

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	pag 2
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	pag 4
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	pag 5
<b>RESUMEN</b> .....	pag 9
<b>ABSTRACT</b> .....	pag 10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	pag 11
1. ESPECIES DEL GENERO PRUNUS Y SU IMPORTANCIA ECONOMICA .....	pag 11
2. EL PAPEL DE LOS PORTAINJERTOS EN EL DESARROLLO DE LOS FRUTALES DE CAROZO .....	pag 12
3. EL ESTRÉS POR HIPOXIA Y EL PAPEL DE LOS PORTAINJERTOS EN LAS RESPUESTAS DE LOS FRUTALES DE CAROZO .....	pag 14
4. HEMOGLOBINAS EN PLANTAS Y SU ROL POTENCIAL EN LA RESPUESTAS AL ESTRÉS POR HIPOXIA.....	pag 15
5. IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEINAS PARA DAR LUCES ACERCA DE SUS FUNCIONES .....	pag 19
6. VARIACIONES ALElicas EN HEMOGLOBINAS COMO BASE DEL PROCESO ADAPTATIVO A CONDICIONES DE HIPOXIA.....	pag 25
<b>HIPÓTESIS</b> .....	pag 29
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	pag 29
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	pag 30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	pag 31
1. COLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO	pag 31
2. DISEÑO DE PARTIDORES PARA EL AISLAMIENTO DEL GEN <i>nsHb</i> DESDE DIFERENTES PORTAINJERTOS DE <i>PRUNUS</i> .....	pag 31
3. COMPARACIÓN DE SECUENCIAS POR ALINEAMIENTO MÚLTIPLE Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	pag 32
4. GENERACIÓN DE MODELOS TRIDIMENSIONALES MEDIANTE MODELAMIENTO COMPARATIVO.....	pag 33
5. SIMULACIONES DE DINAMICA MOLECULAR (MDS) .....	pag 35

6. VALIDACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS.....	pag 36
7. IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN.....	pag 37
8. ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO .....	pag 37
9. POTENCIAL ELECTROESTATICO .....	pag 38
<b>RESULTADOS</b> .....	pag 39
1. COLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO .....	pag 39
2. DISEÑO DE PARTIDORES PARA EL AISLAMIENTO DEL GEN <i>nsHb</i> DESDE DIFERENTES PORTAINJERTOS DE <i>PRUNUS</i> .....	pag 39
3. COMPARACIÓN DE SECUENCIAS POR ALINEAMIENTO MÚLTIPLE Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	pag 40
4. GENERACIÓN DE MODELOS TRIDIMENSIONALES MEDIANTE MODELAMIENTO COMPARATIVO .....	pag 44
4.1. BÚSQUEDA DE TEMPLADOS .....	pag 45
4.2. REFINAMIENTO Y VALIDACIÓN DE LOS MODELOS OBTENIDOS.....	pag 47
4.3. MINIMIZACIÓN DE ENERGÍA Y EQUILIBRADO DE LOS MONÓMERO DE <i>nsHbs</i> .....	pag 47
4.4. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE MODELOS ESTRUCTURALES .....	pag 48
5. SIMULACIONES DE DINAMICA MOLECULAR (MDS) .....	pag 51
6. VALIDACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS.....	pag 53
7. IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN .....	pag 60
8. ESTUDIOS DE ACOPLAMIENTO .....	pag 61
9. POTENCIAL ELECTROESTATICO .....	pag 68
<b>DISCUSIÓN</b> .....	pag 71
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	pag 80
<b>REFERENCIAS</b> .....	pag 82
<b>ANÉXOS</b> .....	pag 89

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Ubicación de Chile en exportaciones mundiales y del hemisferio sur. .pag 12	
<b>Tabla 2:</b> Cantidad exportada de fruta de carozo (toneladas), 2000-2007 (Fuente: Servicio Nacional de Aduanas, 2008) .....pag 12	
<b>Tabla 3:</b> Tolerancia relativa de especies del género <i>Prunus</i> a la asfixia radical causada por inundación. ....pag 15	
<b>Tabla 4:</b> Clases de hemoglobinas presentes en plantas y sus características. *3-on-3: globina con estructura secundaria conformada por las hélices A-H, conocido como plegamiento mioglobina, y un grupo hemo escondido dentro de una cavidad hidrofóbica formado por un “sándwich 3/3” de las hélices A, B, C y E, sobre las hélices F, G y H (véase Figura 2). ....pag 17	
<b>Tabla 5:</b> Genotipos de portainjertos de <i>Prunus</i> en estudio .....pag 32	
<b>Tabla 6:</b> Especies de <i>Prunus</i> . Muestra la variedad de especies a las que se le extrajo su material genético. ....pag 39	
<b>Tabla 7:</b> Resultados Procheck y ProSa. ....pag 53	
<b>Tabla 8:</b> Resultados entregados por Modeller para cada uno de los 10 modelos generados para la nsHb de Mariana. ....pag 89	
<b>Tabla 9:</b> Resultados entregados por Modeller v.9 para cada uno de los 10 modelos generados para la nsHb de Mazzard F12. ....pag 90	
<b>Tabla 10:</b> Resultados de la evaluación de la calidad de los modelos obtenidos por MODELLER para la nsHb de Mariana, mediante PROCHECK y ProSA. ....pag 91	
<b>Tabla 11:</b> Resultados de la evaluación de la calidad de los modelos obtenidos por MODELLER para la nsHb de Mazzard F12, mediante PROCHECK y ProSA. ....pag 92	
<b>Tabla 12:</b> Resultados Procheck y ProSa. ....pag 92	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de un árbol de “frutal de carozo” con su injerto y portainjerto .....	pag 14
Figura 2: Estructura tridimensional de una hemoglobina hexacoordinada y detalle de los aminoácidos que conforman el bolsillo que contiene el grupo Hemo. ....	pag 22
Figura 3: Análisis de las cavidades para la migración de ligandos en AHb1. ....	pag 23
Figura 4: Comparaciones Estructurales y de la secuencia de AHB 1 con otras hemoglobinas no simbiótica. ....	pag 24
Figura 5: Interfaz dimérica de la unión de dos hemoglobinas de Arabidopsis 1 (AHB1). ....	pag 25
Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa 1,5% TBE 1X de productos de PCR. ....	pag 40
Figura 7: Árbol filogenético de las nsHb en el género <i>Prunus</i> . ....	pag 41
Figura 8: Árbol filogenético de nsHb de <i>Prunus</i> y otras angiospermas. ....	pag 42
Figura 9: Alineamiento múltiple de secuencias de nsHbs del genero <i>Prunus</i> . ....	pag 43
Figura 10: Aminoácidos que varían en las secuencias estudiadas de <i>Prunus</i> . ....	pag 44
Figura 11: Árbol filogenético entregado por el software Modeller v9.12. ....	pag 45
Figura 12: Estructuras de las nsHb como monómeros. ....	pag 47
Figura 13: Estructuras de las nsHb con el grupo hemo incorporado. ....	pag 49
Figura 14: Detalle de los aminoácidos que difieren entre ambas estructuras. ....	pag 50
Figura 15: Distancias del grupo hemo con la histidina distal y proximal. ...	pag 51
Figura 16: Grafica de RMSD de las minimizaciones de energía y equilibrio termodinamico de las nsHbs de Mariana y Mazzard F12 como dímeros. ....	pag 52
Figura 17. Niveles de energía de los residuos, asociados a la evaluación de calidad de los modelos. ....	pag 54

<b>Figura 18. Grafica de Z-score entregado por ProSa, .....</b>	<b>pag 55</b>
<b>Figura 19: Gráfico de Ramachandram obtenido con Procheck .....</b>	<b>pag 56</b>
<b>Figura 20: Análisis de Anolea para las nsHbs de Mariana, Mazzard F12 y el templado (3QQQ) como dímeros. ....</b>	<b>pag 57</b>
<b>Figura 21: Alineamiento estructural de las nsHbs con el templado 3QQQ. ....</b>	<b>pag 58</b>
<b>Figura 22: Interfaz dimérica de ambas nsHbs. ....</b>	<b>pag 59</b>
<b>Figura 23: Aminoácidos que componen la Interfaz dimérica de ambas nsHbs. ....</b>	<b>pag 60</b>
<b>Figura 24: Cavidades de las nsHbs. ....</b>	<b>pag 61</b>
<b>Figura 25: Interacción de los bolsillos alrededor de los grupos hemo de cada monómero de nsHb en Mariana con los ligandos. ....</b>	<b>pag 64</b>
<b>Figura 26: Interacción de los bolsillos alrededor de los grupos hemo de cada monómero de nsHb en Mazzard F12 con los ligandos. ....</b>	<b>pag 65</b>
<b>Figura 27: Bolsillo distal y cavidades que lo rodea en las nsHbs de <i>Prunus</i>. ....</b>	<b>pag 67</b>
<b>Figura 28: Posición de la valina 113 en ambas nsHb de <i>Prunus</i>. ....</b>	<b>pag 67</b>
<b>Figura 29: Potencial electroestático global de las proteínas al estar unidas a los ligandos. ....</b>	<b>pag 69</b>
<b>Figura 30. Potencial electroestático de las cercanías del grupo hemo en las nsHbs (hasta 3 Å). ....</b>	<b>pag 70</b>
<b>Figura 31: Migración de O<sub>2</sub> a través del túnel existente entre ambos bolsillos distales en Mariana. ....</b>	<b>pag 79</b>
<b>Figura 32: Resultados de Anolea para las nsHbs de Mariana y Mazzard F12 con y sin el grupo hemo incorporado. ....</b>	<b>pag 93</b>
<b>Figura 33: Análisis entregado por Anolea del templado (3QQQ) .....</b>	<b>pag 93</b>
<b>Figura 34: Distancia entre grupo hemo y oxígeno (monómero 1) .....</b>	<b>pag 94</b>
<b>Figura 35: Distancia entre grupo hemo y óxido nítrico (monómero 2) .....</b>	<b>pag 95</b>
<b>Figura 36: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 1) .....</b>	<b>pag 95</b>
<b>Figura 37: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 1) .....</b>	<b>pag 96</b>
<b>Figura 38: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 2) .....</b>	<b>pag 96</b>

<b>Figura 39: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 2) .....</b>	<b>.....pag 97</b>
<b>Figura 40: Distancia entre grupo hemo y oxígeno (monómero 1) .....</b>	<b>.....pag 97</b>
<b>Figura 41: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 1) .....</b>	<b>.....pag 98</b>
<b>Figura 42: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 1) .....</b>	<b>.....pag 98</b>
<b>Figura 43: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 2) .....</b>	<b>.....pag 99</b>
<b>Figura 44: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 2) .....</b>	<b>.....pag 99</b>
<b>Figura 45: Distancia entre grupo hemo y oxígeno (monómero 2) .....</b>	<b>..... pag 100</b>
<b>Figura 46: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 1) ..</b>	<b>..... pag 100</b>
<b>Figura 47: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 1) .....</b>	<b>..... pag 101</b>
<b>Figura 48: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 2) ..</b>	<b>..... pag 101</b>
<b>Figura 49: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 2) .....</b>	<b>..... pag 102</b>
<b>Figura 50: Distancia entre grupo hemo y oxígeno (monómero 1) .....</b>	<b>..... pag 102</b>
<b>Figura 51: Distancia entre grupo hemo y óxido nítrico (monómero 2) .....</b>	<b>..... pag 103</b>
<b>Figura 52: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 1) ..</b>	<b>..... pag 103</b>
<b>Figura 53: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 1) .....</b>	<b>..... pag 104</b>
<b>Figura 54: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 2) ..</b>	<b>..... pag 104</b>
<b>Figura 55: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 2) .....</b>	<b>..... pag 105</b>
<b>Figura 56: Distancia entre grupo hemo y oxígeno (monómero 1) .....</b>	<b>..... pag 105</b>
<b>Figura 57: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 1) ..</b>	<b>..... pag 106</b>

<b>Figura 58: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 1) .....</b>	<b>..... pag 106</b>
<b>Figura 59: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 2) ..</b>	<b>pag 107</b>
<b>Figura 60: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 2) .....</b>	<b>..... pag 107</b>
<b>Figura 61: Distancia entre grupo hemo y oxígeno (monómero 1) .....</b>	<b>pag 108</b>
<b>Figura 62: Distancia entre grupo hemo y oxígeno (monómero 2) .....</b>	<b>pag 108</b>
<b>Figura 63: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 1) ..</b>	<b>pag 109</b>
<b>Figura 64: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 1) .....</b>	<b>..... pag 109</b>
<b>Figura 65: Distancia entre grupo hemo y histidina distal (monómero 2) ..</b>	<b>pag 110</b>
<b>Figura 66: Distancia entre grupo hemo y histidina proximal (monómero 2) .....</b>	<b>..... pag 110</b>