



Ciencias Marinas

ISSN: 0185-3880

cmarinas@uabc.mx

Universidad Autónoma de Baja California
México

Juárez, OE.; Rosas, C.; Arena-Ortiz, ML.
Phylogenetic relationships of *Octopus maya* revealed by mtDNA sequences
Ciencias Marinas, vol. 38, núm. 3, septiembre, 2012, pp. 563-575
Universidad Autónoma de Baja California
Ensenada, México

Available in: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48024401008>

- How to cite
- Complete issue
- More information about this article
- Journal's homepage in redalyc.org

redalyc.org

Scientific Information System
Network of Scientific Journals from Latin America, the Caribbean, Spain and Portugal
Non-profit academic project, developed under the open access initiative

Phylogenetic relationships of *Octopus maya* revealed by mtDNA sequences

Relaciones filogenéticas de *Octopus maya* inferidas a partir de secuencias de ADNmt

OE Juárez, C Rosas, ML Arena-Ortiz*

Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación Sisal (UMDI-SISAL), Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto de abrigo s/n, Sisal, Yucatán, CP 97135, México.

* Corresponding author. E-mail: leticia.arena@ciencias.unam.mx

ABSTRACT. The phylogenetic relationships among the *Octopus* species have not been fully established. We compared sequences for three mitochondrial genes (16S ribosomal RNA, cytochrome oxydase I, and cytochrome oxydase III) from *Octopus maya*, an endemic taxon of the Yucatan Peninsula, with homologous sequences from other taxa within the *Octopus* genus, with the aim of elucidating the phylogenetic relationships of this species. Maximum likelihood trees grouped *O. maya* with octopuses that inhabit the East Pacific. Considering that the distribution of *O. maya* is limited to the Yucatan peninsula in the West Atlantic and that the sequences analyzed show equal evolutionary rates across taxa, we propose that the divergence of *O. maya* possibly started during the formation of the Panama Isthmus, when the Pacific and Atlantic basins were split. The genetic distances that *O. maya* sequences show within the trees obtained are in the range of congeneric distances of other taxa in this genus so that these sequences are characters that support the inclusion of *O. maya* within the genus *Octopus*.

Key words: *Octopus*, phylogeny, COI, COIII, 16S rRNA.

RESUMEN. Las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Octopus* no han sido establecidas por completo. En este estudio se compararon las secuencias de tres genes mitocondriales (ARN ribosomal 16S, citocromo oxidasa I y citocromo oxidasa III) de *Octopus maya*, una especie endémica de la península de Yucatán, con las secuencias de genes homólogos de otros taxones del género *Octopus*, con el objetivo de elucidar el estatus filogenético de esta especie. Los árboles de máxima verosimilitud agrupan a *O. maya* con pulpos que habitan en el Pacífico oriental. Debido a que la distribución de *O. maya* se limita a la península de Yucatán en el Atlántico occidental y que las secuencias analizadas presentaron tasas evolutivas iguales en los taxones analizados, se propone que *O. maya* tuvo origen durante la formación del istmo de Panamá, cuando las cuencas del Pacífico y el Atlántico se separaron. Las distancias genéticas que presenta *O. maya* se encuentran en el intervalo de distancias que presentan las demás especies del género; por lo tanto, estas secuencias son caracteres que apoyan la inclusión de *O. maya* dentro del género *Octopus*.

Palabras clave: *Octopus*, filogenia, COI, COIII, ARNr 16S.

INTRODUCTION

To date, the phylogenetic relationships among the 200 odd species of the genus *Octopus* have not been fully established (Hochberg *et al.* 1992, in Barriga-Sosa *et al.* 1995), with less than 50 of the total number of identified species described in detail (Barriga-Sosa *et al.* 1995, Warnke *et al.* 2004). A major difficulty has been that octopuses exhibit great phenotypic plasticity and lack hard structures and so do not lend themselves to classification by traditional phenotypic methods (Pérez-Losada *et al.* 2002). Molecular genetic data have greatly enhanced knowledge of phylogenetic relationships within the genus (Barriga-Sosa *et al.* 1995, Söller *et al.* 2000, Oosthuizen *et al.* 2004, Guzik *et al.* 2005).

Octopus maya, a benthic octopus with direct development, is endemic to the Yucatan Peninsula (Solís *et al.* 1997) and is the subject of much taxonomic conjecture. In a recent allozyme-based study (30 loci), Pérez-Losada *et al.* (2002) reported that *O. maya* genotypes clustered outside the *Octopus* genus. Furthermore, they suggested that its origin

INTRODUCCIÓN

A la fecha, aún no se han establecido completamente las relaciones filogenéticas entre las alrededor de 200 especies del género *Octopus* (Hochberg *et al.* 1992, en Barriga-Sosa *et al.* 1995), y menos de 50 del número total de especies identificadas se han descrito en detalle (Barriga-Sosa *et al.* 1995, Warnke *et al.* 2004). Un gran problema es que los pulpos presentan gran plasticidad fenotípica y carecen de estructuras duras, lo que dificulta su clasificación con métodos fenotípicos tradicionales (Pérez-Losada *et al.* 2002). Datos genéticos moleculares han contribuido a mejorar enormemente el conocimiento de las relaciones filogenéticas del género (Barriga-Sosa *et al.* 1995, Söller *et al.* 2000, Oosthuizen *et al.* 2004, Guzik *et al.* 2005).

Octopus maya, un pulpo bentónico con desarrollo directo, es endémico de la península de Yucatán (Solís *et al.* 1997) y objeto de mucha conjetura taxonómica. En un trabajo reciente en el que se utilizaron aloenzimas (30 loci), Pérez-Losada *et al.* (2002) documentaron que los genotipos de

resulted from a speciation event that followed the formation of the Isthmus of Panama, which separated the Atlantic and Pacific Oceans, as *O. mimus* was its closest taxon. However, the study of Pérez-Losada *et al.* (2002) only included samples of *O. vulgaris*, *O. mimus*, and *O. maya*. Furthermore, the role of selection effects of genotypes could have potentially obscured true underlying evolutionary relationships. It is noteworthy that *O. maya* lacks a larval stage, unlike other geographically close species such as *O. vulgaris* and *O. mimus* that have larval and paralarval stages (Warnke 1999). This might be interpreted as supporting the placement of *O. maya* outside the *Octopus* genus. The question of whether the differences in life history traits reflect the phylogenetic relationships within these octopuses also emerges. Robust phylogenetic and taxonomic conclusions for *O. maya* require comparisons of both additional taxa and genetic loci.

The objective of the present study was to combine all the 16S ribosomal RNA (rRNA), cytochrome oxidase I (COI), and cytochrome oxidase III (COIII) sequence information available for *Octopus* species with novel data for *O. maya*. As a result, this study is the first to adopt a global approach and consequently provide a potentially more complete picture of the evolutionary relationships within the genus *Octopus*, with particular attention to *O. maya*.

MATERIAL AND METHODS

DNA extraction

Specimens of *O. maya* were caught off the coast of Sisal (19°40.45' N, 90°43.00' W), Yucatan, Mexico. Sampled tissues were frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. For the DNA genome extraction, 20 mg of frozen muscle tissue were macerated in an extraction buffer of DNA:100 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8), 500 mM NaCl, 2% SDS, and 2% β -mercaptoethanol. Next, the macerate was incubated with Proteinase K (Promega) and RNase (Promega). A variation of the phenol:chloroform extraction procedure (Lin *et al.* 2001) was used for the separation and precipitation of the DNA.

Primer design

Using sequences from the *O. vulgaris* complete mitochondrial genome (access code: AB158363; 16S rRNA, EF016336; COI, EF016328; and COIII, EF016319), PCR primers flanking the COI, COIII, and 16S rRNA gene sequences were designed using the online software NetPrimer: <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>.

The primers used were CGAGTCTTCCGAAAGTTTCTT (forward) and TGCGATGAATATTCTCAACAAA (reverse) for COI, CATCGAGGTCGCAATCTCTTTTT (forward) and AAGAGTTGGGCCTGCTCGGT (reverse) for rRNA 16S, and CTACGTCTACAAAATGTCAGTATCA (forward) and ATTCAATGATGACGTGATATTATTC (reverse) for COIII.

O. maya se agrupaban fuera del género *Octopus*. Además, sugieren que su origen es resultado de un evento de especiación que sucedió después de la formación del istmo de Panamá, que separó los océanos Atlántico y Pacífico, ya que *O. mimus* resultó ser su taxón más cercano. Sin embargo, el estudio de Pérez-Losada *et al.* (2002) sólo incluyó muestras de *O. vulgaris*, *O. mimus* y *O. maya*, y el papel de los efectos de selección de genotipos pudo haber potencialmente ocultado las verdaderas relaciones evolutivas. Es notable que *O. maya* no presenta una etapa larval, a diferencia de otras especies geográficamente cercanas como *O. vulgaris* y *O. mimus* que tienen estadios larvales y poslarvales (Warnke 1999). Esto podría apoyar la colocación de *O. maya* fuera del género *Octopus*. También surge la pregunta de si las diferencias en los rasgos de historia de vida reflejan las relaciones filogenéticas de estos pulpos. Para obtener conclusiones filogenéticas y taxonómicas robustas para *O. maya* se requieren comparaciones de tanto taxones adicionales como loci genéticos.

El objetivo del presente estudio fue combinar toda la información disponible sobre las secuencias de ARN ribosomal (ARNr) 16S, citocromo oxidasa I (COI) y citocromo oxidasa III (COIII) para las especies del género *Octopus* con datos nuevos para *O. maya*. Como resultado, este estudio es el primero en adoptar un enfoque global y en consecuencia proporcionar una idea potencialmente más completa de las relaciones evolutivas dentro del género *Octopus*, con especial atención a *O. maya*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN

Se capturaron especímenes de *O. maya* en la costa de Sisal (19°40.45' N, 90°43.00' W), Yucatán, México. El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta utilizarse. Para la extracción del ADN genómico, se maceraron 20 mg del tejido muscular congelado en un amortiguador de extracción de ADN:Tris-HCl 100 mM (pH 8), EDTA 50 mM (pH 8), NaCl 500 mM, SDS 2% y β -mercaptoetanol 2%. Posteriormente, el macerado se incubó con proteinasa K (Promega) y RNase (Promega). Para separar y precipitar el ADN se empleó una variación de la técnica de extracción con fenol:cloroformo (Lin *et al.* 2001).

Diseño de cebadores

Usando secuencias del genoma mitocondrial completo de *O. vulgaris* (código de acceso: AB158363; ARNr 16S, EF016336; COI, EF016328; y COIII, EF016319), se diseñaron los cebadores para las secuencias genómicas de COI, COIII y ARNr 16S con el software NetPrimer: <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>.

Los cebadores utilizados fueron los siguientes: CGAGTCTTCCGAAAGTTTCTT (hacia adelante) y TGCGATGAATATTCTCAACAAA (hacia atrás) para COI, CATCGAGGTCGCAATCTCTTTTT (hacia adelante) y

DNA sequencing

Polymerase chain reactions (PCR) were carried out in a Bio-Rad iQ5 Thermocycler, following Guzik *et al.* (2005), modifying annealing temperature to 55 °C and adding a final extension step at 72 °C for 10 min. Amplicons were recovered and purified from an agarose gel with the help of purification columns (Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns) from Bio-Rad, following the manufacturer's specifications. Cleaned amplicons were ligated into pGEM-T Easy clonation vectors made by Promega (Cat. No. A1360). The ligated vector was used to transform *Escherichia coli* DH5' bacteria through heat shock (42 °C 50" to 4 °C 2') and plated out in a selective medium. Following the selection of positive colonies for each gene, they were planted in tubes with ψ medium for 12 h at 37 °C, 250 rpm, and the cloned plasmids were extracted following the slow alkalization method with recovery via silica matrix (Lakshmi *et al.* 1998). The presence of DNA inserts in the plasmids (of each gene on each distinct plasmid) was corroborated via digestion with the restriction enzyme EcoRI (Hedpeth *et al.* 1972). Plasmids containing DNA inserts were sent to the Institute of Biotechnology, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), in Cuernavaca, Morelos, where they were sequenced.

Data analysis

All COI, COIII, and 16S rRNA sequences available for the genus *Octopus* in GenBank, along with those obtained from *O. maya*, were aligned (each gene separately) using the ClustalW program provided in the software package MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). The alignment was then used as character matrix in order to construct the phylogenetic trees. Phylogenetic analysis was performed with PAUP v4.0b10 (Swofford 2003), using the maximum likelihood (ML) method. The software ModelTest v3.06 (Posada and Crandall 1998) was used to determine the best-fit model of DNA evolution among 56 different possible evolutionary models, using the Akaike Information Criterion, which was used for the ML analysis.

The ML analysis was done using heuristic searches, including gaps in sequence alignment. Evaluation of statistical confidence in nodes was based on 100 non-parametric bootstrap replicates in the ML analysis (Felsenstein 1985). Only bootstrap support values of 50% or more are shown in the phylogenetic trees. Polytomies in the trees were resolved using TreeEdit v1.0a10 (© 2001, Andrew Rambaut and Mike Charleston), and finally trees were edited with MrEnt v2.1 (© 2005–2010, Alessandro Zuccon and Dario Zuccon).

Independent trees were constructed for each gene and also for concatenated sequences for the three genes (for those taxa for which such data were available; see appendix). *Opisthoteuthis* species were used as outgroup and *Enteroctopus dofleini* (previously *Octopus dofleini*) was also

AAGAGTTGGGCCTGCTCGGT (hacia atrás) para ARNr 16S, y CTACGTCTACAAAATGTCAGTATCA (hacia adelante) y ATTCAATGATGACGTGATATTATTC (hacia atrás) para COIII.

Secuenciación de ADN

Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en un termociclador Bio-Rad iQ5, siguiendo lo propuesto por Guzik *et al.* (2005), modificando la temperatura de fusión hasta 55 °C y agregando una extensión final a 72 °C por 10 min. Se recuperaron y purificaron amplicones de un gel de agarosa con ayuda de columnas de purificación (*Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns*) de Bio-Rad, siguiendo las especificaciones del fabricante. Los amplicones purificados se ligaron a los vectores de clonación pGEM-T Easy fabricados por Promega (No. Cat. A1360). El vector ligado se usó para transformar bacterias *Escherichia coli* DH5' mediante choque térmico (42 °C 50" a 4 °C 2') y se sembró en un medio selectivo. Después de seleccionar las colonias positivas para cada gen, se colocaron en tubos con medio ψ durante 12 h a 37 °C (250 rpm), extrayéndose los plásmidos clonados usando el método de alcalinización lento con recuperación a través de la matriz de sílice (Lakshmi *et al.* 1998). La presencia de insertos de ADN en los plásmidos (de cada gen en cada plásmido) se corroboró mediante digestión con enzimas de restricción EcoRI (Hedpeth *et al.* 1972). Los plásmidos con insertos de ADN fueron enviados al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en Cuernavaca, Morelos, para su secuenciación.

Análisis de datos

Todas las secuencias de COI, COIII y ARNr 16S disponibles para el género *Octopus* en GenBank, así como las obtenidas para *O. maya* fueron alineadas (cada gen por separado) usando el programa ClustalW en el software MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). El alineamiento se usó como matriz de caracteres para construir los árboles filogenéticos. El análisis filogenético se realizó con PAUP v4.0b10 (Swofford 2003) mediante el método de máxima verosimilitud (MV). Se empleó ModelTest v3.06 (Posada y Crandall 1998) para determinar el modelo de evolución de ADN de mejor ajuste entre 56 diferentes modelos evolutivos posibles con el criterio de información de Akaike, que se usó para el análisis de MV.

El análisis de MV se realizó mediante búsquedas heurísticas, incluyendo huecos en el alineamiento de secuencias. La evaluación de confianza estadística en nodos se basó en 100 repeticiones *bootstrap* no paramétrico en el análisis de MV (Felsenstein 1985). En los árboles filogenéticos sólo se muestran los valores de apoyo *bootstrap* de 50% o más. Se resolvieron politomías en los árboles usando TreeEdit v1.0a10 (© 2001, Andrew Rambaut y Mike Charleston) y los árboles

included with the aim of comparing genetic distances within the genus *Octopus* with respect to another closely related genus.

The equality of evolutionary rate between the analyzed species in each tree was tested using *Opisthoteuthis massyae* as an outgroup in Tajima's relative rate test (Tajima 1993) implemented in MEGA4 software. The divergence time for the concatenated gene tree was estimated and *P*-values for the chi-square test on pairs of sequences were used in the construction of linearized branches (Takezaki *et al.* 2004). For *P*-values < 0.05 the null hypothesis of equal evolutionary rates between taxa was rejected. For the molecular clock calibration, the common mutation rate for mitochondrial DNA of 2% per million years (Avise 2004) was used to identify possible selective influences.

RESULTS

For *O. maya*, sequences were obtained for 560 bases of the COIII gene (GenBank access: GU362546.1), 803 bases of the COI gene (GenBank access: GU362545.1), and 372 bases of the 16S rRNA gene (GenBank access: FJ751763).

Across all sequences the GTR+I+G model was identified as the most suitable mutation model. Table 1 summarizes the features of the phylogenetic analyses performed. Due to the respective availability of sequence data, there were different numbers of operational taxonomic units (OTUs) in the trees constructed for the various single gene regions.

The 16S rRNA gene tree had the highest number of OTUs (fig. 1). The sequence of *O. maya* was grouped with the sequences obtained from octopuses that inhabit the East Pacific. The phylogenetic groupings were concordant with

se editaron con MrEnt v2.1 (© 2005–2010, Alessandro Zuccon y Dario Zuccon).

Se construyeron árboles independientes para cada gen, así como para las secuencias concatenadas de los tres genes (para los taxones para los cuales existían tales datos; ver apéndice). Se usaron especies del género *Opisthoteuthis* como grupo externo (*outgroup*) y también se incluyó *Enteroteuthis dofleini* (antes *Octopus dofleini*) para comparar las distancias genéticas dentro del género *Octopus* con respecto a otro género estrechamente relacionado.

La igualdad de tasas evolutivas entre las especies analizadas en cada árbol se comprobó usando *Opisthoteuthis massyae* como grupo externo en la prueba de tasas relativas de Tajima (1993) implementada en MEGA4. Se estimó el tiempo de divergencia para el árbol de los genes concatenados, y los valores *P* para la prueba chi-cuadrada de pares de secuencias se usaron en la construcción de ramas linearizadas (Takezaki *et al.* 2004). Para los valores *P* < 0.05, se rechazó la hipótesis nula de igualdad de tasas evolutivas entre taxones. Para la calibración del reloj molecular, se usó la tasa de mutación común para el ADN mitocondrial de 2% cada millón de años (Avise 2004) para identificar posibles influencias selectivas.

RESULTADOS

Para *O. maya*, se obtuvieron secuencias para 560 bases del gen COIII (número de acceso en GenBank: GU362546.1), 803 bases del gen COI (GenBank: GU362545.1) y 372 bases del gen ARNr 16S (GenBank: FJ751763).

Para todas las secuencias, el modelo GTR+I+G resultó ser el modelo de mutación más adecuado. En la tabla 1

Table 1. Features of the phylogenetic analyses using mtDNA sequences.

Tabla 1. Información de los análisis filogenéticos con secuencias de ADNmt.

	COIII	COI	16SrRNA	Three together
Number of taxa	29	23	34	9
Analyzed sites	510 bp	662 bp	520 bp	1459 bp
Evolutionary model	GTR + I + G	GTR + I + G	GTR + I + G	GTR + I + G
Gamma distribution shape parameter	0.5629	0.8269	0.5349	1.2003
A frequency	0.3220	0.2950	0.3896	0.3311
C frequency	0.1757	0.1655	0.0753	0.1485
G frequency	0.1114	0.1549	0.1190	0.1384
T frequency	0.3909	0.3846	0.4161	0.3820
Substitution model:				
A – C	1.3767	4.7638	0.0827	0.4853
A – G	4.1235	17.1328	5.2649	5.6555
A – T	4.6447	49.5383	0.6370	6.0570
C – G	1.0216	4.7536	0.2613	0.5409
C – T	67.9969	470.4032	0.4587	30.4287
G – T	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

the geographical distribution of the taxa. The more similar taxa were those that were geographically nearest, with the exception of *O. marginatus*.

The COI gene tree (fig. 2) illustrates that the *O. maya* sequence is related to octopus' sequences from the East Pacific. The COI gene tree shows that the taxa are split into two major clades. The biogeographical agreement of the COI tree groupings seems to be biased because there are only two taxa (*O. maya* and *O. joubini*) that do not correspond to the Pacific basin. Interestingly, although both octopuses inhabit the Caribbean and the Gulf of Mexico, they were not grouped together in the tree. Both species are more closely related to octopuses from different major clades.

The COIII gene tree (fig. 3) includes more species from the East Pacific than the 16S rRNA and COI gene trees, and clearly supports the evolutionary relationship of *O. maya* with East Pacific octopuses. It also supports the split of taxa into two major clades with similar sorting to that of the COI gene tree. The COIII gene tree shows groups with clear biogeographical agreement, regarding the monophyletic clade composed of Australian octopuses as well as American octopuses.

Table 2 shows the genetic distances between taxa included in the concatenated gene tree, as well as the relative rate test (Tajima 1993) for each pair of sequences. *Octopus californicus* and *E. dofleini* show very short genetic distances between them (0.098) but large distances with respect to the rest of the taxa (22.6–28.3). Also, these two North Pacific octopuses have similar evolutionary rates for the genes analyzed, but both show significant rate difference with *O. vulgaris* (P -values = 0.02259 and 0.01669), so they were excluded from the linearized tree, where the divergence time between taxa was estimated.

Figure 4a shows the concatenated gene tree with an early divergence of the *O. californicus*-*E. dofleini* pair with respect to the rest of the taxa. The bootstrap support values in that tree are remarkably high due to the highest number of informative sites, so it is the best supported tree.

Figure 4b shows that the diversification of the octopuses that present equal evolutionary rates across all three genes occurred between 5 and 2.5 million years ago.

DISCUSSION

Biogeographical support of the trees and the origin of *O. maya*

All constructed trees show broad-scale agreement between the groupings and the geographical distribution of the taxa, and the evolutionary relationship between *O. maya* and the East Pacific octopuses was consistent in the whole analysis.

The COI gene tree suggests that allopatric speciation processes have occurred independently but in the same way

se resumen las características de los análisis filogenéticos realizados. Debido a la disponibilidad respectiva de los datos de secuencia, hubo diferentes números de unidades taxonómicas operativas (UTO) en los árboles construidos para las diversas regiones de un gen.

El árbol del gen ARNr 16S presentó el mayor número de UTO (fig. 1). La secuencia de *O. maya* se agrupó con las secuencias obtenidas de pulpos que habitan en el Pacífico oriental. Los grupos filogenéticos coincidieron con la distribución geográfica de los taxones. Los más similares fueron aquellos más cercanos geográficamente, con excepción de *O. marginatus*.

El árbol del gen COI (fig. 2) indica que la secuencia de *O. maya* se relaciona con las secuencias de los pulpos del Pacífico oriental. Este árbol muestra que los taxones se dividen en dos clados principales. La congruencia biogeográfica de las agrupaciones del árbol de COI parece estar sesgada ya que hay sólo dos taxones (*O. maya* y *O. joubini*) que no corresponden a la cuenca del Pacífico. Resulta interesante que aunque ambos pulpos se encuentran en el Caribe y el golfo de México, no se agruparon en el árbol. Ambas especies están más estrechamente relacionadas con pulpos de diferentes clados principales.

El árbol del gen COIII (fig. 3) incluye un mayor número de especies del Pacífico oriental que los árboles de los genes ARNr 16S y COI, y claramente apoya la relación evolutiva entre *O. maya* y los pulpos del Pacífico oriental. También apoya la separación de los taxones en dos clados principales con una agrupación similar a la del árbol de COI. El árbol de COIII muestra grupos con una clara congruencia biogeográfica, como el clado monofilético compuesto de pulpos australianos así como americanos.

La tabla 2 muestra las distancias genéticas entre los taxones incluidos en el árbol de los genes concatenados, así como en la prueba de tasas relativas (Tajima 1993) para cada par de secuencias. Las especies *O. californicus* y *E. dofleini* muestran distancias genéticas muy cortas entre ellas (0.098) pero distancias largas con respecto a los demás taxones (22.6–28.3). Estos dos pulpos del Pacífico Norte presentan tasas evolutivas similares para los genes analizados, pero ambos muestran diferencias significativas con *O. vulgaris* ($P = 0.02259$ y 0.01669), por lo que se excluyeron del árbol linearizado, donde se estimó el tiempo de divergencia entre taxones.

La figura 4a muestra el árbol de los genes concatenados con una divergencia temprana del par *O. californicus* y *E. dofleini* en relación con los demás taxones. Los valores de apoyo *bootstrap* de este árbol son notablemente altos debido al mayor número de sitios informativos, por lo que es el árbol mejor respaldado.

La figura 4b muestra que la diversificación de los pulpos que presentan tasas evolutivas iguales para los tres genes sucedió hace 5 a 2.5 millones de años.



Figure 1. 16S rRNA evolutionary relationships in the *Octopus* genus.

Figura 1. Relaciones evolutivas de ARNr 16S en el género *Octopus*.

between the Pacific and Atlantic basins, as illustrated by the *O. maya* and *O. joubini* sequences. Both species have similar geographical distribution and development and their sequences were also related to Pacific octopuses, but were sorted in different clades. According to the COI tree, species with the same development are not necessarily closely related. The evolutionary relationship between Pacific and Atlantic sequences, even for different clades, suggests that a single oceanographic incident (possibly the lifting of the

DISCUSIÓN

Apoyo biogeográfico de los árboles y el origen de *O. maya*

Todos los árboles construidos muestran una amplia congruencia entre las agrupaciones y la distribución geográfica de los taxones, y la relación evolutiva entre *O. maya* y los pulpos del Pacífico oriental fue consistente durante todo el análisis.

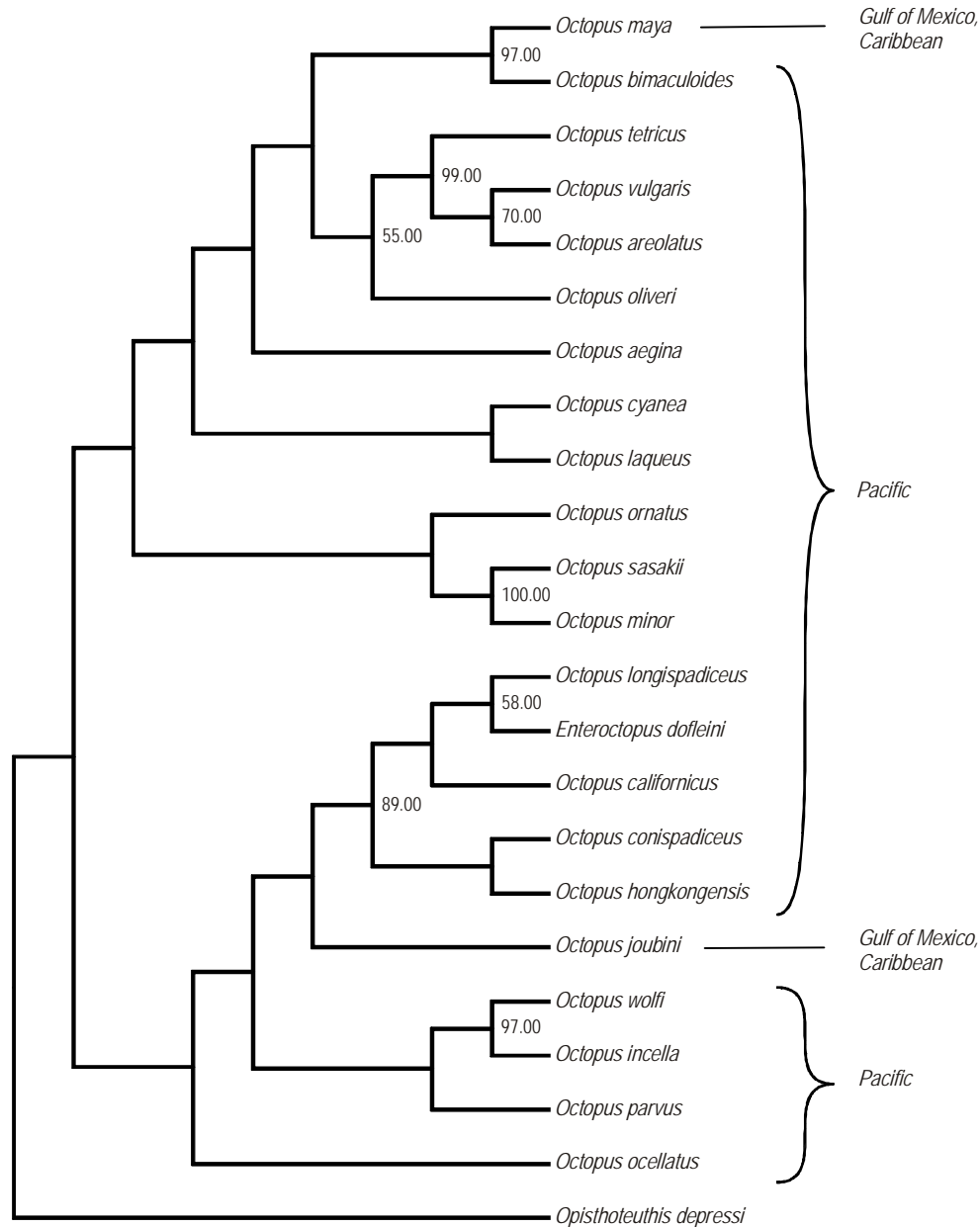


Figure 2. COI evolutionary relationships in the *Octopus* genus.

Figura 2. Relaciones evolutivas de COI en el género *Octopus*.

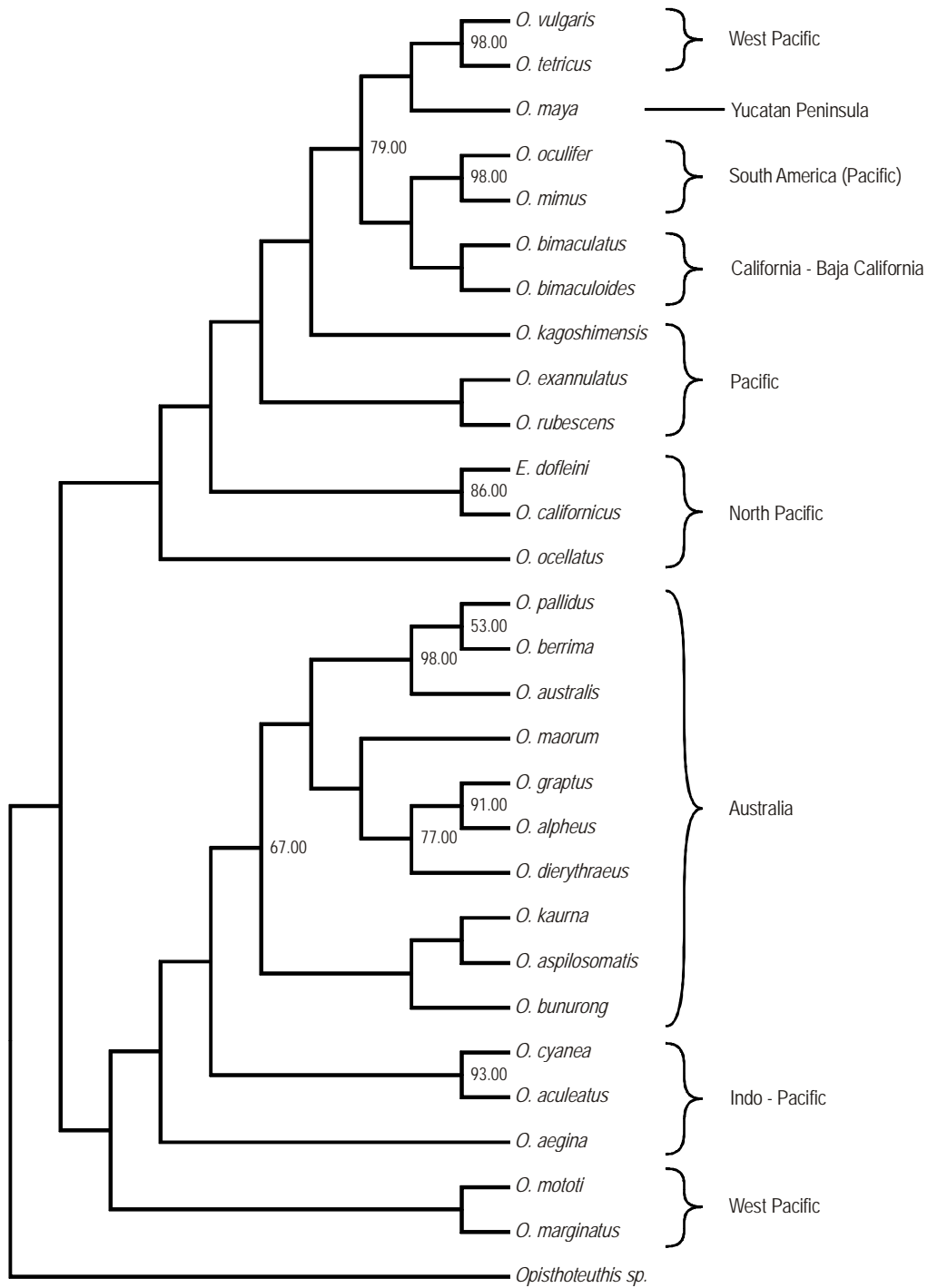


Figure 3. COIII evolutionary relationships in the *Octopus* genus.

Figura 3. Relaciones evolutivas de COIII en el género *Octopus*.

Panama Isthmus) triggered several speciation events within the genus. The divergence time estimated for the sequences in the concatenated gene tree (fig. 4b) was between 5 and 2.5 million years ago. That time corresponds to the formation of the Isthmus of Panama (Stanley 2005), supporting the possibility that this geological event initiated an important process of speciation of octopuses not only in the American continent but also worldwide. The estimated divergence time also corresponds to that determined by Pérez-Losada *et al.* (2002). The COIII tree also suggests that *O. maya* shares ancestry with the Californian octopuses *O. bimaculoides* and *O. bimaculatus* and with the South American octopuses *O. mimus*, which is distributed from Peru to Chile (Pérez-Losada *et al.* 2002), and *O. oculifer*, which is endemic to the Galapagos Islands. The common ancestor of these species possibly had a life cycle with a larval phase, although both *O. maya* and *O. bimaculoides* follow a life cycle marked by direct development. The presence of larval stages during the life cycle has been determined to be the ancestral state and has not presented regressions along the branches in other octopus phylogenies (Guzik 2004). We propose that all these octopuses (*O. maya*, *O. vulgaris*, *O. tetricus*, *O. bimaculoides*, *O. bimaculatus*, *O. mimus*, and *O. oculifer*) compose a monophyletic group that was diversified during the formation of the Isthmus of Panama.

The topology obtained from the phylogenetic tree of the COIII gene was identical to that obtained by Barriga-Sosa *et al.* (1995) in terms of the taxa common to both studies. The monophyletic clades in figure 3 that correspond to the Australian and West Pacific octopuses are very similar and include the same species that were analyzed by Guzik *et al.*

El árbol del gen COI sugiere que procesos de especiación alopátrica han sucedido independientemente pero de la misma manera en las cuencas del Pacífico y Atlántico, como lo muestran las secuencias de *O. maya* y *O. joubini*. Ambas especies tienen una distribución geográfica y un desarrollo similar y sus secuencias también se relacionan con los pulpos del Pacífico, pero se agruparon en diferentes clados. Según el árbol de COI, las especies que tienen el mismo desarrollo no necesariamente están estrechamente relacionadas. La relación evolutiva entre las secuencias del Pacífico y el Atlántico, aun para distintos clados, sugiere que un solo incidente oceanográfico (posiblemente el levantamiento del istmo de Panamá) originó varios eventos de especiación dentro del género. El tiempo de divergencia estimado para las secuencias en el árbol de los genes concatenados (fig. 4b) fue hace entre 5 y 2.5 millones de años. Ese tiempo coincide con la formación del istmo de Panamá (Stanley 2005) y apoya la posibilidad de que este evento geológico inició un proceso de especiación de pulpos no sólo en el continente americano sino también en todo el mundo. El tiempo de divergencia obtenido también corresponde al estimado por Pérez-Losada *et al.* (2002). El árbol de COIII sugiere que *O. maya* comparte ascendencia con los pulpos californianos *O. bimaculoides* y *O. bimaculatus*, así como con los pulpos sudamericanos *O. mimus*, que se distribuye de Perú a Chile (Pérez-Losada *et al.* 2002), y *O. oculifer*, que es endémico de las islas Galápagos. El ancestro común de estas especies posiblemente tuvo un ciclo de vida con una fase larvaria, aunque tanto *O. maya* como *O. bimaculoides* presentan desarrollo directo. Se ha determinado que la presencia de etapas larvarias durante el ciclo de vida es el estado ancestral y no se

Table 2. Tajima's (1993) relative rate test for COIII + COI + 16S rRNA genes and genetic distances between taxa. Chi-square *P*-values of the Tajima test between pairs of taxa are shown below the diagonal with significant values in bold letters, while genetic distances are shown above the diagonal.

Tabla 2. Prueba de tasas relativas de Tajima (1993) para los genes COIII + COI + ARNr 16S y distancias genéticas entre taxones. Los valores *P* de chi-cuadrada de la prueba de Tajima entre pares de taxones se muestran debajo de la diagonal con valores significativos en negritas, mientras que las distancias genéticas se muestran por arriba de la diagonal.

(1) *Octopus maya*, (2) *O. vulgaris*, (3) *O. californicus*, (4) *O. bimaculoides*, (5) *O. ocellatus*, (6) *O. cyanea*, (7) *O. aegina*, (8) *Enteroctopus dofleini*, (9) *Opisthoteuthis massyae* (outgroup).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	—	0.172	0.267	0.110	0.197	0.191	0.199	0.247	0.340
2	0.18228	—	0.276	0.153	0.205	0.211	0.199	0.264	0.347
3	0.32518	0.02259	—	0.248	0.241	0.256	0.255	0.098	0.283
4	0.70546	0.25908	0.18318	—	0.178	0.170	0.193	0.220	0.320
5	0.34545	0.07471	0.65211	0.36571	—	0.203	0.148	0.225	0.291
6	0.82726	0.31731	0.19001	1.00000	0.42829	—	0.203	0.247	0.325
7	0.69489	0.55245	0.14639	0.77967	0.29715	0.76970	—	0.226	0.302
8	0.39719	0.01669	1.00000	0.19365	0.64103	0.13399	0.12224	—	0.275

In the relative rate test, *P*-values < 0.05 were used to reject the null hypothesis of equal rates between lineages.

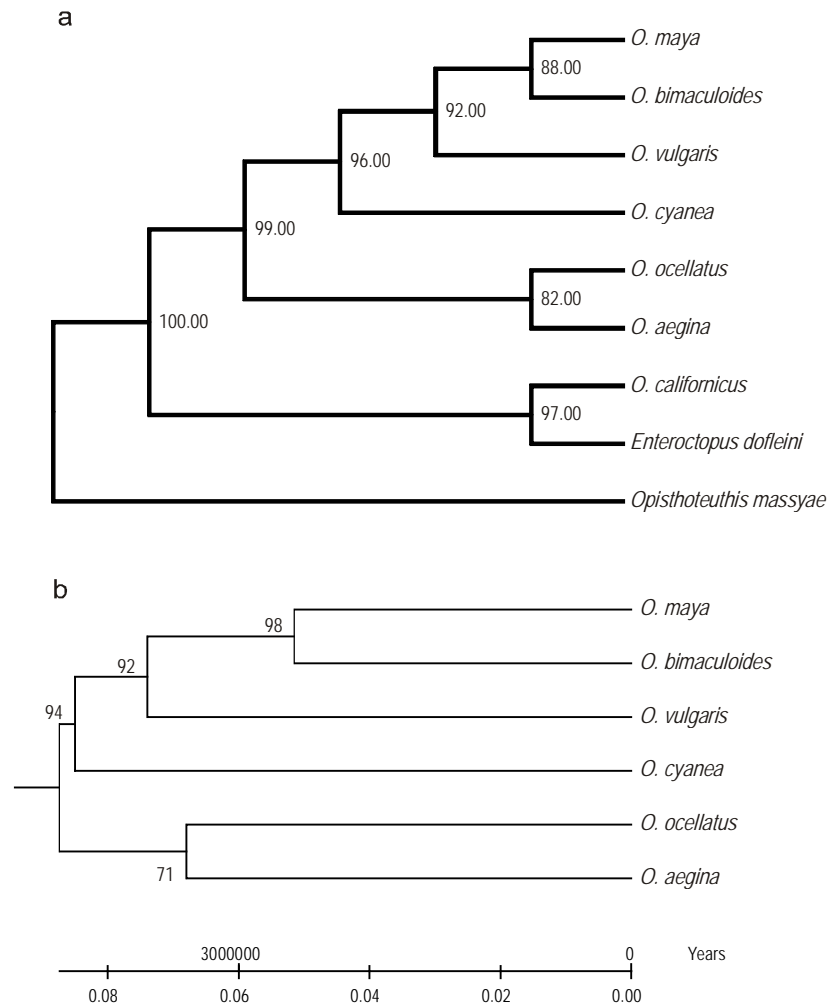


Figure 4. Evolutionary relationships of the COI, COIII, and 16S rRNA concatenated sequences for the *Octopus* genus: (a) genetic distance tree and (b) linearized tree. The tree produced by the concatenated sequences provides better support than the individual sequences. The diversification of the concatenated sequences in *Octopus* species is estimated to have started between 5 and 2.5 million years ago (MYA). Bootstrap support values changed after taxa with different evolutionary rates were excluded from the analysis.

Figura 4. Relaciones evolutivas de las secuencias concatenadas de COI, COIII y ARNr 16S para el género *Octopus*: (a) árbol de distancias genéticas y (b) árbol linearizado. El árbol producido por las secuencias concatenadas proporciona mejor respaldo que las secuencias individuales. Se estima que la diversificación de las secuencias concatenadas en las especies de *Octopus* comenzó hace entre 5 y 2.5 millones de años (MYA). Los valores de apoyo *bootstrap* cambiaron después de excluir del análisis los taxones con diferentes tasas evolutivas.

(2005), though in that study cytochrome *b* and a nuclear gene (elongation factor-1 α) were analyzed along with COIII.

Possible implications of the results in *Octopus* systematics and evolution

Table 2 shows that the *O. maya* genetic distances (11–19.9%) are in the same range as those of the *Octopus* species analyzed, with the exception of *O. californicus* that shows larger distances (24.1–27.6%). These results support the inclusion of *O. maya* in the *Octopus* genus. This conclusion is different to that reached by Pérez-Losada *et al.* (2002),

presentan regresiones en las ramas de otras filogenias de pulpo (Guzik 2004). Nosotros proponemos que todos estos pulpos (*O. maya*, *O. vulgaris*, *O. tetricus*, *O. bimaculoides*, *O. bimaculatus*, *O. mimus* y *O. oculifer*) forman un grupo monofilético que se diversificó durante la formación del istmo de Panamá.

La topología obtenida del árbol filogenético del gen COIII es idéntica a la obtenido por Barriga-Sosa *et al.* (1995) en cuanto a los taxones comunes a ambos estudios. Los clados monofiléticos en la figura 3 que corresponden a los pulpos de Australia y el Pacífico occidental son muy similares e incluyen las mismas especies analizadas por Guzik *et al.*

who suggested that the genetic distances of *O. maya* could place it out of the *Octopus* genus. On the other hand, we propose that the current status of *O. californicus* should be reviewed as it shows genetic distances out of the range of the *Octopus* genus, showing shorter genetic distances as well as similar evolutionary rates as *E. dofleini*.

It is necessary to put limitations on the interpretation of real evolutionary history. While trees based on DNA sequences are very useful tools for understanding the evolution of a group given the great phenotypic variability and a limited fossil record (Strugnell *et al.* 2005), it is first necessary to sequence a great quantity of genes and genomes, generating the greatest quantity of characters available for resolving the phylogeny.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico, grant 24743) and UC MEXUS CONACYT (CN 09-348). We thank G Lizama for technical support and N McKeown for providing language help, kind assistance, and useful suggestions during the writing process.

REFERENCES

- Avice J. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. 2nd ed. Sinauer Associates, USA, 684 pp.
- Barriga-Sosa I, Beckenbach K, Hartwick B, Smith M. 1995. The molecular phylogeny of five eastern North Pacific octopus species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4: 163–174.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Guzik T. 2004. Molecular phylogenetics and the evolutionary history of reproductive strategies in benthic shallow-water octopuses (Cephalopoda: Octopodinae). PhD thesis, School of Tropical Biology, James Cook University.
- Guzik T, Norman M, Crozier R. 2005. Molecular phylogeny of the benthic shallow-water octopuses (Cephalopoda: Octopodinae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 235–248.
- Hedgpeth J, Goodman H, Boyer H. 1972. DNA nucleotide sequence restricted by the RI endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 3448–3452.
- Lakshmi R, Baskar V, Ranga U. 1998. Extraction of superior-quality plasmid DNA by a combination of modified alkaline lysis and silica matrix. *Anal. Biochem.* 272: 112–115.
- Oosthuizen A, Jiwaji M, Shaw P. 2004. Genetic analysis of the *Octopus vulgaris* population on the coast of South Africa. *S. Afr. J. Sci.* 100: 603–607.
- Pérez-Losada M, Guerra A, Sanjuan A. 2002. Allozyme divergence supporting the taxonomic separation of *Octopus mimus* and *Octopus maya* from *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda). *Bull. Mar. Sci.* 71: 653–664.
- Posada D, Crandall K. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Lin RC, Ding ZS, Li LB, Kuang TY. 2001. A rapid and efficient DNA miniprep suitable for screening transgenic plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 379a–379e.
- Solís M, Arreguín-Sánchez F, Seijo J. 1997. Pesquería de pulpo de la plataforma continental de Yucatán. In: Flores-Hernández D,

(2005), aunque en este último estudio se analizaron el gen citocromo *b* y un gen nuclear (factor de elongación-1 α) junto con COIII.

Posibles implicaciones de los resultados en la sistemática y evolución de *Octopus*

La tabla 2 muestra que las distancias genéticas que presenta *O. maya* (11–19.9%) se encuentran en el intervalo de distancias que presentan las otras especies de *Octopus* analizadas, con excepción de *O. californicus* que presenta mayores distancias (24.1–27.6%). Estos resultados apoyan la inclusión de *O. maya* en el género *Octopus*. Esta conclusión difiere de la obtenida por Pérez-Losada *et al.* (2002), quienes sugirieron que las distancias genéticas de *O. maya* podrían colocarlo fuera del género *Octopus*. Por otro lado, proponemos que se debería de revisar el estatus actual de *O. californicus* ya que muestra distancias genéticas más cortas así como tasas evolutivas similares a *E. dofleini*.

Es necesario poner límites a la interpretación de la historia evolutiva real. Aunque los árboles basados en secuencias de ADN son herramientas muy útiles para comprender la evolución de un grupo dada la gran variabilidad fenotípica y un registro fósil limitado (Strugnell *et al.* 2005), primero es necesario secuenciar una gran cantidad de genes y genomas y generar la mayor cantidad de caracteres posible para resolver la filogenia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, proyecto 24743) y UC MEXUS-CONACYT (CN 09-348). Agradecemos a G Lizama su apoyo técnico, así como a N McKeown su ayuda con el inglés y sus atinadas sugerencias durante el proceso de escritura.

Traducido al español por Christine Harris.

- Sánchez-Gil P, Seijo J, Arreguín-Sánchez F (eds.), Análisis y Diagnóstico de los Recursos Pesqueros Críticos del Golfo de México. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica 7, pp. 61–80.
- Söller R, Warnke K, Saint-Paul U, Blohm D. 2000. Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Mar. Biol.* 136: 29–35.
- Stanley S. 2005. Earth System History. WH Freeman, USA, 567 pp.
- Strugnell J, Norman M, Jackson J, Drummond A, Cooper A. 2005. Molecular phylogeny of coleoid cephalopods using a multigene approach; the effect of data partitioning on resolving phylogenies in a Bayesian framework. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37: 426–441.
- Swofford DL. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Tajima F. 1993. Simple methods for testing molecular clock hypothesis. *Genetics* 135: 599–607.
- Takezaki N, Rzhetsky A, Nei M. 2004. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Mol. Biol. Evol.* 12: 823–833.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 10.1093/molbev/msm092.
- Warnke K. 1999. Observations on the embryonic development of *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda) from northern Chile. *Veliger* 42: 211–217.
- Warnke K, Söller R, Blohm D, Saint-Paul U. 2004. A new look at geographical and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): Indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 42: 306–312.

*Received March 2011,
Received in revised form February 2012,
accepted March 2012.*

Appendix. GenBank accession numbers for *Octopus* sequences used.

Apéndice. Número de acceso en GenBank de las secuencias de *Octopus* utilizadas.

Species	16S rRNA	COIII	COI
<i>Octopus maya</i>	FJ751763.1	GU362546.1	GU362545.1
<i>O. aculeatus</i>		AJ628213.1	
<i>O. aegina</i>	AJ252746.1	AJ628214.1	AB191276.1
<i>O. alpheus</i>		AJ628215.1	
<i>O. areolatus</i>	AJ252747.1		AB191274.1
<i>O. aspilosomatis</i>	AJ311109.1	AJ628216.1	
<i>O. australis</i>		AJ628217.1	
<i>O. berrima</i>	AY545105.1	AJ628218.1	
<i>O. bimaculatus</i>		X83100.1	
<i>O. bimaculoides</i>	AJ252748.1	AJ250482.1	AF377967.1
<i>O. bocki</i>	AJ311112.1		
<i>O. bunurong</i>		AJ628219.1	
<i>O. californicus</i>	AJ390322.1		AF377968.1
<i>O. conispadiceus</i>			AB430533.1
<i>O. cyanea</i>	AJ252782.1	AJ628220.1	AB430534.1
<i>O. dierythraeus</i>		AJ628222.1	
<i>O. exannulatus</i>		AJ628223.1	
<i>O. graptus</i>		AJ628224.1	
<i>O. hongkongensis</i>	AB302174.1		AB430537.1
<i>O. incella</i>			AB430542.1
<i>O. joubini</i>			AY377732.1
<i>O. kagoshimensis</i>	AJ311108.1	AJ628226.1	
<i>O. kaurana</i>	AY545106.1	AJ628227.1	
<i>O. laqueus</i>	AB302177.1		AB430543.1
<i>O. longispadiceus</i>			AB430539.1
<i>O. luteus</i>	AJ252749.1		
<i>O. macropus</i>			
<i>O. magnificus</i>	AJ252750.1		
<i>O. maorum</i>	AJ311110.1	AJ628231.1	
<i>O. marginatus</i>	AJ252751.1	AJ628232.1	
<i>O. mimus</i>	AJ390318.1	AJ012128.1	
<i>O. minor</i>			AB191275.1
<i>O. mototi</i>	AJ252752.1	AJ628233.1	
<i>O. ocellatus</i>	NC_007896.1	NC_007896.1	NC_007896.1
<i>O. oculifer</i>		AJ628235.1	
<i>O. oliveri</i>			AB430532.1
<i>O. ornatus</i>	AJ252753.1		AB191279.1
<i>O. pallidus</i>	AJ252754.1	AJ628236.1	
<i>O. parvus</i>			AB430544.1
<i>O. rubescens</i>	AJ252755.1		
<i>O. salutii</i>	AJ390323.1		
<i>O. sasakii</i>			AB191277.1
<i>O. tehuelchus</i>	AJ252761.1		
<i>O. tetricus</i>		AJ628237.1	AF000056.1
<i>O. variabilis</i>	EU234591.1		
<i>O. vulgaris</i>	AB158363.1	AB158363.1	AB158363.1
<i>O. wolffi</i>	AJ311111.1		AB430545.1
<i>Enteroctopus dofleini</i>	AB191107.1	FJ603531.1	AY545190.1
<i>Opisthoteuthis massyae</i>	AJ315372.1	EU071451.1	AY545187.1
<i>Opisthoteuthis depressa</i>		AB191282.1	