

Análisis bioinformático de cpDNA en seis especies del género *Adiantum*

MINJAREZ, Benito*† & MACÍAS-RODRÍGUEZ, Miguel Ángel

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara

Recibido Enero 02, 2016; Aceptado Marzo 15, 2016

Resumen

Las Pteridophyta son plantas vasculares inferiores con ciclo de vida independientes. Generalmente se encuentran en ambientes húmedos pero pueden adaptarse a un rango amplio de hábitats. Los helechos tienen gran importancia evolutiva pues, marcaron la conquista de los ambientes terrestres favoreciendo directamente en la diversificación de las especies innovando nuevas estructuras y mecanismos de adaptación, reproducción y sobrevivencia. Son después de las angiospermas el grupo más diverso de plantas vasculares con casi 9,000 especies y 267 géneros, siendo el género *Adiantum* uno de los de mayor distribución. Por otra parte, los helechos difieren fundamentalmente de las plantas con semilla en varias características biológicas y genómicas. Lo cual representa una ventaja en la generación de estudios en la búsqueda de los principales eslabones a lo largo de la cadena evolutiva. Recientes estudios filogenéticos basados en aspectos genómicos y genéticos principalmente de cpDNA apoyados en bases de datos y herramientas bioinformáticas han permitido la caracterización e identificación de rasgos comunes o ancestrales entre especies. Así, el objetivo principal de este trabajo se centra en un estudio comparativo del gen *atpB* específico de cloroplastos entre diferentes especies del género *Adiantum* en América por medio de plataformas bioinformáticas.

Adiantum, cpDNA, filogenia, *atpB*, bioinformática

Citación: MINJAREZ, Benito & MACÍAS-RODRÍGUEZ, Miguel Ángel. Análisis bioinformático de cpDNA en seis especies del género *Adiantum*. Revista de Sistemas Experimentales. 2016, 3-6: 1-12.

Abstract

Pteridophytes are a group of primitive vascular plants, the life cycle is characterized by alternating generations. Generally, are more common in humid places but they can adapt to a wide range of habitats. Ferns were also the first plants to extensively colonize the terrestrial environment directly promoting the diversification of species, innovating new structures and mechanisms of adaptation, reproduction and survival. Ferns are the most diverse group of vascular plants after angiosperms with almost 9,000 species and 267 genera being the genus *Adiantum* one of the most widely distributed. On the other hand however, ferns differ fundamentally from seed plants in several biological and genetic features. These represented an advantage to develop studies related to evolutionary processes. Recently, some phylogenetic studies based on genomic and genetic aspects through cpDNA and bioinformatic tools have allowed the characterization and identification of the common and ancestral features among species. Thus, the main purpose of this study is to correlate a gen from chloroplasts called *atpB* between different species in the genus *Adiantum* from America through bioinformatic platforms.

Adiantum, cpDNA, phylogeny, *atpB*, bioinformatic

* Correspondencia al Autor (Correo electrónico: mmacias@cucba.udg.)

† Investigador contribuyendo como primer Autor.

Introducción

Hace más de un siglo (1872) Colm propuso el término Pteridophyta (del griego *ptēris* = helecho, *phyta* = planta) para englobar como grupo taxonómico a todas las criptógamas o plantas vasculares inferiores, es decir, a los helechos, licopodios y otras plantas afines (Salvo, 1998).

Las Pteridophyta son plantas vasculares que no tienen flores y no producen semilla, se reproducen por medio de esporas, difieren de las Bryophyta y de las Spermatophyta por sus ciclo de vida donde tanto el esporofito como el gametofito son independientes en su madurez (Martínez-Salas y Ramos, 2014). Recientes estudios filogenéticos han revelado una dicotomía basal dentro de las plantas vasculares (División Traqueophyta), separándolas en dos grandes clados (subdivisiones): Licophytina (licopodios, selaginellas e isoetes) y Euphyllrophytina (plantas con semilla y helechos verdaderos) (Smith *et al.*, 2006).

Debido a lo anterior, todos los helechos han quedado incluidos dentro del grupo de las Monilofitas (infradivisión) que incluye tanto equisetos, psilotáceas y helechos eusporangiados como leptosporangiados.

Los hay terrestres, rupícolas, epífitos y acuáticos. Sin embargo, también se distribuyen en zonas áridas, pero dependen de la lluvia y de las corrientes efímeras para su reproducción (Martínez-Salas y Ramos, 2014). Generalmente se encuentran en ambientes muy húmedos y en la proximidad de corrientes, hay especies adaptadas a un rango amplio de hábitats. La mayoría de las especies se encuentran en zonas tropicales, y es el bosque mesófilo el tipo de vegetación más rico en este tipo de plantas; le siguen la selva perennifolia, el bosque de pino-encino, la selva caducifolia, los matorrales xerófilos y la vegetación acuática (Riba, 1993).

Actualmente se estima la existencia de 10,000 especies de helechos en el mundo, concentradas en áreas tropicales con diversidad de ambientes (Mickel y Smith, 2004).

Los helechos leptosporangiados se originaron hace 300 m.a. y son, después de las angiospermas el grupo más diverso de plantas vasculares con casi 9,000 especies y 267 géneros (Schuettpelez y Pryer, 2007).

En México se encuentra alrededor de 11% del total de especies de pteridofitas del mundo y está representado 75% (95) de los géneros reportados para América, tiene una de las pteridofloras más diversas del mundo y más amplias latitudinalmente, lo que representa cerca de 5% de las especies de plantas vasculares en el país. Según Martínez-Salas y Ramos (2014) se han registrado 888 especies, de ellas 155 son endémicas lo que representa el 17% de helechos para México.

Esta pteridoflora mexicana es más que una combinación de especies del oeste de Estados Unidos y de Centroamérica, pues constituye una compleja mezcla taxonómica que incluye géneros cuyo centro de origen se encuentra en México. Además, es destacable el hecho de que los géneros con mayor porcentaje de endemismo en México habitan en ambientes estacionalmente secos (Riba, 1993).

Género *Adiantum*

Uno de los géneros con mayor distribución y casi con 200 especies, es el género *Adiantum*. Donde, más de la mitad de ellas son de la América tropical. Las cuales crecen a elevaciones de bajas a medias en bosques húmedos o en regiones secas (Mickel y Smith, 2004).

De las casi 200 especies de *Adiantum* en América, 35 especies ocurren en México, de éstas, 13 están ampliamente distribuidas hasta Sudamérica y las Indias occidentales. Cinco especies son endémicas de México (*A. amblyopteridium*, *A. galeottianum*, *A. macvaughii*, *A. oaxacanum* y *A. shepherdii*), y otras dos son relativamente raras fuera de México (*A. feei* y *A. tricholepis*) (Mickel y Smith, 2004).

El género *Adiantum* fue descrito por Carlos Linneo y publicado en *Species Plantarum* en 1753, su nombre proviene del griego y significa "no mojar", en referencia a las hojas, por su capacidad de ser arrojadas al agua sin mojarse.

Según Mickel (1992) describe el género de hábito terrestre o epipétrico, con rizoma corto a largo rastrero o subrecto, escamoso; de frondas de pequeñas a largas; estipe castaño a atroporpúreo, lustroso, glabro a densamente cubierto de angostas escamas o pelos, quebradizo; con una lámina simple a 5-pinnada; segmentos a menudo romboides, trapezoides o flabelados, sésiles o corto peciolulallos, pero nunca adnados al raquis, a menudo deciduos (articulados); lámina generalmente glabra, algunas veces glauca, pocas especies presentan pelos rígidos en la lámina o escamas en forma de pelos en las láminas; venas libres, bifurcándose, raramente anastomosadas, a menudo con idioblastos epidérmicos lineares entre las venas verdaderas; los soros nacen sobre y entre las venas del margen fuertemente recurvado y altamente modificado (falso indusio), de modo que los esporangios se oponen a la superficie abaxial de la hoja. Este carácter es una autapomorfía del género. El indusio puede ser de forma redondo-reniforme, semilunar, oblongo o linear, de 1 a muchos por segmento; parafisos ausentes, esporas en tetradas globosas, por lo general de color pardo claro a amarillento (ver tabla 1).

Las características importantes en la agrupación y unión de las especies incluyen los patrones de ramificación de las láminas (pinnadas o imparipinnadas; con o sin conformar una pinna terminal), el grado de división de láminas (pinadas, 2-pinadas, o más dividida), la presencia o ausencia de idioblastos venuloides ("venas" epidérmicas falsas), formas de las últimas divisiones (si son dimidiadas o flabelada), indumento de las láminas y ejes (ya sea de pelos, escamas, o ninguno), márgenes de las escamas (entero, denticulados, o ciliados), nervadura (libre o anastomosada) extremos de la vena (ya sea en los dientes o en los senos), y la presencia o ausencia de zonas de articulación en las bases de las divisiones finales. Esta última característica es presumiblemente una adaptación a hábitats periódicamente más secos (Mikel y Smith, 2004).

Las afinidades del género *Adiantum* son con los géneros de la familia Pteridaceae, aunque el género está algo aislado, es a menudo tratado dentro de la subfamilia Adiantoideae. Es grupo hermano de los helechos vittaroides, los cuales son usualmente también tratados como subfamilia Vittarioideae, ambas subfamilias dentro Pteridaceae (Tryon y Tryon, 1982; Mikel y Smith, 2004; Smith *et al.*, 2006).

Por otro lado, se han reportado diferentes usos medicinales en especies de *Adiantum*, como la utilización de sus rizomas, que pueden producir un efecto abortivo, las frondas han gozado de propiedades medicinales de un gran valor popular, como béquico, expectorante, emoliente, astringente, y ligeramente diurético. Por ejemplo, *A. capillus-veneris* es usado como antitusivo para curar afecciones pectorales, facilitar las menstruaciones o deshacer piedras en los riñones (Arreguín-Sánchez, 1987).

En la actualidad se conocen unas 50 especies de *Adiantum* que son cultivadas, siendo muchas de ellas producidas industrialmente para su comercialización, dada la belleza de su frondas y la facilidad de cultivo (Salvo, 1998).

Diversidad genética

Todo lo anteriormente mencionado, hace sin duda de los helechos un grupo importante de estudio tanto para la conservación de los ecosistemas en los que habita actualmente y su relación con el entorno; así como también por su gran importancia comercial y medicinal. Pero además de estas cualidades, destacamos también la importancia que representa su estudio en la búsqueda de los mecanismos evolutivos que fueron utilizados para la colonización de los ecosistemas terrestres.

Varios reportes indican como las plantas evolucionaron hace aproximadamente 470 m.a. a partir de las algas verdes de ambientes acuáticos hacia ambientes terrestres marcando con ello uno de los mayores eventos en la historia de la tierra. Pues esto favoreció directamente en la diversidad y evolución tanto de plantas como animales. (Chaloner, 1998; Karol, *et al.*, 2001).

Así, durante millones de años las plantas vasculares han innovado nuevas estructuras y mecanismos de adaptación, reproducción y sobrevivencia, lo que lleva al aumento de la complejidad morfológica y fisiológica (Plackett, 2015). Sin embargo, hasta ahora no se sabe con certeza cuales son los grupos específicos que dieron origen a las primeras plantas vasculares, como tampoco se conoce por completo cuales fueron los mecanismos genéticos y adaptativos que se generaron para dicho fin, lo que ha generado controversia en la búsqueda de un ancestro común para todo este grupo.

Aunque la búsqueda y caracterización de dichos eventos suele ser un proceso poco sencillo, debido a que en muchas ocasiones puede haber miembros intermediarios que permanecen desconocidos o se cuenta con muy poca información o evidencia fósil. Aun así, es posible hacer estudios comparativos entre especies que nos permitan conocer rasgos comunes o ancestrales y/o aquellos que difieren de una especie a otra.

Lo anterior, se demuestra en varios trabajos previos donde por medio de técnicas de secuenciación genómica y apoyándose en la información contenida en las distintas bases de datos ha permitido un rápido crecimiento en la disponibilidad de secuencias del genoma de muchas especies (Wolf, *et al.*, 2015; Zhong, *et al.*, 2015). Dichas técnicas han favorecido en la búsqueda de nuevos marcadores moleculares que permitan establecer y aclarar las relaciones evolutivas entre las distintas especies favoreciendo la generación de nuevos y más precisos árboles filogenéticos (Zhong, *et al.*, 2015).

Por otro lado, cabe destacar que uno de los retos que representa el llevar a cabo este tipo de estudios son los rasgos genómicos y genéticos. Pues, los helechos a diferencia de las plantas con semillas (como se mencionó anteriormente), muestran una alternancia de vida libre entre el gametofito y el esporofito lo que presumiblemente hace que solo una parte del genoma se exprese en la fase haploide o en la diploide; lo que probablemente tiene relación con el número y tamaño de los cromosomas de los helechos que suele ser mayor en comparación con las espermatofitas pues, en promedio presentan 57 y 16 cromosomas respectivamente (Klekowski y Baker, 1996). Además de que los helechos muestran este tipo de genomas, existen otros fenómenos relacionados a mecanismos evolutivos entre las criptógamas vasculares como es la hibridación.

Principalmente los patrones no aleatorios de flujo genético interespecífico o también conocida como hibridación asimétrica (Testo, *et al.*, 2015) aumentando aún más la variación y diversidad genética.

Lo anterior solo hace aun más complejo el estudio genético a gran escala pues el poder identificar genes o secuencias genéticas conservadas entre las distintas especies de este grupo de plantas vasculares ha representado un serio reto para los investigadores.

ADN de cloroplastos

Una alternativa en la búsqueda de características evolutivas a nivel genético ha sido el enfocarse en aquellos genes presentes en organelos subcelulares como las mitocondrias y los cloroplastos como lo señalan algunos estudios previamente reportados (Wolf, 1997; Wolf, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2015).

Donde por ejemplo, el material genético contenido en los cloroplastos (cpDNA) se ha utilizado para conocer la relación en la distribución de diferentes variedades. Como el trabajo realizado por Wang y colaboradores (2015), donde se analizaron dos especies localizadas entre China y las Islas Canarias. Para cual se estudiaron muestras de cpDNA particularmente los genes *atpA*, *atpB* y *rbcL*. Pudiendo concluir que *Adiantum reniforme* var. *sinense* es una especie independiente de la variedad de *Adiantum reniforme* var. *reniforme*, renombrando a la primera como *Adiantum nelumboides* X.C. Zhang. Además, de demostrar la viabilidad de los análisis filogenéticos y la estimación en la divergencia de diferentes especies (Wang, *et al.*, 2015).

Además, este tipo de estudios no solo nos permiten conocer aspectos filogenéticos si no también fisiológicos como el trabajo realizado por Kawaga y Wada en 1999.

Donde, se analizó los efectos fototrópicos y generadores de energía, dos eventos fundamentales para toda planta. En dicho estudio se indica la importancia en la absorción de la luz y su influencia en la eficiencia de la fotosíntesis y su relación con un grupo de genes. Todo lo anterior nos permite el poder plantearnos nuevos retos en la búsqueda no solo del parentesco entre diferentes especies si no también el identificar los genes o grupo de genes que se han adquirido o especializado para una mejora a nivel morfológico o funcional. Dando a la planta a lo largo de su evolución, nuevas herramientas para su desarrollo, conservación, propagación y adaptabilidad.

El gen *atp B*

Como se ha mencionado, algunos estudios han utilizado el uso de secuencias nucleotídicas referentes a un gen, principalmente de cloroplastos. Esto con la finalidad de realizar análisis filogenéticos en plantas destacándose el gen *rbcL*. Este gen parece brindar información de parentesco entre diferentes familias de plantas (Gastony & Rollo, 1995).

Sin embargo, el uso filogenético del gen *rbcL* ofrece poca evidencia para los eventos más antiguos de divergencia, especialmente en aquellos que implican relaciones entre los grupos basales de helechos y los principales grupos de plantas vasculares (Manhart, 1994).

Debido a ello, es que se han abordado este tipo de estudios desde diferentes enfoques o buscando otro gen o grupo de genes que brinden resultados más evidentes no sólo en aspectos de filogenia sino que también permitan inferir cambios en el genoma tales como inserciones, deleciones o pérdida y/o ganancia de genes; lo cual permitirá relacionar o diferenciar entre sí grupos y especies particulares.

Así, el gen que codifica para la cadena β de la ATP sintetasa resulta un serio candidato para realizar este tipo de estudios como lo demuestran reportes previos (Wolf, 1997; Wang, *et al.*, 2015). El gen *atpB* es parte del genoma de los cloroplastos con una longitud aproximada de más de 1490 pb y está apenas río debajo de *rbcL* (Shinozaki & Sugiura, 1986).

Dicho gen codifica para una proteína transmembranal cuya principal función es la de producir ATP a partir de ADP en presencia de un gradiente de protones a través de la membrana principalmente por sus subunidades beta. Además, se ha sugerido ha dicho gen como una herramienta útil y novedosa para realizar estudios de parentesco entre diferentes grupos de plantas incluyendo las pteridofitas (Wolf, 1997).

Cabe resaltar que aun cuando la generación de estudios filogenéticos basados en el análisis de genes o de un solo gen en particular debe tenerse en mente que esto no necesariamente representara la filogenia exacta de toda la especie si no, la relación directa al gen o grupo de genes a estudiar (Doyle, 1992).

Divergencia filogenética

Así, siendo los helechos el principal grupo de plantas vasculares “inferiores” es también uno de los más antiguos, pues sus primeros registros datan del Período Devónico de la era Paleozoica, los cuales tuvieron su apogeo a fines del Mesozoico (período Cretácico). Por lo que, dicho grupo representan junto con las briofitas, gimnospermas y angiospermas las llamadas embriofitas, que reúnen en su conjunto el 14.3% de los seres vivos.

Por otra parte, los helechos difieren fundamentalmente de las plantas con semilla en varias características biológicas y genómicas.

Lo cual representa una clara evidencia en la generación de estudios en la búsqueda de los principales eslabones a lo largo de la cadena evolutiva entre los ambientes acuáticos y la colonización de los ambientes terrestre.

Aun cuando se han hecho grandes avances en el estudio y entendimiento de los mecanismos morfológicos y fisiológicos de este grupo para su supervivencia y evolución, aun se desconocen los aspectos genómicos y genéticos de dicho grupo tales como su alto número de cromosomas y genoma de gran tamaño. De hecho hasta el día de hoy se carece de una secuencia completa del genoma lo cual hace aun más difícil su estudio e impide el poder contar con una visión más detallada de la evolución genética de las plantas vasculares. Por lo que el uso de análisis comparativos a gran escala en aspectos genéticos y genómicos para la caracterización de los helechos provee de gran información en la comprensión de los mecanismos evolutivos, no sólo de las plantas terrestres si no en el entendimiento y desarrollo de la vida en general. Pues esto tiene gran efecto sobre las condiciones de hábitat (flora, fauna y clima). Además de brindar conocimiento en otros procesos como la reproducción, pasando de una reproducción homospórica a heterospórica impactando favorablemente en la colonización del hábitat. Así, el objetivo principal de este trabajo se centra en el análisis y diversidad genética entre diferentes especies del género *Adiantum* en América a través de un estudio comparativo del gen *atpB* específico de cloroplastos por medio de plataformas bioinformáticas.

Metodología

Se seleccionaron aquellas especies americanas del género *Adiantum* que contaran con información contenida en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Las especies seleccionadas fueron: *Adiantum aleuticum* (Ruprecht) Paris, *A. capillus-veneris* L., *A. lunulatum* Burm. f., *A. pedatum* L., *A. peruvianum* Klotzch, y *A. raddianum* C.Presl, posteriormente se buscó información referente a las descripciones morfológicas y, hábitat y ecología de cada una de las especies para poder compararlas. (Paris, 1993; Mikel & Smith, 2004)

Las fotos de las especies se obtuvieron en las siguientes páginas electrónicas:

Adiantum aleuticum: Flora de Eastern Washington and Adjacent Idaho, *A. pedatum*: Flora of North America, *A. peruvianum*: Plant Systematics y de Poppinga *et al.* 2015, *A. lunulatum*: Flora de Zimbabwe, *A. raddianum*: Fernkloof Nature Reserve, New Zealand Plant Conservation Network. Y para el caso de *A. capillurus veneris* las fotos se obtuvieron de especies que crecen dentro del Área de Protección de Flora y Fauna La Primavera, en Jalisco, Méx.

Análisis bioinformático del gen *atpB*

La identificación del gen se realizó utilizando la base de datos del NCBI, permitiendo la selección de la secuencia específica para el gen *atpB* en cada una de las especies del género *Adiantum*. Posteriormente, se hizo el análisis bioinformático y el alineamiento para dicho gen utilizando la plataforma que ofrece el software de Kaling 2.0 (Multiple Sequence Alignment) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/>), el cual brinda un algoritmo de alineamiento de secuencias múltiples rápida y precisa. Además, se realizó la identificación de las proteínas utilizando la base de datos de UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.ebi.ac.uk/swiss-prot/>) con los parámetros predeterminados por la página.

También cada una de las secuencias nucleotídicas obtenidas para cada uno de los genes fue alineada por medio de la plataforma de MULTALIN (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_multalin.html)

Posteriormente, cada uno de los genes fue analizado para obtener un cladograma a través del software Dendroscope (version 3.5.7, built 30 Jan 2016) generado por la Universität Tübingen (<http://dendroscope.org>).

Resultados

Características morfológicas del género Adiantum en América. Se seleccionaron seis diferentes especies americanas del género *Adiantum*, las cuales fueron *A. capillus-veneris* (JF935427), *A. raddianum* (JF935387), *A. aleuticum* (JN052875), *Adiantum pedatum* (JN052880), *Adiantum peruvianum* (JF935365) y *Adiantum lunulatum* (JF935376).

Posteriormente se realizó una tabla comparativa referente a las características morfológicas y ecológicas para corroborar si compartían algunos rasgos o de lo contrario, en que características diferían unas de otras (Tabla 1). Además, se realizó un análisis morfológico entre cada una de las especies las cuales se muestran en la Figura 1. Es importante mencionar que aun cuando las imágenes de las especies no muestran las mismas partes estructurales, es aun posible hacer una correlación entre dichas especies. Una vez hecho el análisis morfológico estructural de las seis especies del género *Adiantum* se realizó un mapa de distribución para conocer las áreas en las cuales se desarrollan, y poder realizar una comparación biogeográfica (Figura 2). Dicho mapa, fue correlacionado con el árbol filogenético obtenido *in silico* por medio de diferentes plataformas bioinformáticas (ver materiales y métodos).

Análisis bioinformático del gen *atpB* para el género *Adiantum*.

Para llevar a cabo el estudio filogenético de las especies, se eligió el gen *atpB*. El cual, como se mencionó anteriormente, está presente en los cloroplastos y pertenece a la familia de las ATPasas presente en prácticamente todos los reinos y participa en múltiples procesos celulares entre los que se destaca, la fusión celular, la replicación de DNA, el transporte y degradación de proteínas; además de facilitar el ensamblaje de proteínas recién sintetizadas (Ogura y Wilkinson, 2001).

Para dicho estudio, se seleccionaron de la base de datos del NCBI, las secuencias nucleotídicas referentes a las isoformas más largas para el gen de cada una de las especies. De tal forma, se realizó un alineamiento de dichas secuencias utilizando la plataforma MULTALIN, Kaling junto con un BLAST con el propósito de identificar regiones conservadas las cuales mostraran mayor similitud así como, destacar zonas específicas y cambios puntuales entre las diferentes secuencias biológicas a través de una agrupación jerárquica. Dicho alineamiento muestra que las seis especies presentan una similitud del más del 90% pero, se destacan ciertos cambios puntuales a lo largo de la secuencia específica para *A. raddianum* (Figura 3).

Análisis filogenético y biogeográfico del género *Adiantum* en América

Con base a la información obtenida, se generó un cladograma que nos muestra las afinidades y diferencias de las seis especies del género *Adiantum*. Dichos datos fueron analizados por medio del software Dendroscope el cual es capaz de generar árboles filogenéticos por medio del análisis de las secuencias nucleotídicas, con base en la evaluación del grado de sustitución en el número de bases y regiones genómicas comparadas.

Dado a que las diferencias tanto en la secuencia, longitud y orden genético son características intrínsecas que más impactan en los estudios de relación y conservación evolutiva, nos permiten así conocer la homología entre cada una de las especies referente al gen a evaluar.

Este resultado muestra una marcada división entre las especies, formando tres diferentes grupos. Los cuales, fueron nombrados como Grupo I para *A. peruvianum* y *A. raddianum*, grupo II *A. pedatum* y *A. aleuticum* y en el grupo III tenemos a *A. capillus-veneris* y *A. lunulatum*. Cada uno de ellos incluyen dos diferentes especies lo que permite desde este punto, identificar aquellas especies más emparentadas así como destacar a aquellas más primitivas o que comparten una historia natural en común (Figura 4). Además, la información obtenida del árbol filogenético, corrobora la distribución y afinidad de las seis especies del género *Adiantum* mostrado previamente (Figura 2).

El grupo I incluye a *Adiantum raddianum* y *A. peruvianum* que hasta ahora no se encuentran ligadas a ninguna especie o grupo y permanecen como especies independientes. Ambas, son de afinidad Neotropical pero con diferentes áreas de distribución. La primera se distribuye desde Mesoamérica hasta el norte de Sudamérica y la segunda, se ubicada en la región andina de Bolivia, Ecuador, Perú, y ultimadamente registrada en el noroeste argentino (Cacharani *et al.* 2014).

Por su parte el grupo II conformado por *A. pedatum* y *A. aleuticum* presentan una gran similitud y comparten muchas características morfológicas que las hacen ser muy semejantes (Tabla 1), esto se relaciona con la distancia tan corta que existe entre ellas.

Aunque ambas especies son de afinidad templada y se distribuyen en Norteamérica en su porción más septentrional, llegan a diferenciarse por sus áreas de distribución tan contrastantes, la primera lo hace en la vertiente pacífica y la segunda en la oriental. Finalmente, el grupo III que incluye a las especies *A. capillus-veneris* y *A. lunulatum* aunque no presentan características morfológicas semejantes, como hojas bipinnadas y hojas pinnadas respectivamente, ambas, en este análisis, se unen en este clado por ser especies de amplia distribución en el continente y de afinidad Pantropical; la primera mayormente distribuida desde la mitad sur de EEUU hasta el norte de Sudamérica y la segunda desde la parte de Mesoamérica hasta Argentina. Con base al árbol filogenético podemos observar que las seis especies americanas comparten el gene *atpB*, desde que aparecieron en el Devónico medio y hasta nuestros días, presentan una alta diversidad en cuanto a los hábitats que colonizan, desde bosques templados de coníferas, de encino, mesófilos de montaña o bosques tropicales caducifolio, semidecíduo o perennifolio, la mayoría de las especies siempre prefieren lugares húmedos y sombreados.

Conclusiones

A lo largo de este trabajo, nos hemos propuesto analizar la relación del gen *atpB* y la fitogeografía del género *Adiantum* desde un punto de vista evolutivo. Apoyándonos en el uso de diferentes software, herramientas bioinformáticas, aspectos morfológicos y biogeográficos de seis diferentes especies americanas para dicho género. Con la finalidad de conocer la historia evolutiva del grupo basándose principalmente en la generación de árboles filogenéticos, los cuales, representan no sólo el nivel evolutivo y la era geológica en la que aparecieron si no también muestran cuáles son aquellas especies más emparentadas y relacionadas dentro de un mismo grupo.

Los cuales nos han permitido identificar en muchos de los casos ancestros comunes y algunos otros, aun se desconocen miembros intermedios a lo largo de la filogenia. Con base a los resultados obtenidos del análisis bioinformático del gen *atpB*, se generó el cladograma donde relacionamos su biogeografía y morfología, pudiendo observar tres grupos principales. El Grupo I, conformado por dos especies *A. raddianum* y *A. peruvianum*, ambas especies no forman un grupo bien definido, ya que morfológica y biogeográficamente son muy distintas, se unen al resto de las especies por ser de distribución tropical; la primera se distribuye principalmente por Mesoamérica hasta la parte norte de Sudamérica, según Mikel y Smith (2004) podría no ser una especie nativa, si no más bien recientemente introducida, escapada de cultivo, ya que en ninguna parte de México es común, excepto en el estado de Morelos. La especie *A. peruvianum* no se encuentra ligada a ninguna otra especie o es la más aislada, debido a que, a diferencia del resto de las demás, su distribución se ubica en el hemisferio sur, en la región andina de Bolivia, Ecuador y Perú y noroeste argentino; creciendo en el sotobosque de selva montaña, en lugares húmedos y sombríos (Cacharani *et al.* 2014). Y morfológicamente presenta hojas pinnadas a diferencia del resto de las especies.

A continuación, El Grupo II une dos especies muy emparentadas tanto desde el punto de vista morfológico, como biogeográfico se trata de *A. aleuticum* y *A. pedatum*, ambas especies se caracterizan por ser muy semejantes y sus diferencias son muy sutiles e inclusive algunas páginas especializadas en taxonomía vegetal (Tropicos.org) las consideran una sola especie (*A. pedatum*), con sus variantes infraespecíficas; otras páginas como (The Plant List, ó Taxonomic Name Resolution Service) las consideran como especies diferentes:

En nuestro caso las consideramos como dos especies diferentes de acuerdo a Flora de Norteamérica, ya que aunque son muy semejantes como ya se había dicho, pero hay varias características morfológicas que nos hacen considerarlas especies diferentes (Tabla 1). Además sus áreas de distribución son muy diferentes, aunque ambas se distribuyen en el Hemisferio Norte, *A. aleuticum* se distribuye principalmente en la porción occidental de Norteamérica a lo largo de las provincias bióticas Aleutiana, Sitkan, Oregoniana y Californiana propuestas por Dice (1943), llegando hasta el estado de Chihuahua en México, sobre una altitud que va desde los 0-3200 m, en una variedad de hábitats en toda su gama, desde húmedos, barrancas boscosas a eriales de serpentina y poco frecuente en acantilados costeros subalpinos; mientras que *A. pedatum* se presenta en la vertiente oriental de norteamericana a lo largo de las provincias Caroliniana y Canadiense, en la Región Ecológica Bosques Templados del Este (CCA, 1997) con una distribución altitudinal inferior a la especie anterior, de 0-700 m y se limita a los bosques de hoja caduca en el este de América del Norte.

Por último, El Grupo III donde *Adiantum capillus-veneris* y *A. lunulatum* se encuentran unidas por ser especies biogeográficamente Pantropicales. Ambas, son las de mayor distribución en América, aunque morfológicamente son muy diferentes y comparten pocas características como el color del estípite y raquis, $2n = 120$ (Tabla 1). Ambas se distribuye en los bosques deciduos, semideciduos y perennes. *A. capillus-veneris* se distribuye principalmente en el hemisferio norte, mientras *A. lunulatum* prefiere el hemisferio sur.

Destacamos que *A. capillus-veneris* al ser de amplia distribución presenta una gran variación genotípica. Pues, en el hemisferio oriental, las especies son diploides con $2n = 60$. Varios recuentos tetraploides se han reportados de América del Norte. Los datos de medición de esporas sugieren, sin embargo, que el citotipo poliploide no puede distribuirse ampliamente. Por lo que se necesita realizar más investigación para determinar si las poblaciones de *A. capillus-veneris* en América del Norte son la misma especie con las de Eurasia y África (Paris, 1993).

Referencias

- Arreguín-Sánchez ML, Importancia económica de las Pteridofitas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Informes Técnicos, México. 1987, I(1):1–47.
- Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J and Schwede T, Protein structure homology modelling using SWISS-MODEL Workspace. Nature Protocols, 2009 4,1.
- Cacharani DA, Ramos M y Martínez OG, Dos nuevos registros de helechos para el noroeste argentino. Darwiniana 2014, 2(2):277–283.
- Chaloner B, The greening of the land. Trends Ecol Evol. 1998, Jun 1;13(6):251.
- CCA (Comisión para la Cooperación Ambiental), *Regiones Ecológicas de América del norte, hacia una perspectiva común*. Comisión para la Cooperación Ambiental, Québec, Canadá. 1997.
- Combet C, Blanchet C, Geourjon C and Deléage G, NPS@: Network Protein Sequence Analysis TIBS 2000, Vol. 25, No 3 [291]:147–150.
- Dice LR, *The biotic provinces of North America*. University of Michigan, Press, Ann Arbor. 1943

Doyle J J, Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Systematic Botany* 1992, 17: 144–163. [SEP]

Gastony GJ, and Rollo, D. R, Phylogeny and generic circumscriptions of cheilanthoid ferns (Pteridaceae: Cheilanthes) inferred from rbcL nucleotide sequences. *American Fern Journal* 1995, 85: 341–360.

Guex N, Peitsch MC, Schwede T, Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 2009, 30(S1), S162-S173.

Kagawa T, Wada M, Chloroplast-avoidance response induced by high-fluence blue light in prothallial cells of the fern *Adiantum capillus-veneris* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Physiol.* 1999, 119(3):917–24.

Karol KG, McCourt RM, Cimino MT, Delwiche CF, The closest living relatives of land plants. *Science*. 2001, 14; 294(5550):2351–3.

Klekowski EJ Jr, Baker HG, Evolutionary significance of polyploidy in the pteridophyta. *Science*. 1996, 153(3733):305–7.

Lassmann T, Frings O, Sonnhammer EL, Kalign, 2: high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. *Nucleic acids research* 2009, 37(3):858–65.

Letunic I, Doerks T, Bork, SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43(Database issue):D257–60.

Manhart JR, Phylogenetic analysis of green plant rbcL sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1994, 3: 114–127.

Martínez-Salas E y Ramos CH, Biodiversidad de Pteridophyta en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 2014, 85:110–113.

Mickel JT, Pteridophytes. In: McVaugh R. (Ed.). *Flora Novo-Galiciana. Gymnosperms and Pteridophytes*. Vol 17. The University of Michigan Herbarium Ann Arbor. 1992, pp 137–153.

Mickel JT y Smith AR, *The Pteridophytes of Mexico*. Memoirs of the New York Botanical Garden 2004, 88: 1–568.

Ogura T y Wilkinson AJ, AAA+ superfamily ATPases: common structure diverse function. *Genes Cells* 2001, 6(7):575-97.

Paris CA. *Adiantum*. In *Flora of North America*, ed. Flora of North America Editorial Committee. New York: Oxford University Press. 1993.

Plackett AR, Di Stilio VS, Langdale JA, Ferns: the missing link in shoot evolution and development. *Front Plant Sci.* 2015, Nov 6;6:972.

PlantSistematic.org.

<www.Plantsystematics.org> (consultada en junio 2106).

Poppinga S, Haushahn T, Warnke M, Masselter T, Speck T, Sporangium exposure and spore release in the peruvian maidenhair fern (*Adiantum peruvianum*, Pteridaceae). *PLoS ONE* 2015. 10(10): e0138495. doi:10.1371/ journal. pone. 0138495.

Riba R, Mexican Pteridophytes: Distribution and endemism. In: Ramamoorthy T.P., R. Bye, A. Lot, y J. Fa (Eds.) *Biological Diversity of Mexico*. Oxford University Press. 1993, pp 379–395.

Salvo E, Helechos. In: Izco J, Barreno E, Brugués M, Costa M, Devesa J, Fernández F, Gallardo T, Llimona X, Salvo E, Talavera S y Valdés B (eds.). *Botánica*. Mc Graw Hill-Interamericana de España S.A.U. Madrid, España. 1998, pp. 353–377.

Shinozaki K, Sugiura M, Organization of chloroplast genomes. *Adv Biophys.* 1986, 21:57–78.

Smith AR, Pryer KM, Schuettpetz E, Korall P, Shneider A y Wolf PG, A Classification for extant ferns. *Taxon* 2006, 55(3):705-731.

Testo WL, Watkins JE Jr, Barrington DS, Dynamics of asymmetrical hybridization in North American wood ferns: reconciling patterns of inheritance with gametophyte reproductive biology. *New Phytol.* 2015, 206(2):785-95.

The Plant List. Version 1.1. <<http://www.theplantlist.org>> (consultada el 25 julio 2016).

The Taxonomic Name Resolution Service. Version 4.0 <tnrs.iplantcollaborative.org> [consultada el 28 julio 2016].

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org> (consultada el 25 julio 2016).

Tryon RM, Tryon AF, *Ferns and Allied Plants, With Special Reference to Tropical America*. Springer-Verlag, New York Heidelberg Berlin 1982, pp 1– 857.

Wang AH, Sun Y, Schneider H, Zhai JW, Liu DM, Zhou JS, Xing FW, Chen HF, Wang FG, Identification of the relationship between Chinese *Adiantum reniforme* var. *sinense* and Canary *Adiantum reniforme*. *BMC Plant Biol.* 2015, 5;15:36.

Wolf P, Evaluation of atpB nucleotide sequences for phylogenetic studies of ferns and other pteridophytes. *Am J Bot.* 1997, 84(10):1429.

Wolf PG, Rowe CA, Sinclair RB, Hasebe M, Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from a leptosporangiate fern, *Adiantum capillus-veneris* L. *DNA Res.* 2003, 10(2):59 – 65.

Wolf PG, Sessa EB, Marchant DB, Li FW, Rothfels CJ, Sigel EM, Gitzendanner MA, Visger CJ, Banks JA, Soltis DE, Soltis PS, Pryer KM, Der JP, An Exploration into Fern Genome Space. *Genome Biol Evol.* 2015, 26;7(9):2533 – 44.

Zhong B, Sun L, Penny D, The Origin of Land Plants: A Phylogenomic Perspective. *Evol Bioinform Online.* 2015, 8;11:137– 41.