

RESUMEN

La maduración de frutos es un proceso que involucra la sumatoria de eventos que ocurren a nivel molecular. La coordinación espacio-temporal de ellos favorece cambios que inducen el desarrollo de un fruto atractivo para el consumo, con cualidades particulares como aroma, sabor, textura y color, que lo hacen único. Particularmente, las modificaciones de la textura durante la maduración se encuentran estrechamente relacionadas con el metabolismo de la pared celular, donde se aprecia la activa participación de enzimas como glicosil hidrolasas y liasas.

Fragaria chiloensis (L.) Mill. es un fruto endémico de Chile con exóticas cualidades organolépticas, sin embargo su comercialización y consumo se ve dificultado a causa de su rápida pérdida de firmeza, responsable de su breve vida útil de postcosecha. Se ha comprobado que el principal polisacárido metabolizado y solubilizado durante la maduración de este fruto son las pectinas, principalmente ramnogalacturonano I (RG-I). Hoy en día, se conocen enzimas pertenecientes a la propia maquinaria molecular del fruto que actúan modificando las cadenas laterales de RG-I, no obstante la información reportada sobre la escisión del esqueleto central de este polisacárido es escasa.

A partir del transcriptoma de frutos de *F. chiloensis*, se identificó un *contig* que codificaría para una enzima con actividad catalítica sobre el esqueleto de RG-I, una ramnogalacturonano endoliasa (RGL4, EC number 4.2.2.23), cuyos niveles de FPKMs (Fragmentos por kilobase de exón por millón) incrementan a través del proceso de maduración del fruto. Se aisló la secuencia codificante completa de *FchRGL1* de 3.328 pb, que codifica para una proteína de 676 residuos aminoacídicos. Por medio de análisis *in silico* se comprobó que ésta proteína presenta los tres dominios funcionales de las RG-liasas: dominio RGL4, fibronectina tipo III (FNIII) y módulo de unión a carbohidratos (CBM). Además, presenta los residuos aminoacídicos clave para la actividad enzimática y de coordinación con ion Ca^{2+} . Mediante análisis de RT-qPCR se corroboró que la expresión del transcrito se incrementa a lo largo del proceso de maduración del fruto de *F. chiloensis*; también se expresa en tejidos en constante expansión como tallo, estolón y raíz. La cuantificación de actividad RG-liasa en extractos proteicos de fruto evidenció un notable incremento a medida que el fruto madura.

Se realizó el modelado por homología de la enzima, utilizando como estructura de referencia el cristal de una RG-liasa del hongo saprófito *Aspergillus aculeatus*, donde ambas secuencias comparten un 28% de identidad. El modelo fue evaluado con servidores bioinformáticos que permitieron determinar la construcción de una estructura robusta. La proteína fue colocada en una caja de agua neutralizada con CaCl_2 . Luego de 1,5 ns de dinámica molecular, la proteína alcanzó su estabilidad con un valor de RMSD de $\sim 5,4$ Å.

La expresión heteróloga de la secuencia codificante (*FchRGL1*) en la levadura *Pichia pastoris* permitió purificar la proteína y con ella realizar la caracterización bioquímica. Las condiciones óptimas para la cuantificación de actividad enzimática son: pH 5,0, entre 20°C y 30°C, 0,2 mg/mL RG-I de papa como sustrato y presencia de 2 mM Ca^{2+} . El valor de K_M para RG-I de papa es de 0,2 mg/mL y $V_{\text{máx}}$ de 769,2 mU/mg. Adicionalmente, la enzima sufre inhibición a concentraciones elevadas de sustrato. Por otro lado, la enzima es capaz de degradar el mucílago producido por semillas de *Arabidopsis thaliana* en germinación que es rico en RG-I.

Tratamientos de frutos con hormonas permitieron demostrar que ABA induce la expresión del gen *FchRGL1*, mientras que AUX la inhibe. En el análisis *in silico* del promotor del gen que codifica para la enzima RG-liasa en *Fragaria vesca*, se observó la presencia de elementos *cis* capaces de responder a dichas hormonas.

El conocer las propiedades de esta enzima que es capaz de degradar el esqueleto central de RG-I, componente importante de las pectinas, contribuye a comprender de mejor manera el desensamblaje de la pared celular que se produce durante la maduración de frutos de frutilla y que conduce al ablandamiento de los frutos y a su breve vida útil.