int. J. Spectrosc.* **2016**, *2016*, 2526946. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Defernez, M.; Wren, E.; Watson, A.D.; Gunning, Y.; Colquhoun, I.J.; Le Gall, G.; Williamson, D.; Kemsley, E.K. Low-field ¹H NMR spectroscopy for distinguishing between arabica and robusta ground roast coffees. *Food Chem.* **2017**, *216*, 106–113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sobolev, P.A.; Mannina, L.; Proietti, N.; Carradori, S.; Daglia, M.; Giusti, M.A.; Antiochia, R.; Capitani, D. Untargeted NMR-Based Methodology in the Study of Fruit Metabolites. *Molecules* **2015**, *20*, 4088–4108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gunning, Y.; Jackson, A.J.; Colmer, J.; Taous, F.; Philo, M.; Brignall, R.M.; El Ghali, T.; Defernez, M.; Kemsley, E.K. High-throughput screening of argan oil composition and authenticity using benchtop ¹H NMR. *Magn. Reson. Chem.* **2020**, *58*, 1177–1186. [\[PubMed\]](#)
- Gunning, Y.; Taous, F.; El Ghali, T.; Gibbon, J.D.; Wilson, E.; Brignall, R.M.; Kemsley, E.K. Mitigating instrument effects in 60 MHz ¹H NMR spectroscopy for authenticity screening of edible oils. *Food Chem.* **2022**, *370*, 131333. [\[CrossRef\]](#)
- Sobolev, A.P.; Thomas, E.; Donarski, J.; Ingallina, C.; Circi, S.; Marincola, F.C.; Capitani, D.; Mannina, L. Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *91*, 347–353. [\[CrossRef\]](#)
- Antoniolo, D.S.; Cónsola, N.R.B.; Gómez, J.F.M.; Beline, M.; Pavan, B.; Souza, C.; Goulart, R.S.; Colnago, L.A.; Silva, S.L. NMR-based metabolomics to assess metabolites correlated with beef sensory properties. In Proceedings of the 65th International Congress of Meat Science and Technology, Berlin, Germany, 4–9 August 2019; pp. 801–803.
- Muroya, S.; Ueda, S.; Komatsu, T.; Miyakawa, T.; Ertbjerg, P. MEATabolomics: Muscle and meat metabolomics in domestic animals. *Metabolites* **2020**, *10*, 188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pavagadhi, S.; Swarup, S. Metabolomics for evaluating flavor-associated metabolites in plant-based products. *Metabolites* **2020**, *10*, 197. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hatzakis, E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 189–220. [\[CrossRef\]](#)
- Salvino, R.A.; Colella, M.F.; De Luca, G. NMR-based metabolomics analysis of Calabrian citrus fruit juices and its application to industrial process quality control. *Food Control* **2021**, *121*, 107619. [\[CrossRef\]](#)
- Cirillo, A.; Magri, A.; Scognamiglio, M.; D'Abrósca, B.; Fiorentino, A.; Petriccione, M.; Di Vajo, C. Evaluation of Morphological, Qualitative, and Metabolomic Traits during Fruit Ripening in Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Horticulturae* **2022**, *8*, 384. [\[CrossRef\]](#)
- Migues, I.; Hodos, N.; Moltini, A.I.; Gámbaro, A.; Rivas, F.; Moyna, G.; Heinzen, H. ¹H NMR metabolic profiles as selection tools of new mandarin cultivars based on fruit acceptability. *Sci. Hortic.* **2021**, *287*, 110262. [\[CrossRef\]](#)
- Castaing-Cordier, T.; Ladrone, V.; Besacier, F.; Bulete, A.; Jacquemin, D.; Giraudeau, P.; Farjon, J. High-field and benchtop NMR spectroscopy for the characterization of new psychoactive substances. *Forensic Sci. Int.* **2021**, *321*, 110718. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Alamprese, C. Food Authentication. In *Spectroscopic Methods in Food Analysis*; Franca, A.S., Nollet, L.M.L., Eds.; CRC Press: Miami, FL, USA, 2018; pp. 327–352.

28. Schiffman, S.S.; Booth, B.J.; Losee, M.L.; Pecore, S.D.; Warwick, Z.S. Bitterness of sweeteners as a function of concentration. *Brain Res. Bull.* **1995**, *36*, 505–513. [[CrossRef](#)]
29. Stampanoni, C.R. Influence of acid and sugar content on sweetness, sourness and the flavour profile of beverages and sherbets. *Food Qual. Prefer.* **1993**, *4*, 169–176. [[CrossRef](#)]
30. Matviychuk, Y.; Yeo, J.; Holland, D.J. A field-invariant method for quantitative analysis with benchtop NMR. *J. Magn. Reson.* **2019**, *298*, 35–47. [[CrossRef](#)]

Apêndice 4: Variability levels of selected amino acids among mandarins produced in Uruguay (Rezende et al., 2021)

Variability levels of selected amino acids among mandarins produced in Uruguay

Sofia Rezende^{1,2}, Sabrina Banchero², Ignacio Miguez³, Maria Veronica Cesio⁴, Carlos Fernando Rivas⁴, Horacio Heinzen³, Maria Natalia Besil^{1*}

1. University of the Republic of Uruguay, Chemistry Department of Litoral, Paysandú, Uruguay.
2. Technological University, Southwest Regional Technological Institute, Paysandú, Uruguay.
3. University of the Republic of Uruguay, Faculty of Chemistry, Montevideo, Uruguay.
4. National Institute for Agricultural Research, Salto, Uruguay.

+Corresponding author: Maria Natalia Besil. **Phone:** +598-4722-7950, **Email address:** nbesil@fq.edu.uy

ARTICLE INFO

Article history:

Received: July 27, 2020

Accepted: July 16, 2021

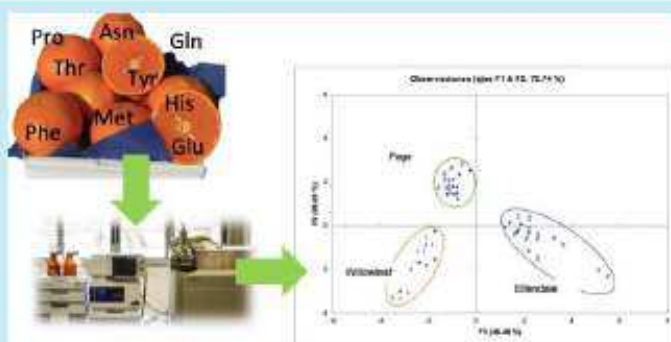
Published: October 01, 2021

Section Editor: Assis Vicente Benedetti

Keywords

1. mandarins
2. amino acids
3. nutraceuticals
4. high performance liquid chromatography-mass spectrometry

ABSTRACT: Nutraceutical properties of mandarins are of great interest to promote their consumption. The occurrence of free amino acids in foods is relevant to assess the nutritional value of it. To learn more about the amino acids' occurrence and variability between species, a targeted metabolomics study in 'Ellendale', 'Willowleaf' and 'Page' varieties was performed through ion exchange liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The studied amino acids were asparagine, glutamic acid, glutamine, histidine, methionine, phenylalanine, proline, threonine and tyrosine. The difference between two consecutive seasons was evaluated, as well as the influence of fruit maturity of 'Page' collected in two periods of 2015. The analytical methodology was validated. The concentration of the compounds through principal component analysis, separated well apart the three cultivars in both harvests, showing a particular profile for each of them. When comparing mature and immature cultivar 'Page', the amino acids with higher levels in mature samples were histidine, asparagine, glutamine and glutamic acid. The profiles were different due to genetic diversity, and the climatic conditions. These results add value to citric production.



1. Introduction

In recent years, the consumption of healthy foods by the world population has been increasing. The knowledge on food composition seeking a healthier life boosts consumer demand for foods with low amounts of additives, fewer colorants, nontransgenic, with beneficial health properties beyond their own nutritional capacity (Fernández, 2007).

Particularly, citrus fruits contain nutritious ingredients and their consumption is associated with a reduction in the risk of cardiovascular diseases, diabetes and cancer, linked to the presence of flavonoids among other compounds with antioxidant and anti-inflammatory activity (Khan *et al.*, 2014; Xi *et al.*, 2014). Nevertheless, the presence and contribution of amino acids to the healthy properties of citrus fruits has not been acknowledged in recent reviews (Lado *et al.*, 2018). It is reported that the amino acids present in different foods are used as nutraceuticals for the treatment and prevention of diseases (Sharma *et al.*, 2016). It is also known that amino acids are essential nutrients in the diet and supplements containing them can be beneficial in strict vegetarian people. Recent studies suggest that a supplementation of tryptophan could improve the therapeutic treatment of patients with anorexia nervosa (Haleem, 2017). Besides, the supplements containing essential amino acids together with keto acids is beneficial to ensure an adequate supply of essential amino acids in patients with chronic kidney disease (Cupisti and Bolasco, 2017).

Particularly, mandarins have eight of the nine essential amino acids (histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan and valine), which makes their consumption beneficial to human health, but the content of free amino acids is different depending on the variety. The total content of amino acids in Satsuma mandarin has been reported as 15 $\mu\text{mol g}^{-1}$, being the most abundant ones asparagine (3.5 $\mu\text{mol g}^{-1}$), arginine (2.4 $\mu\text{mol g}^{-1}$), aspartic acid (2.0 $\mu\text{mol g}^{-1}$), proline (1.5 $\mu\text{mol g}^{-1}$) and glutamine (1.0 $\mu\text{mol g}^{-1}$). Meanwhile, the remaining amino acids are in concentrations lower than 1 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Besides, in mandarin juices the most abundant amino acids are proline (1 mg mL^{-1}), arginine (0.85 mg mL^{-1}), asparagine (0.18–0.86 mg mL^{-1}), aspartic acid (0.24–0.50 mg mL^{-1}), glutamic acid (0.17–0.34 mg mL^{-1}), serine (0.12–0.26 mg mL^{-1}), alanine and phenylalanine (0.60–0.15 mg mL^{-1}). The total content of free amino acids changes during the maturity of the fruit, being proline and arginine those that showed the most substantial changes (Ladanyia, 2008). In citrus fruits,

free amino acids play an important role as osmoprotectants, but also their connection to disease resistance had been highlighted (Killiny and Hijaz, 2016; Sadka *et al.*, 2019). Although amino acids are compounds which belong to the primary metabolism, their contribution to specific adaptive properties to stress places them as contributors to the role of secondary metabolism. Secondary metabolites are normally at concentration levels of one or two orders of magnitude lower than primary metabolites. Given the reported amounts of amino acids in citrus fruits, it could be of interest to study the changes they go through between two different cropping years, with distinct water availability during fruit development. To study these changes, coupling analytical determinations with statistical analyses is the most appropriate strategy (Dewick, 2009). Within this frame, the study of changes in the amino acids profile, using the concepts of targeted metabolomics was faced using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Up to date, there have not been studies using a targeted determination by ion exchange liquid chromatography-mass spectrometry (LC-(ESI)-MS/MS) of the occurrence of amino acids in mandarins produced in the region. These data allow the regional and national industries to characterize and differentiate their production from a nutraceutical point of view. With this idea in mind, the inter-cultivar composition variability of nine amino acids in cultivars Willowleaf, Page and Ellendale, as well as the variations between two consecutive harvests, is presented in this work.

2. Materials and methods

2.1 Samples

Mandarin samples were bred at Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) — Salto Grande (31°16'18" S 57°53'26" W) in two consecutive harvesting seasons during 2015 and 2016. Fruits were harvested at their optimal fruit ripening and stored at –20 °C until processed.

A total of 59 samples of mandarins of three different genetically stable cultivars: Willowleaf (*Citrus reticulata*), Page (*Tangelo minneola* × *Clementina*), Ellendale (*Citrus sinensis* × *Citrus reticulata*) were selected for this study. In the sampling process, 10 mandarins were taken from each tree randomly. At the time of harvest, the quality parameters of the fruit (titratable acidity, soluble solids, texture, internal and external color) were evaluated to ensure that the maturity between the varieties was the

same. In the case of 'Page' (2015), the samplings were carried out in May and July in order to evaluate the amino acids profile for the same variety at different maturity stages.

2.2 Reagents and materials

High purity amino acid standards were provided by Sigma-Aldrich. Individual standard solutions were prepared at a concentration of 1000 mg L⁻¹, using a mixture of 50:50 CH₃OH:H₂O 0.1% formic acid (HCOOH) as solvents. Subsequently, a mix of 10 mg L⁻¹ was prepared, containing all the purchased amino acids, making the corresponding dilutions from the different standard solutions. Ultra-pure water was used as solvent for the mobile phase and acidified water with 1 mmol L⁻¹ citric acid (Analar-BDH Chemical Ltd Poole England) and finally adjusted to pH 11 with dimethylamine (DMA). Methanol (PHARMCO-AAPER) quality UV-HPLC and chloroform (J.T. Baker) quality HPLC were used as extraction solvents.

For the extraction procedure, 50 mL conical polypropylene tubes, 5 mL syringes and 0.45 µm hydrophobic PTFE filters were used. Vials of 12 and 4 mL to store the samples, and vials for automatic sampling of 2 mL with screw cap and septum for injection in the chromatographic equipment were used.

2.3 Apparatus and experimental conditions

The LC-(ESI)-MS/MS analysis was performed with an Agilent 1200 LC system (Agilent Technologies, Palo alto, CA, USA) coupled to a 4000 QTRAP LC-MS/MS system from AB SCIEX™ (Framingham, Massachusetts, USA) run in the Scheduled MS/MS-mode. The LC-Separation was performed on a Dionex AS11 (250 × 2 mm, 4 µm) ion exchange column. The column temperature was 40 °C and it was reconstituted after de analysis with a solution of NaOH 30 mmol L⁻¹. The operation of the LC gradient involved the elution program described in Fig. 1, A: water; B: water 1 mmol L⁻¹ citric acid and adjusted to pH 11. It was run at 300 µL min⁻¹. The injection volume was 5 µL. The MS/MS detection was performed with a QqQ analyzer in the multiple reaction monitoring (MRM) mode using an Electrospray Ionization (ESI) interface in the negative ion mode (Bringans *et al.*, 2011). The ionization voltage was 5000 V, the nebulizer and the curtain gases were nitrogen at 50 psi each. The solvent evaporation in the source was assisted by a drying gas (heated nitrogen at 500 °C per 50 psi). The optimal

MRM transitions, collision energies (CE), cell exit potential (CXP) and declustering potentials (DP) for each investigated compound were determined infusing with a syringe directly the amino acids individual standard solutions to the instrument at a constant flow of 10 µL min⁻¹.

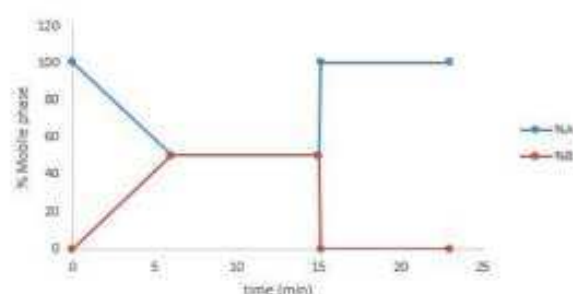


Figure 1. LC-MS/MS elution program.

2.4 Instrumental identification

The criteria used for identification of the targeted analytes using MRM acquisition mode, based in mass spectrometry pesticide residue analysis guidelines, were retention time of the analyte corresponding to that of the calibration standard (0.1 min of tolerance) and the precursor ion that yields product ions of specific m/z, called transitions. Additional confirmation was achieved evaluating the reference ion ratio. The reference ion ratio (m/z ratio) is the average obtained in solvent of standards measured in the same sequence and under the same conditions as the samples [Intensity(m/z)_{main-ion}/(intensity(m/z)_{parent})]. The MRM transitions ratio from sample extracts should be within ± 30% (relative) of average of calibration standards tolerance deviation (EURL, 2017).

2.5 Amino acids extraction

The amino acids were extracted from mandarins pulp with a methodology adapted from Verpoorte *et al.* (2007). For the extraction of the amino acids, 2.0 ± 0.1 g of frozen crushed pulp were placed in a 50 mL polypropylene centrifuge tube together with 8 mL of CHCl₃ (LiChrosolv, Merck, Germany), 4 mL of MeOH (LiChrosolv, Merck, Germany), and 4 mL of ultrapure water (Millipore Milli-Q Ultrapure Water Solutions Type 1). The resulting suspension was vortexed for 30 s and sonicated for 60 s. It was then centrifuged for 5 min at 1400 xg, the phases were separated, and 8 mL of CHCl₃ were added to the aqueous phase. The whole

process was repeated, and the organic phases were combined and stored for future analysis. The aqueous extract was filtered, distilled under reduced pressure to remove MeOH, and then lyophilized to remove water (Migues *et al.*, 2021). Finally, the freeze-dried extract was dissolved in water and citric acid adjusted to pH 11 with DMA, filtered and placed in a 2 mL injection vial.

2.6 Study of linearity and limit of quantification (LOQ)

The LOQ and linearity were determined from the calibration curves performed in solvent for each analyte. To establish the linear range, curves that have a correlation coefficient greater than 0.99 and a good visual adjustment were considered acceptable. The LOQ was determined by the lowest level of concentration studied in which a signal-to-noise ratio greater than 10 was obtained and an adequate peak shape with correct superposition between transitions was observed.

2.7 Statistical analysis

For data treatment, the XLSTAT version 2015 software was used, as well as the principal component analysis (PCA) and Levene's test for homogeneity of variances.

A student's *t* test was applied to the results obtained for two samples, assuming equal variances with 95% confidence. This test assumes normal distribution and homogeneity of variances between the samples. For the samples that did not present homogeneous variances, a student's test was performed for two samples with unequal variances.

For the classification of mandarin varieties, to evaluate their diversity, and to identify outliers within each class, PCA was employed. For the identification of the most relevant amino acids between harvests, a discriminant analysis of partial least squares (PLS-DA) was performed using MetaboAnalyst software (version 4.0) (Chong *et al.*, 2018; Chong and Xia, 2018). Pareto scaling was applied to minimize the weight of large values while maintaining data structure partially intact (van den Berg *et al.*, 2006). The models derived from PLS-DA were validated using permutation tests of 100 iterations where the classes were randomly reassigned, two thirds of the data were used as training data to build a classifier, and the remaining third of the data was used to test it. The VIP scores study based on loadings from the PLS analysis show the amino acid that contribute to the separation and differentiation of the two harvests.

3. Results and discussion

The production of mandarins in Uruguay has a broad harvest calendar that covers from the end of February (mid-summer) to the end of October (mid-spring) according to the different varieties that are cultivated. These numerous varieties have been originated by spontaneous mutations of mandarins or by crossing with other citrus fruits, such as orange or grapefruit (Otero *et al.*, 2020). Differences in their amino acids profiles are expected due to their wide genetic variety and harvesting times during the year (Kefford and Chandler, 1970; Underwood and Rockland, 1953). The amino acids selected for the study, listed in Tab. 1, represent a combination of essential amino acids and those with relevant osmoprotective properties.

Table 1. Mass of the ions generated operating in ESI negative mode. Amino acid, precursor ion and product (m/z), fragmentation potential (DP), collision energy (CE), input potential (EP), cell output potential (CXP) is from the mass analyzer operating in ESI mode negative.

Amino acid	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Asparagine	132.0	88.0	-10	-10	-16	-8
	132.0	115.0	-10	-10	-16	-10
	132.0	71.0	-10	-10	-18	-6
Glutamine	145.0	128.0	-10	-10	-12	-6
Methionine	148.0	47.0	-10	-10	-22	-6
Phenylalanine	164.0	147.0	-70	-10	-18	-25
	164.0	103.0	-70	-10	-24	-15
	164.0	72.0	-70	-10	-20	-11

Continue...

Tyrosine	180.0	163.0	-80	-10	-20	-27
	180.0	119.0	-80	-10	-26	-19
Threonine	118.0	74.0	-55	-10	-16	-11
	118.0	72.0	-55	-10	-14	-11
Proline	114.0	68.0	-75	-10	-18	-9
	114.0	66.0	-75	-10	-20	-11
Histidine	154.0	109.0	-40	-10	-12	-17
	154.0	93.0	-40	-10	-26	-13
	154.0	137.0	-40	-10	-20	-21
Glutamic acid	146.0	102.9	-50	-10	-18	-15
	146.0	128.0	-50	-10	-18	-9

3.1 Targeted analysis

Taking into account that the level of the concentrations of free amino acids reported in mandarins are in the order of $\mu\text{g/kg}$, as well as the polarity of the moieties, the most suitable analytical approach for their analysis is liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Due to the ionic behavior of these compounds, the use of the reverse phase in liquid chromatography (LC) is not the best selection for the analysis. The reported methods show that it is possible to analyze them directly, using an ion

exchange column (Piraud *et al.*, 2003), polar columns (Yao *et al.*, 2013), or indirectly, using derivatization (Alterman and Hunziker, 2012). Particularly, in this work the analysis was performed using an ion exchange column, as it is described in section 2.3, to avoid the standardization of the derivative reaction and make the analysis simpler.

For the analysis it was necessary to optimize the chromatographic separation with an ion exchange column (Fig. 2), as well as the tandem mass detector conditions described above (Tab. 1).

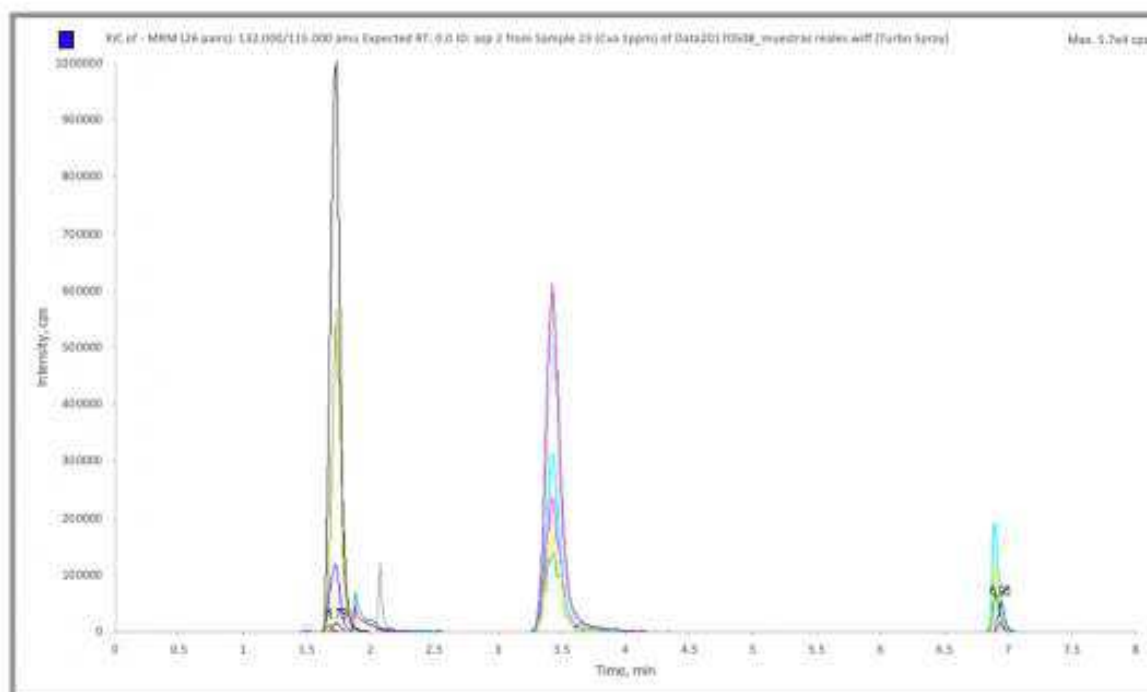


Figure 2. Multi reaction monitoring (MRM) chromatogram of the nine studied amino acids at a 1 mg L^{-1} level.

The final instrumental method was based on the MRM operation mode, which is a highly specific and

sensitive mass spectrometry operation mode that can selectively quantify compounds in a complex matrix

(Bringans *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2015). Multiple reaction monitoring provides high selectivity to the determination, enhancing the signal to noise (S/N) ratio of the peaks, improving the overall sensitivity.

In summary, the triple quadrupole configuration allows to work in tandem mass spectrometry configuration. The first quadrupole acts as a filter for the $[M-H]^+$ ions generated in the ESI source, they are then guided to a second quadrupole which is a collision chamber. The $[M-H]^+$ ions (precursor ion) degrade to fragmented ions (product ions). The third quadrupole filters the product ions, eliminating the back noise that spoils the S/N relationship. The transitions from the precursor ion to the product ion are highly specific and are the basis for the high selectivity and sensibility of the MRM acquisition mode. In this work, precursor ions, declustering potential, product ions, cell exit potential and collision energies were determined by direct infusion of each analyte. It is important to notice that, for each precursor ion, different collision energies and cell exit potential are settled in order to enhance the production of each product ion and, as a consequence, a better S/N ratio will be obtained.

For MRM compounds optimization and MRM quantitative analysis, amino acids standards are necessary. Focused on the instrumental confirmation of the analytes, two transitions were monitored, and a time-scheduled acquisition method was developed. However, this criterion has not been accomplished for glutamine and methionine, it was only possible to optimize just one transition for each of these compounds.

3.2 Linearity and LOQ

The linearity was evaluated with calibration curves in solvent in a range between 5–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. For all

the amino acids in study a linear adjustment was obtained with a correlation coefficient higher than 0.99 in a range that varies with the analyzed compound. The linear ranges for each compound were set from the LOQ value to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

The LOQs obtained were 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for asparagine, methionine and threonine, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ for phenylalanine and glutamic acid, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ for histidine, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for glutamine, 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ for tyrosine and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ for proline, respectively.

3.3 Sample analysis

A total of 59 mandarin samples were analyzed (33 belonging to the 2015 harvest and 26 to the 2016 harvest). The samples from 2015 were: 10 cultivar Ellendale, 13 cultivar Page and 10 cultivar Willowleaf. While the ones from 2016 were: 10 cultivar Ellendale, 9 cultivar Page and 7 cultivar Willowleaf.

To study the variability of the amino acids content during maturation of cultivar Page, a total of 23 samples collected in May and July of 2015 were tested.

The content of each amino acid (expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried extract) present in the different varieties in two years of production are presented in Tabs. 2 and 3. The amino acids were distributed in a wide range of concentration as it was reported by Ladanyia (2008). The amino acid with higher concentration was a different one in the three studied varieties. Ellendale presented proline, as the amino acid with higher concentration in both years of production studied, while 'Willowleaf' was characterized by the presence of asparagine and for cultivar Page the prevalent ones were proline and asparagine in both harvests, being the concentration level of glutamic acid remarkably close to the levels of the other two.

Table 2. Average, maximum and minimum concentrations of the nine amino acids for the three varieties year 2015.

Harvest 2015	'Willowleaf'			'Ellendale'			'Page'		
Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Average	Minimum	Maximum	Average	Minimum	Maximum	Average	Minimum	Maximum
Glutamic acid	266.0	240.0	500.0	163.0	89.0	305.0	577.1	358.9	1360.6
Asparagine	1215.7	40.0	4560.0	2021.4	811.0	3556.0	806.4	66.0	1369.0
Phenylalanine	26.2	16.0	35.0	196.1	89.0	254.0	46.0	12.0	92.0
Glutamine	665.8	18.0	2593.0	200.6	101.0	362.0	55.9	10.0	86.0
Histidine	< LOQ	< LOQ	< LOQ	33.8	26.0	61.0	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Methionine	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Proline	6.7	1.0	11.0	7431.0	330.6	11615.5	996.9	641.2	1440.2
Tyrosine	< LOQ	< LOQ	< LOQ	77.9	37.0	111.0	11.3	6.0	20.0
Threonine	15.8	7.0	35.0	84.8	45.0	114.0	16.2	9.0	38.0

Table 3. Average, maximum and minimum concentrations of the nine amino acids for the three varieties year 2016.

Harvest 2016	‘Willowleaf’			‘Ellendale’			‘Page’		
Concentration (µg g ⁻¹)	Average	Minimum	Maximum	Average	Minimum	Maximum	Average	Minimum	Maximum
Glutamic acid	348.1	51.0	963.0	280.0	195.0	346.0	1457.4	865.0	1969.3
Asparagine	5629.2	3148.0	8044.0	1377.1	517.0	2769.0	2255.5	1128.3	2985.2
Phenylalanine	60.1	39.0	76.0	130.0	81.0	264.0	83.6	69.4	99.4
Glutamine	340.9	114.0	570.0	231.7	66.0	689.0	148.5	103.0	231.0
Histidine	< LOQ	< LOQ	< LOQ	68.2	40.0	127.0	19.8	10.0	33.0
Methionine	2.0	1.0	3.0	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Proline	18.6	13.0	24.0	4293.6	3055.0	5627.0	1601.1	634.0	3429.0
Tyrosine	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	43.0	24.0	96.0
Threonine	3.1	2.0	5.0	97.4	67.0	146.0	26.3	19.0	45.0

In general, asparagine showed a wide range of concentrations among all the varieties. Low concentration levels of threonine, methionine and tyrosine were observed in the three varieties. Moreover, low concentrations ranges were observed for these amino acids in both evaluated years.

For ‘Willowleaf’ it was only possible to identify but not to quantify histidine and tyrosine because they concentration levels were below the LOQs. Same scenario was seen for asparagine, glutamine, threonine and methionine in ‘Ellendale’; and for ‘Page’, methionine was not detected in neither of the studied years of production.

These results are in line with previous literature reports which assigned the variability in the mandarins amino acids composition to their wide genetic variety and their harvest time during the year (Otero *et al.*, 2020; Underwood and Rockland, 1953).

3.4 Statistical analysis

A student’s t-test was carried out to study if the amino acid profiles were the same in each variety in the harvest of 2015 and 2016. The results for ‘Willowleaf’ variety showed that the concentrations of the amino acids asparagine, phenylalanine and proline have significant differences, while glutamine, methionine and glutamic acid have no significant differences.

Cultivar Ellendale showed that glutamic acid, phenylalanine, histidine, tyrosine and proline presented significant differences between their concentrations.

For cultivar Page, it was observed that glutamic acid, asparagine, phenylalanine, glutamine, proline, tyrosine and threonine present significant differences, while histidine did not present significant differences.

The student’s t-test was also carried out for ‘Page’ harvested in May and July 2015 to study the differences in the amino acid profiles due to ripening. The results show that there are no significant differences between the concentration levels of the amino acids: glutamic acid, asparagine, phenylalanine, tyrosine and threonine. However, significant differences were observed for glutamine, histidine and proline. The difference between the amino acids’ profiles can be explained by the influence of several factors, such as genetic, maturity, the position of the fruit in the tree, management of the plant, climatic conditions and field factors (Otero *et al.*, 2020; Underwood and Rockland, 1953). The differences in appearance and taste that distinguish the different types and varieties of citrus are fundamentally differences in chemical composition because of genetic factors (Underwood and Rockland, 1953).

After the evaluation of the amino acid profiles in each mandarin variety, a PCA was carried out to study the differentiation of these varieties due to their amino acids composition. The PCA was implemented separately for the 2015 and 2016 samples.

3.4.1 Principal component analysis (PCA) of 2015 samples

In the PCA carried out for the varieties harvested in 2015, a slight separation between samples was achieved. According to the concentration levels, cultivar Ellendale is characterized by the presence of threonine, histidine, proline, phenylalanine and tyrosine; the cultivar Page is distinguished by containing a high concentration of glutamic acid; while ‘Willowleaf’ mandarin is differentiated by its content of methionine and glutamine (Fig. 3).

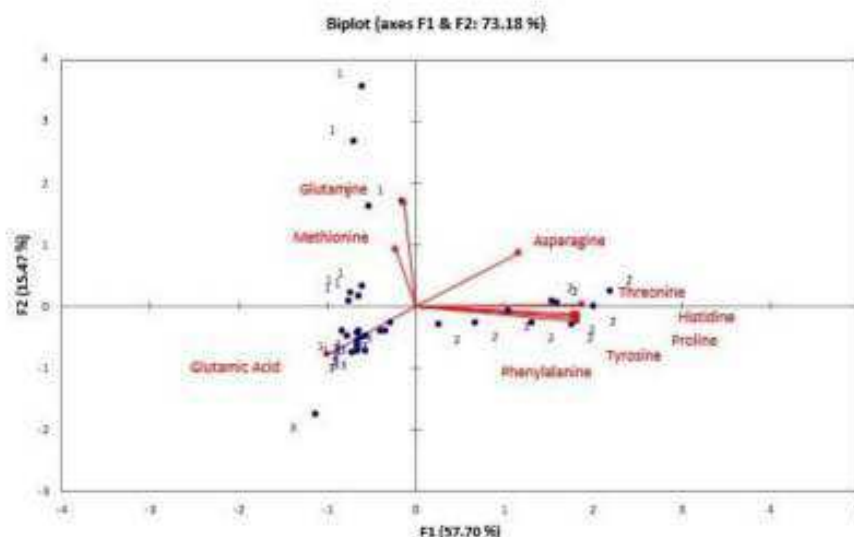


Figure 3. Principal component analysis of the three varieties of mandarin harvested in 2015 (1: 'Willowleaf'; 2: 'Ellendale'; 3: 'Page').

3.4.2 Principal component analysis of 'Page' May-July 2015 samples

Page variety harvests were carried out in two periods of the same year, in May and July 2015, being able in this way to compare the amino acid profiles of the fruit depending on the ripening grade (Tab. 4). [Lin et al., \(2015\)](#) reported that the concentration of free amino acids may increase or decrease depending on the maturity of the fruit. In this study, it was observed that some amino acids content increased (glutamic acid, asparagine and phenylalanine) upon maturity. The

level of proline slightly decreased and a possible explanation for this result is the well-known increment in sugars concentration upon maturation, which will also increase the osmotic pressure within the juice sacs and, therefore, the contribution of proline as osmoprotectant is no longer needed ([Torres et al., 2007](#)). The results of the PCA ([Fig. 4](#)) showed a differentiation between mandarins at different harvest times, being those of July better represented by the amino acids histidine, asparagine, glutamine and glutamic acid.

Table 4. Average, maximum and minimum concentrations of the nine amino acids for the variety 'Page' May-July 2015.

Harvest 2015	'Page' May			'Page' July		
Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Average	Minimum	Maximum	Average	Minimum	Maximum
Glutamic acid	589.7	178.0	976.5	1457.4	865.0	1969.3
Asparagine	2378.8	43.7	8378.3	2255.5	1128.3	2985.2
Phenylalanine	45.8	30.6	74.0	83.6	69.4	99.4
Glutamine	345.2	24.8	943.2	148.5	103.0	231.0
Histidine	126.6	5.8	260.4	19.8	10.0	33.0
Methionine	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Proline	1803.6	947.8	2947.9	1601.1	634.0	3429.0
Tyrosine	14.7	3.7	20.3	43.0	24.0	96.0
Threonine	19.5	1.7	24.6	26.3	19.0	45.0

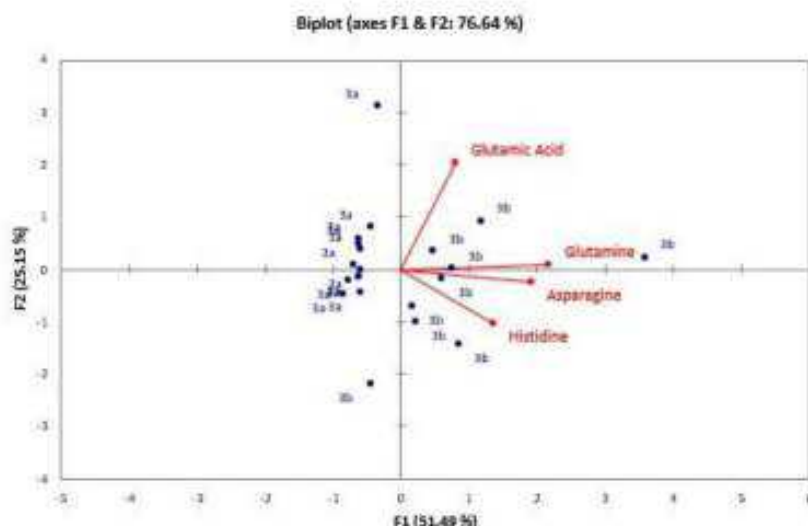


Figure 4. Principal component analysis of 'Page' variety with different degree of maturity (3a: May harvest; 3b: July harvest).

3.4.3 Principal component analysis of 2016 samples

For the varieties harvested in 2016, there is a clear differentiation between the samples of the three cultivars Ellendale, Page and Willowleaf. 'Ellendale'

was characterized for its high concentration levels of glutamine, phenylalanine, histidine and threonine; whereas cultivar Page is represented by its high content of glutamic acid and tyrosine; and asparagine and methionine were the major amino acids for cultivar Willowleaf samples (Fig. 5).

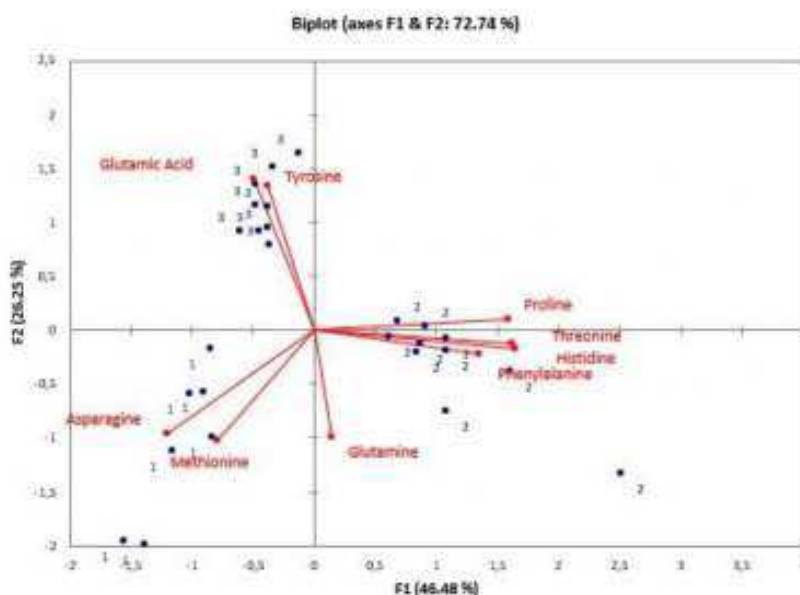


Figure 5. Principal component analysis of the three varieties of mandarin harvested in 2016 (1: 'Willowleaf'; 2: 'Ellendale'; 3: 'Page').

3.4.4 Discriminant analysis of partial least squares of the varieties harvested in 2015 and 2016

The comparison between Ellendale variety harvested in 2015 and 2016 indicate that the amino acid that weighted the most in the differentiation between both years is proline followed by asparagine (Fig. 6a). In Page variety, the most important amino acid for this classification was asparagine followed by glutamic acid and proline (Fig. 6b).

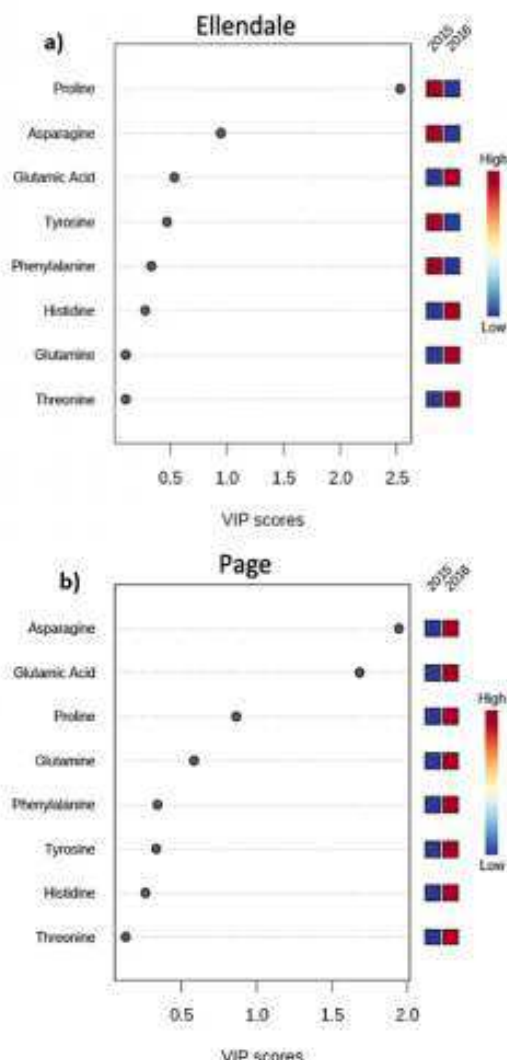


Figure 6. The VIP score plots of the PLS analysis performed on 'Ellendale' (a) and 'Page' (b) cultivated in 2015 and 2016.

In the case of 'Willowleaf' (Fig. 7a), asparagine was the amino acid that showed greater changes between harvests followed by glutamic acid and proline, the same was as in cultivar Page. When this analysis was performed with all the three samples together (Fig. 7b), the results also indicate asparagine, glutamic acid and proline as the amino acids that suffered the most drastic change between one harvest and the other.

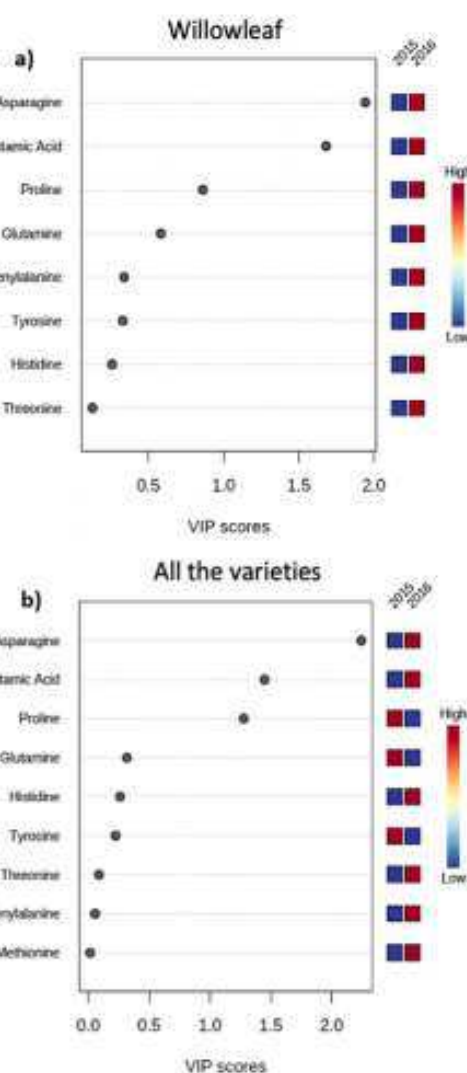


Figure 7. The VIP score plots of the PLS analysis performed on 'Willowleaf' (a) and the three varieties together (b) cultivated in 2015 and 2016.

Even though the most abundant amino acid for each variety was the same between harvests (see section 3.2), this type of analysis allows to identify the most important concentration changes between one harvest and the other. These changes could also be attributed to environmental conditions during maturation process as 2016 was characterized by a larger precipitation range than 2015 specially during the first months of each year (INIA, 2017).

4. Conclusions

A sensitive methodology for the underivatized analysis of amino acids in mandarins was developed and applied to the extraction and determination of nine amino acids: asparagine, glutamic acid, glutamine, histidine, methionine, phenylalanine, proline, threonine and tyrosine.

Fifty-nine mandarin samples were analyzed, and the results showed the differences between the amino acid profiles which allow to differentiate the varieties. The most abundant amino acid of each variety was the same in both harvests, however, it was observed that there were significant differences in the concentrations of amino acids between the two years. These differences were also observed when comparing the evolution of the amino acid profiles of cultivar Page upon maturation. The increase in sugar concentration dropped down the proline levels. The results could be explained by the genetic differences between the varieties, as well as due to the environmental conditions. Osmoprotectants as proline showed lower levels in the rainy year 2016 (Zulfiqar *et al.*, 2020).

The analysis of the main amino acids profile in different mandarin varieties using targeted MRM determination by LC-MS/MS proved to be a straightforward methodology to broaden marketing opportunities for the citrus industry, giving emphasis to the health-promoting effects of mandarins consumption due to their amino acids composition.

Authors' contribution

Conceptualization: Heinzen, H.; Besil, N.

Data curation: Not applicable

Formal Analysis: Rezende, S.; Mignes, I.; Banchemo, S.

Funding acquisition: Not applicable

Investigation: Not applicable

Methodology: Rezende, S.; Mignes, I.; Banchemo, S.

Project Administration: Rivas, C. F.; Heinzen, H.

Resources: Rivas, C. F.

Software: Not applicable

Supervision: Cesio, M. V.; Besil, N.

Validation: Rezende, S.; Mignes, I.; Banchemo, S.

Visualization: Not applicable

Writing – original draft: Rezende, S.; Mignes, I.

Writing – review & editing: Cesio, M. V.; Heinzen, H.; Besil, N.

Data availability statement

The data will be available upon request.

Funding

Financial support from INIA through the L4 funding program, the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (award POS_NAC_2017_1_140316) and the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

Acknowledgments

The authors want to thank Joanna Lado (INIA) for her participation during mandarin cultivars sampling. Rezende and Banchemo are grateful to Departamento de Química del Litoral for the possibility of performing their undergraduate thesis.

References

- Alterman, M. A.; Hunziker, P. *Amino Acid Analysis: Methods and Protocols*; Springer, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-445-2>
- Bringmis, S.; Stoll, T.; Winfield, K.; Casey, T.; Davis, T.; Albanese, J.; Lipscombe, R. Protein Biomarker Research Pipeline for Developing Protein Biomarkers for Diabetic Kidney Disease. *AB Sciex*, 2011, 1–5. <http://www.proteomics.com.au/wp-content/uploads/Biomarker-Pipeline-Diabetes-4250211-01.pdf> (accessed 2020-06-10).
- Cupisti, A.; Bolasco, P. Keto-analogues and essential aminoacids and other supplements in the conservative management of chronic kidney disease. *Panminerva Med*, 2017, 59 (2), 149–156. <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.16.03288-2>
- Chong, J.; Soufan, O.; Li, C.; Caraus, I.; Li, S.; Bourque, G.; Wishart, D. S.; Xia, J. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46 (W1), W486–W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>

- Chong, J.; Xia, J. MetaboAnalystR: An R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics* **2018**, *34* (24), 4313–4314. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty528>
- Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*; Wiley & Sons, 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470742761>
- EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides (EURL). *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*; SANTE/2017/11813; European Commission: Brussels, 2017. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11813_2017-fin.pdf (accessed 2020-06-11).
- Fernández, E. L. *Alimentos funcionales y nutraceuticos*; Sociedad Española de Cardiología, 2007.
- Haleem, D. J. Improving Therapeutics in Anorexia Nervosa with Tryptophan. *Life Sci.* **2017**, *178*, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.04.015>
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Estación meteorológica. 2017. <http://www.inia.uy/gras/Clima/Precipitación-nacional/Estación-meteorológica> (accessed April 2017).
- Kefford, J. F.; Chandler, B. V. *The Chemical Constituents of Citrus Fruits*; Academic Press, 1970.
- Khan, M. K.; Zill-E-Huma; Dangles, O. A Comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* **2014**, *33* (1), 85–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004>
- Killiny, N.; Hijaz, F. Amino acids implicated in plant defense are higher in *Candidatus liberibacter asiaticus*-tolerant citrus varieties. *Plant Signal. Behav.* **2016**, *11* (4), e1171449. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1171449>
- Ladanyia, M. *Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation*; Academic Press, 2008.
- Lado, J.; Gambetta, G.; Zacarias, L. Key Determinants of Citrus Fruit Quality: Metabolites and Main Changes during Maturation. *Sci. Hortic.* **2018**, *233*, 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.055>
- Lin, Q.; Wang, C.; Dong, W.; Jiang, Q.; Wang, D.; Li, S.; Chen, M.; Liu, C.; Sun, C.; Chen, K. Transcriptome and metabolome analyses of sugar and organic acid metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during fruit maturation. *Gene* **2015**, *554* (1), 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.10.025>
- Migues, I.; Hodos, N.; Moltini, A. I.; Gámbaro, A.; Rivas, F.; Moyna, G.; Heinzen, H. ¹H NMR metabolic profiles as selection tools of new mandarin cultivars based on fruit acceptability. *Sci. Hortic.* **2021**, *287*, 110262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110262>
- Otero, A.; Grasso, R.; Goñi, C.; Pérez, E.; Rubio, L.; Maeso, D.; Bertalmio, A.; Buenahora, J.; Giambiasi, M.; Arruabarrena, A.; Lado, J.; Moltini, A. I.; Fasiolo, C.; Espino, M.; Rivas, F. Desafíos de la citricultura en el Uruguay y el aporte de inia a su competitividad. *Revista INIA* **2020**, *61*, 55–68.
- Piraud, M.; Vianey-Saban, C.; Petritis, K.; Elfakir, C.; Steghens, J.-P.; Morla, A.; Bouchu, D. ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionization mode. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17* (12), 1297–1311. <https://doi.org/10.1002/rcm.1054>
- Sadka, A.; Shlizerman, L.; Kamara, I.; Blumwald, E. Primary Metabolism in Citrus Fruit as Affected by Its Unique Structure. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1167. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01167>
- Sharma, V.; Singh, L.; Verma, N.; Kalra, G. The Nutraceutical Amino Acids: Nature's Fortification for Robust Health. *Br. J. Pharm. Res.* **2016**, *11* (3), 1–20. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2016/24415>
- Torres, G. A. M.; Gimenes, M. A.; Rosa Junior, V. E.; Quecini, V. Identifying water stress-response mechanisms in citrus by in silico transcriptome analysis. *Genet. Mol. Biol.* **2007**, *30* (3 Suppl.), 888–905. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000500018>
- Underwood, J. C.; Rockland, L. B. Nitrogenous constituents in citrus fruits. *J. Food Sci.* **1953**, *18* (1–6), 17–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1953.tb17681.x>
- van den Berg, R. A.; Hoefsloot, H. C. J.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; van der Werf, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* **2006**, *7*, 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- Verpoorte, R.; Choi, Y. H.; Kim, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem. Rev.* **2007**, *6*, 3–14. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9031-3>
- Wright, M. J.; Thomas, R. L.; Stanford, P. E.; Horvath, A. R. Multiple Reaction Monitoring with Multistage Fragmentation (MRM3) Detection Enhances Selectivity for LC-MS/MS Analysis of Plasma Free Metanephines. *Clin. Chem.* **2015**, *61* (3), 505–513. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.233551>
- Xi, W.; Fang, B.; Zhao, Q.; Jiao, B.; Zhou, Z. Flavonoid composition and antioxidant activities of Chinese local pummelo (*Citrus Grandis* Osbeck.) varieties. *Food Chem.*

2014, 161, 230–238.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.001>

Yao, X.; Zhou, G.; Tang, Y.; Pang, H.; Qian, Y.; Guo, S.; Mo, X.; Zhai, S.; Su, S.; Qian, D.; Jin, C.; Qin, Y.; Duan, J.-a. Direct determination of underivatized amino acids from *Ginkgo biloba* leaves by using hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36* (17), 2878–2887. <https://doi.org/10.1002/jssc.201201045>

Zulfiqar, F.; Akram, N. A.; Ashra, M. Osmoprotection in plants under abiotic stresses: new insights into a classical phenomenon. *Planta* **2020**, *251*, 3. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03293-1>

Apéndice 5: Flavonoids and Limonoids Profiles Variation in Leaves from Mandarin Cultivars and Its Relationship with Alternate Bearing (Rodríguez Ceraolo et al., 2022)



Article

Flavonoids and Limonoids Profiles Variation in Leaves from Mandarin Cultivars and Its Relationship with Alternate Bearing

Cecilia Rodríguez Ceraolo¹, Valeria Vázquez¹, Ignacio Mígués^{1,2} , María Verónica Cesio¹, Fernando Rivas³ and Horacio Heinzen^{1,*}

¹ Grupo de Análisis Metabólicos (GAME), Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay; ccerao@fq.edu.uy (C.R.C.); valeria.vazquezp@gmail.com (V.V.); imigues@fq.edu.uy (I.M.); cs@fq.edu.uy (M.V.C.)

² Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay

³ Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Salto 50000, Uruguay; cfrivas@inia.org.uy

* Correspondence: heinzen@fq.edu.uy



Citation: Rodríguez Ceraolo, C.; Vázquez, V.; Mígués, I.; Cesio, M.V.; Rivas, F.; Heinzen, H. Flavonoids and Limonoids Profiles Variation in Leaves from Mandarin Cultivars and Its Relationship with Alternate Bearing. *Agronomy* **2022**, *12*, 121. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010121>

Academic Editor: Salvatore Campos

Received: 31 October 2021

Accepted: 2 December 2021

Published: 4 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Alternate bearing in citrus trees has been extensively studied as a key feature for citrus growers. Although the genetic and the biochemical process occurring during alternate bearing has been studied extensively, there is a lack of information identifying the presence of metabolic indicators during “on” and “off” years. In citrus plants, leaves play a central role in the metabolic pathway triggering the flowering induction process. To investigate the changes during this transition, a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of the leaf profiles of 20 compounds (17 polyphenols, two limonoids, and one furanocoumarin), in bearing and non-bearing branches arising from four different mandarin genotypes, was performed. The same metabolites were found in all the genotypes at both stages: both limonoids and 11 polyphenols. Using these compounds, the chemotaxonomic differentiation between cultivars was assessed. The levels of flavanones and limonoids showed differences in both bearing stages and the transition from vegetative to flowering could be shown by the activation of the polyphenol biosynthetic pathway, from precursors like naringenin to metabolic end-points such as narirutin and polymethoxyflavones. Narirutin levels showed significant differences between both stages, suggesting it as a possible marker of the physiological status of the branch.

Keywords: polyphenols; limonoids; secondary metabolism; bearing branches; non-bearing branches

1. Introduction

Citrus is one of the main fruit crops worldwide with more than 143 million tons produced in 2019 [1]. Alternate bearing in Citrus is one of the major limiting factors affecting production profits and, thus, tackling the maximal potential benefits for the global citrus industry is essential. Therefore, the genetic, biochemical, and metabolic determinations of alternate bearing have been widely studied, aiming to gain knowledge about the regulatory process in the transition from bearing to non-bearing trees. However, the mechanism by which the developing crop influences blooming and fruit yield the forthcoming year has not been fully understood yet. One hypothesis holds that return bloom and yield are related to tree carbohydrate status and, thus, lack of carbohydrate in the “on” year directly or indirectly reduces flowering the following year [2]. Other authors claim that developing fruit produces an inhibitor that directly or indirectly reduces flowering in the spring following the “on” crop [2,3]. Although extensive research has been conducted to unravel the hormonal and genetic regulation of flowering induction in Citrus [4,5], there is still a lack of information describing metabolites’ changes (in terms of

quality and quantity) occurring during “on” and “off” years as putative markers depicting this transition.

Flowering represents a transition phase from vegetative to reproductive growth and, thus, it is one of the most important events in the plant life cycle. During vegetative to reproductive transition, citrus undergoes metabolic regulations that have been extensively reported [6].

Flowering is regulated by endogenous and exogenous factors. The first one has been mainly attributed to the genetic and hormonal modulation of the *LFY* gene and Gibberellins metabolic pathway [7–9], identifying the fruit-mediated inhibition of flowering as the main cause of alternate bearing in citrus [10]. Similarly, carbon metabolism has also been reported to be involved in flower induction mediated by fruit presence in citrus [2]. Exogenous regulation of flowering has been mainly attributed to environmental stress factors including light intensity and wavelength, temperature, mineral and carbon nutrition, drought, low oxygen, crowding, root removal, and mechanical stimulation, as well as biotic stress factors such as infection by pests and pathogens [11–13].

A possible approach to find the metabolic changes involved in the process of alternate bearing is the study of the metabolome of the leaves in both stages. In this way, polyphenols and limonoids fulfill definite biological and ecological properties in plants [14]. As an example, when the carbon/nutrient ratio is high, photosynthesis is primarily diverted to the production of carbon-based metabolites such as phenolics [15,16] and, thus, high levels of phenolics are associated with in-excess accumulation of leaf carbohydrates. In this way, phenyl-propanoid biosynthesis serves as an ‘energy overflow’ mechanism by diverting photosynthate and cellular reducing power into stable product pools [17], preventing further oxidative damage during photoinhibition caused by high carbohydrates accumulation in leaves [18].

Polyphenols are a remarkably diverse group of secondary products with a vast array of biological functions. They protect plants from different biotic and abiotic stress and act as unique UV filters, signal molecules, allelopathic compounds, phytoalexins, detoxifying agents and antimicrobial defensive molecules [19]. They are classified in to two major classes: flavonoids and nonflavonoids. The latter include structurally simple molecules such as phenolic acids (hydroxybenzoic acids and hydroxycinnamic acids) and stilbenes, along with highly complex molecules such as stilbene oligomers, tannins, and lignans [20]. The former is the most studied class of polyphenols, sharing the same general C6-C3-C6 structure. The most abundant have a flavan nucleus, consisting of two aromatic rings (A and B) linked by a pyran ring (C). Differences in the location of the B-ring to C-ring linkage make it possible to distinguish between flavonoids (2-phenylbenzopyrans), isoflavonoids (3-phenylbenzopyrans), and neoflavonoids (4-phenylbenzopyrans). The first one is by far the most abundant group and may be further divided into 3-hydroxyflavonoids (flavonols, flavanols, anthocyanidins, and dihydroflavonols), and flavonoids without substituent at C3 (flavanones and flavones). The flavonoids may be among the most important aromatic compounds. In this regard, they are the most ancient and widespread of the polyphenols, synthesized even in mosses and ferns, and have a wide range of potent physiological activities [21].

Citrus limonoids (CLs) are a crowded family of polycyclic secondary metabolites found mostly in seeds, fruits, and peel tissues of citrus fruits, including lemons, limes, oranges (both sour and sweet), pummels, grapefruits, bergamots, and mandarins [22]. CLs are highly oxygenated and modified triterpenes classified as tetranotriterpenoids, found as both free aglycones and their corresponding β -D-glycosides. Up to date, about 55 limonoid aglycones and 18 limonoid glycosides were identified in Citrus. Limonin is the most abundant aglycone in most citrus species followed by Nomilin, and limonin glycoside is the most representative limonoid glycoside [23]. CLs possess a wide array of biological activities [23], and have been acknowledged as high anti-insect activity compounds, both by their toxicity and antifeedant properties [22,24–28]. They probably protect leaflets from insects during bud development, justifying their abundance in young leaves and

fruit [29]. The first studies of CLs originate on the attempt to find bitter compounds in citrus fruit [30–32], but few reports on the occurrence of CLs in citrus tree leaves are found.

Metabolomic research strategies can be faced by two distinct approaches, untargeted and targeted, each with their own inherent advantages and disadvantages. Untargeted metabolomics is the comprehensive analysis of all measurable analytes in a sample. Although it offers the opportunity for novel target compounds discovery, the importance of rare molecules can be underestimated [33]. In contrast, the targeted approach is the precise and quantitative measurement of the concentrations of a defined group of chemically characterized metabolites. Hypothesis-driven targeted experiments can go together with the risk of losing the real natural products that are responsible for an observed biological property. For targeted analysis, sample preparation is optimized for obtaining a defined group of natural products.

Seeking the identification of possible representative phytomarkers of the transition from “on” to “off” bearing, the profiling of polyphenols and limonoids in leaves from bearing and non-bearing branches was studied using a targeted metabolomic approach.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

The study was carried out at the National Agricultural Research Institute (INIA) of Uruguay, in Salto Province (31°16' S; 57°53' W, altitude: 47 m), on adult trees from cv. ‘Ellendale’ (*Citrus reticulata* Blanco), cv. ‘Satsuma’ (*Citrus unshiu* Marc.), cv. ‘Willowleaf’ (*Citrus deliciosa* Ten.), and cv. ‘Page’ (*Citrus reticulata* Blanco × *Citrus paradisi* Macf.) grafted onto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. rootstock, under accurate horticulture cares (irrigation and pest management). From each variety, five bearing and five non-bearing trees were sampled. Adult leaves between 6 and 12 months old (5 leaves/branch; 10 branches sampled) were collected from bearing (B) and non-bearing (NB) branches. In bearing branches, leaves were collected immediately below the fruits (5–20 cm from the peduncle) during full fruit color stage, whereas in non-bearing branches, leaves were selected to have the same characteristics and position as in bearing branches. All trees were located in the same orchard and growing conditions. Therefore, the differences in the composition between the varieties could not be ascribed to changes in the tree environment, but due to the genetic background and physiological state of each tree. In all the branches for sampling, leaves were taken randomly all around the outer part of the tree canopy, exposed to full sunlight, and immediately stored at −20 °C until extraction.

2.1.1. Reagents and Equipment

All mobile phases were prepared using High Performance Liquid Chromatography-grade solvents, supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany), as well as analytical grade solvents used for extraction. Ultrapure water (Millipore Milli-Q® Ultrapure Water Solutions Type 1 by Merckmillipore, Molsheim, France) was used for the extraction and HPLC analysis. All standards were selected based on previous studies of flavonoid content in mandarins [34] and purchased from PhytoLab GmbH & Co.KG (Vestenbergsgreuth, Germany).

Polyphenols and limonoids were analyzed in an Agilent 1200 LC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to a 4000 QTRAP® LC-MS/MS System from AB SCIEX™ (Framingham, MA, USA). LC-Separation was performed on a Gold Aq-Hypersil (5 µm 150 × 4.6 mm) column from Thermo Scientific™ (USA). The injection volume was 5 µL. MS/MS detection was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode using an electrospray ionization (ESI) interface in both positive and negative ion mode.

2.1.2. Standard Solutions Preparation

Individual standard solutions of the target compounds were prepared and stored at −20 °C. Each standard was weighed to approximately 20 mg and dissolved in 10.00 mL of HPLC-grade methanol, to obtain a 2000 mg/L stock solution. A working solution mix of all targeted compounds (20 mg/L) was prepared by appropriate dilution of the stock solutions

in acetonitrile and used for the calibration curve construction. The selected concentrations for the curve were 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, and 1500 µg/L.

2.1.3. Sample Preparation

The extraction procedure for mandarin leaves was performed using an Ultrasound-assisted extraction (UAE) adapted from Safdar M.N. et al. [35]. A total of 50 g of freeze-dried leaves was pool together and ground using a cut mill for each variety. Then, 1 g of the powdered leaf samples was extracted with methanol 80% in a sample/solvent ratio 1:10 for 15 min in an Ultrasound bath (Transsonic 460; Elma, Wetzikon, Switzerland) at 35 kHz frequency. This procedure was repeated twice using fresh solvent. The extracts were combined and subjected to bulk filtration, solvent vacuum evaporation, and lyophilization, followed by redissolution in 80% methanol HPLC grade and filtration through 0.22 µm Polyvinylidene fluoride (PVDF) filters.

2.1.4. Chromatographic and MS/MS Conditions

The mobile phase was ultrapure water with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B), with the subsequent gradient: 0–23 min 5% to 50% B, 23–26 min 50% to 100% B, 26–31 min 100% B, 31–33 min 100% to 5% B, 33–38 min 5% B, at 600 µL/min. The ionization voltage was 5000 V, the nebulizer and the curtain gases were nitrogen at 50 psi each. The solvent evaporation in the source was assisted by a drying gas (heated nitrogen at 500 °C per 50 psi).

A multiple reaction monitoring (MRM) mode method was used for quantification. The optimal MRM transitions, collision energies (CE), and declustering potentials (DP) for each investigated compound were determined infusing the standard solutions directly into the instrument at a constant flow, using a syringe.

2.1.5. Data Treatment

The statistical treatment was performed using Metaboanalyst 5.0 [36] and R-Studio software package (version 1.1.463). Each of the studied compounds were considered as a single variable and were included in all the treatments. Data were normalized using pareto scaling. ANOVA, Wilcoxon/Mann-Whitney, and multiple comparisons test using a Bonferroni correction were performed. Principal component analysis (PCA) and the supervised test partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used for the classification of the varieties. The latter was validated to avoid overfitting using cross-validation and permutation test. Heatmap based on Student's t-test was also performed.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of MS/MS Parameters of the Target Compounds

The acquisition method was ESI positive for limonoids and polymethoxyflavones, and negative for flavanones, flavone, and flavonols (Table 1). The chromatogram of the optimized compounds is shown in Supplementary Materials.

3.2. Identification and Quantification of Phytochemicals in Leaves

A total of 11 polyphenols were identified and quantified among the four genotypes, together with two limonoids. The identified phytochemicals were the flavanones didymin, eriocitrin, naringenin, hesperidin, and narirutin; two polymethoxyflavones, tangeretin and nobiletin; a flavonol, quercitrin, and the flavone luteolin, as well as the hydroxycinnamic acids chlorogenic and caffeic acid and the limonoids limonin and nomilin (Figure 1). The chromatogram of the identified compounds is shown in Supplementary Materials.

Table 1. Results of optimization parameters for each evaluated compound.

Analyte	[M-H] [−]	[M-H] [−] → m/z	DW	DP	EP	CE	CXP	Rt (min)
Protocatechuic acid	153	108.8	150	−40	−10	−22	−15	9.4
		90.7	150	−40	−10	−42	−1	
Chlorogenic acid	353.7	190.8	150	−50	−10	−24	−31	11.1
		84.7	150	−50	−10	−68	−9	
Caffeic acid	179	133.3	150	−45	−10	−40.7	−21.1	12.7
		88.7	150	−45	−10	−48	−14.1	
Eriocitrin	595.2	286.6	150	−80	−10	−38	−9	14.5
		134.6	150	−80	−10	−90	−19	
Narirutin	579.2	150.5	150	−95	−10	−75	−20.3	15.9
		270.8	150	−95	−10	−39.9	−8.4	
Naringin	579.2	270.8	150	−105	−10	−54	−7	16.3
		150.7	150	−122.03	−10	−75.03	−21	
Quercitrin	447.1	300.5	150	−90	−10	−36	−11	16.3
		270.8	150	−90	−10	−66	−41	
Hesperidin	609.2	300.8	150	−85	−10	−46	−49	16.5
		285.8	150	−85	−10	−70	−41	
Neohesperidin	609.2	163.5	150	−85	−10	−88	−25	16.9
		300.7	150	−115	−10	−56	−9.32	
Didymin	593.2	285.7	150	−115	−10	−72.89	−42.3	19.8
		150.5	150	−115	−10	−100	−21	
Poncirin	593.3	284.8	150	−100	−10	−48	−45	20.0
		164	150	−100	−10	−92	−27	
Luteolin	285	284.8	150	−120	−10	−54	−9	20.5
		163.4	150	−120	−10	−92	−23	
Quercetin	301	150.6	150	−85	−10	−41.6	−20.9	20.7
		132.9	150	−85	−10	−54	−17	
Kaempferol	284.9	150.8	150	−75	−10	−36	−21	23.1
		178.7	150	−75	−10	−28	−27	
Naringenin	271	120.8	150	−75	−10	−44	−16.3	23.2
		92.9	150	−80	−10	−51.4	−14.1	
		116.88	150	−80	−10	−67	−18.8	
		150.7	150	−60	−10	−28.87	−23.14	
		118.7	150	−60	−10	−40.9	−16.7	
		106.6	150	−60	−10	−37.8	−16.9	
Analyte	[M-H] ⁺	[M-H] ⁺ → m/z	DW	DP	EP	CE	CXP	Rt (min)
Bergapten	217.2	202	150	64.1	10	30.9	10.9	25.8
		174.3	150	64.1	10	41.4	6.1	
Limonin	471.2	90.1	150	64.1	10	57.9	3.1	26.7
		425.3	150	71	10	28.6	22	
Nobiletin	403.1	161.1	150	71	10	37.7	12.7	26.7
		373.1	150	61	10	41	14	
Nomilin	515.2	388.1	150	61	10	31	16	27.9
		469.3	150	44.9	10	20.18	11.4	
Tangeretin	372.97	161.1	150	44.9	10	35.1	11.2	28.4
		343	150	71	10	39	26	
		297.1	150	71	10	47	10	
		211.1	150	71	10	60.87	7.3	

M, molecular weight; m/z, selected ions monitored; DW, dwell time in msec; DP, declustering potential; EP, entrance potential; CE, collision energy; CXP, collision cell exit potential; and Rt, retention time.

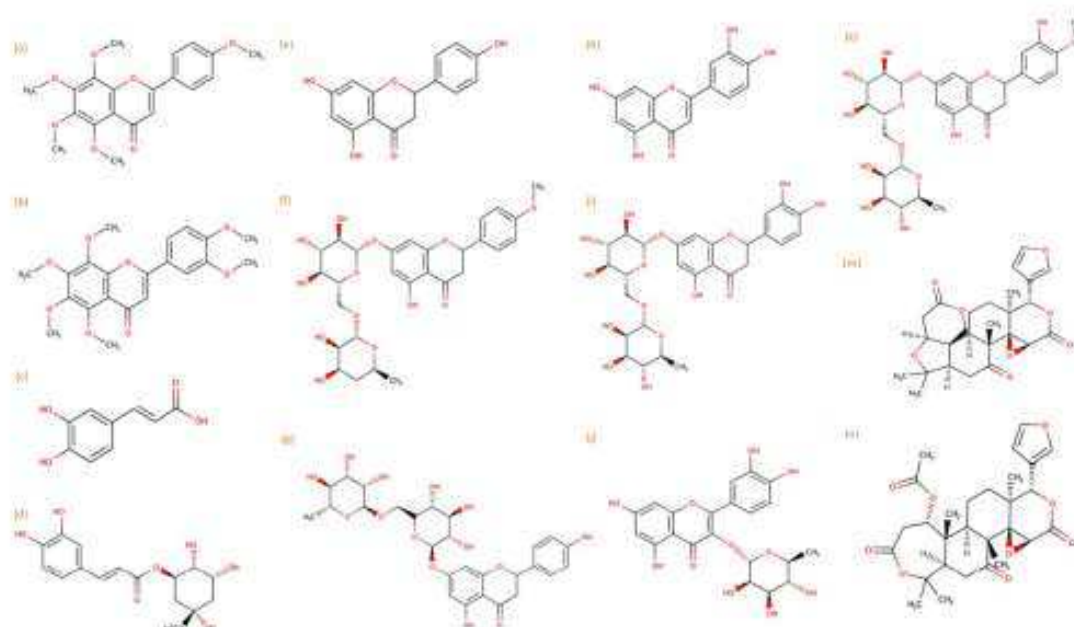


Figure 1. Structure and classification of polyphenols quantified in commercial varieties of mandarin leaves. Polymethoxyflavones, tangeretin (a) and nobiletin (b); hydroxycinnamic acids, caffeic acid (c) and chlorogenic acid (d); flavanones, naringenin (e), didymnin (f), narirutin (g), eriocitrin (i), and hesperidin (k); flavone, luteolin (h); flavonol, quercitrin (j); and limonoids, limonin (m) and nomilin (n).

3.3. Chemotaxonomic Characterization of Bearing Branches

Leaves from bearing branches of the four studied genotypes contained high concentrations of hesperidin (2824.43 $\mu\text{g/g}$ *), followed by nobiletin (583.71 $\mu\text{g/g}$ *), tangeretin (326.60 $\mu\text{g/g}$ *), narirutin (63.22 $\mu\text{g/g}$ *), and eriocitrin (37.23 $\mu\text{g/g}$ *). Meanwhile, the most abundant limonoid was limonin (0.69 $\mu\text{g/g}$ *). The phytochemical concentration of each variety is displayed in Table 2. * Average of the four genotypes.

Table 2. Identified phytochemicals in bearing leaf of ‘Ellendale’ (B-END), ‘Willowleaf’ (B-WL), ‘Page’ (B-PG), and ‘Satsuma’ (B-SAT) and their concentration expressed in $\mu\text{g/g}$ of dried leaf.

Compound	B-SAT	B-END	B-WL	B-PG
	(μg/g) *			
Chlorogenic Acid	3.88 ^b ± 0.40	3.53 ^b ± 0.37	6.70 ^a ± 0.78	5.04 ^b ± 1.39
Caffeic Acid	3.87 ^b ± 0.21	4.34 ^{ab} ± 0.23	5.38 ^a ± 1.05	5.18 ^a ± 0.51
Didymnin	10.57 ^b ± 1.11	20.19 ^a ± 3.27	3.30 ^c ± 0.43	21.17 ^a ± 3.76
Hesperidin	3008.58 ^a ± 151.89	2512.39 ^b ± 182.61	2624.31 ^b ± 114.09	3152.43 ^a ± 298.13
Eriocitrin	47.93 ^a ± 6.42	13.90 ^c ± 1.19	29.85 ^b ± 2.44	57.24 ^a ± 8.02
Luteolin	1.45 ^a ± 0.05	1.21 ^a ± 0.08	1.81 ^a ± 0.28	2.31 ^a ± 1.26
Naringenin	0.38 ^b ± 0.02	0.57 ^a ± 0.01	0.34 ^b ± 0.01	0.63 ^a ± 0.15
Narirutin	87.03 ^a ± 12.68	50.08 ^b ± 7.58	17.58 ^c ± 7.58	98.20 ^a ± 14.35
Quercitrin	2.29 ^b ± 0.07	2.43 ^b ± 0.13	2.98 ^{ab} ± 0.55	3.69 ^a ± 0.61
Nobiletin	258.17 ^c ± 16.48	1121.36 ^a ± 34.94	747.15 ^b ± 55.16	208.17 ^c ± 13.63
Tangeretin	64.96 ^c ± 6.15	731.28 ^a ± 30.15	475.84 ^b ± 56.24	34.34 ^c ± 5.01
Limonin	0.45 ^c ± 0.04	0.88 ^a ± 0.08	0.72 ^b ± 0.12	0.76 ^{ab} ± 0.08
Nomilin	0.42 ^b ± 0.03	0.62 ^a ± 0.08	0.57 ^{ab} ± 0.13	0.52 ^{ab} ± 0.04

* In each row, means (5 replicates) ± SD followed by the same letter do not differ significantly using significance t-test with Bonferroni correction, $p \leq 0.05$.

A PCA was performed to check the grouping of the samples and detect similarities and differences between the four varieties. Figure 2a shows the 2D plot of the PCA, where PC1 and PC2 explain 97.7% of the total data variance. It shows a good classification of all genotypes, with 'Page' and 'Satsuma' being the ones that have the most similarities between each other.

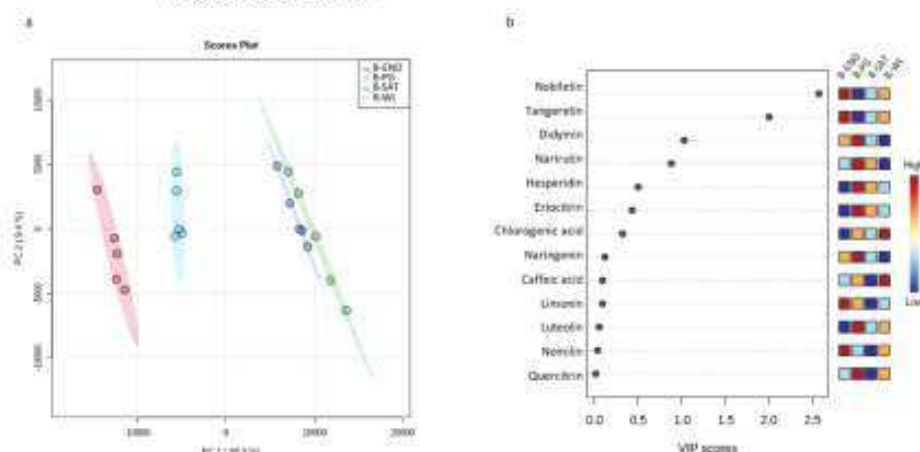


Figure 2. (a) PCA plot of the four varieties of mandarin leaf at a bearing stage 'Ellendale' (B-END), 'Willowleaf' (B-WL), 'Page' (B-PG), and 'Satsuma' (B-SAT); (b) VIP scores of the PLS-DA performed over the four varieties of bearing mandarin leaves.

After performing a PLS-DA, the top three scores of the Variables Importance in the Projection (VIP) are nobiletin for the differentiation of END-PG, tangeretin for END-PG, and didymnin for PG-WL (Figure 2b).

3.4. Chemotaxonomic Characterization of Non-Bearing Branches

The same polyphenols and limonoids found in bearing branches were found in the non-bearing branches' leaves but with different concentrations (Table 3). Narirutin was the principal flavonoid with the highest concentration for non-bearing 'Page' and 'Willowleaf' (42198.36 $\mu\text{g/g}$ in NB-PG and 10049.66 $\mu\text{g/g}$ in NB-WL, respectively). Hesperidin is the most abundant flavonoid for the non-bearing 'Satsuma' and 'Ellendale' (2591.54 $\mu\text{g/g}$ in NB-SAT and 2433.21 $\mu\text{g/g}$ in NB-END, respectively), as shown also in bearing branches.

Table 3. Identified phytochemicals in non-bearing leaves of 'Ellendale' (NB-END), 'Willowleaf' (NB-WL), 'Page' (NB-PG), and 'Satsuma' (NB-SAT) and their concentration expressed in $\mu\text{g/g}$ of dried leaf.

Compound	NB-SAT	NB-END	NB-WL	NB-PG
	($\mu\text{g/g}$) *			
Chlorogenic Acid	126.02 ^a $\pm$ 6.40	11.31 ^b $\pm$ 0.62	6.75 ^b $\pm$ 1.41	6.35 ^b $\pm$ 1.50
Caffeic Acid	2.32 ^a $\pm$ 0.12	2.00 ^b $\pm$ 0.09	0.12 ^c $\pm$ 0.04	0.04 ^c $\pm$ 0.02
Didymnin	6.44 ^{bc} $\pm$ 0.47	17.40 ^a $\pm$ 2.97	5.03 ^c $\pm$ 2.56	14.07 ^{ab} $\pm$ 8.77
Hesperidin	2591.54 ^b $\pm$ 55.63	2433.21 ^b $\pm$ 179.79	4224.72 ^a $\pm$ 450.98	4270.21 ^a $\pm$ 400.09
Eriocitrin	132.39 ^a $\pm$ 15.01	17.09 ^d $\pm$ 1.82	39.62 ^c $\pm$ 5.34	69.98 ^b $\pm$ 17.91
Luteolin	3.16 ^c $\pm$ 0.60	2.13 ^c $\pm$ 0.15	2659.07 ^a $\pm$ 267.40	2023.38 ^b $\pm$ 121.10
Naringenin	0.32 ^b $\pm$ 0.02	0.68 ^b $\pm$ 0.12	509.61 ^a $\pm$ 100.14	574.03 ^a $\pm$ 101.15
Narirutin	97.45 ^c $\pm$ 8.08	62.85 ^c $\pm$ 5.04	10049.66 ^b $\pm$ 1005.64	42198.36 ^a $\pm$ 3700.22
Quercetin	2.80 ^b $\pm$ 0.21	2.44 ^b $\pm$ 0.16	350.39 ^a $\pm$ 122.31	362.45 ^a $\pm$ 50.83
Nobiletin	290.48 ^a $\pm$ 24.07	1257.23 ^a $\pm$ 87.18	1028.88 ^b $\pm$ 151.80	228.71 ^c $\pm$ 12.86
Tangeretin	99.89 ^c $\pm$ 10.05	517.97 ^a $\pm$ 78.41	347.23 ^b $\pm$ 82.59	33.27 ^c $\pm$ 5.98
Limonin	3.40 ^a $\pm$ 0.44	0.77 ^c $\pm$ 0.05	1.30 ^b $\pm$ 0.09	1.28 ^b $\pm$ 0.03
Nominin	0.6 ^{ab} $\pm$ 0.01	0.54 ^b $\pm$ 0.05	0.19 ^a $\pm$ 0.14	0.66 ^{ab} $\pm$ 0.03

* In each row, means (5 replicates) $\pm$ SD followed by the same letter do not differ significantly using significance t-test with Bonferroni correction, $p \leq 0.05$.

Non-bearing branches of 'Page' were characterized by the highest luteolin, narirutin, and quercitrin levels, a situation which was also observed in 'Willowleaf'. In 'Satsuma', eriocitrin and chlorogenic acid were characteristic of this genotype, whereas in 'Ellendale', the polymethoxyflavones tangeretin and nobiletin were the metabolites that characterize the leaves of non-bearing branches.

In the PCA plot, it can be seen that the four genotypes are well classified from each other. PC1 and PC2 accounted for the 97.3% of the observed variance (Figure 3a). 'Willowleaf' and 'Page' showed more dispersion compared to the other two varieties due to the variability in the levels of some flavonoids.

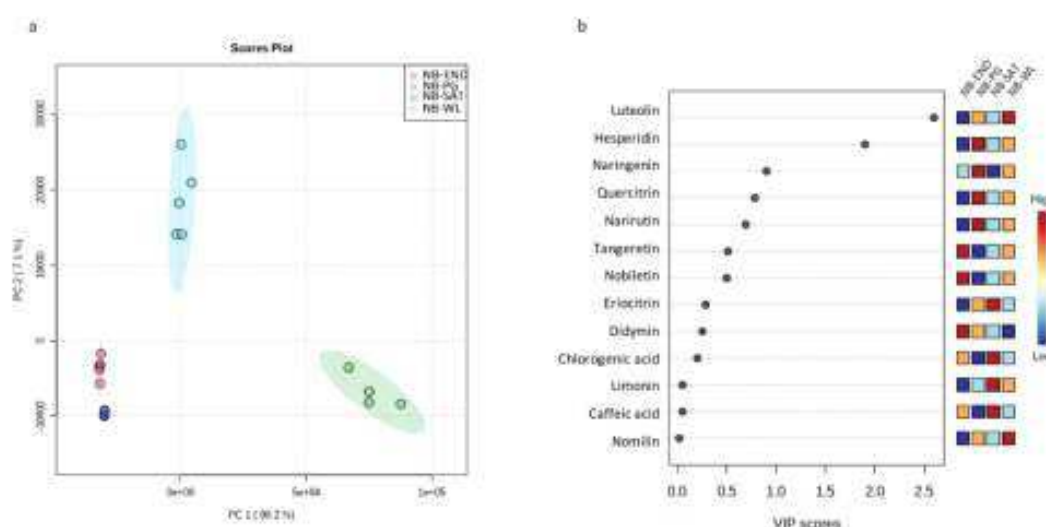


Figure 3. (a) PCA plot of the four varieties of mandarin leaf in their non-bearing stage: 'Ellendale' (NB-END), 'Willowleaf' (NB-WL), 'Page' (NB-PG), and 'Satsuma' (NB-SAT); (b) PLS-DA VIP scores.

The concentration of both polymethoxyflavones were different, being highest to lowest NB-END, NB-WL, NB-SAT, and NB-PG. The flavanone hesperidin was highest for the dual WL-PG; the same behavior was observed for flavanones naringin and naringenin, flavonols, and flavones. Didymnin had high concentration values in NB-END and NB-PG, but not in NB-WL and NB-SAT. Hydroxycinnamic acids are present in the highest concentration in NB-SAT variety (Figure 3a, Tables 2 and 3).

The most important compounds according to VIP scores include luteolin, hesperidin, and naringenin. (Figure 3b). 'Willowleaf' has the highest concentration of luteolin, and 'Page' of hesperidin and naringenin.

3.5. Metabolites' Profile Comparison between Leaves from Bearing and Non-Bearing Branches

The chemotaxonomic characterization of the four genotypes in both bearing stages ("on" and "off") allowed the identification of characteristic compounds that could differentiate between bearing stages. In order to determine if there is a significant difference between the means of these two groups, a Wilcoxon/Mann-Whitney test for each compound between bearing and non-bearing leaves was performed for each genotype. Figure 4 shows that nobiletin is not useful in differentiating between bearing and non-bearing stages, for any genotype. Hesperidin, luteolin, naringenin, narirutin, and quercitrin are the compounds that could differentiate between stages; however, it depends on the genotype considered. For example, narirutin is useful for differentiating all the genotypes except for 'Satsuma'. Using this test, a set of compounds could not be selected to classify both stages for all the varieties, due to their high variability. Instead, a pairwise study of the "on"–"off" physiological situations of each cultivar showed significant differences between them.

These facts could be ascribed to the different genetic origins of each genotype. Interestingly, there were significant differences in eriocitrin levels between both physiological stages for three of the genotypes excepting 'Satsuma'.



Figure 4. Visual representation of Wilcoxon test for determination of significant differences between bearing and non-bearing stages, for each compound and each variety. References: 'Ellendale' (END), 'Page' (PG), 'Satsuma' (SAT), 'Willowleaf' (WL), bearing stage (B), non-bearing stage (NB), yellow means does not differ significantly using Wilcoxon test, $p > 0.05$, and red means differs significantly using Wilcoxon test, $p < 0.05$.

In order to identify the compounds responsible for the differentiation of stages in all the genotypes, other statistical approaches were performed and, thus, a Heatmap based on a Student's t-test was developed and shown in Figure 5a. Narirutin, hesperidin, luteolin, naringenin, and quercitrin could be used to differentiate both stages in 'Page' and 'Willowleaf', as the non-bearing samples have the highest concentration of these compounds. Interestingly, caffeic acid is a common marker for the bearing branches of the other varieties. In Figure 5b, the VIP scores of the PLS-DA performed are shown. This analysis allowed the identification of the compounds responsible for the classification of the "on" or "off" bearing stages. Narirutin and luteolin are the variables with the highest VIP scores, and could be identified as candidate markers of alternate bearing.

'Willowleaf' and 'Page' showed clear differences in the concentration level of some metabolites between "on" and "off" phases, that could easily distinguish both bearing stages. Quercitrin presented two orders of magnitude higher concentration in "off" than in "on" phase. The ratio hesperidin/narirutin could be indicative of the bearing stage of 'Willowleaf' and 'Page', when it is <1 the tree is in the non-bearing phase, whereas when the quotient is >10 , the tree is at the bearing stage.

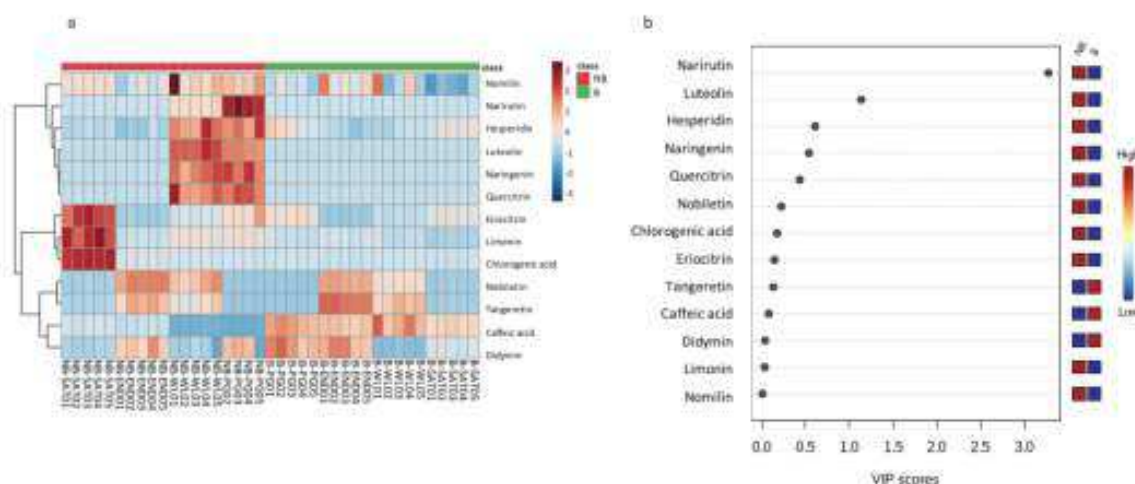


Figure 5. (a) Heatmap of bearing and non-bearing leaf samples of the four varieties of mandarin: 'Ellendale' (END), 'Willowleaf' (WL), 'Page' (PG), and 'Satsuma' (SAT); (b) VIP scores of the PLS-DA performed to identify the metabolites that differentiate between both bearing stages.

Some differences in the metabolites' profile detected between "on" and "off" mandarin branches are due to the position of the biosynthetic pathways of the prevailing metabolites found in them. For instance, nobiletin is the biosynthetic precursor of Limonin [37,38]. Limonoids have not been studied as markers of alternate bearing in mandarin trees. In the case of the limonoid biosynthetic pathway the sequence Nobiletin–Limonin reaches higher concentration levels during the non-bearing phase, indicating the possibility that the tree is preparing to protect itself against pest and insects before the flowering stage. Naringenin, which is the first polycyclic flavonoid skeleton, is found in trace amounts in leaves arising from non-bearing branches of cvs. 'Satsuma' and 'Ellendale', but in significant levels in 'Page' and 'Willowleaf' cultivars. In bearing branches naringenin was found in very low quantities in all four varieties. In the former case, the biosynthetic pathway to flavanones is favored by 7-O-glycosylation with hesperoside, a disaccharide [1→6]glucose-rhamnose producing naringin, which is the prevailing flavanone in non-bearing leaves of 'Page' and 'Willowleaf' [39,40].

From naringenin, hesperidin and naringin are formed. Naringin seems to be a marker of non-bearing trees, as it showed significant differences between bearing and non-bearing samples, particularly in 'Page' and 'Willowleaf'. The biosynthesis of both hesperosides (Figure 6) goes through the 7-O-glycosylation of naringenin, which is then specifically glycosylated in the position 6-O of the sugar moiety by a rhamnosyl residue. In the non-bearing phase, when the tree is recovering after the energy sink caused by fruiting, the glycosylation reaction yielded higher levels of the naringenin glycosides. When the fruit is developing, the metabolism is fully expressed and active, and all the naringenin is driven through the oxidation-methylation pathway to hesperidin, the most ubiquitous citrus flavonoid.

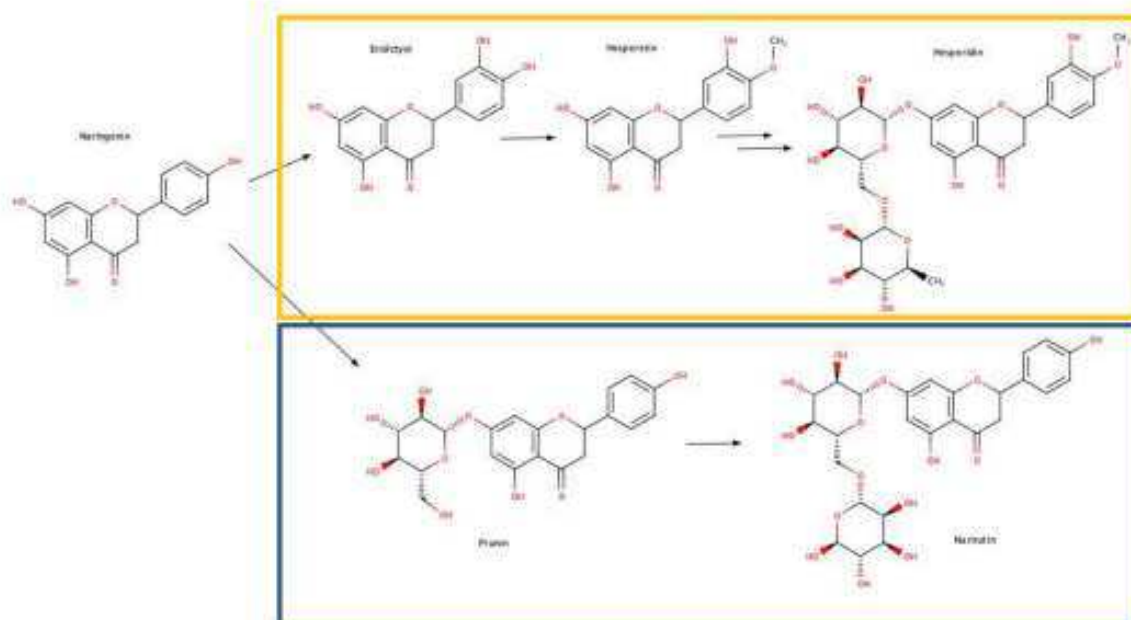


Figure 6. Biosynthetic pathway from naringenin to hesperidin through eriodictyol and hesperetin. The aglycone is then glycosidated with glucose and rhamnose. In a similar sequence, intact naringenin is glycosidated two times; first, to form prunin, which is later glycosidated by the 6-O-rhamnosyl transferase to form narirutin.

Interestingly Mou et al. [41], in an attempt to decipher the flavonoid biosynthetic pathway in *C. reticulata*, did not describe the pathway leading to narirutin, but they described the naringenin–naringin route. The mandarin species studied produce the tasteless narirutin instead of the bitter naringin. The difference between both compounds is the union between the rhamnose and the glucose moiety, in narirutin the link is (1→6) (rutinoside), whereas in naringin the link is (1→2) (neohesperoside).

Another route downstream of the flavonoid biosynthesis in mandarin trees leads to the polymethoxyflavones (PMF), suggested as markers of bearing stages [42,43]. Luteolin, an acknowledged precursor of PMF is also distinctive polyphenol of the non-bearing phase.

The general trend discussed above, allowed the assessment of qualitative and quantitative differences between the four genotypes, depending on the physiological status of the branch. Flavonoid biosynthesis in citrus is regulated by a combination of environmental, genetic, and hormonal factors. As the former is the same for all the individuals in this study, the two latter variables are the ones responsible for the observed differences. It has been accepted that in “off” branches, buds are directed to morph to leaves instead of flowers, enhancing primary and secondary metabolism, which confirms the general trend identified by Shalom et al. [2], that flavonoid biosynthesis is enhanced during the “off” phase in ‘Murcott’ mandarins. They found that the expression of all the enzymes of the flavonoid pathway were significantly higher in “off” branches, as well as the expression of mRNA from FT, AP1, and LFY related genes, which was correlated with the up-regulation effect of these genes in the “off” phase. The obtained results of our study in four different mandarin cultivars are in accordance with the expression of the genes described by Shalom [2]. Moreover, high levels of abscisic acid, which is high in buds, leaves, and fruits during autumn in ‘Murcott’ (“on” phase) and other alternating citrus varieties, have been shown to up regulate the flavonoid biosynthesis in another non-climateric fruits, such as blueberries and tomatoes [44,45].

Furthermore, Narirutin is identified as a possible marker of the “on/off” phase as it presents statistically different levels in all varieties during both stages. The only exception is ‘Satsuma’, a variety that does not present the typical alternate bearing behavior as exhibited by the rest of the studied varieties.

4. Conclusions

A specific analytical protocol using LC-MS-(QqQ)-MS, applying different acquisition modes, permitted the unambiguous determination of 13 secondary metabolites in leaves of mandarin trees. A chemosystematic study of the profile of these metabolites in leaves from non-bearing (“off”) and bearing (“on”) mandarin branches belonging to four different genotypes was performed. The different genotypes could be chemotaxonically distinguished from each other at both developmental stages using multivariate data analysis and the representative metabolites were identified.

This study allowed the differentiation between leaves from non-bearing and bearing branches. Leaves from both physiological stages accumulated limonin, but nomilin showed an increased leaf concentration in non-bearing branches compared to bearing ones. “On” and “off” ‘Willowleaf’ and ‘Page’ mandarin trees can be distinguished due to the high narirutin content in leaves of non-bearing branches, and an easy relationship has been proposed to define each phase. One of the most important observations found is the increase of Narirutin content in non-bearing leaves for genotypes that show a typical alternate bearing behavior which could lead to the use of this compound as a biomarker of the stage of the branch. The presence of flavonoids as markers of the different physiological stages of mandarin trees also hints to possible new ways of crop management. Future studies should be performed following the developed methodology to control the levels of these compounds, specially Narirutin, during the ontogeny of mandarin branches along the plant growth.

The results reported in the present research can contribute towards a useful technology for growers and scientists to determine the physiological stage of a tree depicting the transition from “off” to “on” phase in Citrus.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agronomy12010121/s1>, Table S1: Target compounds selected for the analysis, Figure S1: Chromatogram of the mix of standards at 800 g/L injected into the LC-MS/MS in negative (Top) and positive 46 (Bottom) mode, and Figure S2: Chromatograms of ‘Willowleaf’ genotype at non-bearing (“off”) stage (A) and at a bearing (“on”) stage (B) in negative acquisition mode.

Author Contributions: Conceptualization, H.H. and I.M.; methodology, C.R.C. and V.V.; validation, C.R.C. and I.M.; formal analysis, C.R.C., I.M. and V.V.; investigation, C.R.C., I.M. and H.H.; writing—original draft preparation, C.R.C. and I.M.; writing—review and editing, H.H. and E.R.; supervision, H.H. and M.V.C.; project administration, H.H. and E.R.; funding acquisition, E.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by INIA through the L4 funding program, CSIC grant number 1822, the Agencia Nacional de Investigación e Innovación grant number POS_NAC_2017_1_140316, and the Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank Natalia Besil for the assistance during the optimization of the MS analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (accessed on 5 October 2021).
2. Shalom, L.; Samuels, S.; Zur, N.; Shlizerman, L.; Zemach, H.; Weissberg, M.; Ophir, R.; Blumwald, E.; Sadka, A. Alternate Bearing in Citrus: Changes in the Expression of Flowering Control Genes and in Global Gene Expression in ON- versus OFF-Crop Trees. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46930. [CrossRef]
3. Agust, M.; Almela, V.; Pons, J. Effects of girdling on alternate bearing in citrus. *J. Hortic. Sci.* **1992**, *67*, 203–210. [CrossRef]
4. Talon, M.; Tadeo, F.R.; Ben-Cheikh, W.; Gomez-Cadenas, A.; Mehouchi, J.; Pérez-Botella, J.; Primo-Millo, E. Hormonal regulation of fruit set and abscission in citrus: Classical concepts and new Evidence. *Acta Hort.* **1998**, *463*, 209–217. [CrossRef]
5. Bower, J.P.; Cutting, J.G.M.; Lovatt, C.J.; Blanke, M.M. Interaction of plant growth regulator and carbohydrate in flowering and fruit set. *Acta Hort.* **1990**, *425*–434. [CrossRef]
6. Davenport, T.L. Citrus Flowering. In *Horticultural Reviews*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 349–408.
7. Peña, L.; Martín-Trillo, M.; Juárez, J.; Pina, J.A.; Navarro, L.; Martínez-Zapater, J.M. Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 263–267. [CrossRef]
8. Pillitteri, L.J.; Lovatt, C.J.; Walling, L.L. Isolation and characterization of LEAFY and APETALA1 homologues from Citrus sinensis L. Osbeck “Washington”. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2004**, *129*, 846–856. [CrossRef]
9. Araki, T. Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, *4*, 63–68. [CrossRef]
10. Moss, G.I. Effect of fruit on flowering in relation to biennial bearing in sweet orange (*Citrus sinensis*). *J. Hortic. Sci.* **1971**, *46*, 177–184. [CrossRef]
11. Wada, K.C.; Takeno, K. Stress-induced flowering. *Plant Signal. Behav.* **2010**, *5*, 944–947. [CrossRef] [PubMed]
12. Takeno, K. Stress-Induced Flowering. *Abiotic Stress Responses Plants* **2012**, *331*–345. [CrossRef]
13. Kazan, K.; Lyons, R. The link between flowering time and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 47–60. [CrossRef]
14. Zagorskina, N.V.; Kazantseva, V.V.; Fesenko, A.N.; Shirokova, A.V. Accumulation of Phenolic Compounds at the Initial Steps of Ontogenesis of Fagopyrum esculentum Plants That Differ in Their Ploidy Levels. *Biol. Bull.* **2018**, *45*, 171–178. [CrossRef]
15. Coley, P.D.; Bryant, J.P.; Chapin, F.S. Resource Availability and Plant Antiherbivore Defense. *Science* **1985**, *230*, 895–899. [CrossRef]
16. Waterman, P.; Mole, S. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK, 1994.
17. Grace, S.G.; Logan, B.A. Energy Dissipation and Radical Scavenging by the Plant Phenylpropanoid Pathway. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2000**, *355*, 1499–1510. [CrossRef]
18. Rivas, E.; Fornes, E.; Agust, M. Girdling induces oxidative damage and triggers enzymatic and non-enzymatic antioxidative defences in Citrus leaves. *Environ. Exp. Bot.* **2008**, *64*, 256–263. [CrossRef]
19. Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*, 1–15. [CrossRef]
20. Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 223S–229S. [CrossRef] [PubMed]
21. McClure, J.W. Physiology and Functions of Flavonoids. In *The Flavonoids*; Harbone, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1975; pp. 970–1055.
22. Gualdani, R.; Cavalluzzi, M.; Lentini, G.; Habtemariam, S. The Chemistry and Pharmacology of Citrus Limonoids. *Molecules* **2016**, *21*, 1530. [CrossRef]
23. Shi, Y.S.; Zhang, Y.; Li, H.T.; Wu, C.H.; El-Seedi, H.R.; Ye, W.K.; Wang, Z.W.; Li, C.B.; Zhang, X.F.; Kai, G.Y. Limonoids from Citrus: Chemistry, anti-tumor potential, and other bioactivities. *J. Funct. Foods* **2020**, *75*, 104213. [CrossRef]
24. Roy, A.; Saraf, S. Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 191–201. [CrossRef]
25. Hafeez, F.; Akram, W.; Shaalan, E.A.-S. Mosquito larvicidal activity of citrus limonoids against Aedes albopictus. *Parasitol. Res.* **2011**, *109*, 221–229. [CrossRef] [PubMed]
26. Warikoo, R.; Ray, A.; Sandhu, J.K.; Samal, R.; Wahab, N.; Kumar, S. Larvicidal and irritant activities of hexane leaf extracts of Citrus sinensis against dengue vector Aedes aegypti L. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2*, 152–155. [CrossRef]
27. Khan, M.K.; Dangles, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* **2014**, *33*, 85–104. [CrossRef]
28. Yu, X.; Shi, D.; Zhi, X.; Li, Q.; Yao, X.; Xu, H. Synthesis and quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of C7-oxime ester derivatives of obacunone as insecticidal agents. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 31700–31707. [CrossRef]
29. Hasegawa, S.; Berhow, M.A.; Manners, G.D. Citrus limonoid research: An overview. *ACS Symp. Ser.* **2000**, *758*, 1–8. [CrossRef]
30. Celano, R.; Campone, L.; Pagano, I.; Carabetta, S.; Di Sanzo, R.; Rastrelli, L.; Piccinelli, A.L.; Russo, M. Characterisation of nutraceutical compounds from different parts of particular species of Citrus sinensis ‘Ovale Calabrese’ by UHPLC-UV-ESI-HRMS. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33*, 244–251. [CrossRef]
31. Russo, M.; Arigò, A.; Calabrò, M.L.; Fametti, S.; Mondello, L.; Dugo, P. Bergamot (Citrus bergamia Risso) as a source of nutraceuticals: Limonoids and flavonoids. *J. Funct. Foods* **2016**, *20*, 10–19. [CrossRef]
32. Wang, F.; Yu, X.; Liu, X.; Shen, W.; Zhu, S.; Zhao, X. Temporal and spatial variations on accumulation of nomilin and limonin in the pummelos. *Plant Physiol. Biochem.* **2016**, *106*, 23–29. [CrossRef] [PubMed]
33. Roberts, L.D.; Souza, A.L.; Gerszten, R.E.; Clish, C.B. Targeted metabolomics. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2012**, *1*, 30.2.1–30.2.24. [CrossRef]

34. Xi, W.; Zhang, Y.; Sun, Y.; Shen, Y.; Ye, X.; Zhou, Z. Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Balnco.) pulps and their antioxidant properties. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *52*, 466–474. [\[CrossRef\]](#)
35. Safdar, M.N.; Kausar, T.; Jabbar, S.; Mumtaz, A.; Ahad, K.; Saddozai, A.A. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 488–500. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Pang, Z.; Chong, J.; Zhou, G.; de Lima Morais, D.A.; Chang, L.; Barrette, M.; Gauthier, C.; Jacques, P.-É.; Li, S.; Xia, J. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 388–396. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Ou, P.; Hasegawa, S.; Herman, Z.; Fong, C.H. Limonoid biosynthesis in the stem of *Citrus limon*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 115–118. [\[CrossRef\]](#)
38. Gerolino, E.; Chierrito, T.; Santana-Filho, A.; Rorigues, S.; Gonçalves, R.; Oliveira, A. Evaluation of limonoid production in suspension cell culture of *Citrus sinensis*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, *56*. [\[CrossRef\]](#)
39. Berim, A.; Gang, D.R. Methoxylated flavones: Occurrence, importance, biosynthesis. *Phytochem. Rev.* **2016**, *15*, 363–390. [\[CrossRef\]](#)
40. Abad-García, B.; Garmón-Lobato, S.; Berrueta, L.A.; Gallo, B.; Vicente, F. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta* **2012**, *99*, 213–224. [\[CrossRef\]](#)
41. Mou, J.; Zhang, Z.; Qiu, H.; Lu, Y.; Zhu, X.; Fan, Z.; Zhang, Q.; Ye, J.; Fernie, A.R.; Cheng, Y.; et al. Multiomics-based dissection of citrus flavonoid metabolism using a *Citrus reticulata* × *Poncirus trifoliata* population. *Hortic. Res.* **2021**, *8*, 56. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Zhao, C.; Wang, F.; Lian, Y.; Xiao, H.; Zheng, J. Biosynthesis of citrus flavonoids and their health effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 566–583. [\[CrossRef\]](#)
43. Frydman, A.; Weissman, O.; Bar-Peled, M.; Huhman, D.V.; Sumner, L.W.; Marín, F.R.; Lewinsohn, E.; Fluhr, R.; Gressel, J.; Eyal, Y. Citrus fruit bitter flavors: Isolation and functional characterization of the gene Cml2RhaT encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *Plant J.* **2004**, *40*, 88–100. [\[CrossRef\]](#)
44. Chung, S.W.; Yu, D.J.; Oh, H.D.; Ahn, J.H.; Huh, J.H.; Lee, H.J. Transcriptional regulation of abscisic acid biosynthesis and signal transduction, and anthocyanin biosynthesis in 'Bluecrop' highbush blueberry fruit during ripening. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0220015. [\[CrossRef\]](#)
45. Moreselle, S.P.; Goldschmidt, E.E. Alternate bearing in citrus and ways of control. In Proceedings of the International Society of Citriculture, Tokyo, Japan, 9–12 November 1981; pp. 239–242.