

Informe final publicable de proyecto

Estudio metabolómico de los cambios sufridos durante la polinización de mandarina ?Afourer? enfocados a un aumento de la calidad de la fruta.

Código de proyecto ANII: FMV_3_2020_1_162453

Fecha de cierre de proyecto: 01/05/2023

MIGUES BORGHINI, Ignacio (Responsable Técnico - Científico)

CAVALLO PERCOVICH, Lucía (Investigador)

HEINZEN GONZALEZ, Horacio (Investigador)

MOYNA BORTHAGARAY, Guillermo (Investigador)

OTERO, Alvaro (Investigador)

RIVAS GRELA, Carlos Fernando (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIÓN LITORAL NORTE \\\

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA. INIA SALTO GRANDE \\\

FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

En este estudio, nos centramos en mejorar la competitividad de la citricultura uruguaya en los mercados de exportación, donde la calidad de la fruta fresca es clave. La evolución de los conceptos de calidad, enfocados en la conveniencia y la salud, destaca la importancia de frutos fáciles de pelar, sin semillas y con procesos de producción que garanticen la inocuidad. Ante la intensificación de los sistemas productivos, surge la necesidad de tecnologías sustentables para mantener altos estándares de producción y eficiencia en el uso de recursos.

Este proyecto abordó estos desafíos evaluando el impacto de diversas técnicas agronómicas en la presencia de semillas y el cuajado de frutos cítricos. Se exploraron técnicas como el uso de polinizadores confinados por mallas, en comparación con métodos convencionales como la exclusión de abejas y la aplicación de ácido giberélico. Se aplicó una metodología de estudio metabolómico, utilizando espectrometría de masas y resonancia nuclear magnética, para analizar los cambios endógenos durante la polinización y desarrollo del ovario.

Los resultados obtenidos revelaron perfiles metabólicos en diversas situaciones, permitiendo una comprensión más profunda de las rutas metabólicas en el proceso partenocárpico de la mandarina Afourer, conocida por su alto valor comercial. Se lograron los objetivos propuestos, identificando marcadores específicos del proceso de floración/polinización y correlacionándolos con parámetros de calidad de la fruta.

Este enfoque innovador proporciona información valiosa para la citricultura de exportación, destacando prácticas agronómicas que reducen la presencia de semillas y mejoran el cuajado de frutos. Sin embargo, para implementar estas técnicas a gran escala, se reconoce la necesidad de fuentes de financiamiento debido a los costos asociados, especialmente en el mallado de cultivos. A pesar de este desafío, los conocimientos generados brindan una base sólida para futuras investigaciones y el potencial desarrollo de prácticas agrícolas más eficientes y sostenibles en la citricultura.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Orgánica / Productos naturales

Palabras clave: Metabolómica / Mandarinas / Giberelinas /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

La citricultura, destacada como el principal rubro hortifrutícola de Uruguay, se caracteriza por su perfil exportador, lo que la expone a la competencia en los mercados internacionales [1]. La calidad de la fruta, especialmente en términos de características precisas, se ha convertido en un factor crítico en la jerarquía del mercado global de cítricos. En particular, la diferenciación en la producción de mandarinas, enfocada en criterios de calidad, abre la puerta a la posibilidad de acceder a mercados exclusivos y valiosos.

Uruguay ha logrado exportar entre el 30% y el 50% de su producción nacional de cítricos, lo que destaca la importancia de este sector en la economía del país [1]. Con el objetivo de capitalizar el valor agregado y la creciente demanda de mandarinas, se implementó un plan estratégico a partir de 2010. Este plan destacó la oportunidad de aumentar la producción de mandarinas para que cumplan con los requisitos de conveniencia por parte de los consumidores, siendo las características de fácil pelado y ausencia de semillas algunas de

los factores más importantes para su selección. El resultado de este plan fue un incremento del 25% en el volumen de producción, alcanzando el máximo en las últimas dos décadas [1].

Sin embargo, a pesar de estos avances productivos, el sector enfrenta desafíos significativos, especialmente en relación con la industria apícola. La polinización cruzada, causada por las abejas, ha llevado a un aumento en la presencia de semillas en las mandarinas, lo que no solo desmerece su valor comercial sino que también impide el acceso a mercados de mayor valor como son los mercados internacionales [1].

El estudio de los compuestos responsables de las características que definen la calidad de la fruta es un desafío científico crucial. Aunque los caracteres genéticos involucrados en la producción de cítricos pueden identificarse, el mecanismo de expresión de estos genes aún no ha sido completamente elucidado. En este contexto, el metaboloma se presenta como una herramienta valiosa para aproximarse a los caracteres organolépticos de la fruta y, por ende, a su calidad y aptitud para el consumo [2].

Para abordar la complejidad de los compuestos responsables de la calidad de la fruta, se emplean diversas metodologías analíticas. Los análisis dirigidos o "targeted" se centran en una clase específica de compuestos y se utilizan para evaluar la calidad de los alimentos, sus propiedades nutricionales y sensoriales, así como sus características biológicas. En este tipo de análisis, se realizan extracciones selectivas y/o separaciones para aislar y concentrar los metabolitos seleccionados, evitando la interferencia de otros compuestos. Este enfoque proporciona una identificación fiable, sensible y una cuantificación precisa de compuestos específicos [3].

Por otro lado, los análisis no dirigidos o "untargeted" buscan proporcionar una imagen completa de la composición química de la muestra. En estos casos, la extracción de metabolitos se realiza utilizando un disolvente capaz de extraer el mayor número posible de compuestos presentes en la muestra. Este enfoque se alinea con el concepto de biología de sistemas, que busca medir el mayor número de variables y componentes posibles para obtener una visión holística del problema [4].

La integración de diversas disciplinas científicas ha llevado al desarrollo de las ciencias "ómicas", que incluyen la genómica, proteómica, transcritómica y metabolómica. Esta última, la metabolómica, representa la expresión metabólica de las dos primeras en moléculas discretas. El estudio de los grandes conjuntos de datos generados en experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) o espectrometría de masas (MS) de extractos requiere el uso de análisis multivariados (MVDA) después del pretratamiento de los datos obtenidos experimentalmente [5-6]. El tipo de análisis realizado en un estudio metabolómico puede variar según el propósito, incluyendo análisis exploratorio, análisis de clasificación/análisis discriminante y modelos de análisis/predicción [7].

Aunque los programas de mejoramiento de cítricos han incorporado enfoques "ómicos," hasta la fecha hay poca investigación específica sobre la metabolómica de los cítricos [8-20]. La mayoría de los informes se han centrado en la autenticidad de los alimentos y se han empleado enfoques metabólicos para investigar propiedades agronómicas, como la resistencia a enfermedades como el Huanglongbing [12-16], pero no en técnicas de cultivo para obtención de fruta de mejor calidad.

La cobertura de árboles cítricos con mallas anti-insectos se ha convertido en una práctica de manejo extendida a nivel mundial, especialmente para la producción de frutas sin semillas en variedades de alto valor comercial [21]. Sin embargo, esta cobertura temporal, principalmente durante el período de floración, plantea desafíos ambientales. Aunque reduce las condiciones predisponentes para algunas enfermedades, como el cancro cítrico, al disminuir el viento, puede generar mayores periodos de hoja mojada, lo que podría aumentar la incidencia de otras enfermedades [22].

Estos nuevos sistemas productivos buscan la oportunidad de producir fruta cítrica de alta calidad, centrándose principalmente en la apariencia externa de la fruta y reduciendo al máximo los daños exteriores en la piel de los cítricos. La producción de frutas sin semillas se ha vuelto especialmente relevante, ya que la ausencia de semillas en la fruta cítrica, especialmente en mandarinas, se traduce en precios diferenciales significativos, llegando hasta 700U\$S por tonelada por encima de los precios estándar. Sin embargo, la producción tradicional de frutas sin semillas entra en conflicto con la presencia de polinizadores, principalmente abejas, durante la floración de los cítricos, generando un conflicto con la apicultura.

El conocimiento y manejo de las causas fisiológicas que permiten la ausencia de semillas en los frutos están en una etapa inicial a nivel metabólico. Por lo tanto, se vislumbra un campo promisorio en el uso de herramientas metabolómicas para el estudio endógeno de los mecanismos y tecnologías que permitan mejorar la partenocarpia y su compatibilidad con la producción apícola. Una propuesta interesante es el uso confinado de abejas para mejorar el cuajado en variedades autoincompatibles, con el objetivo de mejorar el cuajado de frutas sin semillas y permitir el desarrollo de la apicultura en huertos citrícolas.

La mandarina 'Afourer', patentada como autoincompatible, se destaca por producir frutos de alta calidad organoléptica y sin semillas en ausencia de polinización cruzada [23-24]. A pesar de su excelente productividad en condiciones de polinización abierta, los frutos de 'Afourer' presentan un elevado número de semillas, lo que reduce su valor en el mercado de consumo de fruta fresca. En el contexto de Uruguay, 'Afourer' ha demostrado la capacidad de cuajar frutos sin el estímulo de la polinización, estableciéndose como un cultivar de partenocarpia autónoma [25-26]. Sin embargo, el precio de exportación de esta mandarina se reduce a menos de la mitad en presencia de semillas, lo que subraya la necesidad de generar nuevas técnicas de cultivo que fomenten la producción de fruta sin semillas para agregar valor al producto.

La clave para mejorar la calidad de la mandarina 'Afourer' y su valor comercial radica en el diseño de tecnologías adecuadas de manejo de los árboles. Estas tecnologías deben incorporar el concepto de protección ambiental, aumentando la productividad y mejorando la calidad, especialmente en términos de la ausencia de semillas. El desafío consiste en desarrollar prácticas que fomenten la partenocarpia autónoma de 'Afourer', maximizando la producción de frutas sin semillas.

El Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) ha desarrollado técnicas de manejo que

combinan el uso de polinizadores e inductores químicos, como el ácido giberélico. Este último ha demostrado mejorar la productividad del árbol, generando frutos más firmes y de mejor aspecto. Sin embargo, la polinización por insectos, si bien induce una mayor productividad y frutos menos susceptibles a enfermedades, conlleva la desventaja de la presencia de semillas, que afecta su valor comercial.

La evaluación de la conveniencia y adecuabilidad de estas técnicas de manejo desarrolladas por INIA se presenta como un paso crítico en el camino hacia la producción óptima de 'Afourer'. La combinación de estas técnicas bajo mallas anti-insectos podría aumentar la productividad del árbol, al tiempo que evita la polinización cruzada, generando frutos estériles de alta calidad, ideales para el mercado de consumo de frutas frescas.

El Programa de Mejoramiento de Citrus de INIA se posiciona como líder a nivel nacional y regional en investigación para el desarrollo de nuevas variedades y en experiencia en el desarrollo de metodologías de cultivo. La colaboración con este programa se revela fundamental para el éxito del estudio. Los ensayos en campo, la participación de personal experto a nivel agronómico, la colecta de muestras y el análisis de la fruta serán aportados por este grupo. La correlación de los datos quimiométricos obtenidos con las observaciones a nivel de los cultivos permitirá una comprensión integral de los factores que influyen en la calidad y la producción de 'Afourer'.

Dado que la citricultura es la actividad agroindustrial de mayor mano de obra en las diversas cadenas productivas de Uruguay, este estudio tiene un impacto socioeconómico significativo. Los productores de cítricos, al buscar mejorar la calidad de sus productos para acceder a mejores precios en el mercado internacional, se beneficiarán directamente de las nuevas técnicas de cultivo desarrolladas. El conocimiento y la implementación de estas prácticas no solo contribuirán a la competitividad de la citricultura uruguaya en el escenario global, sino que también fortalecerán el sustento de la mano de obra involucrada en esta industria crucial para el país. En resumen, la investigación propuesta no solo se centra en la mejora de la producción de 'Afourer' sino que también aborda aspectos fundamentales de la sostenibilidad y el desarrollo económico en el contexto de la citricultura uruguaya.

El estudio propuesto busca abordar estas complejas interrelaciones entre la calidad de la fruta, la presencia de polinizadores y las prácticas productivas en la citricultura uruguaya. Los resultados esperados pueden dividirse en varias categorías:

1. Identificación de Biomarcadores de Calidad: Se espera identificar biomarcadores específicos en el metaboloma de las mandarinas que estén correlacionados con la calidad de la fruta, especialmente en términos de la ausencia de semillas. Estos biomarcadores podrían utilizarse como indicadores de la aptitud para el consumo y la presencia de semillas.
2. Desarrollo de Estrategias para la Producción Sostenible: Con base en los resultados, se propondrán estrategias para la producción sostenible de mandarinas de alta calidad. Esto incluirá recomendaciones para la gestión de polinizadores y prácticas agronómicas que minimicen los riesgos ambientales asociados con la cobertura de mallas anti-insectos.

El estudio propuesto busca llenar una brecha en la investigación científica, integrando la metabolómica con la producción de cítricos en Uruguay. La combinación de enfoques analíticos avanzados con prácticas productivas innovadoras tiene el potencial de ofrecer soluciones a los desafíos actuales en la citricultura.

Se anticipa que los resultados proporcionarán conocimientos valiosos sobre la relación entre el metaboloma de las mandarinas y las condiciones de producción, lo que permitirá mejorar la calidad de la fruta y, al mismo tiempo, abordar las preocupaciones de la industria apícola. La identificación de biomarcadores y el desarrollo de estrategias sostenibles contribuirán a fortalecer la posición de Uruguay en los mercados internacionales de cítricos, asegurando la competitividad y la sostenibilidad a largo plazo de este sector crucial para la economía del país.

Metodología/Diseño del estudio

Exploración Metabolómica para Mejorar la Producción de Frutas Sin Semillas en Mandarina 'Afourer':

La partenocarpia, un fenómeno bien conocido en los cítricos, se regula endógenamente por las giberelinas [27-28], hormonas sintetizadas típicamente por las semillas. En el caso de la variedad 'Afourer', que es autoincompatible pero capaz de producir frutos sin semillas en ausencia de polinización cruzada, se ha observado una reducción significativa en la producción cuando la polinización por abejas es limitada, requiriendo la aplicación exógena de giberelinas para mejorar la producción de frutos sin semillas [21, 29].

La hipótesis de trabajo plantea que la incorporación confinada de abejas al cultivo de 'Afourer', evitando la llegada de polen de otras variedades, podría mejorar la producción de frutos sin semillas. Se espera que esta técnica, en comparación con técnicas convencionales, genere cambios en el metabolismo a nivel del ovario que permitan mejorar el estímulo partenocárpico.

Para explorar esta hipótesis, se propone un enfoque metabólico utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS). El análisis no dirigido (RMN) de extractos de ovarios recolectados en diferentes etapas de la floración permitirá determinar perfiles metabólicos de los diferentes tratamientos de cultivo. Por otro lado, el estudio dirigido (MS) se centrará en evaluar la presencia de giberelinas en extractos de muestras sometidas a estos tratamientos, lo que permitirá detectar y cuantificar estos metabolitos a niveles de detección superiores a los obtenidos mediante el estudio no dirigido.

El enfoque no dirigido busca proporcionar una imagen completa de la composición química de la muestra y se utiliza en el estudio metabolómico mediante RMN. Este método permite la detección de una amplia variedad de metabolitos sin preconcepciones, lo que lo hace útil para explorar cambios metabólicos inesperados en los ovarios de mandarinas 'Afourer'. En cambio, el enfoque dirigido, utilizando MS, se concentra en la identificación y cuantificación precisa de un conjunto selecto de metabolitos, como las giberelinas, que están químicamente caracterizados y tienen actividad biológica reportada. Este enfoque es más selectivo y sensible, ideal para el estudio específico de las giberelinas en el contexto de la producción de frutas sin semillas.

La combinación de ambas metodologías, RMN y MS, permitirá obtener aproximaciones más integrales al mecanismo de acción de las técnicas de cultivo propuestas. Se espera que este enfoque brinde información valiosa sobre los cambios metabólicos y la presencia de giberelinas, contribuyendo así a la mejora de las

características de la fruta obtenida y proporcionando una base científica para la optimización de prácticas de cultivo en la citricultura uruguaya.

Instalación de los tratamientos:

En el Sitio Experimental de INIA Salto Grande, ubicado en Colonia Gestido Salto, se instalaron los tratamientos de los cuales se obtuvieron las muestras para este proyecto. El diseño experimental consistió en parcelas al azar con 4 repeticiones, utilizando el árbol como unidad experimental. Cada tratamiento incluyó 4 plantas, distribuidas de la siguiente manera:

1. Plantas enmalladas con abejas confinadas durante la floración.
2. Plantas enmallada con aplicación de AG3 foliar (30 ppm).
3. Plantas enmallada con aplicación de AG3 foliar (30 ppm) en 2 ocasiones.
4. Plantas enmalladas.
5. Plantas sin mallas.

Los árboles tenían aproximadamente 12 años de edad. Los invernaderos utilizados medían 16 m x 5 m cada uno. Las muestras se tomaron en la zona media alrededor de cada árbol. Los muestreos se realizaron en 4 etapas:

Las fechas de muestreo en cada etapa fueron las siguientes:

1. Flor abierta y con pistilos
2. Frutitos sin pétalos y con pistilos.
3. Frutitos sin pistilos.
4. Frutitos formalmente cuajados con un diámetro de 4-5 mm.

Análisis no dirigido:

Se realiza la extracción de las muestras para análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) siguiendo el siguiente protocolo:

1. Triturar los ovarios de mandarina utilizando un molinillo de café (AICOK Coffee Grinder HY-1403).
2. Pesar 50 mg de cada muestra directamente en tubos Eppendorf.
3. Agregar 1 mL de KH_2PO_4 pH 6,0.
4. Someter a baño de ultrasonido durante 30 minutos.
5. Tomar el sobrenadante y filtrar con un filtro de PVDF (13 mm, 0,22 μm).
6. Transferir 0,6 mL a tubos de RMN nuevos.

Se obtuvieron los espectros de ^1H de las muestras en D_2O a una temperatura de 298,0 K usando la secuencia de pulso noesygppr1d con una sonda de 5 mm PABBO BB-1H/D Z-GRD Z108618/0421. Los parámetros experimentales incluyeron 64 scans, con una ganancia recibida de 32,0 y un retardo de la relajación de 2.0 segundos. El ancho del pulso fue de 10,00 microsegundos, con una frecuencia de presaturación de 4.70004 MHz y un tiempo de adquisición de 2,5592 segundos. La frecuencia del espectrómetro fue de 400,13 MHz, con un ancho de espectro de 6402.0 Hz.

Los espectros fueron posteriormente procesados aplicando una función de llenado de ceros, ajuste de fase, ajuste de línea de base, referenciado a la señal correspondiente a la alanina (doblete en 1,49 y 1,47 ppm). De esta manera, los espectros quedaron completamente alineados y no fue necesario alinearlos usando la función del software de procesamiento. Se cortaron las siguientes regiones de los espectros apliados: <0,60 ppm, >9,30 ppm, e intervalo de la señal residual del solvente: 4,89 - 4,76 ppm. Finalmente se realizó

un binning con un ancho de 0,001 ppm y se exportaron los datos generados para realizar el análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el software libre Metaboanalyst.ca [30]. Los datos de RMN fueron preprocesados para eliminar ruido y normalizar las intensidades de señales. Se aplicó análisis de componentes principales (PCA) para explorar la estructura inherente en los datos metabolómicos y visualizar la agrupación de muestras. La dispersión y agrupación de puntos en el espacio de las componentes principales revelan patrones de similitud o diferencia entre las muestras. Se realizó también el análisis de discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), el cual se emplea para maximizar la variabilidad entre grupos y minimizar la variabilidad dentro de los grupos, facilitando así la discriminación entre ellos. Luego se aplicó validación cruzada para evaluar la robustez del modelo PLS-DA. La herramienta genera gráficos de error, como el gráfico de validación cruzada de la precisión del modelo, para asegurar la confiabilidad de la discriminación observada. También se aplicó el test de permutaciones para enriquecer la validez y confiabilidad de los resultados obtenidos ya que proporciona una validación robusta de los resultados obtenidos en los análisis. Al comparar las estadísticas reales con las obtenidas mediante permutaciones aleatorias, se determina si las diferencias observadas son estadísticamente significativas. Y finalmente se obtuvieron los gráficos de análisis de Importancia de variables (VIP) para identificar los metabolitos que contribuyen significativamente a la separación entre grupos. Los metabolitos con VIP alto se consideran los más relevantes en términos de discriminación.

Análisis dirigido:

Se seleccionaron las Giberelinas GA9, GA4, GA34, GA20, GA1 y GA8. Estas giberelinas son conocidas por desempeñar roles clave en la regulación del crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales, incluyendo la formación y desarrollo de los órganos reproductivos. Su selección se fundamenta en su relevancia fisiológica, especialmente en el contexto de los ovarios de mandarinas, donde influyen en la floración, la fructificación y la formación de semillas. Las giberelinas, en particular GA1 y GA4, han sido asociadas con la iniciación y desarrollo del fruto. La evaluación de estas giberelinas específicas puede proporcionar información crucial sobre su potencial regulador en la fructificación de mandarinas, lo que es esencial para la producción de cítricos de alta calidad. Las giberelinas GA1 y GA4 son consideradas bioactivas, mientras que GA20 y GA9 son sus precursoras inactivas. Las giberelinas GA8 y GA4 son también inactivas y son los productos de transforamción de las giberelinas activas.

Con el fin de trabajar con referencias de estándar en el LC-MS/MS y tener la mayor sensibilidad posible a través de experimentos de MRM (Multiple reaction monitoring), se realizó la optimización de las 6 giberelinas. Las propiedades de dichos estándares se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades de estándares de giberelinas (ver anexo).

Compuesto	Peso Molecular (g/mol)	Pureza (%)	[M-H]-
Giberelina GA9	316,40	98	315
Giberelina GA4	332,40	98	331
Giberelina A34	348,4	98	347
Giberelina GA20	332,40	98	331
Giberelina GA1	348,40	98	347
Giberelina A8	364,4	98	363

Se prepararon Soluciones Stock de los estándares a una concentración de 5ppm en MeOH calidad HPLC. Para la optimización se empleó un LC-MS/MS (Thermo Fisher Scientific UltiMate 3000 RSLC acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Thermo Scientific TSQ Fortis con una fuente ESI). Se comenzó ensayando la estabilidad de cada ion a través de un experimento de SIM Scan Q1.

Se realizó una búsqueda de otros iones o aductos predominantes en cada solución estándar a través de un experimento de Full Scan Q1 utilizando las siguientes condiciones experimentales:

- Temperatura de Transferencia de Iones (T Ion Transfer): 350°C
- Temperatura de Vaporización (T Vap.): 375°C
- Gas Barrido (Sweep Gas): 1
- Fragmentación de la Fuente: 0
- Flujo de Jeringa: 100 mL/min
- Polaridad: Negativa (-)
- Potencial de Ionización: 3500V

Posteriormente, se procedió con la optimización utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente en el experimento de Full Scan Q1. Se realizaron búsquedas específicas de cuatro iones de producto para cada compuesto, excluyendo aquellas con masas menores a 10. Estas condiciones optimizadas se aplicaron para garantizar resultados precisos en el análisis de las giberelinas de interés.

Se llevó a cabo una optimización exhaustiva de la separación cromatográfica de las seis giberelinas clave utilizando una columna Thermo Scientific Hypersil Gold aQ C18 (150 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm). Las fases móviles fueron (A) H₂O 0,1% Ácido fórmico y (B) MeOH 0,1% Ácido fórmico, el caudal fue de 0,6 ml/min, la temperatura de la columna fue de 25°C y el volumen de inyección fue de 10 µl. La fuente de ionización por electrospray (ESI) se hizo funcionar en modo de iones negativos bajo un voltaje de 3500 V. La temperatura del tubo de transferencia de iones fue de 350°C y la temperatura del vaporizador fue de 375°C. El gas envolvente, el gas auxiliar y el gas de barrido se establecieron en 60 Arb, 15 Arb y 1 Arb, respectivamente. Se trabajó con MRM importando los datos obtenidos en la etapa de optimización del método de adquisición descrito previamente.

Con el objetivo de identificar el método de extracción más eficiente para las seis giberelinas bajo estudio, se llevaron a cabo pruebas exhaustivas mediante la aplicación de más de 20 métodos de extracción diferentes. Cada método fue sometido a pruebas de recuperación para evaluar su rendimiento en la extracción de las giberelinas de interés.

El análisis de las pruebas de recuperación se llevó a cabo con el fin de determinar cuál de los métodos de extracción demostró ser el más adecuado para el estudio en cuestión.

De esta manera, se seleccionó el siguiente método:

1. Triturar los ovarios de mandarina utilizando un molinillo de café (AICOK Coffee Grinder HY-1403).
2. Pesar 100 mg de cada muestra directamente en tubos Eppendorf (2mL).
3. Agregar 1 mL de buffer acético/acetato pH=3,8.
4. Dejar reposar 10 minutos.
5. Agregar 1 mL de acetonitrilo.
6. Agitar en vórtex 1 minuto a 1800rpm.
7. Agregar 0,4g de MgSO₄ anhidro.
8. Agitar en vórtex 5 minutos a 1800rpm.
9. Centrifugar 6 minutos a 4400rpm.
10. Tomar sobrenadante (aprox 900µL) a un tubo Eppendorf de 1,5mL que contiene las sales de clean up:

50mg de C18, 50mg de GCB y 150mg de MgSO₄ anhidro.

11. Agitar en vórtex 1 minuto a 1800rpm.

12. Centrifugar 4 minutos a 4400rpm.

13. Filtrar por PVDF, 0,22µm.

Los extractos se realizaron por quintuplicado, asegurando la reproducibilidad y la representatividad de los resultados obtenidos. Este enfoque metodológico permitió reducir la variabilidad experimental y proporcionar una base sólida para la evaluación precisa de las giberelinas en estudio. Posteriormente, se determinó el contenido de 5 giberelinas (se excluyó la GA8 debido a problemas en su recuperación) en cada muestra proporcionando datos cuantitativos esenciales para el análisis comparativo entre las diferentes muestras. Para evaluar de manera rigurosa las posibles diferencias entre las muestras, se aplicaron pruebas estadísticas robustas. Se utilizó el software R [31] para analizar los resultados empleando tanto métodos paramétricos (ANOVA / Tukey) como no paramétricos (Kruskal-Wallis / Dunn) para determinar si existían diferencias significativas en los contenidos de giberelinas entre los grupos analizados. La aplicación de estas pruebas estadísticas permitió determinar con confianza si las variaciones observadas en los contenidos de giberelinas eran estadísticamente significativas.

Resultados, análisis y discusión

Calidad de la fruta obtenida:

Sitio Experimental: INIA Salto Grande, Colonia Gestido Salto.

Latitud -31.279073

Longitud -57.899887

Tabla 2. Resultados de calidad de la fruta obtenida para cada tratamiento (ver anexo).

Tratamiento	N° fruta	Peso (Kg)	N° frutas con semillas	% Frutos con semilla	N° semillas/fruto
Malla + Abejas	1372.8ns	149.5ns	625.0a	46.0a	4.4a
Malla + AG3	1317.5	125.1	469.3b	31.3b	3.5b
Malla + AG3 x2	1434.8	141.5	449.0b	30.9b	4.9a
Malla	1104.3	115.6	325.3b	31.5b	3.5b
Sin Malla	1571.5	155.3	1014.3a	64.3a	3.0b
Promedio general	1360.2	137.4	576.6	40.8	3.9

La colocación de malla reduce la polinización cruzada por lo que mejora la producción de frutos sin semillas.

El tratamiento 1 (malla) produce un menor número de frutos con semillas sin embargo produce menor número de frutas debido a que se producen únicamente por autopolinización.

Los resultados sugieren que la utilización de malla, abejas y la aplicación de AG3 puede afectar significativamente los rendimientos de las frutas en términos de cantidad, peso, presencia de semillas y características relacionadas con la reproducción de las mismas.

Para lograr una buena productividad de frutos sin semillas, basándonos en los datos proporcionados y considerando que la presencia de semillas afecta negativamente la calidad del fruto en este caso,

podríamos sugerir las siguientes condiciones ideales:

1. Uso de Mallas + Abejas:

- Esta condición muestra una alta productividad de frutas con un porcentaje moderado de frutos sin semillas (54% de frutos con semillas en promedio).
- Las abejas pueden aumentar la autopolinización y mejorar la calidad de los frutos, mientras que las mallas pueden proteger contra los insectos no deseados y la polinización cruzada.

2. Mallas + 1 AG3:

- Esta condición también muestra una buena productividad de frutas y un porcentaje moderado de frutos sin semillas (68.7% de frutos con semillas en promedio).
- La aplicación de AG3 puede ser beneficiosa para la producción de frutas sin semillas, aunque el porcentaje de frutos con semillas es ligeramente mayor que en la condición de Mallas + Abejas.

Análisis no dirigido (RMN):

Al realizar el análisis multivariado de todos los datos, se encontró mediante PCA que las muestras son agrupadas por fecha de muestreo, lo que indica que en cada una de las fechas, las muestras presentaban diferencias en cuanto a su composición global, mostrando las diferentes etapas a lo largo del proceso de polinización/crecimiento inicial del fruto.

Figura 1. PCA de las muestras analizadas mediante RMN (ver anexo).

En la figura 1 se muestra el PCA de todas las muestras, donde se ve la clasificación según los 4 muestreos. En este análisis no hubo diferencias entre los tratamientos realizados, por lo tanto se decidió comparar los tratamientos en cada una de las fechas de muestreo.

Se realizó un PLS-DA con cada una de las fechas de muestreo, y se identificó que las principales diferencias entre los tratamientos se dan en etapas iniciales de la formación del fruto, en etapas iniciales de la polinización de la flor. En la figura 2 se muestran los resultados del PLS-DA y el VIP scores para identificar las señales responsables de esta diferenciación en los tratamientos, este análisis fue realizado para cada fecha de muestreo obteniendo resultados similares entre cada fecha.

Figura 2. PLS-DA y VIP scores para el muestreo 2 (ver anexo).

Las señales de RMN con valores más altos de VIP score en la etapa de desarrollo del ovario son las de azúcares y ciclo de Krebs para el tratamiento de polinización por abejas.

La señal en δ =3,28 ppm es la principal diferencia entre los tratamientos distintos tratamientos (1-4) y la polinización natural (5) (ya sea autopolinización o polinización provocada por el viento). Esta señal se corresponde con la glicina betaína, un osmoprotector que favorece a su vez el metabolismo de azúcares y compuestos fenólicos, los cuales pudimos identificar como señales importantes en etapas tempranas del desarrollo del fruto.

El modelo generado fue validado mediante el test de permutaciones y los valores de desempeño del modelo para 3 componentes fueron muy buenos: p-value = 0,003, el ajuste (R²) por encima de 0,9 y la predictibilidad del modelo (Q²) por encima de 0,8.

Análisis dirigido a giberelinas (MS):

Se diseñó y validó un método de extracción, purificación y análisis de giberelinas a partir de ovarios secos de mandarina Afourer. Se evaluó el efecto matriz de los extractos mediante comparación de la pendiente de una curva en solvente y curva en un extracto de ovarios. En todas las giberelinas evaluadas, el efecto matriz fue menor al 15% por lo que se decidió realizar la cuantificación utilizando la curva en solvente. Se evaluó la recuperación de las 5 giberelinas a un nivel de 50 y 25 ppb en extractos realizados el mismo día, obteniendo un RSD menor al 15%. Durante la extracción e inyección de las muestras, se repitieron los ensayos de recuperación para cada lote de extracción y cada día de inyección, obteniendo recuperaciones que se mantuvieron a lo largo de todo el análisis de las muestras. De esta manera se realizó una validación del método y una validación “on-going” que permitió monitorear tanto la extracción a lo largo del tiempo como el desempeño del equipo ya que cada lote de inyección incluyó inyecciones de recuperación y de puntos de la curva tanto al principio como al final de cada batch.

Las giberlinas GA20, GA34 y GA4 fueron detectadas en algunas muestras puntuales, sin seguir un patron determinado. Las giberelinas GA1 y GA9, si fueron detectadas en todas las muestras y cuantificadas obteniendo los resultados (expresados en ppb) mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Cuantificación de GA1 y GA9 (ppb) (ver anexo).

Muestreo Tratamiento GA1 GA9

1	153.1	8.1
2	117.8	20.9
3	147.0	12.4
4	125.1	6.8
5	130.2	8.0
2	143.2	0.9
2	44.0	4.8
3	31.1	3.2
4	51.5	5.9
5	51.3	4.0
3	157.9	3.3
2	68.1	3.2
3	59.9	0.6
4	61.0	5.7
5	88.7	4.1
4	1160.0	3.7
2	126.6	4.9
3	126.6	8.7
4	138.7	7.0
5	145.5	10.3

Figura 3. Representación gráfica de los niveles de GA1 y GA9 de todas las muestras (ver anexo).

La GA1, que es la hormona activa en el proceso, muestra una alta concentración en el primer y cuarto muestreo (especialmente en el Tratamiento 1 de ambos). Esto podría sugerir un aumento de actividad hormonal en momentos específicos del desarrollo, que corresponden a fases críticas de crecimiento: apertura de la flor y cuajado de la fruta luego de la polinización. Durante el segundo y tercer muestreo, los

niveles de GA1 son considerablemente más bajos en todos los tratamientos. Este patrón podría indicar una disminución de la actividad de GA1 en esas etapas, lo cual podría estar relacionado con la transición de una fase de crecimiento a una fase de desarrollo donde la GA1 no es tan determinante.

Por otro lado, la GA9, que es un derivado del metabolismo de GA4 (otra hormona activa proveniente de la vía no hidroxilada en 13), presenta niveles bajos en general en comparación con GA1. Sin embargo, se observan picos ocasionales, como en el Tratamiento 2 del primer muestreo y el Tratamiento 5 del cuarto muestreo.

La GA9 muestra una variación menos marcada a lo largo de los muestreos y tratamientos, lo que podría indicar que su papel es más secundario o regulado de manera menos directa en el ovario en comparación con GA1 (ver figura 3).

Dado que GA9 proviene del metabolismo de GA4, es posible que GA9 refleje una actividad residual o un producto de degradación de GA4 en lugar de una regulación directa sobre el crecimiento activo del ovario. Su presencia baja y constante sugiere que la ruta de GA4 podría estar menos activa en el desarrollo del ovario o que su contribución es más estable y menos dependiente de fases específicas durante el cuajado del fruto.

Conclusiones y recomendaciones

Tanto el uso de mallas con abejas como el uso de mallas con aplicación de ácido giberélico parecen ser técnicas adecuadas para obtener una buena productividad de frutos sin semillas, aunque la elección entre ellas dependerá de factores adicionales como el costo, la disponibilidad de recursos y las preferencias específicas del productor. La combinación de apicultura con el cultivo de mandarinas puede traer varios beneficios tanto para la calidad de la miel como para la fruta obtenida a través de este tipo de polinización. Las abejas son excelentes polinizadores y pueden mejorar significativamente la polinización de los árboles de mandarina. La polinización adecuada puede aumentar la cantidad de fruta producida por los árboles de mandarina. Las abejas pueden aumentar el número de frutos cuajados, lo que se traduce en una mayor productividad del cultivo.

Resultando en frutas más uniformes, de mejor tamaño y calidad. La presencia de abejas puede ayudar a asegurar una mejor formación y desarrollo de los frutos, lo que puede influir positivamente en su aspecto, sabor y valor comercial.

Por otro lado, la presencia de árboles de mandarina en áreas donde se practica la apicultura puede proporcionar a las abejas una fuente confiable de néctar y polen. Esto puede resultar en la producción de miel de calidad con notas de sabor y aroma característicos de las flores cítricas [32].

Para los agricultores que practican la apicultura y el cultivo de mandarinas, la combinación de ambas actividades puede representar una oportunidad para diversificar sus fuentes de ingresos.

Los resultados de RMN (estudio no dirigido) mostraron una clara diferenciación según la fecha de muestreo (evolución de la polinización) y se encontraron algunas diferencias en etapas tempranas del desarrollo del fruto según la técnica de cultivo.

La polinización eficiente por parte de las abejas puede reducir la necesidad de que las plantas gasten recursos adicionales en producir más flores o mecanismos secundarios para el cuajado del fruto. Esta reducción del estrés podría ayudar a las plantas a destinar más recursos a la síntesis de compuestos protectores como la glicina betaína.

Cuando se forma el fruto, se favorece el metabolismo de los azúcares; sin embargo, en las etapas tempranas de la polinización se encontraron señales importantes relacionadas con los compuestos fenólicos.

Las diferentes técnicas de cultivo mostraron diferencias en la producción de frutos y la presencia de semillas. También favorecidas por compuestos osmoprotectores como la glicina betaína, compuesto favorecedor del metabolismo de azúcares, ácido cítrico (proveniente del ciclo de Krebs) y compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes.

Entender el proceso de polinización desde un punto de vista metabólico ayudará a diseñar técnicas de cultivo que favorezcan la producción de fruta de calidad según las tendencias del mercado de manera sostenible.

Los resultados del análisis dirigido a giberelinas (Mediante LC-MS/MS) mostraron que la diferencia entre los niveles de GA1 y GA9 en diferentes etapas y tratamientos indica que la vía metabólica de GA1 es probablemente la más activa y relevante para el desarrollo de esta estructura en los cítricos.

El hecho de que GA1 muestre variaciones marcadas en momentos específicos, mientras que GA9 se mantiene en niveles bajos y estables, podría indicar que GA1 es la hormona principal en la regulación activa de este proceso, mientras que GA4 (precursor de GA9) juega un papel complementario o secundario.

La GA1 parece ser la giberelina clave para el desarrollo del ovario en cítricos, con fluctuaciones que sugieren una regulación dinámica durante el proceso de floración. Los picos observados en el primer y cuarto muestreo podrían señalar momentos críticos donde la actividad hormonal es esencial.

La GA9 tiene un papel menos preponderante en el proceso, posiblemente como un subproducto del metabolismo de GA4. Su presencia en niveles más bajos y con menos variabilidad indica una menor participación directa en el desarrollo activo del ovario, aunque podría contribuir de manera secundaria.

Este patrón es consistente con la naturaleza de las vías de biosíntesis de giberelinas en cítricos, donde GA1 y GA4 derivan de rutas distintas y cumplen roles complementarios. En el contexto del ovario, parece que la vía de GA1 es más determinante en esta especie.

Estos resultados sugieren que para intervenciones que busquen mejorar o regular el desarrollo del ovario en mandarina Afourer, enfocarse en la vía de GA1 podría ser más efectivo, dado su papel principal en el proceso observado.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron generados mediante el uso de LC-MS/MS en modo de triple cuadrupolo (QqQ), una técnica que, aunque efectiva para la cuantificación de giberelinas, enfrenta ciertas limitaciones en términos de sensibilidad, especialmente cuando se trata de detectar concentraciones bajas en muestras de pequeño tamaño. A pesar de estas limitaciones instrumentales, se logró establecer un método de extracción relativamente simple que optimizó los niveles de recuperación de las giberelinas GA1 y GA9 sin recurrir a la técnica de extracción en fase sólida (SPE), que suele ser el estándar en este tipo de análisis para mejorar la selectividad y la pureza de los compuestos de interés.

La decisión de omitir la SPE en este protocolo buscó simplificar el proceso y facilitar su aplicación, lo cual es particularmente valioso dadas las limitaciones impuestas por la escasa disponibilidad de material vegetal. Dado que los ovarios de mandarina son estructuras pequeñas y su obtención a lo largo del proceso de floración y polinización es limitada, el desarrollo de un método directo y eficiente para su análisis resulta crucial. Estos avances contribuyen a la búsqueda de métodos que sean no solo precisos, sino también adaptables a estudios donde la cantidad de muestra es restringida y se requiere una cuantificación precisa para comprender la dinámica hormonal en el desarrollo de los cítricos.

Referencias bibliográficas

- [1] Uruguay vendió 30.000 toneladas de cítricos por 20 millones de dólares, con Estados Unidos como principal mercado. Publicado: 28/06/2018, último acceso: 02/06/2020. Disponible en: <https://www.presidencia.gub.uy/comunicacion/comunicacionnoticias/montes-exportacion-citricola-estados-unidos>
- [2] Ignacio Miguez, Natalia Hodos, Ana Inés Moltini, Adriana Gámbaro, Fernando Rivas, Guillermo Moyna, Horacio Heinzen. 1H NMR metabolic profiles as selection tools of new mandarin cultivars based on fruit acceptability, *Scientia Horticulturae*, 287, 2021, 110262, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110262>
- [3] Cox, D.G., et al., The utility of metabolomics in natural product and biomarker characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1840; 12; (3460-3474).
- [4] Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., Natural Products (Secondary Metabolites), in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. G. Buchanan, Jones, Editor. 2000, American Society of Plant Physiologists.: Rockville, Maryland, Estados Unidos.
- [5] Katajamaa, M. & Oresic, M., Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of chromatography A*, 2007; 1158(1-2); (318-328).
- [6] Sysi-Aho, M., Katajamaa, M., Yetukuri, L., Oresic, M., Normalization method for metabolomics data using optimal selection of multiple internal standards. *BMC Bioinformatics*, 2007; 15(8-93).
- [7] Cevallos-Cevallos, J.M. et al. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 2009; 20; (557-566).
- [8] Feng, S., Niu, L., Hyuk Suh, J., Hung, W-L., Wang, Y., . Comprehensive Metabolomics Analysis of Mandarins (*Citrus Reticulata*) as a Tool for Variety, Rootstock, and Grove Discrimination. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2018; 66(39); (10317-10326).
- [9] Le Gall, G., Puaud, M., Colquhoun, I.J., Discrimination between Orange Juice and Pulp Wash by 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2001; 49; (580-588)
- [10] Salazar, M.O, Pisano, P.L., González Sierra, M., Furlan, R., NMR and multivariate data analysis to assess traceability of argentine citrus. *Microchemichal Journal*. 2018; 141; (264-270)
- [11] Cubero-Leon, E., De Rudder, O., Maquet, A., Metabolomics for organic food authentication: Results from a long-term field study in carrots. *Food Chemistry*, 2018; 239; (760-770)
- [12] Cevallos-Cevallos, J.M., Futch, D.B., Shilts, T., Folimonova, S.Y., Reyes-De-Corcuera, J.I., GC-MS metabolomic differentiation of selected citrus varieties with different sensitivity to citrus Huanglongbing. *Plant Physiology Biochemistry*. 2012; 53; (69-76)

- [13] Cevallos-Cevallos, J.M., Rouseff, R., Reyes-De-Corcuera, J.I., Untargeted metabolite analysis of healthy and Huanglongbing-infected orange leaves by CE-DAD. *Electrophoresis*; 30(7); (1240-1247)
- [14] Freitas, D., Carlos, E.F., Gil, M.C., Vieira, L., Alcantara, G., NMR-Based Metabolomic Analysis of Huanglongbing-Asymptomatic and -Symptomatic Citrus Trees. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2015; 63(34); (7582-7588)
- [15] Cuthbertson, D., Andrews, P.K., Reganold, J.P., Davies, N.M., Lange, B.M., 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*, 2012; 60 (35); (8552-8560)
- [16] Fernandez, O., Urrutia, M., Bernillon, S., Giauffret, C., Tardieu, F., Le Gouis, J., Charcosset, A., Moing, A., Gibon, Y., Fortune telling: metabolic markers of plant performance. *Metabolomics*, 2016; 12; 158
- [17] Cubero-Leon, E., De Rudder, O., Maquet, A., Metabolomics for organic food authentication: Results from a long-term field study in carrots. *Food Chemistry*, 2018; 239; (760-770)
- [18] Díaz, R., Pozo, O.J., Sancho, J. V, Hernández, F., Metabolomic approaches for orange origin discrimination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2014; 157; (84-93)
- [19] Vaclavik, L., Schreiber, A., Lacina, O., Cajka, T., Hajslova, J., Liquid chromatography–mass spectrometry-based metabolomics for authenticity assessment of fruit juices. *Metabolomics*, 2012; 8; (793-803)
- [20] Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Casals-Ribes, I., Amat, M., Lamuela-Raventós, R.M., A Metabolomic Approach Differentiates between Conventional and Organic Ketchups. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2011; 59; (11703-11710)
- [21] Otero, A., Rivas, F., Field spatial pattern of seedy fruit and techniques to improve yield on 'Afourer' mandarin. *Scientia Horticulturae*, 2017; 225; (264–270)
- [22] Gottwald, T., Sun, X., Riley, T., Graham, J., Ferrandino, F., Taylor, E., Georeferenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*, 2002; 92; (362-377)
- [23] Bono, R., Soler, J., Buj, A., Problemática de la presencia de semillas en los cítricos. En: IV Congreso Citrícola de l'Horta Sud; 5 - 6 octubre, 2000; Valencia, España. Valencia: Ajuntament de Picassent. 2001, (29-46)
- [24] Chao, C., Fang, J., Devanand, P., Long distance pollen flow in mandarin orchards determined by AFLP markers-implications for seedless mandarin production. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2005; 130(3); (374-380)
- [25] Gravina, A., Fornero, C., Galiger, S., Inzaurrealde, C., Fasiolo, C., Gambetta, G., Partenocarpia, polinización cruzada y presencia de semillas en mandarina Afourer. *Agrociencia*, 2011; 15(2); (40-47)
- [26] Gambetta, G., Gravina, A., Fasiolo, C., Fornero, C., Galiger, S., Inzaurrealde, C., Rey, F., Self-incompatibility,

parthenocarpy and reduction of seed presence in 'Afourer' mandarin. *Scientia Horticulturae*, 2013; 164; (183-188)

[27] Talon, M., Zacarias, L., Primo-Millo, E., Gibberellins and Parthenocarpic Ability in Developing Ovaries of Seedless Mandarins. *Plant Physiology*, 1992; 99; (1575-1581)

[28] Ben-Cheikh, W., Perez-Botella, J., Tadeo, F.R., Talon, M., Primo-Millo, E., "Pollination Increases Gibberellin Levels in Developing Ovaries of Seeded Varieties of Citrus." *Plant Physiology*, 1997; 114; (557-564)

[29] Gravina, A., Gambetta, G., Rey, F., Guimaraens, N., Mejora de la productividad en mandarina 'Afourer' en aislamiento de polinización cruzada. *Agrociencia*, 2016; 20(2); (22-28)

[30] Pang, Z., Chong, J., Li, S., Xia, J. (2020). MetaboAnalystR 3.0: Towards an optimized workflow for global metabolomics. *Metabolites*, 10(5), 186. <https://doi.org/10.3390/metabo10050186>

Software: MetaboAnalyst 6.0: Xia Lab, McGill University. Available at: <https://www.metaboanalyst.ca>

[31] R Core Team. (2024). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

[32] Klatt, B.K., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., Pawelzik, E., Tschardtke, T., Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of the royal society B*, 2013; 281; (32-40)

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)