



TÍTULO

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE K⁺ DURANTE LA
MADURACIÓN DEL FRUTO DE FRESA MEDIANTE TÉCNICAS
ELECTROFISIOLÓGICAS Y ESPECTROMETRÍA ATÓMICA

DETERMINATION OF K⁺ CONTENT DURING STRAWBERRY FRUIT
RIPENING BY ELECTROPHYSIOLOGICAL TECHNIQUES AND
ATOMIC SPECTROMETRY

AUTORA

Claudia Rodríguez Hiraldo

Esta edición electrónica ha sido realizada en 2023

Tutores	Dr. D. José Ángel Mercado Carmona; Dra. D ^a . Lourdes Rubio Valverde
Instituciones	Universidad Internacional de Andalucía ; Universidad de Málaga
Curso	<i>Máster Oficial en Biotecnología Avanzada (2021-22).</i>
©	<i>Claudia Rodríguez Hiraldo</i>
©	De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía
Fecha documento	2022



**Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)**

Para más información:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.en>

Determinación del contenido de K^+ durante la maduración del fruto de fresa mediante técnicas electrofisiológicas y espectrometría atómica

Determination of K^+ content during strawberry fruit ripening by electrophysiological techniques and atomic spectrometry

Trabajo Fin de Máster en Biotecnología Avanzada

Universidad Internacional de Andalucía

Curso 2021/2022

Autora: Claudia Rodríguez Hiraldo

Cotutores: José Ángel Mercado Carmona y Lourdes Rubio Valverde

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DEL TFM	1
Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1. Contenido y transporte de potasio en la célula vegetal	4
1.2. Potencial de membrana en células vegetales	6
1.3. Técnicas de obtención directa o indirecta del contenido de potasio y otros elementos	8
1.4. Papel del K ⁺ en la maduración del fruto	10
1.5. Genotipos de fresa de estudio	11
2. Objetivos	12
3. Material y Métodos	13
3.1. Material vegetal	13
3.2. Obtención del contenido de potasio a través de técnicas electrofisiológicas	13
3.3. Determinación de concentración iónica mediante espectrometría atómica (EAT)	18
3.4. Análisis estadístico de los resultados	20
4. Resultados	21
4.1. Electrofisiología	21
4.2. Espectrometría atómica	25
5. Discusión	29
5.1. El K ⁺ citosólico disminuye conforme avanza la maduración del fruto en fresas control	29
5.2. El K ⁺ citosólico en el estadio temprano está significativamente más presente en fresas control que en fresas transformadas con un gen de poligalacturonasa silenciado	29
5.3. El contenido total de K ⁺ en el tejido del receptáculo es similar en fresas control y en transgénicas PG29, y en cada uno de estos genotipos a lo largo de la maduración	30
5.4. Otros iones y elementos químicos presentan disminuciones significativas durante la maduración del fruto de fresa	31
6. Conclusiones	32
7. Perspectivas Futuras	33
Referencias bibliográficas	35

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DEL TFM

Dña. Claudia Rodríguez Hiraldo,
con DNI (NIE o pasaporte) 79044084F

DECLARA que es autor del presente Trabajo de Fin de Máster, titulado:

Determinación del contenido de K⁺ durante la maduración del fruto de fresa mediante técnicas electrofisiológicas y espectrometría atómica

Que ha cumplido con las obligaciones legales sobre la propiedad intelectual e industrial y que además es un trabajo original, no habiéndose utilizado fuentes bibliográficas sin ser citadas debidamente. De no cumplir con este compromiso, el abajo firmante es consciente de que, de acuerdo con la Normativa de Evaluación y de Calificación de los estudiantes de la Universidad de Málaga de 14 de marzo de 2018, esto conllevará automáticamente la calificación numérica de cero, independientemente del resto de las calificaciones que hubiera obtenido. Esta consecuencia debe entenderse sin perjuicio de las responsabilidades disciplinarias en las que se pudieran incurrir.

En Málaga, a 26/09/2022



Fdo. Claudia Rodríguez Hiraldo

Resumen

El ion potasio (K^+) es el macronutriente más abundante en la célula vegetal y es fundamental para numerosas funciones de la planta, incluyendo el rendimiento y la calidad del fruto. Por ello, el estudio de su dinámica celular durante el desarrollo tiene una gran importancia, ya que puede ser un factor esencial que determine la vida poscosecha del fruto. El objetivo de este proyecto es determinar y comparar el contenido de potasio en distintos estadios de maduración del fruto de fresa. Para ello, se utilizaron frutos del cv. 'Chandler' control sin transformar y dos líneas de fresas (PG29 y 18A37) que contienen un gen de poligalacturonasa (*FaPG1*) en antisentido (PG29) o editado (18A37). Los frutos de estas líneas transgénicas muestran una vida poscosecha más prolongada que los frutos control. Para la cuantificación del K^+ se utilizaron dos procedimientos distintos, a través de técnicas electrofisiológicas y espectrometría atómica (EAT). En el primer caso, se ha optimizado la medida del potencial de membrana de células del fruto de fresa con técnicas electrofisiológicas, se han estimado las concentraciones de potasio citosólico a partir del potencial de difusión, y se ha analizado la concentración de iones por EAT. Los resultados obtenidos muestran que el K^+ citosólico disminuye conforme avanza la maduración del fruto en fresas control. Sin embargo, los frutos transgénicos en estadio verde contienen menos K^+ citosólico que los frutos control. La concentración de potasio total en el tejido del receptáculo fue similar en fresas control y en transgénicas PG29, y en estos dos genotipos a lo largo de la maduración. Por el contrario, los niveles de Mn, Zn, Ca, Mg, Na, así como el carbono y el nitrógeno total presentan disminuciones significativas en el transcurso de este proceso. Los resultados obtenidos sugieren que hay una posible relación entre firmeza de fruto y contenido interno de K^+ , y éste a su vez, se ve modificado al inhibir el gen *FaPG1*. Como posibles perspectivas de investigación futuras, entre otras, sería de gran interés estudiar el papel que tiene la poligalacturonasa en la acumulación del potasio en fases tempranas de la maduración; el mecanismo por el cual el potasio podría viajar durante la maduración a otras partes del tejido del receptáculo, como la vacuola; y la causa de que a medida que progresa este proceso, la mayoría de los iones sufran una disminución.

Palabras clave: Ion potasio (K^+), fresa, maduración, poligalacturonasa, técnicas electrofisiológicas, espectrometría atómica (EAT), potencial de membrana, potencial de difusión.

Abstract

The potassium ion (K^+) is the most abundant macronutrient in the plant cell and is essential for numerous plant functions, including yield and fruit quality. Therefore, the study of its cellular dynamics during development is of great importance, since it can be an essential factor that determines the postharvest life of the fruit. The objective of this project is to determine and compare the potassium content at different stages of ripening of the fruit of cv. 'Chandler' untransformed control strawberries and two strawberry lines (PG29 and 18A37) containing an antisense (PG29) or edited (18A37) polygalacturonase (*FaPG1*) gene. The fruits of these transgenic lines show a longer postharvest life than the control fruits. For the quantification of K^+ , two different procedures were used, through electrophysiological techniques and atomic spectrometry (EAT). In the first case, the measurement of the membrane potential of strawberry fruit cells has been optimized with electrophysiological techniques, cytosolic potassium concentrations have been estimated from the diffusion potential, and the ion concentration has been analyzed by EAT. The results obtained show that cytosolic K^+ decreases as fruit ripening progresses in control strawberries. However, green-stage transgenic fruits contain less cytosolic K^+ than control fruits. Total potassium concentration in receptacle tissue was similar in control and transgenic PG29 strawberries, and in these two genotypes throughout ripening. On the contrary, the levels of Mn, Zn, Ca, Mg, Na, as well as carbon and total nitrogen show significant decreases during this process. The results obtained suggest that there is a possible relationship between fruit firmness and internal K^+ content, and this, in turn, is modified by inhibiting the *FaPG1* gene. As possible future research perspectives, among others, it would be of great interest to study the role of polygalacturonase in the accumulation of potassium in early phases of maturation; the mechanism by which potassium might travel during maturation to other parts of the receptacle tissue, such as the vacuole; and the cause that as this process progresses, most of the ions suffer a decrease.

Keywords:

Potassium ion (K^+), strawberry, ripening, polygalacturonase, electrophysiological techniques, atomic spectrometry (EAT), membrane potential, diffusion potential.

1. Introducción

1.1. Contenido y transporte de potasio en la célula vegetal

El ion potasio (K^+) es el macronutriente más abundante en la célula vegetal y juega un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en el rendimiento y la calidad del fruto, incluyendo su tamaño, los sólidos solubles de su interior y su color. Además, este catión tiene una fuerte influencia en el pH de este, por lo que también es fundamental para la acidez (Rogiers *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017). Dada su importancia para la calidad del fruto, la variación de su contenido a lo largo de la maduración puede desvelar nueva información de gran interés.

El potasio está presente en el citosol con mayor concentración: en torno a 100 mM en forma de ion potasio soluble (Anschütz *et al.*, 2014; Shabala and Pottosin, 2010). Las concentraciones estables de K^+ citosólico son fundamentales para el mantenimiento del potencial de membrana y, por lo tanto, este catión es esencial para la absorción de otros iones y azúcares. Su incorporación en la célula depende de las actividades de las proteínas transportadoras de K^+ unidas a la membrana, que operan en un amplio rango de concentraciones de potasio (Britto and Kronzucker, 2008; Rogiers *et al.*, 2017). Las concentraciones de K^+ citosólico están estrictamente reguladas a través de la regulación integrada de la captación y salida de K^+ en la membrana plasmática, y la importación y exportación de K^+ en el tonoplasto, flujos catalizados por transportadores en la membrana plasmática y en la membrana del tonoplasto, respectivamente (Britto and Kronzucker, 2008; Leigh, 2001). Se cree que la concentración del ion potasio en el citosol disminuye solo cuando se ha agotado en la vacuola (Walker *et al.*, 1996). Por el contrario, el excedente de K^+ se transporta a la vacuola para mantener el K^+ citosólico dentro de unos límites, independientemente de la abundancia de K^+ en el medio. En el rango habitual de potencial de membrana del tonoplasto (20–40 mV, interior positivo) y de concentración de K^+ citosólico (80 mM), el transporte de K^+ hacia la vacuola en células con exceso de ion potasio ocurre contra el gradiente electroquímico y necesita energía (Walker *et al.*, 1996; Martinoia *et al.*, 2000).

Por todo lo mencionado hasta ahora, el transporte del potasio es un componente clave en la regulación de la diferencia de potencial eléctrico. Asimismo, hay factores como la concentración de potasio extracelular que pueden hacer que se reajuste el potencial. Las membranas se despolarizan en respuesta a aumentos de concentración de K^+ externa y se hiperpolarizan con su disminución (Britto and Kronzucker, 2008).

La captación de potasio en las células está mediada por canales pasivos de potasio o por transportadores activos. Los primeros canales de potasio que fueron aislados e identificados fueron KAT1 y AKT1 en Arabidopsis. El canal AKT es de alta afinidad y juega un papel importante en la captación de potasio en las raíces y su expresión es fuertemente inducida por ABA. Por lo tanto, este canal, a través de la señalización de ABA, es fundamental para el desarrollo y la maduración del fruto (Rogiers *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017). Además de estos canales, en cierta medida, también son utilizados para la entrada de potasio canales catiónicos no selectivos. Todos estos canales están fundamentalmente mediados por voltaje y son los responsables del componente difusivo. (Taiz & Zeiger, 2006; Shabala & Pottosin, 2010).

Para los sistemas de incorporación de K^+ , se han descrito dos mecanismos, ya que a bajas concentraciones de potasio externas se pone en marcha el sistema de transporte de alta afinidad (HATS) para el potasio, mientras que a concentraciones externas superiores a 1 mM los patrones de transporte de K^+ se ven dominados por un sistema cinéticamente distinto que apenas muestra saturación. Este último mecanismo se denominó sistema de transporte de baja afinidad (LATS). El modelo de dos mecanismos para el transporte activo de potasio se representa en la **Fig. 1**. En el mecanismo HATS, el flujo termodinámicamente desfavorable de K^+ es impulsado por el flujo favorable de H^+ ; el equilibrio en las cargas se logra mediante el bombeo hacia el exterior de dos protones por parte de la ATPasa de protones de la membrana plasmática. Por el contrario, en el mecanismo LATS, un uniporte de potasio se equilibra eléctricamente por el flujo de salida impulsado por ATP de un protón. (Britto & Kronzucker, 2008; Leigh, 2001). Un transportador especialmente descrito es el conocido como HAK, un simportador de K^+/H^+ , que funciona utilizando el mecanismo HATS y es energéticamente costoso, pero actúa a concentraciones extremadamente reducidas de potasio externo (Rogiers *et al.*, 2017).

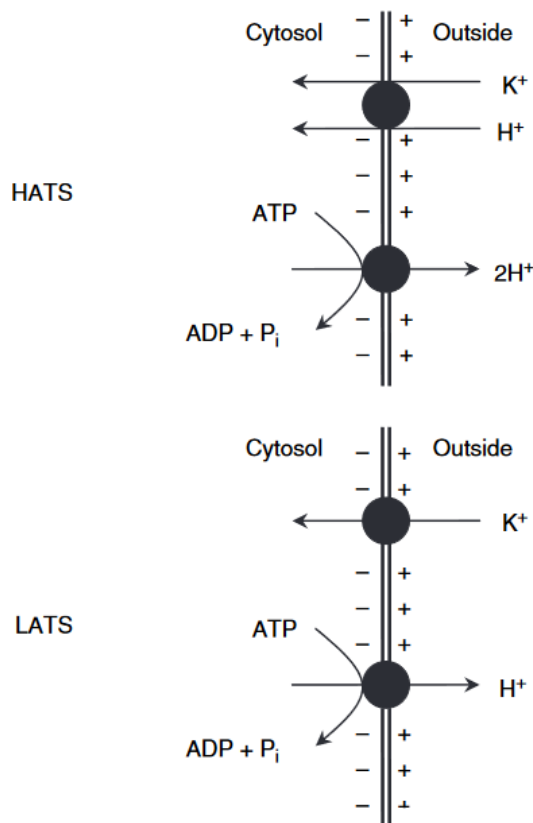


Figura 1. Mecanismos generales de entrada activa de potasio en la célula vegetal a través de HATS (diagrama superior) y de LATS (diagrama inferior). Fuente: Britto & Kronzucker (2008).

1.2. Potencial de membrana en células vegetales

La diferencia de cargas generada por el transporte de iones a través de la membrana es la causante de que se genere el potencial de membrana. En la membrana plasmática, la actividad de la H^+ ATPasa, que saca protones consumiendo energía metabólica, genera un déficit de carga positiva en el citosol. Además, cada ion atraviesa la membrana difundiéndose a favor de su gradiente de potencial electroquímico, para lo cual su permeabilidad para ese ion tiene un papel fundamental. La membrana plasmática de la célula vegetal es especialmente permeable al paso del catión potasio, por lo que su difusión da como resultado un potencial eléctrico negativo con respecto al medio. Al potencial de membrana generado se le llama potencial de difusión. Aunque el gradiente de concentración no haya cambiado, el transporte se encuentra en equilibrio debido a las cargas, es decir, el flujo pasivo a través de la membrana es el mismo en ambas direcciones. Los flujos están relacionados con el potencial electroquímico por lo que, en el equilibrio, estos también se igualan a los dos lados de la membrana. Es posible calcular la diferencia de potencial eléctrico para mantener la diferencia de concentración de un

determinado ion entre los dos compartimentos, la cual se conoce como potencial de Nernst para un ion. Asimismo, la ecuación de Nernst (**Fig. 2A**) establece que la diferencia de concentraciones de un ion (ϕ) en el equilibrio a ambos lados de la membrana está a su vez equilibrada por la diferencia de voltaje existente. En el caso de un ion monovalente como es el catión potasio, esta ecuación se simplifica a 25°C (**Fig. 2B**) (Taiz & Zeiger, 2006).

A

$$\Delta E_{\phi} = \frac{2.3RT}{z_{\phi}F} \left(\log \frac{C_{\phi}^o}{C_{\phi}^i} \right)$$

B

$$\Delta E_{\phi} = 59\mu\zeta \log \frac{C_{\phi}^o}{C_{\phi}^i}$$

Figura 2. Ecuación de Nernst. ΔE_{ϕ} es el potencial de Nernst para el ion ϕ ; C_{ϕ}^o representa la concentración del ion en el exterior; C_{ϕ}^i la misma en el interior de la célula; y $59\mu\zeta$ indica 59 mV. Fuente: Taiz & Zeiger (2006).

Respecto a las células vegetales y, por tanto, también a las células del fruto, el catión potasio es el que presenta la mayor concentración interna y permeabilidad de la membrana. Es por esto por lo que el potencial de difusión puede considerar despreciables los potenciales de Nernst para el resto de los iones y aproximarse al potencial de Nernst para el K^+ (Taiz & Zeiger, 2006). De esta manera, es posible utilizar el potencial de difusión obtenido de la medición directa del mismo con un voltímetro, para calcular la concentración interna del K^+ , a una concentración externa conocida, tal y como se detallará en el apartado siguiente.

Como se ha mencionado anteriormente, el potencial de membrana tiene un segundo componente, ya que experimenta valores mucho más negativos en las células vegetales (de -200 a -100 mV) de los que se esperaría si solo actuara el componente difusivo. La bomba electrogénica H^+ -ATPasa de la membrana plasmática es el principal determinante del potencial de membrana, ya que esta es la principal responsable del transporte activo a través de la misma. Este transporte de protones genera la fuerza motora necesaria para la difusión de K^+ , además

de tener una repercusión directa en los transportadores HATS al existir el simporte de protones con el potasio (Taiz & Zeiger, 2006; Britto & Kronzucker, 2008).

1.3. Técnicas de obtención directa o indirecta del contenido de potasio y otros elementos

Para obtener los datos de contenido de potasio existen diferentes posibilidades en cuanto a las técnicas. Aquellas que se han considerado las más adecuadas han sido la electrofisiología, que nos permite estimar la concentración de potasio en el citosol a partir del potencial de difusión; y la espectrometría atómica, cuyo resultado es la medida directa del contenido iónico de la muestra. Esta última también ha podido ser utilizada para medir la concentración de otros iones y elementos presentes en las muestras. Estas técnicas se describen a continuación.

1.3.1. **Obtención indirecta del contenido de potasio a través de técnicas electrofisiológicas**

Las técnicas electrofisiológicas permiten obtener valores de contenido de potasio intracelular de forma indirecta mediante la medida del potencial de difusión a concentraciones conocidas de medio externo. En general, el procedimiento utilizado para medir electropotenciales en células vegetales es, como se muestra en la **Fig. 3**, el de insertar un electrodo de vidrio microcapilar con la ayuda de un micromanipulador en una célula bajo observación microscópica (Leidi *et al.*, 2010; Higinbotham, 1973; Taiz & Zeiger, 2006).

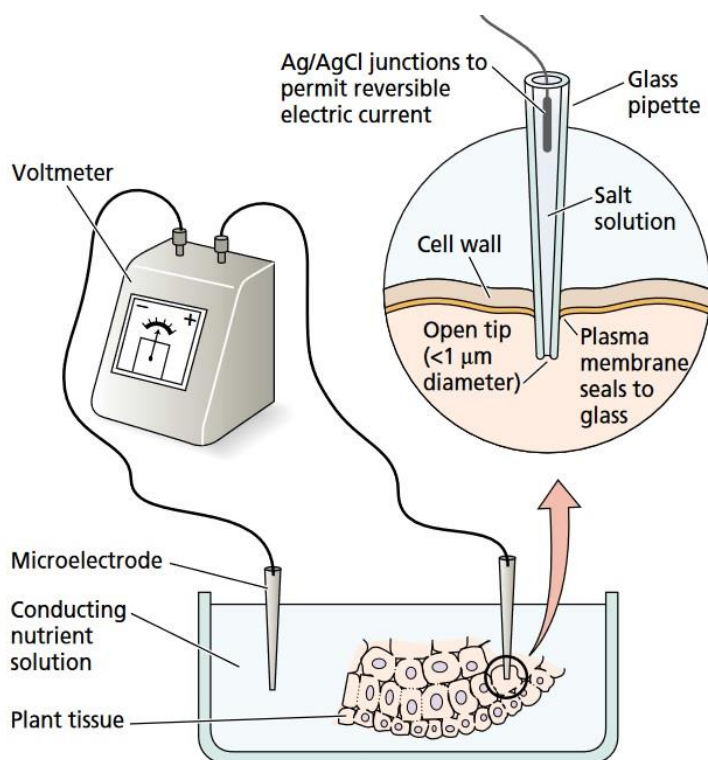


Figura 3. Diagrama de un voltímetro al que están conectados dos microelectrodos, uno de referencia y otro de medida, los cuales miden el potencial de membrana a través de la membrana celular. Fuente: Taiz & Zeiger (2006).

Para obtener el potencial de difusión, es necesario añadir al medio externo una cierta cantidad de cianuro, el cual cancelaría la respiración celular en la mitocondria si no fuese por los mecanismos que la célula vegetal tiene para reducir este efecto considerablemente. Por ello, se puede combinar con ácido salicilhidroxámico (SHAM), un inhibidor de la resistencia a la evitación de la respiración del cianuro, para lograr la totalidad de su efecto. De este modo, los transportadores activos que necesitan ATP para funcionar se anulan y solo quedan los pasivos, es decir, solo funciona el transporte por difusión, lo cual nos permite medir el potencial de difusión (Leidi *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 1999).

Conociendo el potencial de difusión, es posible calcular la concentración del ion potasio citosólico. Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, el potencial de difusión medido en la célula se puede considerar similar al potencial de Nernst del potasio, puesto que este es el que presenta una mayor permeabilidad de la membrana y una mayor concentración en el citosol, considerando despreciables los potenciales de Nernst del resto de iones. Así, a una concentración externa conocida de K^+ , y con la medida del potencial de difusión de la célula, podemos estimar la concentración de K^+ en el citosol despejándola de la ecuación de Nernst simplificada para los iones monovalentes a 25°C que aparece en la **Fig. 2B** (Leidi *et al.*, 2010; Taiz & Zeiger, 2006).

En el caso de frutos, la aplicación de técnicas electrofisiológicas es prácticamente inexistente, debido a las dificultades técnicas que plantea este tipo de tejido.

1.3.2. **Obtención directa del contenido iónico a través de espectrometría atómica**

La base de la espectrometría atómica es la medición de los espectros de absorción, emisión o fluorescencia de átomos o iones elementales. La información atómica se obtiene a partir de dos regiones del espectro, que son la de rayos X y la ultravioleta/visible. Los espectros atómicos de esta última se consiguen tratando la muestra térmicamente a una temperatura lo suficientemente alta como para mantener los átomos en su estado fundamental, obteniendo una mezcla gaseosa. A partir de la absorción, emisión o la fluorescencia de esta mezcla es posible determinar cuantitativa y cualitativamente los elementos que hay en la muestra (Robinson, J. W., 1996).

1.4. **Papel del K^+ en la maduración del fruto**

En primer lugar, cabe destacar que el fruto de fresa es un modelo de fruto no climatérico, lo cual significa que su tasa respiratoria se mantiene aproximadamente constante y no tiene un pico de concentración de etileno como consecuencia de un proceso autocatalítico con respecto a la concentración basal, hormona que en frutos climatéricos es esencial para que se produzca la maduración (Symons *et al.*, 2012).

Los principales estudios sobre la dinámica del K^+ en la maduración del fruto se centran en bayas de uva. En este fruto, a medida que la uva alcanza su peso máximo durante las últimas etapas de maduración, la acumulación de K^+ se hace más lenta hasta ser suspendida. Esto se debe al cese del flujo del floema que ocurre en este proceso y, por lo tanto, de la importación de azúcar y K^+ a la baya, así como también se ve menguado el flujo del xilema. La ruptura de la integridad de la membrana de las células del mesófilo suprime el gradiente de presión que impulsaba el flujo del floema, por lo que así se detiene la acumulación del ion potasio (Rogiers *et al.*, 2017). A nivel molecular, se han identificado dos genes que codifican transportadores de K^+ de alta afinidad, cuya expresión disminuye durante la maduración y que podrían estar relacionados con la disminución del K^+ en estadios maduros (Davies *et al.*, 2006). De igual

forma, en melocotón se han identificado 16 transportadores de K⁺, algunos de los cuales podría estar relacionado con la firmeza del fruto (Song et al., 2015).

En el caso de la fresa, se ha demostrado la relación directa entre el potasio y la maduración, ya que este proceso se encuentra regulado por *FaKAT1*, un canal de potasio inducido por ABA, de modo que, si este canal es bloqueado, no solo se inhibe la expresión de este, sino que se observa una significativa disminución del coloreado rojo del fruto, así como de otros genes relacionados con la maduración (Song et al., 2016).

1.5. Genotipos de fresa de estudio

Los frutos de fresa de estudio han sido de la variedad ‘Chandler’ sin transformar, frutos de la misma variedad transformadas con una secuencia antisentido del gen *FaPG1* (línea PG29; Quesada et al., 2009), así como frutos de plantas con el gen *FaPG1* editado mediante CRISPR/Cas9 (línea 18A37; resultados no publicados).

El fruto de la fresa sufre un rápido ablandamiento durante la maduración. Por ello, se estudió la actividad de la poligalacturonasa (PG), una enzima hidrolítica de la pared celular fundamental en el proceso de maduración del fruto, implicada principalmente en la despolimerización de pectinas (Paniagua et al., 2020; Quesada et al., 2009). En el estudio de Quesada et al., 2009 se obtuvieron líneas transgénicas que contenían una secuencia antisentido del gen *FaPG1* de PG y se demostró que este gen tiene un papel central en el ablandamiento de la fresa en la maduración. Una de las líneas, PG29, obtuvo muy buenos resultados respecto a la firmeza del fruto, con una reducción evidente de la actividad de PG, por lo que fue seleccionada. Un estudio transcriptómico de frutos maduros de estas líneas transgénicos mostró que en estos frutos se inducía un gen que codifica un transportador de K⁺ de alta afinidad de tipo HAK (Paniagua et al., 2020). De esta forma, la degradación de la pared celular inducida por *FaPG1* podría modificar la expresión de transportadores de K⁺, variando el flujo de este ion, y conjuntamente al desmantelamiento de la pared celular, contribuir al reblandecimiento del fruto.

Del mismo modo, se escogió la línea 18A37 por tener el mismo gen (*FaPG1*) silenciado, en este caso, mediante CRISPR/Cas9, y así poder comprobar si existían diferencias en el contenido de potasio entre ambas líneas obtenidas de distinta forma. Los resultados que llevaron a la creación de la línea transformada 18A37 aún no han sido publicados.

2. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto experimental de fin de Máster es determinar y comparar el contenido de potasio en distintos estadios de maduración del fruto de fresa mediante técnicas electrofisiológicas y espectrometría atómica (EAT). Para ello, se han utilizado fresas control no transgénicas, de la variedad ‘Chandler’, y frutos de plantas transgénicas de la misma variedad que tienen silenciado por antisentido (línea PG29) o editado mediante CRISPR/Cas9 (línea 18A37) un gen de poligalacturonasa. Estos frutos presentan una menor tasa de reblandecimiento durante la maduración y una vida poscosecha más prolongada. Se ha escogido este fruto por ser una de las frutas pequeñas más importantes a nivel comercial y, además, ser una planta modelo para el estudio de la maduración de frutos no climatéricos.

Para llevarlo a cabo, se han fijado objetivos específicos que consisten en:

- Optimizar la medida del potencial de membrana de células del fruto de fresa en dos estadios de maduración, verde y blanco, a través de técnicas electrofisiológicas.
- Estimar las concentraciones de potasio citosólico a partir de las medidas de potencial de difusión.
- Analizar la concentración de iones en fruto de fresa en dos estadios de maduración, verde y rojo, mediante EAT.

3. Material y Métodos

3.1. Material vegetal

Para la realización de este trabajo se han utilizado frutos de fresa, *Fragaria x ananassa* Duch., cv. ‘Chandler’. Además, se utilizaron frutos de fresa de la misma variedad transformadas con una secuencia antisentido del gen *FaPGI* (línea PG29; Quesada *et al.*, 2009), así como frutos de plantas con el gen *FaPGI* editado mediante CRISPR/Cas9 (línea 18A37; resultados no publicados). Asimismo, todas las plantas se cultivaron en invernadero de confinamiento con fotoperiodo natural y sin control de temperatura, en las instalaciones del IFAPA en Churriana.

En el caso de las muestras utilizadas para electrofisiología, al necesitar que el fruto esté recién obtenido de la planta, estas se trasladaron desde el invernadero a un fitotrón junto al laboratorio de electrofisiología, donde se mantuvieron durante 2-4 días con fotoperiodo de 16 h de luz y 25°C. Los frutos se muestrearon en estadio verde, blanco y rojo (totalmente maduro).

En cambio, para la EAT se emplearon muestras en estadio verde y rojo para realizar una comparación entre estadios de maduración lo más lejano posible entre sí. Además, cabe destacar que los frutos se transportaron cortados por el peciolo y, en el caso de las fresas en estadio verde, se procesaron en el mismo día y las de estadio rojo de maduración fueron congeladas con nitrógeno líquido para posibilitar su procesamiento.

3.2. Obtención del contenido de potasio a través de técnicas electrofisiológicas

En la realización de esta técnica es imprescindible disponer de un puesto de electrofisiología que disponga de los medios necesarios para introducir de forma precisa un electrodo en la célula (**Fig. 4**). Este consiste principalmente en un microscopio óptico con micromanipuladores, un sistema de cableado para los electrodos unido a la máquina de medida de potencial y a la de registro, un conjunto de tubos para añadir los distintos tratamientos, un sistema de succión para retirar el medio sobrante, y una cámara metálica alrededor del puesto para evitar las interferencias electromagnéticas en la medida del potencial.

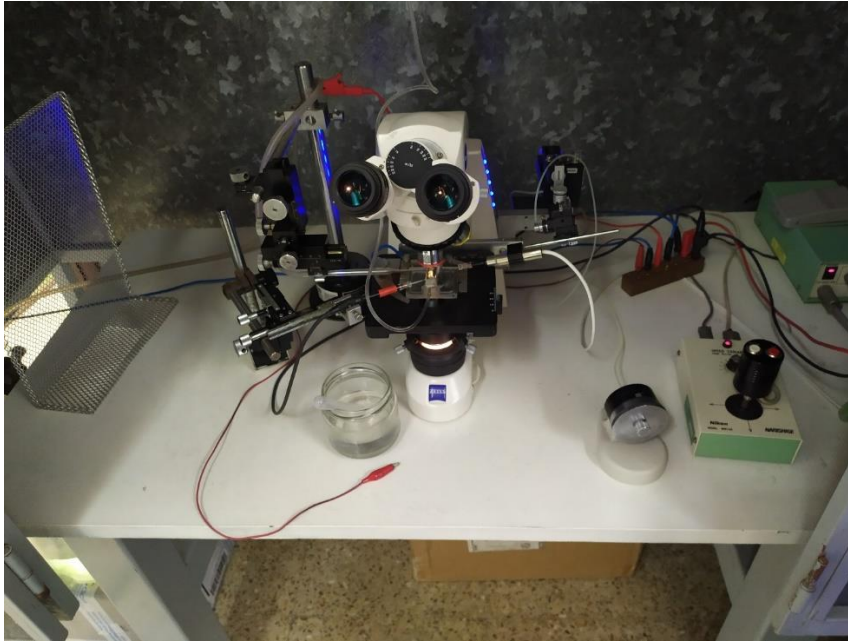


Figura 4. Puesto preparado de electrofisiología.

En primer lugar, se preparó un medio base ajustado a las necesidades de la célula del fruto de fresa. Para la medida del potencial de membrana es necesario bañar el tejido con una solución con un potencial hídrico similar al celular, para así evitar daños durante la introducción del microelectrodo. En el caso del fruto de fresa, el potencial hídrico varía entre -0.5 a -1 MPa, por lo que se diseñó una solución conteniendo una base de agua destilada con 2 mM de CaCl_2 , 0,1 mM de KCl, y dos tampones biológicos para obtener un pH estable de 5,7, el idóneo para la fresa, con 2 g/L de tampón MES y 0,35 g/L de tampón Bis-Tris, y se comprobó que no dañaba osmóticamente al tejido.

A continuación, se procedió al montaje de la muestra de fresa. Se recogió cada fruto, cortándolo directamente de la planta por el peciolo; se le realizó una foto con un sistema de medida para llevar un registro del tamaño de cada fruto (**Fig. 5**); y después se pesó. Al finalizar esta labor, con la ayuda de un bisturí, se cortó de manera oblicua una lámina muy delgada en forma de bisel en la zona central del fruto. Sucesivamente, se colocó la muestra sobre el portaobjetos de montaje, se fijaron los extremos con parafina usando un soldador, se situó el cubreobjetos y se rellenó el espacio interior con medio base.

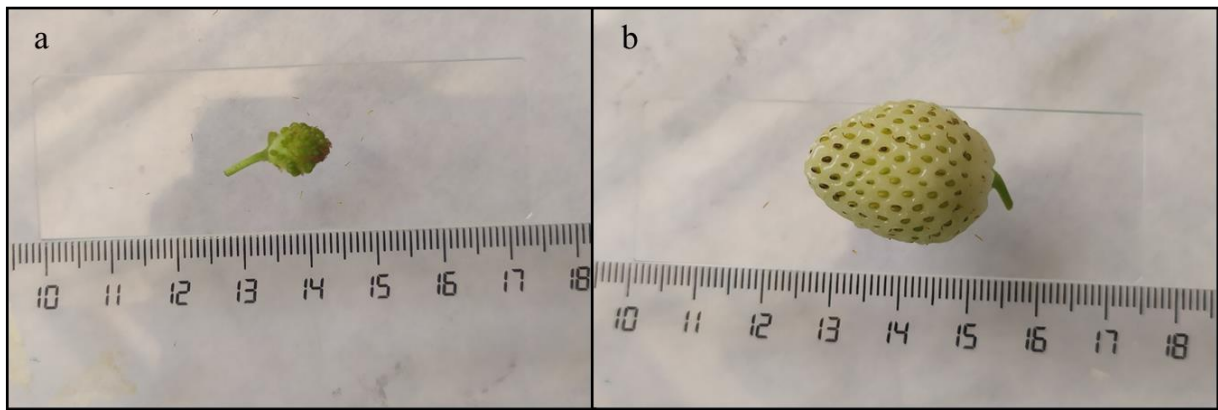


Figura 5. Ejemplos de fotografías tomadas de los estadios de maduración del fruto de fresa verde y blanco.

En esta técnica se utilizan dos tipos de electrodos: los de referencia (también llamados electrodos tierra) y los de medida. Los electrodos de medida se fabricaron a partir de un capilar de vidrio del cual se cortaron fragmentos de 7 centímetros con los extremos lisos; después se fijaron dichos extremos en el extractor de microelectrodos de vidrio (Glass microelectrode Puller, **Fig. 6**) y se encendió. Se retiraron con la ayuda de unas pinzas y se dejaron listos en un soporte para ser empleados en el puesto de electrofisiología. Para los electrodos de referencia, se utilizaron electrodos de medida usados con la punta suficientemente rota, lavados con agua destilada. Se les introdujo por medio de una jeringa con un tubo de silicona una solución KCl 0,5 M con 3% de Agar preparada al baño maría a 80°C y 200 rpm aproximadamente.



Figura 6. Extractor de microelectrodos de vidrio (Glass microelectrode Puller).

Para la preparación del puesto de electrofisiología, se hizo pasar el medio base a través de todo el sistema de tubos, que a continuación iría conectado al tubo metálico del portaobjetos de montaje, de modo que la muestra quedaría sumergida en el medio. Se ajustó la pipeta de succión para que fuera eliminando el medio sobrante, ya que este llevaría un flujo continuo para mantener las propiedades estables. Hecho esto, se enfocó la muestra con el macrométrico y el micrométrico del microscopio, colocada con el bisel hacia la derecha (**Fig. 7**).

El electrodo tierra preparado se insertó en el soporte (holder) de tierra, el cual se rellenó previamente con solución 0,5 M de KCl, y se situó en el lado izquierdo del microscopio fijándose al micromanipulador y, con su ayuda, se introdujo la punta del electrodo en el medio base externo a la muestra.

En el caso del electrodo de medida, se rellenó el soporte (holder) y el propio electrodo con solución 0,5 M de KCl a través de una jeringa y se ajustaron al micromanipulador de la derecha del microscopio. Este posee un mando especial con forma circular mucho más preciso para la inserción de la punta del electrodo dentro de la célula.

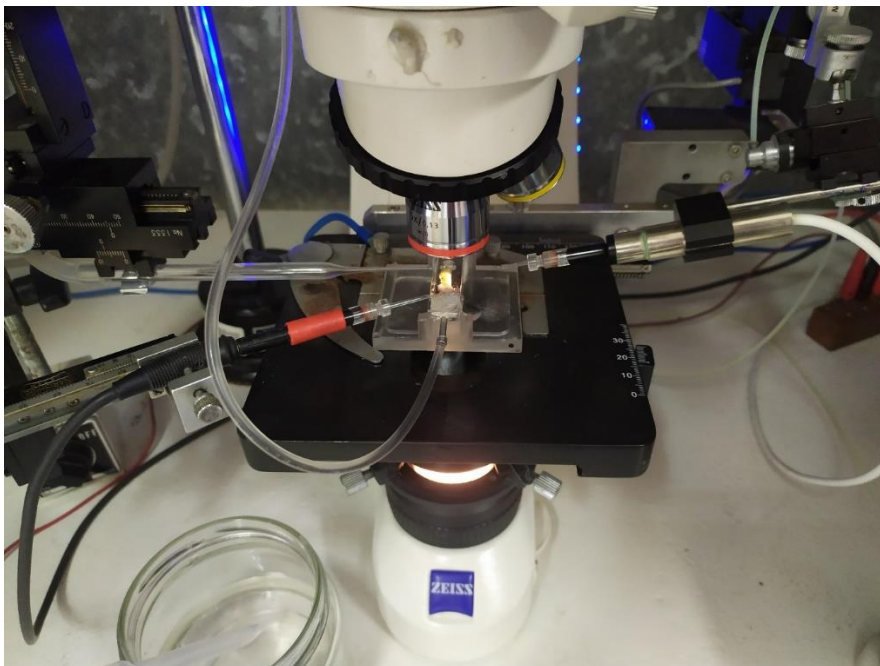


Figura 7. Colocación de la muestra en el microscopio del puesto de electrofisiología. El bisel del tejido debe ir orientado a la derecha, puesto que es por donde se insertará el electrodo de medida.

Antes de dicha inserción, se encendió la máquina de registro, se le enganchó la plumilla y se puso el papel a andar para que quedase registrado el potencial que se obtuviese. En el papel de registro se indicaron datos como la fecha, el medio, el tipo de fresa y el estadio de

maduración. Además, el voltímetro digital se activó pulsando “Operate”, en la cual se iría observando el potencial obtenido hasta conseguir uno aproximadamente estable, según se acercaba lentamente el electrodo de medida a la célula (**Fig. 8**).

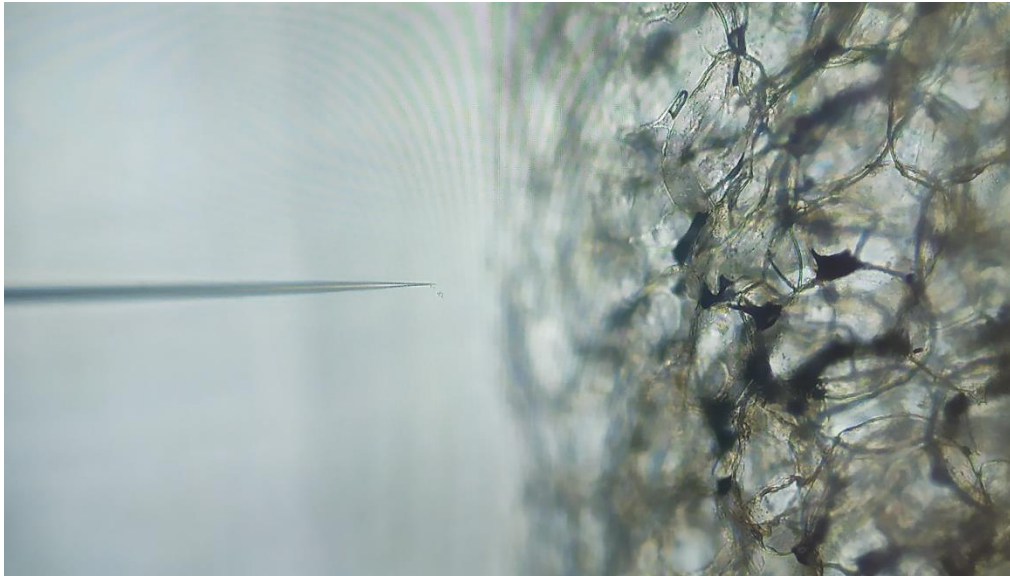


Figura 8. Observación al microscopio de una muestra del tejido de fresa previa a ser introducido el electrodo de medida en una de las células.

Una vez conseguida la inserción, es decir, un potencial de membrana estable se procedió a añadir distintos tratamientos y observar y registrar los cambios en el potencial. Los tratamientos empleados primeramente consistieron en saltos hacia una mayor concentración de potasio extracelular, todos ellos con una cierta cantidad de cianuro y SHAM, al objeto de obtener el potencial de difusión, para después regresar gradualmente al medio base. El primer salto fue una solución del medio base con 0,1 mM de NaCN y 0,1 mM de SHAM sin cambio en la concentración de potasio, es decir, con 0,1 mM de KCl; el segundo llevaba la misma concentración de cianuro y SHAM, pero a 1 mM de KCl; y el tercero igual, pero a 10 mM de KCl; siempre anotando los potenciales a los cuales se realizaban los saltos.

Los potenciales quedaron registrados en el papel de registro y dichos valores fueron trasladados a un Excel para su posterior procesamiento. Con los valores de potencial de difusión a 10 mM de KCl se calculó el contenido de potasio a través de la Ecuación de Nernst, despejándolo de ella. Conociendo el dato de concentración de potasio extracelular, es decir el del medio que es 10 mM, y suponiendo que el potencial de difusión sea el mismo que el de potencial de potasio en el equilibrio por considerar despreciables los potenciales en el equilibrio de los demás iones, se pudo calcular cuál sería la concentración de potasio en el interior celular.

3.3. Determinación de concentración iónica mediante espectrometría atómica (EAT)

Para realizar la determinación de la concentración iónica mediante EAT, el primer paso a seguir tras la recogida de los frutos fue su fotografiado con un sistema de medida para dejar constancia de su tamaño y su color (**Fig. 9**).

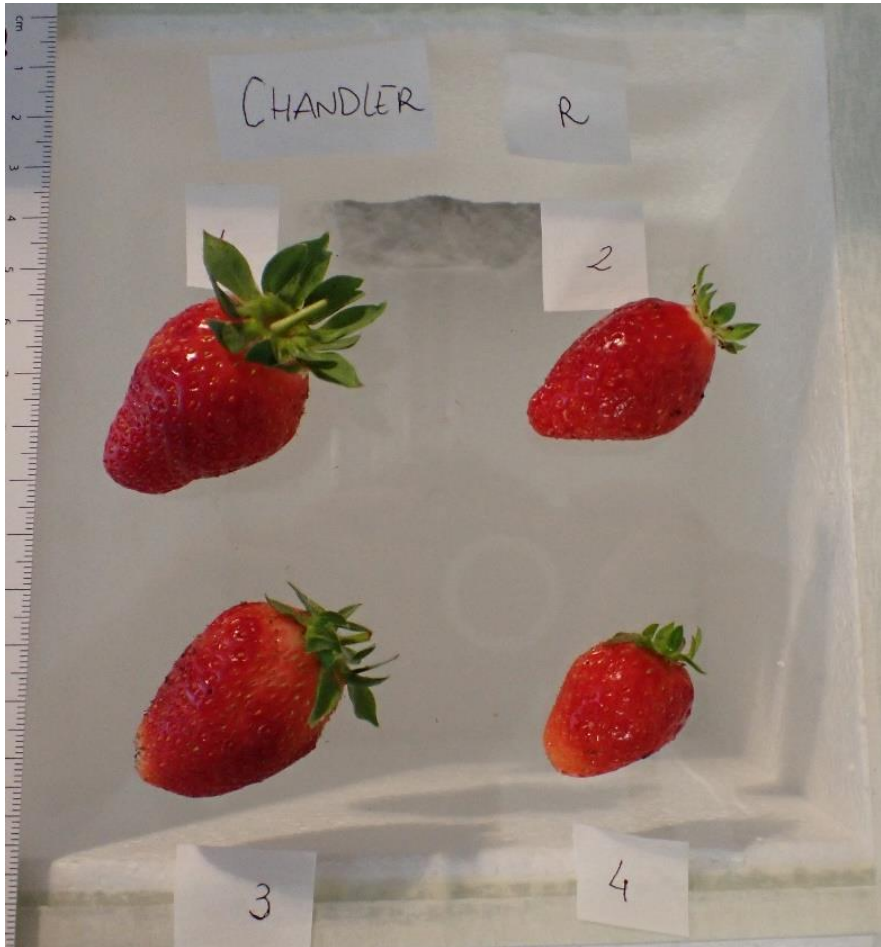


Figura 9. Ejemplo de fotografía tomada de los frutos de fresas control de Chandler en estadio rojo utilizados para la EAT.

A continuación, se llevó a cabo la desaquenización de los mismos, que consistió en eliminar, con la ayuda de un bisturí y unas pinzas, todos los aquenios para así obtener la medida de concentración de potasio concreta del receptáculo. En el caso de las fresas en estadio rojo de maduración, fue necesaria su congelación con nitrógeno líquido para no acabar con la integridad del tejido durante su procesado (**Fig. 10**).

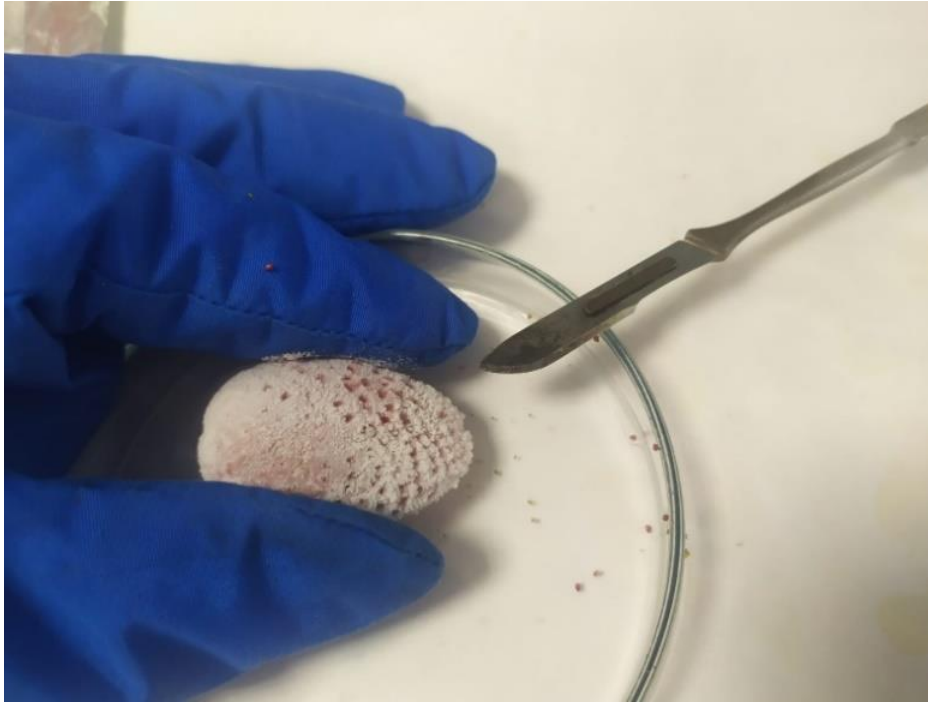


Figura 10. Desaqueñización de una fresa en estadio rojo utilizando nitrógeno líquido.

Sucesivamente, se procedió a la desecación de los receptáculos en una estufa a 80°C durante, al menos, 4 días para asegurar su deshidratación completa; tras haberse pesado antes y cada día durante el proceso del desecado. Cuando el peso no varió entre pesadas, se consideraron deshidratadas, se sacaron de la estufa y se prosiguió con su machacado en un mortero y su almacenaje en tubos Eppendorf rodeados de gel de sílice para evitar su rehidratación.

Reunidas las muestras correspondientes, se envió a la Unidad de Espectrometría Atómica de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) para su procesamiento mediante espectrometría atómica y, de este modo, obtener los datos de concentración de potasio; así como los de otros iones y elementos químicos de gran interés.

3.4. Análisis estadístico de los resultados

En el caso de los datos de concentración de potasio calculados a partir de los potenciales de difusión obtenidos por electrofisiología, se realizó una ANOVA de doble vía con múltiples comparaciones, puesto que había dos factores a analizar. Por un lado, el estadio de maduración de la fresa, en este caso, por motivos metodológicos de la técnica, con las opciones verde y blanco; y por el otro, el genotipo de fresa ya fuese el control sin transformar, PG29 o 18A37. La razón por la cual se realizó un análisis doble fue tanto para poder comparar significativamente entre genotipos en cada estadio de maduración como para distinguir entre los dos estadios de maduración dentro de cada genotipo.

Para los resultados del EAT se optó también por un ANOVA de doble vía con múltiples comparaciones debido a que, igualmente, existían estos dos factores, el estadio de maduración y el genotipo de fresa. Pero a diferencia de la otra técnica, los posibles estadios eran verde y rojo y, las variedades que se analizaron fueron Chandler y PG29. Del mismo modo, el ANOVA tenía la finalidad de comparar significativamente entre genotipos dentro de cada estadio, así como entre los dos estadios en Chandler y en PG29.

4. Resultados

4.1. Electrofisiología

Los primeros ensayos se realizaron con frutos maduros, con el 80-100% de la superficie del fruto de color rojo. Sin embargo, no se lograron obtener registros válidos debido a la poca consistencia del tejido. Aunque en algunos casos se llegaron a registrar potenciales de membrana en torno a -80 mV, la señal no se mantenía estable y no permitía llevar a cabo los ensayos propuestos. A diferencia de los frutos maduros, sí se logró obtener registros fiables con secciones de frutos en estadio verde y blanco (**Fig. 11**).

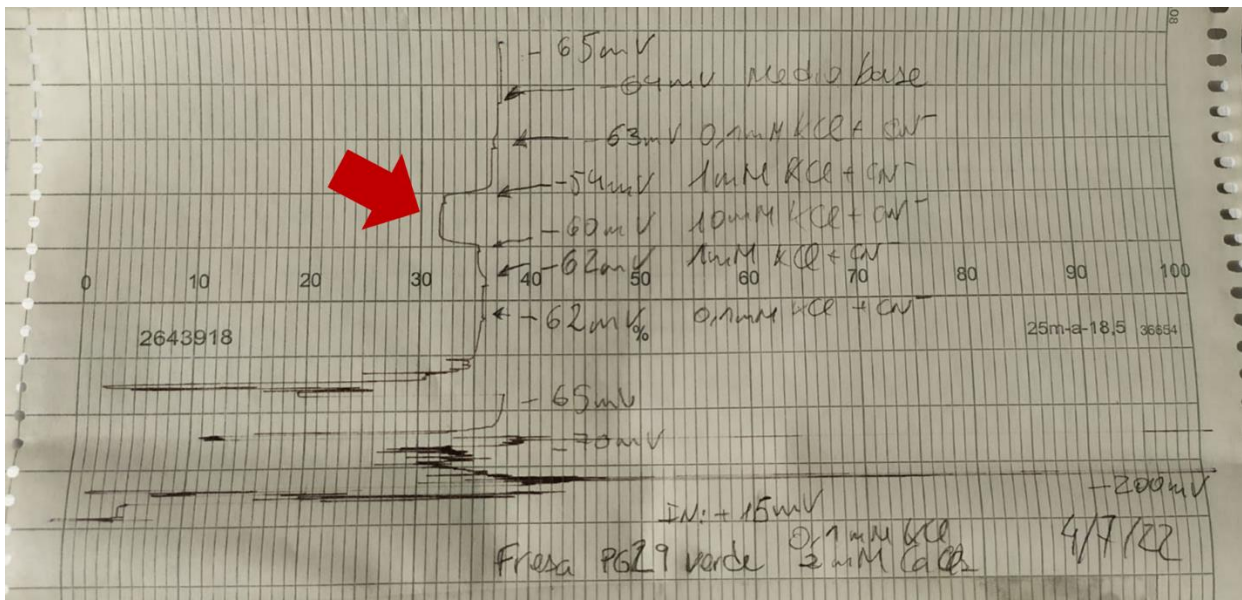


Figura 11. Ejemplo de registro obtenido de la medición del potencial de membrana y de los potenciales de difusión a distintas concentraciones de potasio extracelular (medios $0,1$ mM, 1 mM y 10 mM de KCl). La flecha señala la visible despolarización producida por el tratamiento a 10 mM de potasio.

Los resultados de potencial de membrana y de potencial de difusión fueron recogidos de los distintos tratamientos que se realizaron en todos los genotipos de estudio y los dos estadios utilizados. Consecuentemente, se midió por una parte el potencial de membrana en el medio base (Em), y por otra parte el potencial resultante de exponer el tejido a cianuro y SHAM, es decir, el potencial de difusión (ED), a distintas concentraciones de potasio extracelular ($0,1$ mM KCl, 1 mM KCl y 10 mM KCl).

En los frutos control (**Fig. 12**), el E_m más negativo se obtuvo en los frutos verdes, observándose un claro incremento del mismo (valores menos negativos) en fruto blanco. De igual forma, el ED, a las tres concentraciones de K^+ ensayadas, fue más negativo en fruto verde que en blanco.

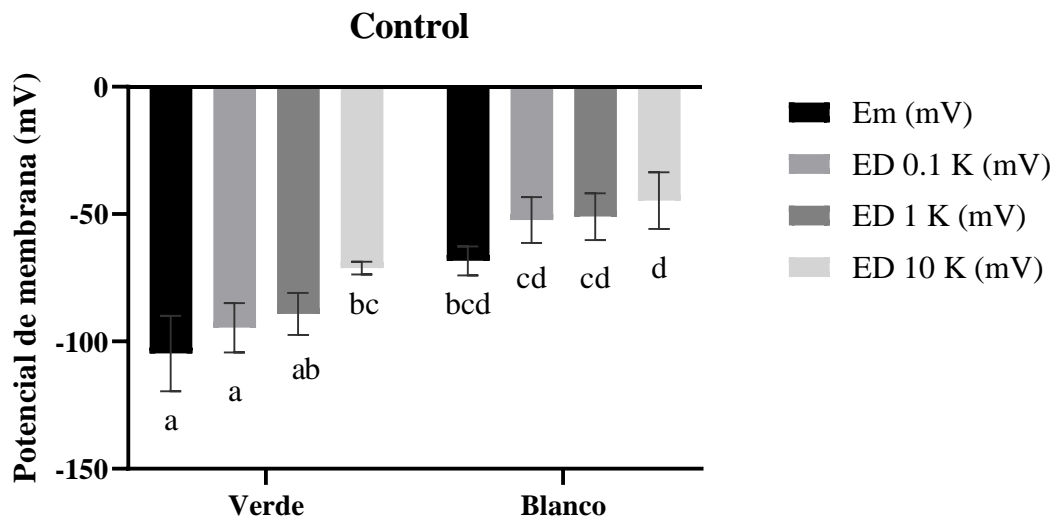


Figura 12. Potencial de membrana en los distintos medios a los que se expuso el tejido de la fresa Control en cada estadio de maduración (verde y blanco). **Em** indica potencial de membrana en el medio base, y **ED** representa el potencial de difusión en las diferentes concentraciones de potasio del medio empleado (0,1 mM K, 1 mM K y 10 mM K). Valores con la misma letra en cada gráfica indican que no se observan diferencias significativas entre ellos a $P < 0,05$.

A diferencia de los frutos control, en los frutos transformados (**Fig. 13**) no se observaron diferencias en los valores de E_m entre los dos estadios analizados, siendo estos valores significativamente inferiores a los de fruto verde control y similares a los obtenidos en frutos blanco control. En ambas líneas transformadas, los valores de ED fueron similares al de E_m . Solo en presencia de 10 mM de K^+ se observó un incremento de ED. Los valores menos negativos tanto de E_m como de ED se obtuvieron en la línea 18A37 (**Fig. 13**).

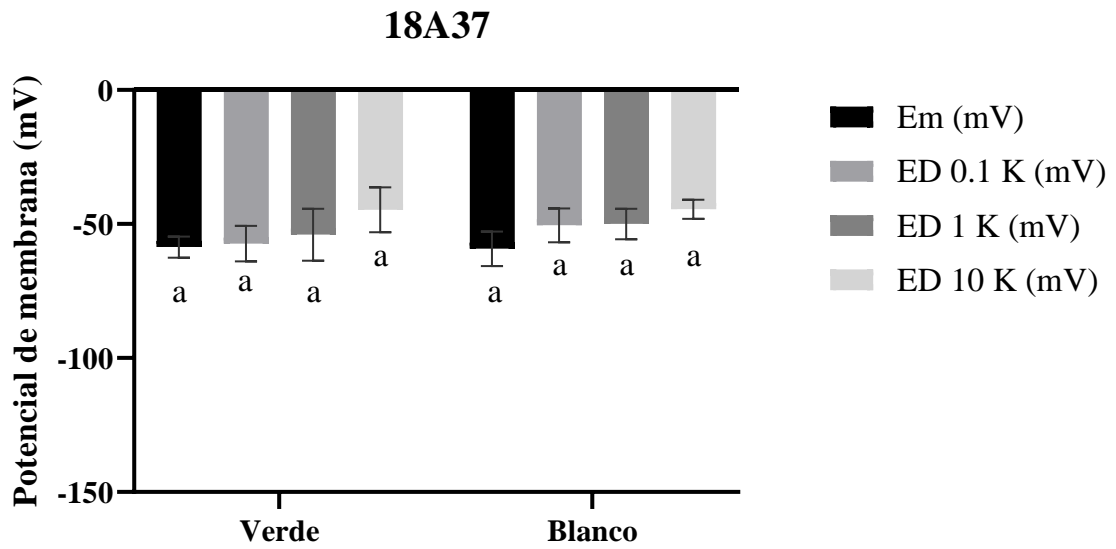
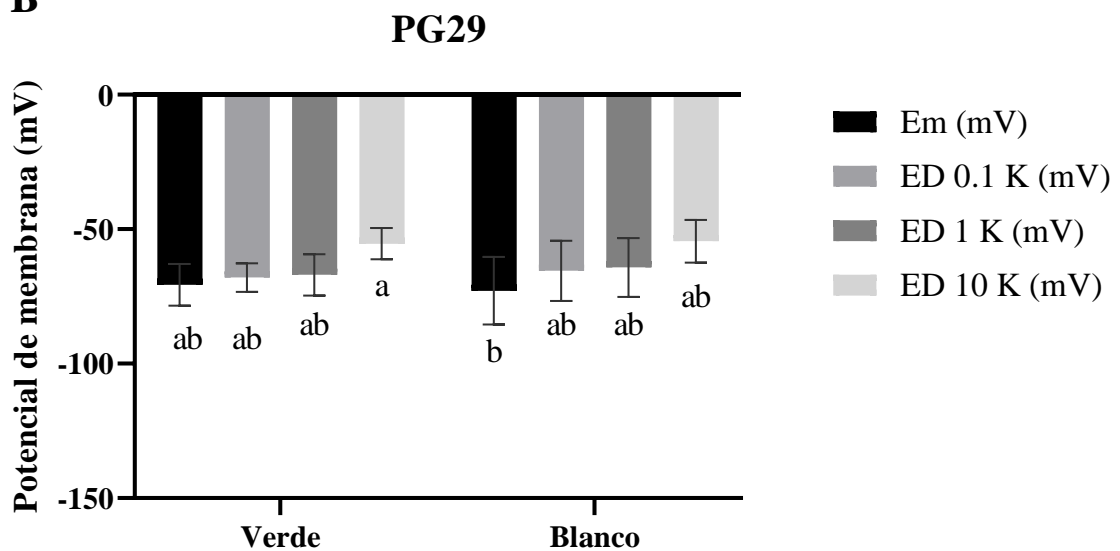
A**B**

Figura 13. Potencial de membrana en los distintos medios a los que se expuso el tejido de la fresa transformada 18A37 (gráfica **A**) y las transgénica PG29 (gráfica **B**) en cada estadio de maduración (verde y blanco). **Em** indica potencial de membrana en el medio base, y **ED** representa el potencial de difusión en las diferentes concentraciones de potasio del medio empleado (0,1 mM K, 1 mM K y 10 mM K). Valores con la misma letra en cada gráfica indican que no se observan diferencias significativas entre ellos a $P < 0,05$.

Con los valores de potencial de difusión obtenidos del tratamiento con cianuro y SHAM, a 10 mM de potasio, se realizaron los cálculos para conseguir los datos de concentración de potasio citosólico a través de la ecuación de Nernst, ya que este es el medio que más se acercaría al potencial de equilibrio del potasio.

En la **Fig. 14**, se encuentran representados los resultados de concentración de potasio citosólico obtenido del cálculo a partir de los potenciales de difusión a través de la Ecuación de Nernst. En la **Fig. 14A** se representan los resultados obtenidos agrupados según el genotipo para, de este modo, poder comparar los dos estadios de maduración analizados. Se aprecia una clara diferencia entre los estadios del control sin transformar, en la que la concentración de potasio en el estadio verde es significativamente mayor que en blanco. En el caso de los genotipos 18A37 y PG29 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos estadios de maduración. En la **Fig. 14B** se representan los mismos datos, pero agrupados por estadio para comparar los tres genotipos en cada estadio de maduración. En estadio verde, los frutos control contenían una concentración de K^+ aproximadamente un 45% mayor que la de los frutos transgénicos. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en el estadio blanco en ninguna de los tres genotipos. Tanto en el estadio verde como en el blanco, los valores medios parecen indicar que hay mayor concentración de ion potasio en PG29 que en 18A37, aunque esta diferencia no esté apoyada estadísticamente.

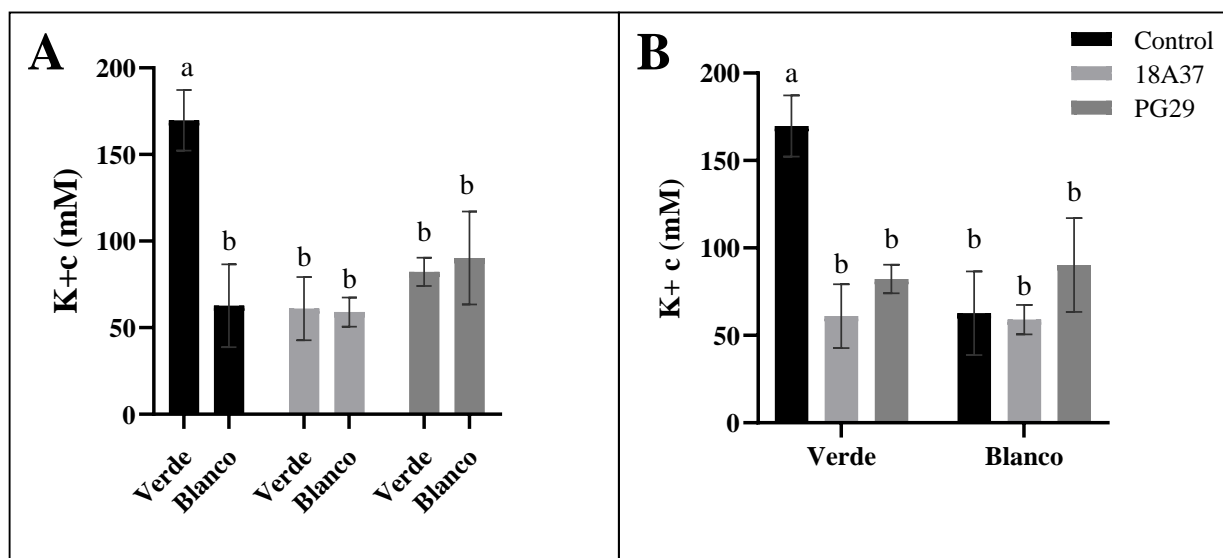


Figura 14. Concentración de potasio citosólico de los genotipos, Control, 18A37 y PG29 en dos estadios de maduración, denominados verde y blanco. Se realizó un ANOVA de doble vía y se dispusieron los datos en dos gráficas. En la gráfica **A**, se pueden comparar los estadios de maduración (verde y blanco) en cada genotipo (Control, 18A37 y PG29). En la gráfica **B**, se pueden comparar los distintos genotipos (Control, 18A37 y PG29) en cada estadio (verde y blanco). Valores con la misma letra en cada gráfica indican que no se observan diferencias significativas entre ellos a $P < 0,05$.

4.2. Espectrometría atómica

Para la cuantificación del contenido iónico en frutos verdes y rojos solo se pudieron utilizar frutos control y de la línea transgénica PG29, ya que no hubo frutos disponibles de 18A37.

En la **Fig. 15**, se encuentran representados los datos de concentración de potasio medido en las muestras por espectrometría atómica. Los valores medios de K^+ fueron ligeramente menores en el estadio de maduración rojo que en el verde en ambos genotipos; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas tras realizar un ANOVA de doble vía con comparaciones múltiples.

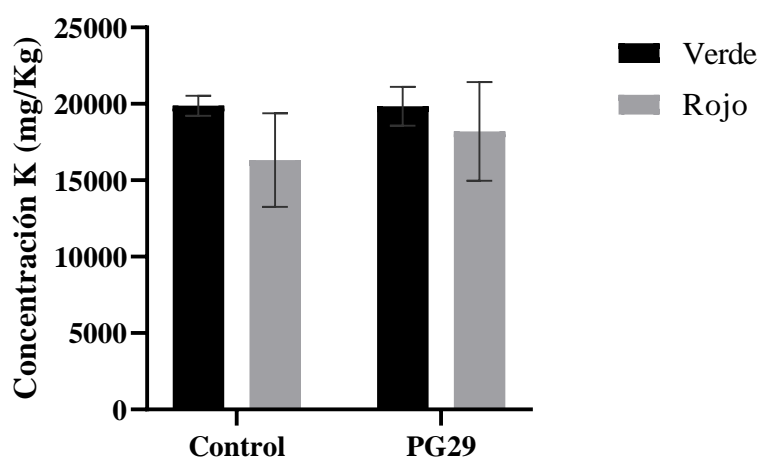


Figura 15. Concentración de potasio en miligramos por cada kilogramo de muestra en los genotipos Control y PG29 en dos estadios de maduración, verde y rojo. No se observaron diferencias significativas entre los datos a $P < 0,05$.

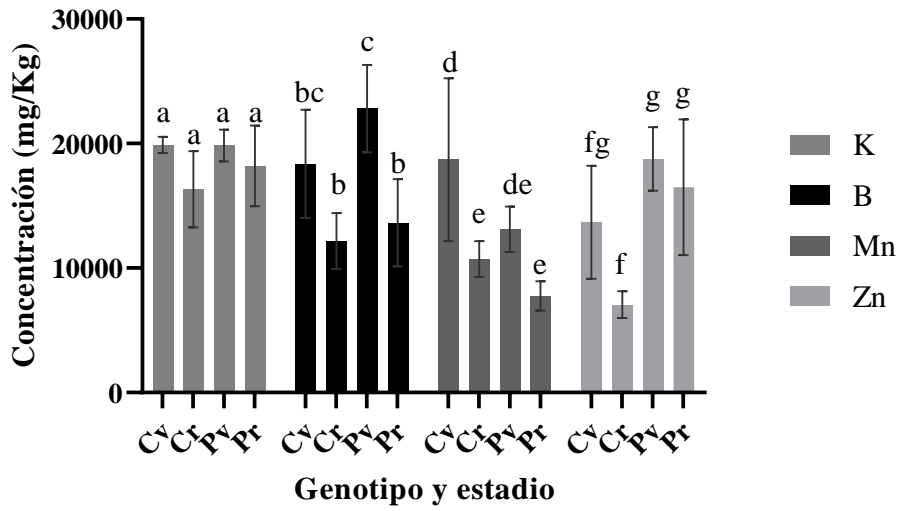
Además del contenido de potasio, se midió la concentración de otros iones mediante EAT representados en la **Fig. 16**; así como otros elementos químicos, en la **Fig. 17**.

Como se ha mencionado, en la **Fig. 16** se encuentran los iones analizados divididos en tres gráficas según su rango de concentración para poder diferenciar mejor los datos. En la **Fig. 16A** tenemos los valores de concentración de potasio (K) que, como se ha observado en la **Fig. 15**, no presenta diferencias estadísticamente significativas; de boro (B), de los cuales podemos concluir que el estadio rojo contiene una menor concentración de B que el estadio verde en los dos genotipos estudiados; de manganeso (Mn), que al igual que el B, hay una disminución de Mn en el estadio rojo respecto al verde en ambos genotipos; y de zinc (Zn), que en este caso la diferencia se encuentra entre el control y PG29 en sus estadios rojos de maduración, ya que este último presenta un valor considerablemente mayor.

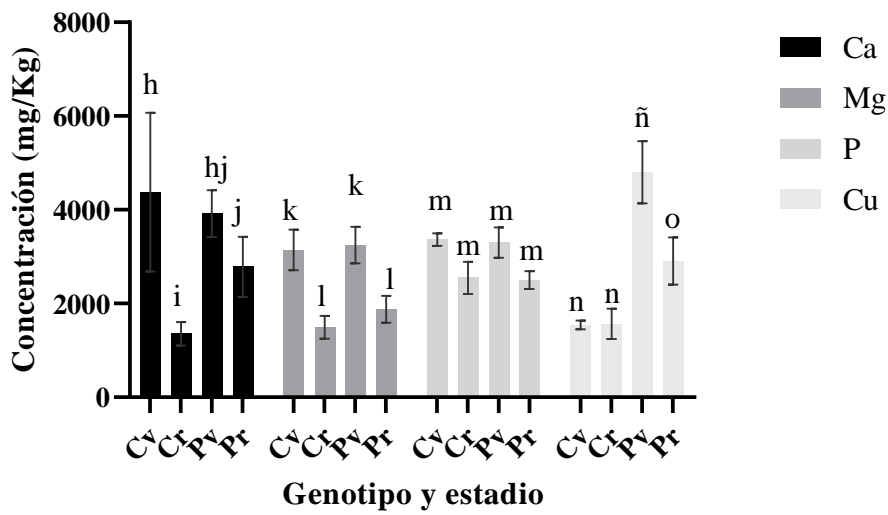
En la **Fig 16B**, se encuentran representados los resultados de calcio (Ca), cuya disminución a lo largo de la maduración solo se presenta en el control; de magnesio (Mg), que tanto en el control como en PG29 experimenta un decrecimiento desde el estadio verde al rojo; de fósforo (P), en los cuales, aunque sus valores medios sugieren que también hay un descenso a lo largo de la maduración en los dos genotipos estudiados, estadísticamente no se han encontrado diferencias significativas; y de cobre (Cu), cuya concentración no varía en el control, pero en PG29 disminuye visiblemente en el estadio rojo y, además, es considerablemente mayor en ambos estadios que en el control.

Acabando el análisis acerca de los iones, en la **Fig. 16C** podemos observar los valores de concentración del sodio (Na), que solo presentan un descenso significativo durante la maduración en el control; y del hierro (Fe), los cuales nos muestran que no hay diferencias significativas entre los genotipos ni los estadios analizados.

A



B



C

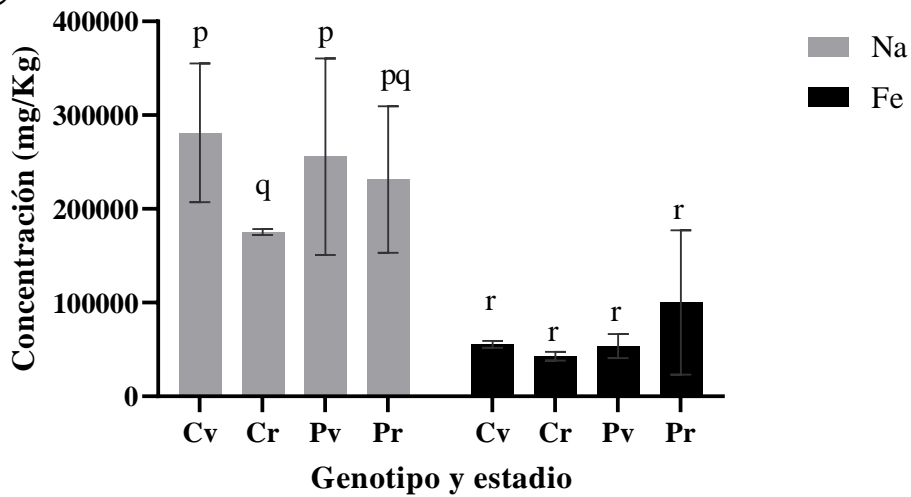


Figura 16. Concentración de los iones analizados en miligramos por cada kilogramo de muestra en los genotipos Control (Cv y Cr) y PG29 (Pv y Pr) en dos estadios de maduración, verde (v) y rojo (r). Valores con la misma letra en cada agrupación indican que no se observan diferencias significativas entre ellos a $P < 0,05$. Se han utilizado letras distintas para cada ion. Se han agrupado los iones en las gráficas **A**, **B** y **C** según su rango de concentración para poder observar mejor las diferencias.

Por último, se midió el contenido de 4 elementos químicos en forma de porcentaje de masa. Estos resultados se muestran en la **Fig. 17** y se puede observar en ellos que el carbono (C) manifiesta en el estadio verde una mayor concentración en el control que en PG29, así como un descenso en el control a lo largo de la maduración; que en el caso del hidrógeno (H) no podemos considerar que haya diferencias significativas entre el control y PG29 ni entre los estadios verde y rojo de ninguno de los genotipos; que en el nitrógeno (N) podemos ver una disminución de su contenido conforme avanza la maduración del fruto tanto en el control como en PG29 y que este decrecimiento es más pronunciado en PG29; y, finalmente, que el azufre (S) no presenta diferencias significativas en sus valores de porcentaje en los genotipos ni los estadios estudiados.

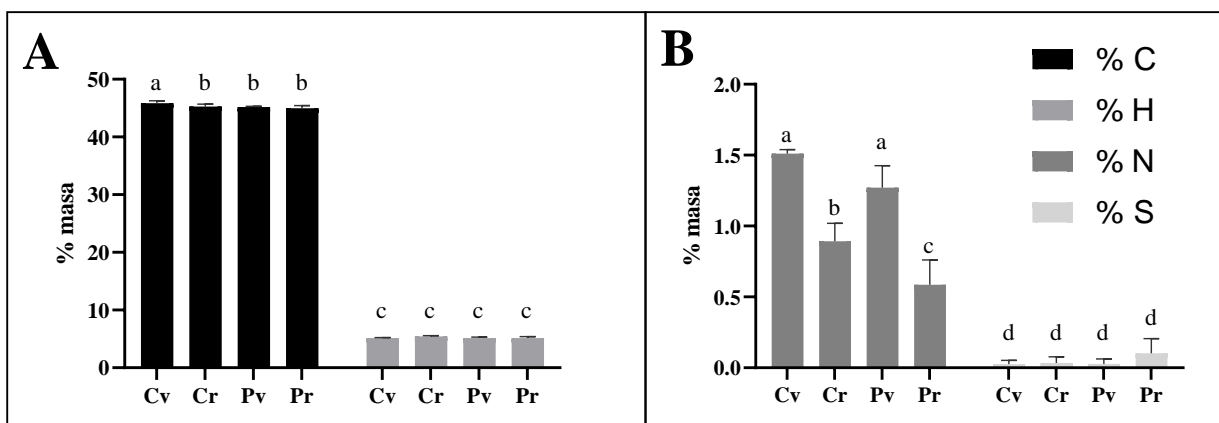


Figura 17. Porcentaje de carbono (C), hidrógeno (H), nitrógeno (N) y azufre (S) de la masa de muestra en los genotipos Control (Cv y Cr) y PG29 (Pv y Pr) en dos estadios de maduración, verde (v) y rojo (r). Valores con la misma letra en cada gráfica indican que no se observan diferencias significativas entre ellos a $P < 0,05$.

5. Discusión

5.1. El K⁺ citosólico disminuye conforme avanza la maduración del fruto en fresas control

Hasta la fecha, no se han descrito valores de Em o ED en células de frutos debido a las dificultades técnicas que presenta este tejido. En este trabajo se ha logrado cuantificar ambas variables en frutos de fresa en estadio verde (inmaduro) y blanco (inicio de maduración). Sin embargo, no fue posible determinar el Em en fases de maduración más avanzadas ya que el tejido era muy poco consistente y las células se rompían tras introducir el electrodo. A pesar de no tener una visión completa del todo el proceso de maduración, los resultados obtenidos son relevantes por la ausencia de datos similares en la bibliografía.

Según el potencial de difusión obtenido en las muestras de frutos de fresa control sin transformar, el contenido del ion potasio en el citosol sufre un descenso a medida que la maduración progresa. Tal y como presentaba el estudio de Rogiers *et al.* (2017), en la baya de uva ocurría algo similar. Esto era debido a que el flujo del floema se ralentiza conforme avanza el proceso debido a la ruptura de la integridad de las membranas celulares del mesófilo y, por tanto, del gradiente de presión que permitía el flujo del floema; esto provoca que progresivamente se vayan importando menos azúcares y otros solutos como el potasio. Es muy probable que, al igual que ocurre en la uva, el fruto de fresa sufra este proceso y también se detenga la acumulación de potasio en el mismo.

5.2. El K⁺ citosólico en el estadio temprano está significativamente más presente en fresas control que en fresas transformadas con un gen de poligalacturonasa silenciado

La poligalacturonasa (PG) es una enzima hidrolítica de la pared celular implicada principalmente en la despolimerización de las pectinas que tiene un papel fundamental en la maduración. La línea transgénica obtenida en el estudio de Quesada *et al.* (2009) que contiene una secuencia antisentido del gen *FaPG1* de PG y la línea 18A37, con el mismo gen silenciado mediante CRIPR/Cas9, presentan una evidente reducción de la actividad de PG.

Con los resultados de este trabajo en los que observamos que la concentración del ion potasio en el citosol en estadios de maduración tempranos (verde) es considerablemente superior en fresas control que en fresas con el gen *FaPGI* silenciado, ya sean de la línea PG29 o la 18A37, podríamos suponer que la PG tiene alguna influencia directa en el contenido de potasio en la fase más temprana de la maduración. Como hemos visto, en fases más tardías de este proceso, el aporte de K^+ a la célula por medio del floema es ralentizado hasta su detención, con lo cual este efecto de la PG sería menos o nada manifiesto. De este modo, sería posible proponer que la PG, al ser en gran medida la responsable de la degradación de la pared celular, y encontrándose perfectamente presente en las fresas control sin transformar, de algún modo facilita la acumulación del ion potasio en el citosol de la célula en fases tempranas de la maduración del fruto de fresa. Por otro lado, a pesar de que en las líneas transgénicas PG29 se induce un gen que codifica un transportador de tipo HAK de K^+ en frutos maduros (Paniagua et al., 2020), esto no se traduce en una acumulación de K^+ , al menos en fruto en estadio blanco. Sería necesario determinar los niveles de K^+ citosólico en fruto rojo maduro, pero como hemos señalado anteriormente, la escasa consistencia del tejido supone una limitación técnica muy importante.

5.3. El contenido total de K^+ en el tejido del receptáculo es similar en fresas control y en transgénicas PG29, y en cada uno de estos genotipos a lo largo de la maduración

Los resultados obtenidos para la concentración de potasio en el tejido del receptáculo sugieren que no hay diferencias entre los frutos control sin transformar y las transgénicas PG29 con el gen *FaPGI* silenciado. Como se ha mencionado, la concentración de K^+ citosólico experimenta una disminución durante la maduración; sin embargo, en este caso los datos consisten en el potasio total del tejido desecado, por lo que se podría plantear la hipótesis de que el contenido de potasio total en el fruto por unidad de masa no varía a pesar de que en el citosol esto sí ocurra. De este modo, el K^+ podría haber viajado a otras partes del fruto, como el apoplasto o a la vacuola, cuyo transporte a través del tonoplasto es fundamental durante la maduración de los frutos, como se sugiere en los estudios de Britto and Kronzucker (2008), Leigh (2001), y Walker *et al.* (1996); y así el contenido de potasio total por unidad de masa se podría haber mantenido a través del proceso.

5.4. Otros iones y elementos químicos presentan disminuciones significativas durante la maduración del fruto de fresa

Podemos observar cómo, en los resultados de cuantificación del contenido iónico, la concentración de estos disminuye visiblemente en la mayoría de los casos. Aunque no se va a proceder a un análisis exhaustivo de cada uno de los iones, de forma general se puede suponer que, en su mayoría, estos descensos son debidos a la ralentización del aporte de solutos a través del xilema y del floema que se describe en el estudio de Rogiers *et al.* (2017).

Los análisis realizados a los otros elementos químicos, que son el carbono, el hidrógeno, el nitrógeno y el azufre, han dejado ver que el carbono y el nitrógeno también disminuyen su porcentaje en masa conforme avanza la maduración, probablemente a causa de la degradación de la pared celular y de los polímeros que ocurren en el proceso.

6. Conclusiones

Para concluir, la determinación del contenido de potasio en los distintos estadios de maduración ha arrojado diferencias visibles a lo largo del proceso de la maduración; así como en cuanto a las líneas con distinto genotipo analizadas.

En fresas control sin transformar, observamos una disminución del K^+ citosólico a lo largo de la maduración del fruto, probablemente debido al cese del aporte del floema de solutos a la célula que ocurre en fases tardías de la maduración.

Al principio de la maduración, hay mayor acumulación de K^+ citosólico en fresas control que en fresas con un gen de la poligalacturonasa silenciado (PG29 y 18A37), lo cual podría significar que esta enzima contribuye de algún modo a la acumulación del ion potasio en fases tempranas del proceso.

Además, el tejido del receptáculo de fresas control y transgénicas PG29 presenta un contenido total de potasio similar, además de no presentar diferencias en el proceso de maduración. Es muy probable que el potasio haya sido transportado a otras partes del fruto y, como la medición es del tejido completo, no se muestran las diferencias que encontrábamos con el K^+ citosólico.

Para terminar, el análisis del contenido de los iones ha mostrado un descenso prácticamente en todos los iones; así como en el carbono y en el nitrógeno. Asimismo, la disminución de los iones, al igual que en el caso del K^+ citosólico, puede ser la consecuencia del cese del aporte de solutos por parte del floema y el xilema. La bajada del carbono y del nitrógeno parecen tener un origen en la degradación que ocurre durante la maduración.

7. Perspectivas Futuras

Las investigaciones sobre el proceso de maduración de la fresa siempre tienen un gran potencial de aplicación biotecnológica práctica, puesto que estamos hablando de un fruto de enorme interés comercial y, averiguando los mecanismos que tienen lugar durante el proceso, es posible desvelar nuevas formas de aumentar la vida poscosecha del fruto.

En este trabajo se ha analizado especialmente el contenido del ion potasio por ser el principal macronutriente y el que más efectos ocasiona sobre las funciones de la planta, incluyendo el desarrollo del fruto. Por todo ello, una mayor investigación sobre este ion y sobre la maduración del fruto, así como la relación entre ambos podría arrojar datos de gran utilidad y tendría importantes perspectivas futuras.

De hecho, sería posible realizar un estudio más exhaustivo del K^+ citosólico utilizando otros procedimientos para la medición de estadios más tardíos de la maduración, que por motivos metodológicos no fue factible, ya que las técnicas electrofisiológicas utilizadas terminaban con la integridad del tejido en estos estadios. Esta información sería muy valiosa para completar y corroborar los resultados obtenidos en este trabajo, además de poder aportar nuevos datos sobre el transportador de alta afinidad inducido en las líneas transgénicas.

Otra cuestión que sería muy interesante consistiría en averiguar cuáles y cómo funcionan los transportadores de potasio concretamente en el fruto de fresa a lo largo de la maduración. Como hemos mencionado, el K^+ disminuye en el citosol durante el proceso, pero el potasio total del tejido del receptáculo es constante, por lo que el ion posiblemente esté siendo transportado a la vacuola. Por ende, se podría investigar los transportadores implicados en este proceso y los genes que lo median.

En relación con la enzima que hemos estado analizando a través de transgénicos con un gen de ella silenciado, la poligalacturonasa, sería de gran interés estudiar el efecto que esta puede provocar en la acumulación de K^+ en el citosol en fases tempranas de la maduración. Las líneas transformadas presentan mayor firmeza y menor degradación de sus paredes celulares, por lo que el estudio de este efecto arrojaría nueva información sobre estas líneas.

Por último, otra notable sugerencia de investigación futura consistiría en analizar por qué se produce la disminución de la concentración de la gran mayoría de los iones, así como del porcentaje de la masa de carbono y de nitrógeno conforme progresa la maduración. Se ha propuesto que el cese de aporte del floema y del xilema está directamente relacionado; sin embargo, se podría realizar un estudio más detallado y, una vez que se conozcan las causas que derivan en este descenso, idear planteamientos para alargar la vida útil del fruto una vez cosechado.

Referencias bibliográficas

- Anschütz, U., Becker, D., & Shabala, S. (2014). Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *Journal of plant physiology*, 171(9), 670-687.
- Britto, D. T., & Kronzucker, H. J. (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiologia Plantarum*, 133(4), 637-650.
- Davies, C., Shin, R., Liu, W., Thomas, M. R., & Schachtman, D. P. (2006). Transporters expressed during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development are associated with an increase in berry size and berry potassium accumulation. *Journal of experimental botany*, 57(12), 3209-3216.
- Fernández, J. A., García-Sánchez, M. J., & Felle, H. H. (1999). Physiological evidence for a proton pump and sodium exclusion mechanisms at the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Journal of Experimental Botany*, 50(341), 1763-1768.
- Higinbotham, N. (1973). Electropotentials of plant cells. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 25-46.
- Leidi, E. O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M. T., Cubero, B., Fernández, J. A., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., Quintero, F. J., & Pardo, J. M. (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal*, 61(3), 495-506.
- Leigh, R. A. (2001). Potassium homeostasis and membrane transport. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164(2), 193-198.
- Martinoia, E., Massonneau, A., & Frangne, N. (2000). Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant and Cell Physiology*, 41(11), 1175-1186.
- Quesada M. A., Blanco-Portales R., Pose S., Garcia-Gago J. A., Jimenez-Bermudez S., Muñoz-Serrano A., Caballero J. L., Pliego-Alfaro F., Mercado J. A., & Muñoz-Blanco J. (2009). Antisense down-regulation of the FaPG1 gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiology* 150, 1022 –1032.

- Paniagua, C., Ric-Varas, P., García-Gago, J. A., López-Casado, G., Blanco-Portales, R., Muñoz-Blanco, J., Schückel, J., Knox, J. P., Matas, A. J., Quesada, M. A., Posé, S., & Mercado, J. A. (2020). Elucidating the role of polygalacturonase genes in strawberry fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 71(22), 7103-7117.
- Robinson, J. W. (1996). Atomic spectroscopy. CRC Press.
- Rogiers, S. Y., Coetzee, Z. A., Walker, R. R., Deloire, A., & Tyerman, S. D. (2017). Potassium in the grape (*Vitis vinifera* L.) berry: transport and function. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1629.
- Shabala, S., & Pottosin, I. I. (2010). Potassium and potassium-permeable channels in plant salt tolerance. *Ion channels and plant stress responses*, 87-110.
- Song, M., Wang, S., Chai, L., Zhang, S., & Shen, Y. (2017). Characterization of an ABA-induced and K⁺ channel gene FaKAT1 that regulates strawberry fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(2), 312-322.
- Song, Z. Z., Ma, R. J., & Yu, M. L. (2015). Genome-wide analysis and identification of KT/HAK/KUP potassium transporter gene family in peach (*Prunus persica*). *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 774-787.
- Symons, G. M., Chua, Y. J., Ross, J. J., Quittenden, L. J., Davies, N. W., & Reid, J. B. (2012). Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 63(13), 4741-4750.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Walker, D. J., Smith, S. J., & Miller, A. J. (1995). Simultaneous measurement of intracellular pH and K⁺ or NO₃⁻ in barley root cells using triple-barreled, ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology*, 108(2), 743-751.