

Historia evolutiva y la función de las hemoglobinas en las plantas

Janet Palacios-Martínez¹, Ana I. Chávez-Martínez¹, Thelma J. Parra-Aguilar¹, Luis Cárdenas¹✦.

¹Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.

✦Correspondencia: luis.cardenas@ibt.unam.mx

Área Temática:

Ciencias de las Plantas

Recibido: 18 diciembre, 2024

Aceptado: 20 de enero, 2025

Publicado: 28 de enero, 2025

Cita: Palacios-Martínez et al., 2025. Historia evolutiva y la función de las hemoglobinas en las plantas. *Bioc Scientia* 1(1): 2503.



Copyright: © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Resumen: Las globinas, es decir, las hemoglobinas y las proteínas hemo-relacionadas, están ampliamente distribuidas en los tres dominios: Archaea, Bacteria y Eukarya. En el reino *Plantae* se han identificado dos clases de hemoglobinas, las simbióticas y las no-simbióticas. Las simbióticas fueron descubiertas en *Glycine max* en 1939, se expresan principalmente en los nódulos simbióticos y están involucradas en la unión y el transporte del oxígeno dentro del nódulo. Por otro lado, las hemoglobinas no-simbióticas, se clasifican en tres clases. La clase 1, es la de mayor ancestría, están involucradas en la respuesta a hipoxia y también regula la concentración de óxido nítrico, un gas que tiene grandes implicaciones en las plantas tales como: la morfogénesis, señalización hormonal, la determinación del destino celular, el metabolismo del nitrógeno y en la interacción simbiótica planta-microorganismo. Las clases 2 y 3 están involucradas en el metabolismo y/o transporte de oxígeno y óxido nítrico. A pesar de haber sido identificadas hace 85 años en leguminosas, aún no se tiene una clasificación amplia de las hemoglobinas en las especies de leguminosas con el genoma secuenciado. En un análisis bioinformático identificamos los genes homólogos de las hemoglobinas en 18 especies de plantas incluyendo ocho especies de leguminosas. Se identificaron los dominios conservados en las hemoglobinas como son el E7, CD1 y C2, sitios claves en la unión al grupo hemo y de otros ligandos como el oxígeno y el óxido nítrico. De acuerdo con el análisis filogenético se identificaron cuatro clusters, el primero y de mayor ancestría se denominó NsAHb3 y corresponde a las no simbióticas, seguido del cluster SAHb en el que se agruparon exclusivamente especies que tienen interacciones simbióticas. En los últimos dos clusters identificamos NsAHb1 y NsAHb2, también reportadas como no simbióticas. De manera interesante, las *PvNsAHb2* y *PvNsAHb3* tienen una expresión diferencial mayor en raíz, mientras que SAHb tienen mayor expresión diferencial en el nódulo. Estos resultados sugieren la especificidad tejido-estadio de las AHb's en *Phaseolus vulgaris*.

Palabras clave: Hemoglobina, leguminosas, simbióticas, no simbióticas, nodulación e hipoxia.

Abstract: Globins, meaning hemoglobins and heme-related proteins, are widely distributed in the three domains Archaea, Bacteria and Eukarya. In the *Plantae* kingdom, two classes of hemoglobins have been identified, symbiotic and non-symbiotic. Symbiotic hemoglobins discovered in the legume *Glycine max* in 1939, are mainly expressed in symbiotic nodules and are involved in the oxygen transport within the nodule. Non-symbiotic hemoglobins are classified into three classes. Class 1, with higher ancestry are involved in the hypoxic responses and modulate the concentration of nitric oxide, a gas with key roles in morphogenesis, hormone signaling, cell fate determination, nitrogen metabolism and in the symbiotic plant-microorganism interaction. The classes 2 and 3 have been related to metabolism and/or transport of oxygen and nitric oxide. Despite hemoglobins were identified 85 years ago in legumes, there is still no comprehensive classification of hemoglobins in legume species with sequenced genomes. In this bioinformatics analysis, we identified the homologous genes of hemoglobins in 18 plant species including eight legume species. The canonical conserved domains in hemoglobins such as E7, CD1 and C2 were recognized, which are heme group binding and ligand binding sites such as oxygen and nitric oxide. According to the phylogenetic analysis, four clusters were identified, the first and most ancestral cluster was called NsAHb3, followed by the SAHb cluster, which exclusively grouped the legumes that establish symbiotic interactions. In the last two clusters we identified NsAHb1 and NsAHb2. Interestingly, *PvNsAHb2* and *PvNsAHb3* have higher differential expression in root, whereas *PvSAHb* have higher differential expression in nodules. These results suggest a tissue-stage specificity for AHb's in *Phaseolus vulgaris*.

Keywords: Hemoglobin, legume, symbiotic, non-symbiotic, nodulation and hypoxia.

INTRODUCCIÓN

Hace 3500 millones de años, la atmósfera de la Tierra mantenía un ambiente predominantemente anóxico. Sin embargo, el surgimiento de las cianobacterias incrementó los niveles de oxígeno (O_2), el cual resultaba tóxico para los primeros organismos unicelulares. Por lo tanto, la aparición de las primeras proteínas hemoglobinas (AHbs) ocurrió como una adaptación al cambio ambiental para poder controlar y reducir las concentraciones de dicho gas (Borroto y Arredondo-Peter, 2015; Vinogradov et al., 2007). Las AHbs son una superfamilia de metaloproteínas ampliamente distribuidas entre los tres dominios: Archaea, Eubacteria y Eukarya (Hardison, 1996). Se estima que alrededor del 25% de las arqueas y aproximadamente el 65% de las bacterias cuentan con genes que codifican para AHbs, mientras que en los organismos eucariotas se presentan en un 90% (Vinogradov et al., 2006).

A estas proteínas se les denominó “hemoglobinas” debido a su estructura globular compacta y a la presencia de un grupo hemo (Figura 1A y 1B). El plegamiento de tipo globina está constituido por un empalme de 6 a 8 α hélices (A-H), el cual forma una región hidrofóbica en donde se localiza el grupo hemo (Figura 1A). Este grupo prostético contiene un átomo de Fe unido a cuatro grupos pirroles y su proximidad a una histidina conservada conlleva a que la sexta posición del Fe quede libre, lo que permite su unión a ligandos gaseosos como el O_2 y/o el óxido nítrico (NO) (Borroto y Arredondo-Peter, 2015; Vinogradov y Moens, 2008). A pesar de que las AHbs poseen estructuras altamente conservadas, estas proteínas presentan una elevada variabilidad en la identidad entre secuencias cercana al 80%, además del grado de multimerización (Borroto y Arredondo-Peter, 2015). De manera general, dentro de las funciones principales de las Hbs se incluye el transporte, el almacenamiento o el secuestro de oxígeno; el transporte y el almacenamiento de sulfuro; y la detoxificación de NO y halofenoles (Hunt et al., 2001). Las AHbs se pueden clasificar con base en su secuencia, su expresión y su grado de afinidad por el O_2 de la siguiente manera:

- AHbs y mioglobinas de vertebrados (mAHbs).
- FHbs. Flavohemoglobinas (proteínas quiméricas): el dominio globina está unido a FAD o NAD (*Escherichia coli* y levaduras).
- SAHbs. Hemoglobinas simbióticas.
- NsAHbs. Hemoglobinas no simbióticas.
 - Clase 1
 - Clase 2
 - Clase 3 (truncada)

En los vertebrados, las AHbs presentes en los eritrocitos son las encargadas

de transportar O_2 de los pulmones a los tejidos aeróbicos y las mioglobinas extraen el O_2 de la sangre para transportarlo a los tejidos musculares (Kundu et al., 2003). En el caso del reino *Plantae*, las AHbs se encuentran ampliamente distribuidas en las algas verdes, las briofitas y las plantas vasculares (Becana et al., 2020; Vinogradov et al., 2006) y están implicadas en diversos aspectos del desarrollo y la respuesta al estrés, debido a su capacidad de secuestrar NO, que es una molécula de señalización (Figura 1C). La primera hemoglobina de plantas fue descubierta por Kubo en 1939 en la planta leguminosa de soja (*G. max*), pero fue hasta 1974 que se le relacionó con la fijación simbiótica/biológica del nitrógeno (N_2) en las plantas leguminosas, por lo que se les denominó como leghemoglobinas o hemoglobinas simbióticas (SAHbs). Posteriormente, en la década de los 80's, se identificaron otras AHbs en nódulos de raíces de *Parasponia andersonii*, una especie no leguminosa, y en *Trema micrantha*, una especie no leguminosa y no nodulante. Estos hallazgos sugirieron que el grupo de las hemoglobinas podría extenderse más allá del clado de las leguminosas y de las no-leguminosas nodulantes, por lo tanto, a este grupo se le denominó hemoglobinas no simbióticas (NsAHbs) (Larrainzar et al., 2020).

Por un lado, los miembros del grupo de las SAHbs se cuantifican en concentraciones milimolares, preferencialmente dentro de los nódulos fijadores de N_2 que se forman en las raíces de las plantas (Figura 1C). Las SAHbs presentan una unión reversible con el O_2 , lo cual les permite movilizar a esta molécula del citosol de las células infectadas hacia las bacterias fijadoras de N_2 , de manera baja y constante para mantener la respiración bacteriana sin inhibir la actividad de la nitrogenasa (Hunt et al., 2001). Por otro lado, las NsAHbs se pueden localizar en cualquier órgano de las plantas y poseen una unión altamente estable al oxígeno, lo que las hace funcionar como transportadores, almacenadores y sensores de dicho elemento (Hoy y Hargrove, 2008; Hunt et al., 2001). Algunos de los miembros de las NsAHbs se inducen durante la respuesta al estrés en condiciones de hipoxia y se ha sugerido que están involucrados en modular los niveles de NO en la célula en condiciones hipóxicas (Figura 1C). Las NsAHbs se distinguen en tres clases, cuya categorización está relacionada con su origen evolutivo, además de sus propiedades bioquímicas y funcionales. Las NsAHbs de clase 1 poseen una alta afinidad por el O_2 ($K_d \sim 2nM$), una baja constante de disociación de este y sus funciones principales consisten en la eliminación del NO y la regulación del potencial redox. Este mecanismo de secuestro del NO conlleva a la formación de un compuesto no tóxico, el nitrato y a la oxidación del NADPH para mantener la síntesis glucolítica de ATP en condiciones de hipoxia (Igamberdiev y Hill, 2004). En el caso de las NsAHbs de la clase 2, tienen una menor afinidad por el O_2 y se han visto involucradas en el mantenimiento del suministro de este gas a los tejidos en desarrollo (Hoy y Hargrove, 2008; Hunt et al., 2001). Sin embargo, ambas clases de NsAHbs se inducen también por la aplicación de ácido abscísico y citocininas. Asimismo, algunos genes homólogos de las NsAHbs se han identificado altamente expresados

en especies como el arroz, que crece en condiciones de anegamiento y de estrés hipóxico. En cuanto a las NsAHbs de la clase 3, es decir, las isoformas truncadas, representan un clado ancestral con menor similitud a las NsAHbs 1 y 2. Este grupo está formado por secuencias de AHbs de longitud menor a 130 aminoácidos. Este tipo de NsAHbs se han identificado en protozoarios, cianobacterias, nemertinos, bacterias, protozoos y algas (Vinogradov et al., 2006; Watts et al., 2001).

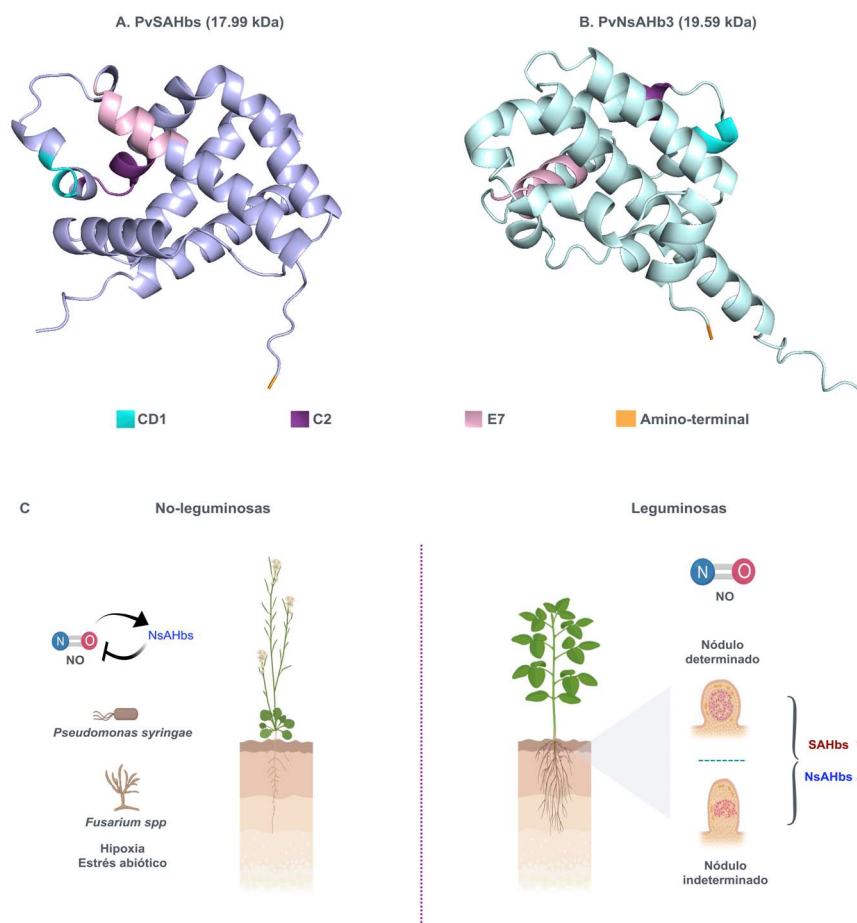


Figura 1. Estructura y función de las hemoglobinas en plantas. En el panel A, se observa el modelamiento molecular de una hemoglobina simbiótica de *P. vulgaris* (PvSAHb) y en el panel B una hemoglobina no simbiótica de la misma especie (PvNsAHb). En ambas estructuras están etiquetados los residuos de las regiones involucradas en la unión al grupo hemo y la unión a ligandos: región CD1 en cian, región C2 en morado y región E7 en rosa; el amino-terminal de las proteínas está resaltado en naranja. En el panel C se ilustran las funciones principales de las AHbs descritas en plantas. En las plantas no leguminosas las NsAHbs están implicadas en el desarrollo, la respuesta a hipoxia, el estrés abiótico y el estrés biótico (ataque por patógenos como *Pseudomonas syringae* y *Fusarium spp.*). Además, parte de la función de las NsAHbs está relacionada con la señalización del NO debido a que estas proteínas modulan la concentración de dicha molécula; a su vez, el NO induce la expresión de las NsAHbs. En cuanto a las plantas leguminosas, además de tener NsAHbs, presentan las SAHbs, las cuales están mayormente expresadas y localizadas en los nódulos simbióticos fijadores de nitrógeno.

Hasta ahora se han sugerido diversas funciones para las AHbs de plantas que van más allá del transporte de oxígeno, por ejemplo, se les han atribuido su participación en la formación embrionaria, la arquitectura de las plantas, el tiempo de floración, la respuesta a estreses bióticos y abióticos, así como durante las interacciones simbióticas (Bahmani et al., 2019; Bai et al., 2016; Maassen Hennig, 2011; Mur et al., 2012; Seregélyes et al., 2003). A pesar de haber sido descubiertas en una especie de leguminosa, aún no se tiene la identificación y la clasificación completa de las hemoglobinas en las especies de leguminosas con genoma secuenciado. Así como también hace falta profundizar en la información disponible respecto a la participación tanto de las SAHbs como de las NsAHbs durante la nodulación de las plantas leguminosas. Es por ello que, en este análisis *in silico* se identificaron y clasificaron filogenéticamente las AHbs en 18 especies de plantas incluidas ocho especies de leguminosas nodulantes. De manera particular nos interesamos en el modelo de estudio de *P. vulgaris*, por ser un cultivo que posee un alto interés comercial y con un alto contenido proteico y de fácil acceso. Adicionalmente, reconstruimos el paisaje transcripcional de las AHbs en algunos tejidos, durante las interacciones simbióticas y con patógenos en *P. vulgaris*. Los resultados de los perfiles transcripcionales nos permiten sugerir que la expresión de las AHbs podría ser tejido-estadio-interacción específicas. Es importante destacar que las pruebas de hipótesis generadas a partir de datos *in silico* se pueden corroborar en organismos *in vivo*, y el modelo de frijol permite el uso de genómica funcional mediante el sistema de generación de plantas compuestas donde es posible generar raíces transgénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis filogenético

Para el análisis filogenético, se utilizaron las secuencias aminoacídicas de AtNsAHb1, AtNsAHb2 y AtNsAHb3 como referencia para identificar las secuencias homólogas en 18 especies de plantas, incluyendo el clado de las leguminosas. Respecto a este clado, se incluyeron ocho especies de la familia Fabaceae, *P. vulgaris*, *Lotus japonicus*, *G. max*, *Medicago truncatula*, *Lens culinaris*, *Vicia faba*, *Vigna unguiculata* y *Arachis hypogea*. Todas las secuencias se descargaron de la base de datos Phytozome v. 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>). La alineación de las secuencias de aminoácidos se realizó con MUSCLE en JalView (Waterhouse et al., 2009).

Análisis de dominios y motivos

Los dominios y motivos característicos de las secuencias AHb se identificaron en MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/>) e InterPro-Pfam (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). El análisis de las relaciones filogenéticas entre

secuencias se realizó con IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at>) utilizando el método de Máxima Verosimilitud con 1000 réplicas bootstrap. El análisis identificó que el modelo de mutación que mejor explica las relaciones filogenéticas de estas secuencias fue JTTDCMut+G4 (Log-likelihood: -14736.054). A partir de las réplicas se generó un árbol consenso. Dicho árbol consenso se editó en iTOL (<https://itol.embl.de>) (Letunic y Bork, 2024).

Paisaje transcripcional

Los perfiles transcripcionales de *AHb1*, *AHb2*, *AHb3* y *SAHb* en los tejidos se obtuvieron a partir de los datos depositados en Phytozome v. 13. Para los perfiles transcripcionales de la nodulación, los datos se tomaron de un análisis metatranscriptómico realizado en nuestro laboratorio, de diferentes estadios del desarrollo del nódulo. Además, los perfiles de interacción con patógenos provienen de datos transcriptómicos descritos en Khankhum et al. (2016) para *Endornavirus*, y Chen et al. (2020) para *Fusarium solani*.

Modelamiento molecular

Las estructuras terciarias basadas en las secuencias de aminoácidos se analizaron en AlphaFold3 (<https://deepmind.google/technologies/alphafold/alphafold-server/>). Las estructuras de las hemoglobinas se descargaron en formato PDB de AlphaFold3, se realizó el modelo de mejor ajuste de la proyección terciaria de la proteína. La optimización del modelo de estructura terciaria se realizó en Avogadro (<https://avogadro.cc/>). El archivo PDB se analizó en PyMOL (<https://pymol.org/2/>). El ángulo de proyección de las proteínas fue frontal. PyMOL también se utilizó para resaltar los aminoácidos involucrados en la unión al grupo hemo y la unión a ligandos (Schrödinger y DeLano, 2020).

RESULTADOS

Se realizó la búsqueda en Phytozome v13.1 de las secuencias homólogas de las hemoglobinas en 18 especies de plantas, considerando AT2G16060.1-ATHb1, AT3G10520-ATHb2 y AT4G32690-ATHb3 como secuencias de referencia. Se incluyeron organismos del clado de las briofitas, gimnospermas y angiospermas. Particularmente nos interesamos en el grupo de las leguminosas incluyendo ocho especies en la búsqueda. Las secuencias homólogas aminoacídicas se descargaron, ordenaron y alinearon para identificar las regiones conservadas.

En el alineamiento de las secuencias múltiples se identificaron 10 regiones

conservadas (Figura 2A), que incluyen los sitios de unión al grupo hemo y de unión a ligandos como la región E7 (KLKAHA) que se encuentra en el dominio 1 y resaltado en color rojo (Figura 2A y 2B).

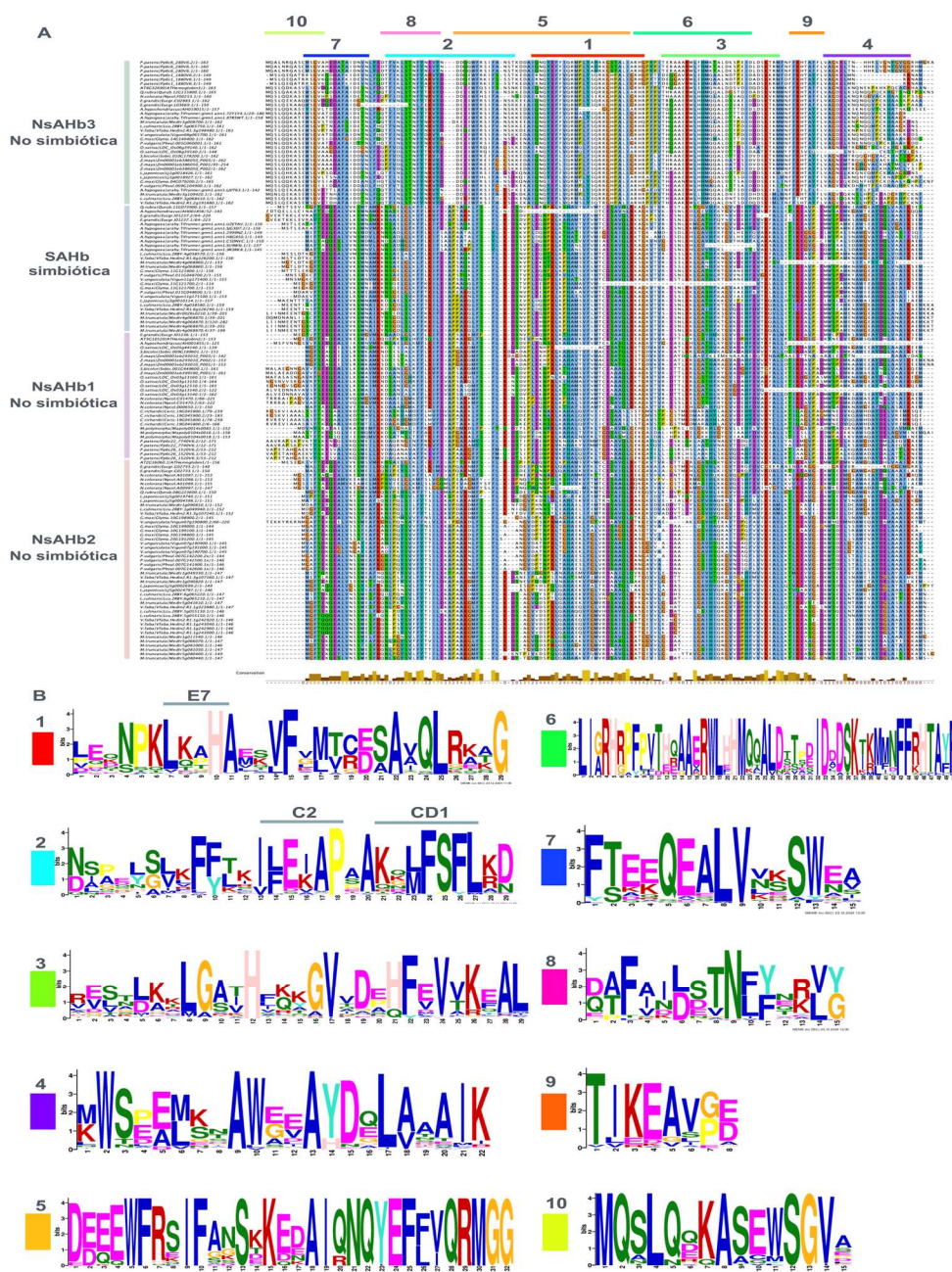


Figura 2. Análisis de las secuencias aminoacídicas de las AHb's. En el panel A, se observa el alineamiento de las secuencias NsAHb's y las SAHb's. Se identificaron 10 dominios conservados, de los cuales resaltan los dominios 1 y 2. Los residuos conservados de unión al grupo hemo y de unión a ligandos, en los sitios E7 dentro del dominio 1 resaltado en color rojo, así como los residuos de los sitios CD1 y C2 ubicados en el dominio 2 resaltados en cian en el panel B. Las secuencias de las proteínas que se muestran en los diagramas se descargaron del repositorio de Phytozome *v13.1*.

Además, de las regiones CD1 (KMFSF) y C2 (IFEAIP), ambas en el dominio 2 y resaltado en cian (Figura 2A y 2B). También podemos identificar algunos motivos conservados en cada clase de hemoglobinas. En el clado AHB3 identificamos residuos de los dominios 3, 4, 6 y 7 conservados. De manera particular en el dominio 5 identificamos los residuos W/L/MF con un porcentaje de conservación del 100%. Posteriormente, a partir de las similitudes de las 142 secuencias aminoacídicas se reconstruyó la historia evolutiva de las hemoglobinas en las 18 especies de plantas.

De acuerdo con los resultados del análisis filogenético identificamos cuatro clados. El clado NsAHb3, también denominado clado de hemoglobinas truncadas que es el de mayor ancestría conformado por secuencias aminoacídicas de menor longitud con respecto al resto de hemoglobinas. En este clado se conservan los residuos de aminoácidos de los dominios 3, 5, 8 y 10. Es importante destacar que basalmente este clado está representado por 6 isoformas en *Physcomitrium patens*, en el que se observa el dominio 10 conservado en el extremo amino-terminal (Figura 3A, 3B y 3C), seguido de eventos de duplicación en las gramíneas y las leguminosas. Específicamente, en *P. vulgaris* se identificaron dos genes con una isoforma cada uno.

El siguiente clado es el de las hemoglobinas simbióticas (SAHb), en el cual identificamos secuencias homólogas de *Quercus rubra* y *Eucalyptus grandis*, ambas especies tienen interacciones simbióticas con cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Evidentemente, también identificamos diversos eventos de duplicación en las ocho leguminosas incluidas en el análisis, en algunas especies como *A. hypogea* y *V. faba* identificamos siete isoformas, mientras que, en *M. truncatula* y *G. max* existen 3 isoformas. Finalmente, en *V. unguiculata*, *L. culinaris* y *P. vulgaris* existen 2 isoformas por cada especie (Figura 3A). Por último, se agruparon los clusters NsAHb1 y 2. En el NsAHb1 observamos isoformas de organismos ancestrales, por ejemplo, de *P. patens*, *Marchantia polymorpha* y *Ceratopteris richardi*. Cabe destacar que es el único clado en el que se identifican isoformas de *M. polymorpha* y *C. richardi*. De más reciente aparición observamos el cluster NsAHb2, en el que identificamos eventos de duplicación en las leguminosas y las gimnospermas (Figura 3A). Respecto al paisaje transcripcional de las hemoglobinas simbióticas y no simbióticas, en algunos tejidos de *P. vulgaris*, identificamos que la *PvSAHbA* está mayormente expresada en los nódulos. Mientras que, las hemoglobinas no simbióticas *PvNsAHb* tienen una mayor expresión en raíz. En el

caso de los perfiles transcripcionales durante la interacción con patógenos, observamos que en la interacción con *F. solani* se expresa más la *PvSAHbA* y con *Ednavirus* la *PvNsAHb3B* (Figura 3D).

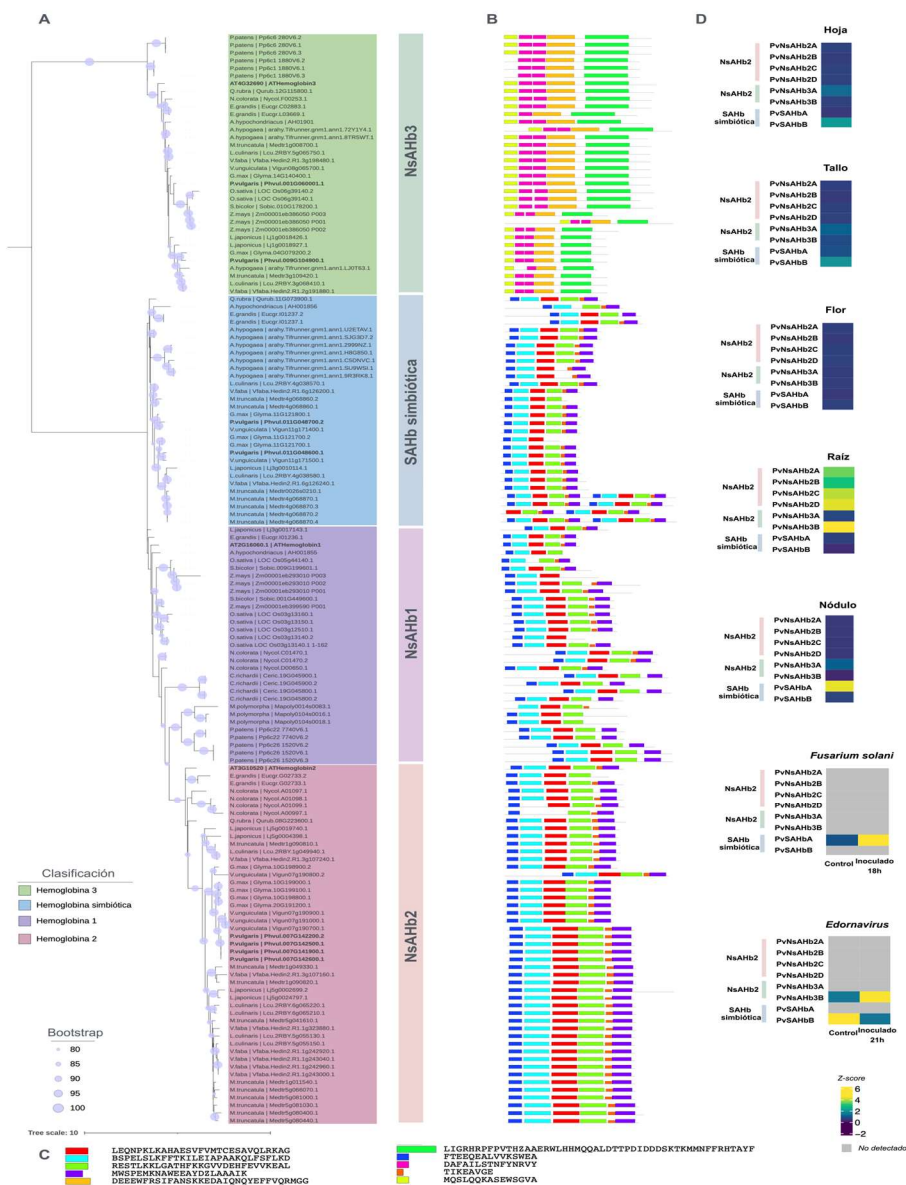


Figura 3. Análisis filogenético y paisaje transcripcional de las AHb's. Se observa la reconstrucción de las relaciones evolutivas entre las AHb's, realizadas a partir de las secuencias aminoacídicas. En el panel A, identificamos cuatro grupos: las NsAHb3 como el grupo de mayor ancestría en el que observamos los dominios 3, 5, 8 y 10 conservados. Mientras que en los grupos SAHb's, NsAHb1 y NsAHb2 están conservados los dominios 1, 2, 3, 4, 7 y 9 representados en los paneles B y C, aunque en diferentes posiciones, respectivamente. En el cluster AHB1 se observan las especies ancestrales como *P. patens*, *M. polymorpha* y *C. richardi* y de gramíneas como *O. sativa* y *Z. mays*. Finalmente, en el cluster NsAHb2 de más reciente aparición, se identifican diversos eventos de duplicación. Las réplicas bootstrap están representadas en porcentaje con círculos lilas en los nodos de la filogenia. En el panel D, se observa el paisaje transcripcional de las hemoglobinas simbióticas y no simbióticas en tejidos de *P. vulgaris*, como en el nódulo y en interacción con patógenos

DISCUSIÓN

Los resultados sugieren la formación de cuatro clusters filogenéticos de las hemoglobinas en las especies de plantas analizadas. De acuerdo con la reconstrucción de las relaciones evolutivas entre las secuencias, identificamos cuatro clados: un clado de mayor ancestría, el NsAHb3, seguido de SAHb, NsAHb1 y NsAHb2. En estos clados, los sitios canónicos E7, CD1 y C2 están conservados. Se ha descrito que los residuos de aminoácidos de dichos sitios están involucrados en la unión al grupo hemo y a ligandos (Hoy et al., 2007). Adicionalmente, el paisaje transcripcional evidenció la mayor expresión diferencial de la *PvSAHbA* en nodulos de *P. vulgaris*, mientras que los genes que codifican las PvNsAHb's tuvieron mayor expresión en tejidos no simbióticos.

Respecto al análisis bioinformático de las relaciones evolutivas entre las AHb's de las especies de briofitas, angiospermas y gimnospermas analizadas, los resultados son consistentes con los clusters filogenéticos descritos en Vinogradov et al., 2006, Vázquez-Limón et al., 2012, Becana et al., 2020 y Hunt et al., 2001. Se han realizado análisis filogenéticos con diferentes métodos de la historia evolutiva de las AHb's en organismos de los tres dominios, en los que se pueden observar las formaciones de los clusters de hemoglobinas simbióticas y no simbióticas de manera consistente, pero presentan inconsistencias en la nomenclatura de los clados entre los diferentes análisis. Es decir, en todos los casos se formaron: un cluster de hemoglobinas simbióticas y tres de hemoglobinas no simbióticas en plantas. Sin embargo, hay una discrepancia en la nomenclatura. Cabe destacar que, en cada una de las filogenias reportadas se han considerado criterios diversos para nombrar los clusters. Por ejemplo, en el análisis realizado por Hunt et al., 2001, el criterio de clasificación para nombrar los clusters fue por especie, lo que podría minimizar el grado de similitud entre secuencias al momento de etiquetarlas. En el presente análisis es de gran importancia mencionar que la metodología usada reúne los criterios específicos novedosos que se sugieren para reconstruir las historias evolutivas. Una de las perspectivas de este análisis es aumentar de manera significativa el número de especies de plantas e incluir otros organismos para tener una visión más amplia de la clasificación de las AHbs en organismos de los tres dominios, usando herramientas bioinformáticas novedosas para su análisis.

En el caso del grado de conservación de los dominios canónicos E7, CD1 y C2 de unión al grupo hemo y a ligandos, identificamos que están conservados en un alto grado en las 142 secuencias de plantas analizadas. Estos dominios también los identificamos en las estructuras terciarias del modelamiento molecular de

PvSAHb y de PvNsAHb. Es importante mencionar que la estructura terciaria está conformada por α -hélices y láminas- β , dentro de las cuales se encuentran los dominios conservados formando una cavidad proximal F8 y distal E7 que contiene un residuo histidina (His), este aa es uno de los sitios de unión del hierro al grupo hemo. El residuo His está conservado en el 95% de las secuencias que conforman los clados de las hemoglobinas SAHb y NsAHb1 y 2, sin embargo, no está presente en ninguna de las secuencias del clado de mayor ancestría NsAHb3. Este resultado es consistente con la historia evolutiva de la terrestreización de las plantas, en donde se plantea que el oxígeno fue la molécula modeladora que permitió la colonización de nichos terrestres.

Adicionalmente, se ha sugerido que un mecanismo opuesto se presenta en organismos evolutivamente más recientes como los vertebrados. En dichos organismos, la estructura molecular de las hemoglobinas tiene una cavidad proximal y otra distal alrededor del grupo hemo en las SAHbs y las mAHBs esto sugiere un mecanismo opuesto de regulación a sus ligandos. En las mAHBs, se ha descrito un mecanismo de compuerta donde la histidina distal unida de manera estable a una molécula de agua genera un impedimento estérico, restringiendo su unión a otros ligandos. Además, la presencia de una serina conservada en la cavidad proximal restringe su movimiento, esto no ocurre en las SAHbs donde el movimiento de la histidina proximal al grupo hemo no se obstaculiza, lo que aumenta la afinidad por su ligando y la constante de asociación con el O₂ (Kundu et al., 2003).

Además, se encontró que ninguna de las AHbs de *P. vulgaris* se agrupó dentro del cluster NsAHbs1 (clase 1), mientras que cuatro de sus AHbs se agruparon dentro de la clase 2 y dos en la clase 3, las cuales tienen una mayor expresión en la raíz. En este sentido, Larrainzar y colaboradores (2020) reportaron que algunas NsAHbs de *M. truncatula* presentan niveles de expresión muy altos en las raíces, y se sugiere que dentro de sus principales funciones está la de mantener el estado redox y energético de las células, lo cual se requiere para la supervivencia de las plantas en condiciones hipóxicas. Aunado a esto, es importante mencionar que la sobreexpresión de las NsAHbs de clase 1 y 2 de *A. thaliana* incrementa la supervivencia de las plantas ante condiciones de anoxia (Hebelstrup et al., 2006), mientras que el silenciamiento de una NsAHbs de clase 1 en *Arabidopsis* compromete la supervivencia de las plantas ante condiciones de hipoxia y genera anomalías en el desarrollo de los hidatodos de las hojas y en las inflorescencias (Hebelstrup et al., 2006).

Además, se ha reportado que las NsAHbs de clase 1 son inducidas en tejidos

de rápido crecimiento. En *Arabidopsis*, la actividad del promotor de un tipo de estas hemoglobinas se ha reportado en hipocotilos y cotiledones de plántulas jóvenes y en plantas en proceso de senescencia, mientras que las NsAHbs de clase 2 se observó en plantas adultas (Hunt et al., 2001). En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de las NsAHb clase 1 y 2 conllevan al incremento en el tamaño de las hojas y el diámetro de la roseta de las plantas (Kuruthukulangarakoola et al., 2017). Además, la sobreexpresión de la NsAHbs 1 de espinaca en *A. thaliana* incrementó la velocidad de floración, pero las plantas resultaron más susceptibles al estrés osmótico y salino (Bai et al., 2016). Por su parte, en *M. truncatula*, una NsAHb de clase 1 se activa transcripcionalmente bajo condiciones de hipoxia y se expresa preferencialmente en los meristemas, los haces vasculares de las raíces y los nódulos (Villar et al., 2020). Sin embargo, su localización no es restrictiva y se ha sugerido que podría cambiar en función de estímulos y disponibilidad de O₂. Por ejemplo, los promotores provenientes de las NsAHbs de *Parasponia andersonii* y *Trema fomenfosa* mostraron actividad de su promotor en los nódulos simbióticos de *Lotus corniculatus* cuando se expresan de manera heteróloga (Andersson et al., 1997).

En el caso de las SAHbs, se encontró que *P. vulgaris* tiene dos representantes, *PvSAHbA* y *PvSAHbB*, siendo *PvSAHbA* la que presenta una mayor expresión en los nódulos. En *L. japonicus*, el silenciamiento de una SAHbs da como resultado la formación de nódulos blancos, los cuales presentan una elevada concentración de oxígeno libre y exhiben una proporción ATP/ADP reducida; además en estos nódulos se observan alteraciones en la ultraestructura y en la diferenciación de los bacteroides (Ott et al., 2005, 2009). De manera relevante, en *L. japonicus* existe una NsAHbs de la clase 1 que se expresa en los nódulos, y su sobreexpresión incrementa el número de nódulos y la fijación de nitrógeno (Shimoda et al., 2009). Además, las líneas estables sobreexpresantes del mismo gen, tienen niveles reducidos de NO e incrementan la fijación de N₂ en nódulos maduros y senescentes (Fukudome et al., 2019).

Por otra parte, se encontró que *PvSAHbA* y *PvNsAHb3B* incrementan sus niveles de expresión ante la infección con *F. solani* y *Endornavirus*. De manera interesante, existen diversos reportes que describen la relación entre las Hbs y la respuesta inmune de las plantas. En este sentido, se ha reportado que la expresión de los genes que codifican para NsAHbs de la clase 1 en algodón son inducidas por hormonas relacionadas con la defensa de las plantas como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Seregélyes et al., 2003). Además,

en las plantas que presentan alguna alteración en la expresión endógena de las hemoglobinas, se ve afectada positiva o negativamente la respuesta de defensa ante diferentes patógenos. La sobreexpresión de una NsAHb de algodón en *Arabidopsis* incrementó la expresión de genes implicados en la defensa de las plantas (PR) y genes de la vía biosintética de JA, lo cual conlleva a una mayor resistencia ante patógenos como *Verticillium dhaliae* (Qu et al., 2006). Asimismo, la sobreexpresión de una NsAHb de la clase 1 de *Medicago sativa* en tabaco conlleva al incremento de la resistencia al virus de la necrosis del tabaco (TNV) y a la infección de *Pseudomonas syringae* (Seregélyes et al., 2003). Sin embargo, en el 2012, Mur y colaboradores reportaron que la sobreexpresión de una NsAHb de clase 1 de *Arabidopsis* regula negativamente la respuesta contra *Pseudomonas syringae* y *Botrytis cinerea*. Los autores relacionaron el incremento de la susceptibilidad de la línea sobreexpresora (35S-GLB1) a esos patógenos, debido a una menor producción de ET y del JA. Por otra parte, el silenciamiento de esta hemoglobina causó un incremento de NO y H₂O₂ en las plantas mutantes (Mur et al., 2012). En este sentido se ha reportado que, las NsAHbs, al modular la concentración de NO, pueden regular la respuesta de defensa de las plantas debido a que el NO es regulado por la vía de SA e incrementa los niveles de JA por la inducción de tres genes biosintéticos: *LOX2*, *AOS* y *OPR3* (Wally et al., 2013).

CONCLUSIÓN

Los análisis filogenéticos evidencian la formación de cuatro clusters de hemoglobinas en 18 especies de plantas. El de mayor ancestría NsAHb3, seguido de SAHb, NsAHb1 y el NsAHb2 de reciente aparición. En el cluster SAHb se agruparon especies que tienen interacciones simbióticas como las leguminosas y dos gimnospermas. Al igual que en el cluster NsAHb2, en el cluster NsAHb1 especies ancestrales y gramíneas. Los sitios canónicos E7, CD1 y C2 que están involucrados en la unión al grupo hemo y en la interacción con los ligandos están conservados en la mayoría de las 142 secuencias de plantas analizadas. El paisaje transcripcional evidenció la sobreexpresión de la *PvSAHbA* en los nódulos de *P. vulgaris*, mientras que las *PvNsAHb*'s tuvieron mayor expresión en los tejidos no simbióticos. En la interacción con patógenos identificamos que durante la infección con *F. solani* se sobreexpresa la *PvSAHbA* y con *Endornavirus* la *PvNsAHb3B*. Estos resultados nos permiten sugerir que, además de ser específicas de un proceso simbiótico o infeccioso, las hemoglobinas tienen una expresión estadio-tejido específicas en *P. vulgaris*.

Agradecimientos

Agradecemos a CONAHCyT por las becas posdoctorales a Janet Palacios-Martínez (No. 2342655) y a Ana Isabel Chávez-Martínez (No. 4057713). A PAPIIT-UNAM IN221224 y Fronteras de la Ciencia CONAHCyT 2023 No. 1032. También al apoyo de los técnicos laboratoristas MC. Juan Olivares-Grajales y a la Biol. Olivia Santana Estrada

Conflicto de interés

Los autores no tienen conflictos de intereses que declarar.

REFERENCIAS

- Andersson CR, Llewellyn DJ, Peacock WJ, Dennis ES. 1997. Cell-specific expression of the promoters of two nonlegume hemoglobin genes in a transgenic legume, *Lotus corniculatus*. *Plant Physiology*, 113(1), 45-57.
- Bahmani R, Kim DG, Na JD, Hwang S. 2019. Expression of the tobacco non-symbiotic class 1 hemoglobin gene *hb1* reduces cadmium levels by modulating *cd* transporter expression through decreasing nitric oxide and ROS level in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 10(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00201>
- Bai X, Long J, He X, Yan J, Chen X, Tan Y, Li K, Chen L, Xu H. 2016. Overexpression of spinach non-symbiotic hemoglobin in *Arabidopsis* resulted in decreased NO content and lowered nitrate and other abiotic stresses tolerance. *Scientific Reports*, 6(May), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep26400>
- Becana M, Yruela I, Sarath G, Catalán P, Hargrove MS. 2020. Plant hemoglobins: a journey from unicellular green algae to vascular plants. *New Phytologist*, 227(6), 1618–1635. <https://doi.org/10.1111/nph.16444>
- Borroto RG, Arredondo-Peter R. 2015. Las hemoglobinas de las bacterias. *Revista de Educación Bioquímica*, 34(3), 66–71.
- Chen L, Wu Q, He T, Lan J, Ding L, Liu T, Wu Q, Pan Y, Chen T. 2020. Transcriptomic and Metabolomic Changes Triggered by *Fusarium solani* in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Genes*, 11(2), 177. <https://doi.org/10.3390/genes11020177>
- Fukudome M, Watanabe E, Osuki K, Imaizumi R, Aoki T, Kucho K, Becana M, Uchiumi T. 2019. Stably transformed *Lotus japonicus* plants overexpressing phytohemoglobin *LjGlb1-1* show decreased nitric oxide levels in roots and nodules as well as delayed nodule senescence. *Plant & Cell Physiology*, 60: 816–825. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy245>
- Hardison RC. 1996. A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist, and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 5675–5679. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5675>
- Hebelstrup KH, Hunt P, Dennis E, Jensen SB, Jensen EO. 2006. Hemoglobin is essential for normal growth of *Arabidopsis* organs. *Physiologia Plantarum*, 127(1), 157–166. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00653.x>
- Hoy JA, Hargrove MS. 2008. The structure and function of plant hemoglobins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.016>
- Hoy JA, Robinson H, Trent JT, Kakar S, Smagghe BJ, Hargrove MS. 2007. Plant Hemoglobins: A Molecular Fossil Record for the Evolution of Oxygen Transport. *Journal of Molecular Biology*, 371(1), 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.029>

- Hunt PW, Watts RA, Trevaskis B, Llewelyn DJ, Burnell J, Dennis ES, Peacock WJ. 2001. Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. *Plant Molecular Biology*, 47(5), 677–692. <https://doi.org/10.1023/A:1012440926982>
- Igamberdiev AU, Hill RD. 2004. Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *Journal of experimental botany*, 55(408), 2473–82. doi: 10.1093/jxb/erh272. Epub 2004 Sep 24. PMID: 15448180.
- Khankhum S, Sela N, Osorno JM, Valverde RA. 2016. RNAseq analysis of endornavirus-infected vs. endornavirus-free common bean (*Phaseolus Vulgaris*) cultivar black turtle soup. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 10–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01905>
- Kundu S, Trent JT, Hargrove MS. 2003. Plants, humans and hemoglobins. *Trends in Plant Science*, 8(8), 387–393. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00163-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00163-8)
- Kuruthukulangarakoola GT, Zhang J, Albert A, Winkler B, Lang H, Buegger F, Gaupels F, Heller W, Michalke B, Sarioglu H, Schnitzler JP, Hebelstrup KH, Durner J, Lindermayr C. 2017. Nitric oxide-fixation by non-symbiotic haemoglobin proteins in *Arabidopsis thaliana* under N-limited conditions. *Plant Cell and Environment*, 40(1), 36–50. <https://doi.org/10.1111/pce.12773>
- Larrainzar E, Villar I, Rubio MC, Pérez-Rontomé C, Huertas R, Sato S, Mun JH, Becana M. 2020. Hemoglobins in the legume–Rhizobium symbiosis. *New Phytologist*, 228(2), 472–484. <https://doi.org/10.1111/nph.16673>
- Letunic I, Bork P. 2024. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, gkae268.
- Maassen A, Hennig J. 2011. Effect of *Medicago sativa* Mhb1 gene expression on defense response of *Arabidopsis thaliana* plants. *Acta biochimica Polonica*, 58(3), 427–432. https://doi.org/10.18388/abp.2011_2257
- Mur LAJ, Sivakumaran A, Mandon J, Cristescu SM, Harren FJM, Hebelstrup, Kim H. 2012. Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene-mediated resistance mechanisms against pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 63(12), 4375–4387. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers116>
- Ott T, Sullivan J, James EK, Flemetakis E, Günther C, Gibon Y, Ronson C, Udvardi M. 2009. Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of *Lotus japonicus* root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 800–808. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-7-0800>
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberg P, Udvardi M. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology*, 15: 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.042>
- Qu ZL, Zhong NQ, Wang HY, Chen AP, Jian GL, Xia GX. 2006. Ectopic expression of the cotton Non-symbiotic Hemoglobin gene GhHbd1 triggers defense responses and increases disease tolerance in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 47(8), 1058–1068. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj076>
- Schrödinger L, DeLano W. 2020. *PyMOL*.
- Seregélyes C, Barna B, Hennig J, Konopka D, Pasternak TP, Lukács N, Fehér A, Horváth GV, Dudits D. 2003. Phytoglobins can interfere with nitric oxide functions during plant growth and pathogenic responses: A transgenic approach. *Plant Science*, 165(3), 541–550. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00213-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00213-9)
- Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T. 2009. Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, 57: 254–263.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03689.x>

- Vázquez-Limón C, Hoogewijs D, Vinogradov SN, Arredondo-Peter R. 2012. The evolution of land plant hemoglobins. *Plant Science*, 191–192, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.04.013>
- Villar I, Larrainzar E, Milazzo L, Pérez-Rontomé C, Rubio MC, Smulevich G, Martínez JI, Wilson MT, Reeder B, Huertas R, Abbruzzetti S, Udvardi M, Becana M. 2020. A plant gene encoding one-heme and two-heme hemoglobins with extreme reactivities toward diatomic gases and nitrite. *Frontiers in Plant Science*, 11, 600336. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.600336>
- Vinogradov SN, Moens L. 2008. Diversity of globin function: Enzymatic, transport, storage, and sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 8773–8777. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700029200>
- Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Arredondo-Peter R, Gough J, Dewilde S, Moens L, Vanfleteren JR. 2006. A phylogenomic profile of globins. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-31>
- Vinogradov SN, Hoogewijs D, Bailly X, Mizuguchi K, Dewilde S, Moens L, Vanfleteren JR. 2007. A model of globin evolution. *Gene*, 398, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.02.041>
- Wally OSD, Mira MM, Hill RD, Stasolla C. 2013. Hemoglobin regulation of plant embryogenesis and plant pathogen interaction. *Plant Signaling and Behavior*, 8(8). <https://doi.org/10.4161/psb.25264>
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191.
- Watts RA, Hunt PW, Hvitved AN, Hargrove MS, Peacock WJ, Dennis ES. 2001. A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10119–10124. <https://doi.org/10.1073/pnas.191349198>