



# UNIVERSIDAD DEL MAR

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA DIETA DE LA SANGUIJUELA MARINA  
*Pontobdella californiana* BURRESON & PASARELLI, 2015 (HIRUDINIDA:  
PISCICOLIDAE) EN EL PACÍFICO MEXICANO

### TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS: ECOLOGÍA MARINA

### PRESENTA

Biól. Mar. Fernando Ruiz Escobar

### DIRECTORA

Dra. Valentina Islas Villanueva

### CO-DIRECTOR

Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa (UNAM)

Puerto Ángel, Oaxaca, México

Julio, 2022

## **Agradecimientos**

A la División de Estudios de Posgrado de la Universidad del Mar (UMAR) por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 766341 que me fue otorgada para realizar mis estudios.

A mis mentores académicos, Dra. Valentina Islas Villanueva y el Dr. Alejandro Ocegüera Figueroa por hacer realidad este proyecto.

Agradezco el financiamiento otorgado por los proyectos “Evaluación del potencial de las técnicas de secuenciación masiva, ADN ambiental y código de barras genético para la descripción de la biodiversidad bentónica de los ecosistemas marinos y costeros de Oaxaca” PDPCN 2015-1418 a cargo de la Dra. Valentina Islas Villanueva, y “Primera aproximación al estudio de la biodiversidad de sanguijuelas marinas de México” del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (PAPIIT IN215722) a cargo del Dr. Alejandro Ocegüera Figueroa.

A la Dra. Ana María Torres Huerta por su revisión experta y sugerencias que mejoraron sustancialmente este trabajo.

A mis revisores, M. en C. Gerardo Torres Carrera y M. en C. Samantha Karam Martínez, por su tiempo dedicado a la revisión del manuscrito.

A mis amigos de Puerto Ángel, por permitirme hacer trabajo de campo durante sus jornadas de trabajo.

A todos los que me apoyaron y alentaron en el camino. Estoy en deuda con ustedes.

## **Dedicatoria**

Para Fernando y Reyna,  
y todo aquel que desee seguir el camino de la ciencia y el mar.

## Contenido

Resumen	v
Abstract	vi
• Introducción	1
<i>Alimentación en Hirudínea</i>	1
<i>Parasitismo o microdepredación</i>	2
<i>Sanguijuelas marinas</i>	2
<i>Importancia ecológica</i>	3
<i>iDNA como herramienta de monitoreo biológico</i>	3
Justificación académica e importancia	5
Preguntas de investigación	5
Hipótesis	6
Objetivos	6
Materiales y métodos	6
<i>Área de estudio</i>	6
<i>Recolecta de sanguijuelas</i>	7
<i>Identificación y preservación</i>	8
<i>Procesamiento de las muestras</i>	9
<i>Análisis</i>	12
Resultados	14
<i>Morfología y biología de las sanguijuelas</i>	14
<i>Análisis de BLAST</i>	18
<i>Análisis filogenéticos</i>	19
<i>Rhinoptera sp.</i>	19
<i>Gymnura crebripunctata</i> (Peters, 1869)	21
<i>Urobatis sp.</i>	23
Discusión	24
<i>¿Cuántas especies de Rhinoptera se distribuyen en el Pacífico mexicano?</i>	24
<i>Detección de especies morfológicamente similares: Gymnura marmorata vs. Gymnura crebripunctata</i>	25
<i>Urobatis sp. y la importancia de la representación taxonómica</i>	25
<i>Errores de anotación taxonómica en GenBank</i>	26
<i>Consideraciones zoogeográficas y ecológicas de Pontobdella californiana</i>	26

Conclusiones	29
Referencias	30
Anexo I. Trabajo de laboratorio	38
Anexo II. Secuencias de DNA generadas en este trabajo	41
Anexo III. Representación taxonómica en GenBank para las especies de elasmobranquios registradas en Oaxaca	46

## Resumen

Las sanguijuelas (subclase Hirudinea) son un grupo perteneciente al phylum Annelida con especies acuáticas (agua dulce y marina) y algunas terrestres, conocidas generalmente por alimentarse de sangre de vertebrados, aunque existen otro tipo de dietas. Entre las sanguijuelas existen especies marinas que se alimentan de sangre de peces osteictios y condriictios. Recientemente se ha popularizado la secuenciación del DNA presente en la sangre ingerida (iDNA) por las sanguijuelas como una herramienta de monitoreo biológico mínimamente invasivo en determinadas regiones geográficas. En el presente trabajo se utilizaron ejemplares de la sanguijuela marina *Pontobdella californiana* con el fin de determinar las especies de peces que utilizaron con fines alimenticios. Las sanguijuelas se encontraron asociadas a redes de enmalle de fondo a lo largo de la costa central de Oaxaca. En total se recolectaron 56 ejemplares, de los cuales 36 contenían sangre en el buche y de 29 se lograron obtener concentraciones satisfactorias de DNA. Con las 29 muestras se realizaron ensayos para la amplificación de DNA con cebadores específicos para elasmobranquios de los marcadores citocromo oxidasa subunidad 1, citocromo b, RAG1 y NADH2. Se secuenciaron por el método Sanger 15 amplicones exitosos del gen citocromo b. Un análisis inicial con el uso de BLAST arrojó en total tres posibles identidades: raya águila *Rhinoptera bonasus* (10), raya mariposa *Gymnura crebripunctata* (1) y raya redonda *Urobatis concentricus* (4). Adicionalmente una secuencia de citocromo oxidasa subunidad I proveniente de un ensayo piloto realizado en 2018 con la misma especie de sanguijuela también fue identificada como *Rhinoptera bonasus* por el análisis BLAST. El análisis filogenético por Máxima Verosimilitud de los taxones disponibles en GenBank junto con las secuencias generadas en el presente trabajo permite aseverar que las secuencias identificadas como *Rhinoptera bonasus* pertenecen a un linaje distinto a dicha especie y a *Rhinoptera steindachneri*, la única especie del género registrada en el área de estudio. Se comprobó que el iDNA de las sanguijuelas fue efectivo para identificar la presencia de *Gymnura crebripunctata* y una especie asignada al género *Urobatis*, la cual no se encuentra representada en las bases de datos de secuencias genéticas.

Palabras clave: DNA ingerido, especies crípticas, Batoidea, Hirudinea.

## Abstract

Leeches (subclass Hirudinea) are a subgroup of phylum Annelida, which includes aquatic and terrestrial species, better known for their blood-sucking feeding habits, despite that other feeding mechanisms exist. Among leeches, marine species feed on blood of bony and chondrichthyan fishes. Recently, sequencing of ingested DNA by invertebrates (iDNA) such as blood-feeding leeches has become a popular biomonitoring tool in certain regions. In this work, specimens of *Pontobdella californiana* were used with the purpose of determining what species they were consuming. Leeches were found associated to bottom-set gillnets deployed along the central Oaxaca coast. In total, 56 specimens were collected, of which 36 contained blood in their guts, with satisfactory DNA concentrations in 29 of them. DNA amplification essays were performed with the 29 samples, using primers designed for elasmobranchs, targeting cytochrome oxidase subunit I, cytochrome b, RAG1 and NADH2. Sanger sequencing of 15 amplicons of cytochrome b was successfully accomplished. A BLAST analysis revealed three possible prey species: the cownose ray *Rhinoptera bonasus* (10), the butterfly ray *Gymnura crebripunctata* (1) and the round ray *Urobatis concentricus* (4). Additionally, a single sequence of cytochrome oxidase subunit I from a pilot study in 2018 was identified as *Rhinoptera bonasus* by a BLAST analysis. A Maximum Likelihood phylogenetic analysis of sequences available in GenBank together with sequences generated in this study revealed that sequenced identified as *Rhinoptera bonasus* belong to a lineage distinct from that species and from *Rhinoptera steindachneri*, the only cownose ray known in the eastern Pacific. Blood samples from the gut content of the marine leeches were successful at identifying the presence of identifiable la presencia de *Gymnura crebripunctata* and a species of *Urobatis* not represented in online databases.

Keywords: iDNA, cryptic species, Batoidea, Hirudinea

- **Introducción**

La subclase Hirudinea Lamarck, 1818 es un grupo que incluye alrededor de 760 especies de gusanos segmentados pertenecientes al phylum Annelida Lamarck, 1818 (Magalhães *et al.* 2021). Estos gusanos son comúnmente llamados sanguijuelas y deben su nombre a que muchas especies se alimentan de sangre, aunque el grupo también incluye especies liquidosomatófagas y macrófagas. Además, también son conocidos por poseer órganos de fijación denominados ventosas en uno o ambos extremos del cuerpo. Lo anterior implica un amplio espectro de adaptaciones fisiológicas y morfológicas dentro de un grupo relativamente poco diverso (Sawyer 1986, Govedich *et al.* 2010).

#### *Alimentación en Hirudinea*

Se han caracterizado tres tipos de alimentación en Hirudinea: el consumo de sangre (hematofagia), consumo de líquidos corporales y tejidos blandos de invertebrados (liquidosomatofagia) y el consumo de presas enteras (macrofagia) (Sawyer 1986). La hematofagia es el tipo de alimentación más estudiado en las sanguijuelas y el más común en el grupo ya que alrededor de dos tercios de las especies son hematófagas, y se ha sugerido que la digestión de la sangre es facilitada por bacterias que viven en simbiosis obligada dentro del tracto digestivo de las sanguijuelas (Graf 1999). Las bacterias simbiotes producen antibióticos que previenen la descomposición de la sangre en el buche, de manera que esta puede ser almacenada en este órgano por largos periodos de tiempo sin que la integridad de los eritrocitos se vea comprometida (Sawyer 1986), conservando el DNA contenido en las células. Algunas sanguijuelas han establecido relaciones simbióticas con bacterias alojadas en órganos denominados bacteriomas. Estas bacterias no tienen conexión directa con el tracto digestivo y se ha determinado que metabolizan vitaminas del complejo B no provistas por la dieta (Manzano-Marín *et al.* 2015).



### *Parasitismo o microdepredación*

Comúnmente se reconoce a las sanguijuelas como parásitos hematófagos de vertebrados, sin embargo, el parasitismo como interacción trófica solo define a aquellos organismos que se alimentan de un solo individuo durante todo su ciclo vital sin matarlo, lo cual no ocurre en todas las especies de sanguijuelas. En cambio, muchas especies se alimentan de manera no letal de diferentes individuos, que comúnmente pertenecen a especies distintas. Cuando esto ocurre, el organismo agresor es denominado microdepredador (Goater *et al.* 2014). Ambos son casos de relaciones simbióticas negativas.

### *Sanguijuelas marinas*

Las familias Ozobranchidae Pinto, 1921 y Piscicolidae Johnston, 1865 son las únicas que incluyen especies marinas (Sawyer 1986). Todas las especies de la familia Ozobranchidae se alimentan exclusivamente de sangre de tortugas acuáticas, mientras que las de la familia Piscicolidae lo hacen en su mayoría de sangre de peces, aunque se ha comprobado que algunas especies se nutren de la hemolinfa de invertebrados, como crustáceos y moluscos (Sawyer 1986). La capacidad de digerir sangre de peces cartilagosos, caracterizada por poseer elevadas concentraciones de urea (Hammerschlag 2006), ha surgido múltiples veces en Piscicolidae (Williams & Burreson 2006), particularmente en las especies de los géneros *Branchellion*, *Ceratobdella*, *Oxytonostoma* y *Pontobdella*, así como en algunas especies de *Austrobdella*, *Notostomum*, *Pterobdella* y *Pterobdellina* (Sawyer 1986, Utevký & Gordeev 2015, Curran *et al.* 2016). Entre ellas, *Pontobdella macrothela* (Schmarda, 1861) es uno de los parásitos de elasmobranquios más frecuentemente registrados alrededor del mundo (Yamauchi & Nagasawa 2008), y los registros de parasitismo sobre esta clase de peces por sanguijuelas marinas de este género se remontan hasta Linnaeus (1758). Lo anterior apunta a que las comunidades de bacterias endosimbiontes difieren en las sanguijuelas que se alimentan exclusivamente de sangre de peces cartilagosos y aquellas que se alimentan de peces óseos, hemolinfa de invertebrados o que tienen un amplio espectro de presas (Tessler *et al.* 2018a).

### *Importancia ecológica*

Las sanguijuelas, al igual que otros parásitos, juegan un papel importante en la transmisión de patógenos. Se ha comprobado que las especies marinas son vectores de protistas hemoparásitos del grupo Apicomplexa (Khan 1980), así como hemoflagelados de los géneros *Cryptobia* y *Trypanosoma* (Hayes *et al.* 2014, Lemos *et al.* 2015) que parasitan exclusivamente peces. Las propias sanguijuelas pueden afectar a sus hospederos por la simple extracción de sangre y la formación de úlceras cutáneas propensas a infecciones, especialmente al alcanzar densidades poblacionales altas en un solo hospedero (Marancik *et al.* 2012). Al ser principalmente ectoparásitas, sirven de alimento para peces ectoparasitófagos, cuya función como limpiadores de elasmobranquios y otros vertebrados marinos es bien conocida (Jorgensen 2013).

### *iDNA como herramienta de monitoreo biológico*

Existe una tendencia creciente hacia el empleo de la secuenciación de DNA ambiental para el registro de fauna en ambientes difíciles de estudiar. De manera similar, la secuenciación de DNA derivado del tracto digestivo de invertebrados (iDNA, abreviatura en inglés de invertebrate-derived DNA) es una técnica emergente de monitoreo biológico basada en la obtención de material genético a partir de tejido ingerido por invertebrados (e.g. mosquitos y sanguijuelas) que se alimentan de organismos de mayor tamaño, generalmente vertebrados (Zaidi *et al.* 1999; Nagel & Loughheed 2006; Bohmann *et al.* 2014; Pérez-Flores *et al.* 2016; Meekan *et al.* 2017; Schnell *et al.* 2018, Lynggaard *et al.* 2022).

Estas herramientas para el estudio de la biodiversidad requieren de la existencia de un repositorio de secuencias genéticas representativas de la riqueza de especies de una localidad determinada, para lo cual se utilizan secuencias cortas de DNA con poca o nula variabilidad intraespecífica y una moderada variación interespecífica. Estas secuencias, también llamadas “códigos de barras genéticos de la vida” comúnmente son fragmentos de la subunidad I de la secuencia de DNA mitocondrial que codifica para la enzima citocromo c oxidasa en animales (Hebert *et al.* 2003), entre otras. Estas secuencias comúnmente se depositan en bases de datos públicas, como GenBank del

NCBI, EEUU, que cuenta con la herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool para nucleótidos, por sus siglas en inglés), un programa utilizado frecuentemente para comparar las secuencias generadas con las secuencias de DNA disponibles en las bases de datos de manera rápida. BLASTn identifica secuencias de nucleótidos homólogas a nuestra secuencia de interés mediante un algoritmo heurístico y por lo tanto, no garantiza que sus resultados sean óptimos (Pertsemlidis & Fondon 2001).

El estudio y caracterización del iDNA, particularmente el obtenido a partir del contenido gástrico de sanguijuelas, se ha propuesto como una herramienta eficiente en términos de costo-beneficio para estudiar la diversidad de vertebrados acuáticos y terrestres (Calvignac-Spencer *et al.* 2013; Schnell *et al.* 2018; Tessler *et al.* 2018b; Weiskopf *et al.* 2018; Fahmy *et al.* 2019; Siddall *et al.* 2019; Lynggaard *et al.* 2022). Hasta el momento, el estudio del iDNA de sanguijuelas ha demostrado ser bastante eficiente en el ambiente terrestre, donde se ha comparado su desempeño frente a métodos de muestreo como el foto-trampeo, que resulta efectivo pero costoso (Weiskopf *et al.* 2018; Gogarten *et al.* 2019; Hanya *et al.* 2019).

El empleo de iDNA en ambientes marinos se ha popularizado en años recientes. Entre las ventajas de esta técnica está el hecho de que puede ser una manera indirecta de obtener información sobre especies en riesgo, como lo demostraron Meekan *et al.* (2017), quienes secuenciaron el DNA mitocondrial del tiburón ballena *Rhincodon typus* a partir del copépodo *Pandarus rhincodonicus*. Además, es la única manera de conocer el hospedero de un simbiote cuando este es recolectado fuera del hospedero, como fue el caso de la identificación del tiburón de puntas negras *Carcharhinus limbatus* (Müller & Henle, 1839) a través de la secuenciación del DNA contenido en la sangre consumida por una sanguijuela marina (*Pontobdella macrothela*) recolectada en Veracruz (Kvist *et al.* 2016). Por último, Turon *et al.* (2020) tomaron en cuenta la naturaleza filtradora de las esponjas marinas para estudiar comunidades de peces arrecifales, aprovechando el hecho de que indirectamente filtran tejidos que quedan suspendidos en la columna de agua, como escamas, heces o restos de piel.

En el presente trabajo se utilizó la información generada a partir de la obtención de secuencias de DNA del contenido del buche de la sanguijuela marina *Pontobdella*

*californiana* para investigar la dieta de las sanguijuelas y usar esta información como un monitor biológico vivo para investigar la diversidad de especies de peces en la costa del estado de Oaxaca.

### **Justificación académica e importancia**

El muestreo de peces con propósitos científicos comúnmente requiere el sacrificio o la extracción de los ejemplares del medio. La extracción y/o manipulación de organismos acuáticos genera niveles de estrés que pueden llegar a ser mortales (Talwar *et al.* 2017). En el contexto actual de pérdida acelerada de la biodiversidad (Ceballos *et al.* 2015), el desarrollo de técnicas rápidas y de bajo impacto de monitoreo biológico es de suma importancia. Las poblaciones de algunas especies son vulnerables a la pesca, debido a los elevados esfuerzos de captura: esto es de particular importancia para la conservación de elasmobranquios, al tratarse de organismos que maduran sexualmente en edades avanzadas, tienen periodos de gestación prolongados y aportan pocas crías en cada camada (Queiroz *et al.* 2016).

En este contexto, el muestreo indirecto a partir del tejido consumido por organismos parásitos o microdepredadores es potencialmente una herramienta útil que evita poner en riesgo a las poblaciones de peces. Las sanguijuelas recolectadas en un solo muestreo pueden potencialmente albergar sangre acumulada de varios hospederos y, por lo tanto, el espectro del muestreo es espacial y temporalmente más amplio que la búsqueda directa de peces. Además, este método de estudio nos permitirá profundizar en la importancia de las sanguijuelas marinas en la cadena trófica marina y su relevancia en el ecosistema.

En este trabajo se caracterizó el DNA ingerido por sanguijuelas marinas, lo que permitió de manera secundaria obtener información genética sobre la presencia de peces en una localidad mediante el uso de un método no invasivo.

### **Preguntas de investigación**

-¿De qué especies de elasmobranquios se alimentan las sanguijuelas marinas hematófagas *Pontobdella californiana* recolectadas en la costa de Oaxaca, México?

- ¿Las especies de peces detectadas en la dieta de *Pontobdella californiana* coinciden con los registros de peces para la costa de Oaxaca, México?

## **Hipótesis**

Considerando que históricamente se ha reconocido que algunas especies de sanguijuelas marinas se alimentan exclusivamente de sangre de condrictios, mientras que otras especies de sanguijuelas lo hacen exclusivamente de sangre de peces óseos, se espera que todas las secuencias obtenidas a partir del contenido gástrico correspondan a lo registrado previamente para especies de *Pontobdella*.

## **Objetivos**

### **General**

Caracterizar la dieta de las sanguijuelas marinas de la especie *Pontobdella californiana* recolectadas en el fondo marino de la costa de Oaxaca a través del DNA de la sangre consumida.

### **Particulares**

Identificar las especies de peces detectadas en el contenido gástrico de sanguijuelas microdepredadoras y compararlas con las registradas en la costa de Oaxaca.

Analizar la utilidad de los porcentajes de similitud y análisis filogenéticos para determinar la identidad de las presas a través de las secuencias de DNA.

## **Materiales y métodos**

### *Área de estudio*

El área de estudio abarca un estrecho de aproximadamente 87 km a lo largo de la costa central del estado de Oaxaca, incluyendo las siguientes localidades: Ventanilla, Punta Cometa, San Agustinillo, Roca Blanca, El Faro, Puerto Ángel, Playa Tijera, Zapotengo, Salchi y Cuatunaco (Fig. 1). En este estrecho predominan los fondos arenosos y rocosos, con parches de arrecifes coralinos en aguas someras (2-13 m) (Glynn & Leyte-

Morales 1997). Esta región se caracteriza por elevados niveles de productividad primaria originados en el cercano golfo de Tehuantepec, promovidos por la acción de fuertes vientos invernales, además de una estrecha plataforma continental (Ortega-García *et al.* 2000). Además, la entrada de agua dulce estacional en algunas lagunas (e.g. Ventanilla y Zapotengo) permiten un importante aporte de nutrientes para la base de la cadena trófica, y en consecuencia, mayor disponibilidad de alimento para peces (Cervantes-Hernández *et al.* 2008). La temperatura superficial del mar máxima es típica del Pacífico oriental tropical (30.7 °C) (Payne *et al.* 2012). En total, la región cuenta con registros de 487 especies de peces, incluyendo 46 especies de condriictios y 441 de peces óseos (del Moral-Flores *et al.* 2017).

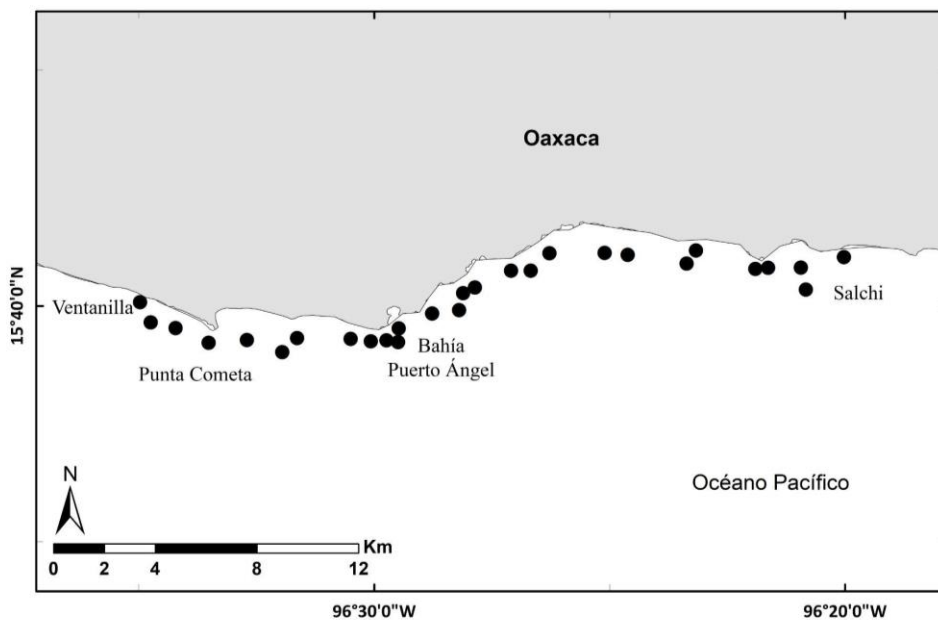


Figura 1. Mapa del área de estudio en la costa de Oaxaca, México.

### Recolecta de sanguijuelas

Las sanguijuelas marinas estudiadas en este trabajo se encontraron asociadas a redes de enmalle de fondo desde el año 2014 (Ruiz-Escobar 2019). Durante diciembre de 2019 a mayo de 2020 se realizó un muestreo recolectando ejemplares de sanguijuelas marinas identificadas inicialmente como *Pontobdella* sp. mediante la inspección de las redes en embarcaciones que operan a lo largo de la costa central del estado de Oaxaca. Las redes tienen una longitud de 100 m por 1 m de altura, y se anclan al fondo en profundidades de

40-100 m, operando durante aproximadamente 12 h (18:00-06:00). Este método de pesca sostiene principalmente pesquerías de peces de las familias Haemulidae, Carangidae y Lutjanidae (Rojo-Vásquez *et al.* 2008). Las sanguijuelas fueron encontradas adheridas al lastre, cabos y monofilamento de nylon de las redes (Fig. 2A). Además, se encontraron ejemplares adultos y ootecas depositadas en objetos biogénicos (esqueletos de octocorales, Fig. 2B) y antropogénicos (metal y plástico) recuperados mediante el mismo arte de pesca (Fig. 2C-E). Ninguna de las sanguijuelas recolectadas estaba asociada a un hospedero.

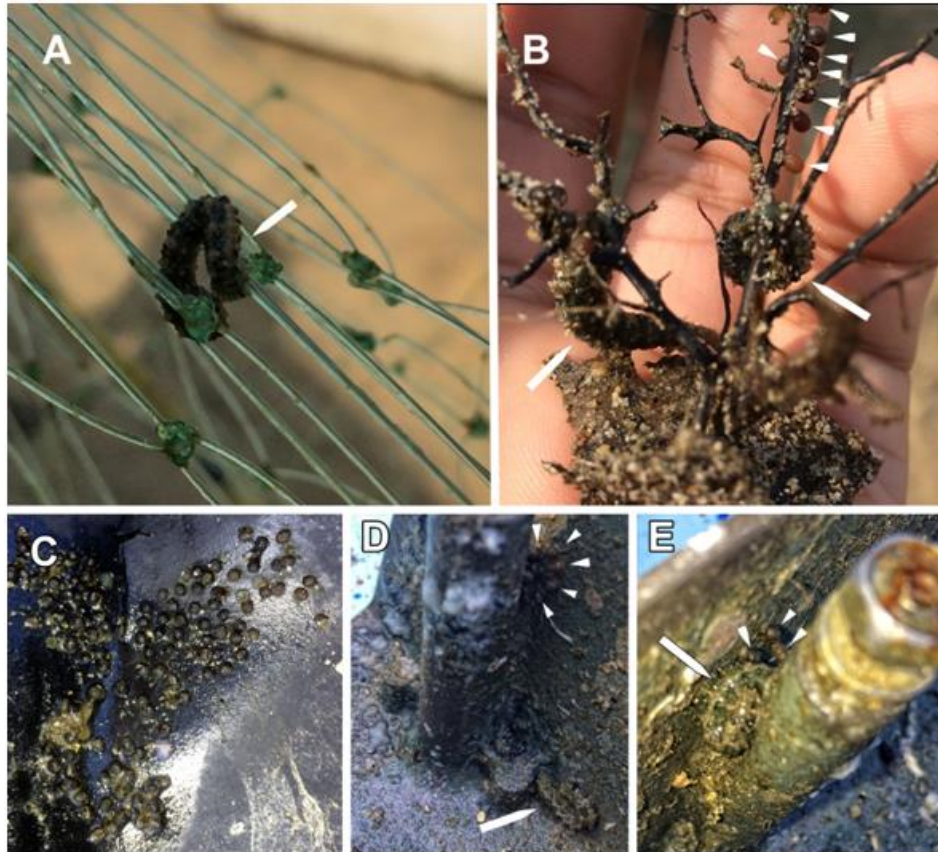


Figura 2. Ejemplares de *Pontobdella californiana* asociadas a redes agalleras de fondo. A, sanguijuela adherida a monofilamento de red de enmalle; B, sanguijuelas y ootecas en esqueleto de octocoral; C, ootecas depositadas en una superficie plástica (cámara de llanta); D, E, sanguijuelas y ootecas en un objeto metálico. Flechas= sanguijuelas; triángulos= ootecas.

#### *Identificación y preservación*

Las sanguijuelas fueron identificadas siguiendo literatura especializada (Burreson 2007, Burreson & Pasarelli 2015). Los ejemplares se relajaron añadiendo alcohol a un

recipiente con agua del medio: Se tomaron mediciones de longitud total de cada individuo, y, por último, se fijaron en alcohol al 96% y se almacenaron en un congelador hasta el procesamiento de las muestras (Oceguera-Figueroa *et al.* 2021).

### *Procesamiento de las muestras*

Para extraer muestras de sangre almacenada en el buche, se realizó un corte longitudinal en la porción dorsal, y se cortaron porciones pequeñas (~1 mg) de dicho tejido con pinzas esterilizadas (Fig. 3). Las sanguijuelas se numeraron siguiendo el orden en que fueron diseccionadas (01-56), sin tener en cuenta la localidad o fechas de colecta.

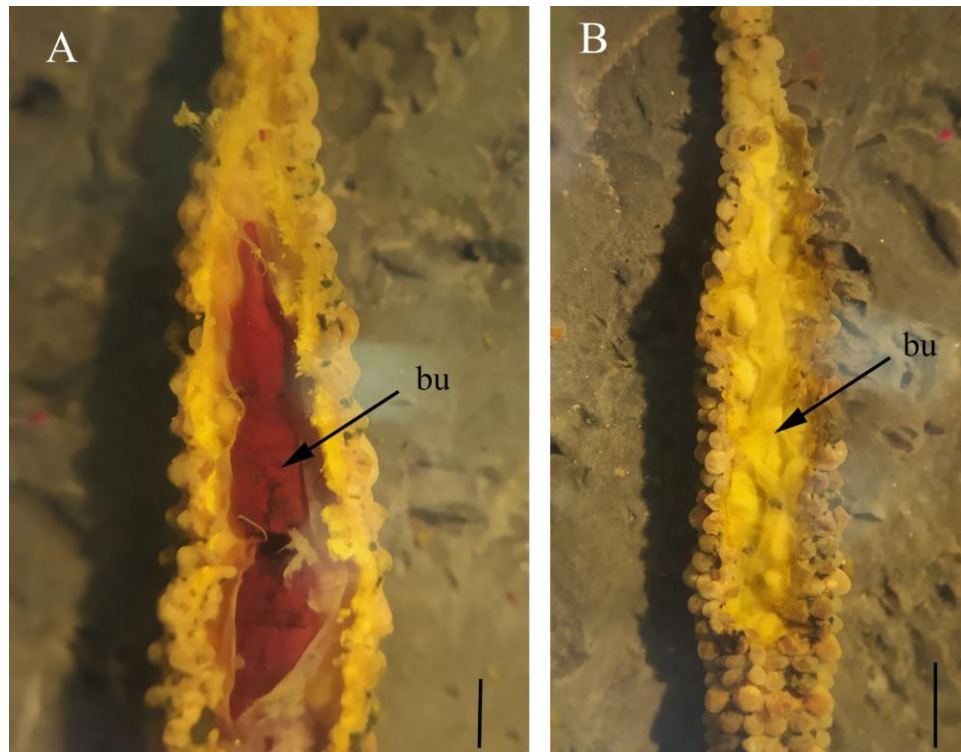


Figura 3. Vista dorsal del corte longitudinal para remover el buche (bu). A) buche lleno de sangre; B) buche vacío. Escala= 1 mm.

El DNA total de las muestras de sangre se extrajo utilizando el Blood & Tissue Kit de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante (a excepción de la digestión, que se extendió hasta 12 horas). El DNA de cada muestra fue cuantificado utilizando un fluorómetro Qubit (ThermoFisher Scientific, EEUU). Las muestras con concentraciones



muy altas de DNA (>600 ng/ml) fueron diluidas en proporciones de 1:5 y 1:10 con agua esterilizada y utilizadas subsecuentemente para la amplificación por PCR.

Con el fin de obtener secuencias de DNA que permitieran identificar la(s) especies de peces usadas por las sanguijuelas como fuente de alimentación, se buscó amplificar los genes citocromo c oxidasa subunidad I (*cox1*), citocromo b (*cytb*), RAG1 y NADH2 con cebadores específicos para elasmobranquios (Tabla I).

Tabla I. Cebadores utilizados en este trabajo.

<b>Cebador</b>	<b>Locus</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>
FishF1	Cox1	5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	Ward <i>et al.</i> (2005)
FishF2	Cox1	5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3'	Ward <i>et al.</i> (2005)
FishR1	Cox1	5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'	Ward <i>et al.</i> (2005)
FishR2	Cox1	5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3'	Ward <i>et al.</i> (2005)
Somn- GLU-L1	Cytb	5'-GAACCATCGTTGTTTATTCAAC-3'	Murray <i>et al.</i> (2007)
Somn- CYTB-H2	Cytb	5'-GGCAAATAGGAAATATCATT-3'	Murray <i>et al.</i> (2007)
MRAGF2	RAG	5'-GGGGCAGATATTCCAACCA-3'	Kashiwagi <i>et al.</i> (2012)
MRAGR2	RAG	5'-TTCTCTTCGTGGCTCCTTGT-3'	Kashiwagi <i>et al.</i> (2012)
ILEM	NADH2	5'-AAGGAGCAGTTTGATAGAGT-3'	Naylor <i>et al.</i> (2012)

Todos los volúmenes de reacción se ajustaron a 15  $\mu$ l. Con el fin de probar el funcionamiento de los cebadores y evitar el desperdicio de reactivos y DNA, se probaron las condiciones especificadas por los autores con al menos una de las muestras de sangre y una de raya (*Hypanus longus*) como testigo positivo, con el fin de probar el funcionamiento de los cebadores y la calidad del ADN de la sangre. La especie de raya se eligió debido a su disponibilidad al momento de realizar los experimentos.

*Cox1*: El volumen de reacción para cada muestra incluyó 11.14  $\mu$ l de agua destilada, 1.5  $\mu$ l de buffer (1X), 0.75  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ l de cada cebador, 0.08  $\mu$ l de polimerasa Taq, 0.125  $\mu$ l de dNTPs, y 1  $\mu$ l de DNA. El ciclo térmico consistió en un calentamiento inicial a 95°C por dos minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C (30 s), 54°C (30 s) y 72°C (60 s), y una extensión final a 72° por 10 minutos.

*Cytb*: el volumen de reacción para cada muestra consistió en 10.8  $\mu$ l de agua destilada, 1.5  $\mu$ l de buffer (1X), 0.6  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ l de polimerasa Taq, 0.3  $\mu$ l de cada cebador, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3  $\mu$ l de dNTPs, y 1  $\mu$ l de DNA. El ciclo térmico consistió en un ciclo inicial a 95°C por 5 minutos, 45°C por 30 segundos, y 72°C por 1.5 minutos, seguidos de una extensión final a 72° por 6.5 minutos.

*RAG1*: el volumen de reacción para cada muestra consistió en 9.86  $\mu$ l de agua destilada, 1.5  $\mu$ l de buffer (1X), 0.6  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 0.75  $\mu$ l de cada cebador, 0.24  $\mu$ l de polimerasa Taq, y 0.3  $\mu$ l de dNTPs. El ciclo térmico consistió en 95°C por 15 minutos, seguidos de 38 ciclos de 95°C (30 s), 55°C (1 min) y 72°C (1 min), con una extensión final de 72°C por 7 minutos.

*NADH2*: el volumen de reacción para cada muestra consistió en 10.28  $\mu$ l de agua destilada, 1.5  $\mu$ l de buffer (1X), 0.9  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 0.45  $\mu$ l de cada cebador, 0.12  $\mu$ l de Taq, 0.3  $\mu$ l de dNTPs, y 1  $\mu$ l de DNA. El ciclo térmico consistió en un calentamiento inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 39 ciclos de 94°C (30 s), 48°C (30 s) y 72°C (90 s), con una extensión final a 72°C por 5 minutos.

En los casos en los que no se tuvo éxito al amplificar, se hicieron ensayos adicionales integrando gradientes de temperatura (ver Anexo I). Las extracciones de DNA total y el resultado de las amplificaciones por PCR fueron visualizados mediante geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Las reacciones de secuenciación Sanger se realizaron en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad (Instituto de Biología, UNAM) en un secuenciador ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). La revisión y edición de las secuencias se realizaron en el programa de cómputo Geneious Pro (Biomatters Ltd. Auckland, New Zealand).

### *Análisis*

Las secuencias obtenidas a partir de la sangre ingerida por las sanguijuelas fueron comparadas con secuencias disponibles en GenBank (NCBI, EEUU, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante la herramienta BLASTn (Altschul *et al.* 1990). Con el fin investigar la posición filogenética de las especies detectadas y corroborar los resultados de las búsquedas en BLAST, se alinearon secuencias disponibles en GenBank (Tabla II) en combinación con las generadas en el presente trabajo en la plataforma ClustalW (disponible en [www.genome.jp/tools/clustalw/](http://www.genome.jp/tools/clustalw/)), y se analizaron bajo el criterio de Máxima Verosimilitud con el programa MEGA (Kumar *et al.* 2018), con 1000 repeticiones bootstrap, eligiendo el modelo de sustitución con el programa PhyML (Guindon *et al.* 2005). La elección de grupos externos en cada análisis se basó en Last *et al.* (2016).

Tabla II. Claves de acceso de GenBank de las secuencias utilizadas en los análisis de este trabajo.

---

<b>Taxón</b>	<b>Localidad</b>	<b>ID GenBank</b>	<b>Referencia</b>
<i>Mobula japonica</i>	Pacífico este	KM364988	Poortvliet <i>et al.</i> (2015)
	China	KT626495	No publicada
<i>Mobula munkiana</i>	La Paz, México	KM364898	Poortvliet <i>et al.</i> (2015)

<i>Mobula thurstoni</i>	Golfo de California	AF110635	Lovejoy <i>et al.</i> (1998)
<i>Rhinoptera brasiliensis</i>	Brasil	MK085731, MK085725, MK085724	Ferrette <i>et al.</i> (2019)
<i>Rhinoptera marginata</i>	Turquía	KY176594	No publicada
		KY176595	No publicada
<i>Rhinoptera jayakari</i>	Bangladesh	MH841982	No publicada
	Bangladesh	MH841998	No publicada
	India	KY574494	Pradeep <i>et al.</i> (2018)
<i>Rhinoptera javanica</i>	Malasia	MG792117	No publicada
		MG774923	No publicada
		MG774927	No publicada
<i>"Rhinoptera steindachneri"</i>	Sri Lanka	KM364907	Poortvliet <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhinoptera steindachneri</i>	Golfo de California	JN184076	Aschliman <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhinoptera bonasus</i>	Brasil	MK085607 MK085607 MK085747	Ferrette <i>et al.</i> (2019)
<i>Gymnura marmorata</i>	Golfo de California	FJ010585 FJ010584 FJ010583 FJ010582 FJ010581 FJ010580 FJ010579 FJ010578 FJ010577 FJ010576 FJ010575	Smith <i>et al.</i> (2009) ----- ----
		AF110631	Lovejoy <i>et al.</i> (1998)
<i>Gymnura crebripunctata</i>	Golfo de California	FJ010574 FJ010573 FJ010572 FJ010571 FJ010570 FJ010569 FJ010568 FJ010567	Smith <i>et al.</i> (2009)

<i>Gymnura micrura</i>	Golfo de México	FJ010566 FJ010565 FJ010564 FJ010563 FJ010567	Smith <i>et al.</i> (2009)
<i>Gymnura japonica</i>	Japón	AB021503	Sesaki <i>et al.</i> (1999)
<i>Urobatis concentricus</i>	Golfo de California	U27265	Martin (1995)
<i>Urobatis halleri</i>	Golfo de California	AF110624	Lovejoy <i>et al.</i> (1998)
	Pacífico oriental	MW481876	Fontenelle <i>et al.</i> (2021)
<i>Urobatis jamaicensis</i>	Atlántico occidental	MW481863	Fontenelle <i>et al.</i> (2021)
<i>Plesiobatis daviesi</i>	Indo-Pacífico	JN184070	Aschliman <i>et al.</i> (2012)

## Resultados

### *Morfología y biología de las sanguijuelas*

En total, se recolectaron 56 ejemplares de la sanguijuela marina *Pontobdella californiana* Burreson & Passarelli, 2015. La determinación de los ejemplares se basó en los siguientes caracteres: sanguijuelas grandes (>15 mm), ventosa oral con dos pares de manchas oculares lineares y dos pares de papilas laterales; ventosa caudal pequeña y terminal; tubérculos prominentes en cada anillo del cuerpo (Fig. 4).



Figura 4. *Pontobdella californiana* de Oaxaca, México. A) vista dorsal; B) vista ventral. Abreviaturas: vo, ventosa oral; vc, ventosa caudal.

El intervalo de tallas de los ejemplares estudiados es de 18.93-47.33 cm. Treinta y seis de los ejemplares (64%) de *Pontobdella californiana* (n=56) contenían sangre en el buche. De los 36 ejemplares con contenido gástrico, 29 contenían concentraciones adecuadas de DNA (Tabla III). Finalmente, se secuenciaron 15 de las muestras que generaron copias abundantes de DNA (cytb) evidenciadas por los geles de electroforesis (ver anexo I). Adicionalmente, se incluye una secuencia de citocromo oxidasa subunidad I generada con los cebadores F1-R1 y condiciones térmicas especificadas por Ward *et al.* (2005) durante un ensayo piloto realizado en el año 2018 en el Instituto de Biología, UNAM (sanguijuela F4, ver anexo II). Es probable que los cebadores que se utilizaron en los ensayos realizados durante este trabajo se encontraban deteriorados, y por lo tanto no funcionaron adecuadamente, lo cual es evidente al no obtenerse amplificaciones de los tejidos de raya.

Tabla III. Concentraciones de DNA en la sangre ingerida y datos de colecta de las muestras de *Pontobdella californiana*.

ID de la sanguijuela	Concentración de DNA (ng/ul)	Localidad de colecta	Fecha de colecta	Longitud total del ejemplar (mm)
----------------------	------------------------------	----------------------	------------------	----------------------------------

28	4.58	Puerto Ángel	07/02/2020	19.06
10	2.48	Salchi	15/04/2020	20.48
21	2.98	El Faro	12/01/2020	21.09
15	Alta	Salchi	15/04/2020	22.78
20	Alta	Puerto Ángel	26/12/2019	25.20
5	6.62	Cuatunalco	13/04/2020	29.10
35	2.3	Salchi	15/04/2020	29.13
4	5.82	Cuatunalco	13/04/2020	29.43
36	10.4	Salchi	15/04/2020	34.08
11	6	Salchi	15/04/2020	34.1
43	Alta	Roca Blanca	04/06/2020	34.14
45	Alta	El Faro	10/06/2020	35.17
25	7.92	Ventanilla	04/03/2020	35.32
32	Alta	Playa Tijera	01/04/2020	36.15

44	9.32	Roca Blanca	04/06/2020	37.93
1	Alta	Roca Blanca	14/12/19	38.5
47	Alta	El Faro	10/06/2020	38.53
23	2.68	Punta Cometa	01/02/2020	39.5
8	10.4	Salchi	15/04/2020	39.61
53	Alta	Roca Blanca	27/03/2020	40.79
26	Alta	Ventanilla	05/03/2020	40.86
41	Alta	Roca Blanca	23/06/2020	41.1
51	Alta	Roca Blanca	27/03/2020	42.57
24	1.82	Ventanilla	04/03/2020	44.14
33	Alta	Playa Tijera	01/04/2020	45.67
48	Alta	Roca Blanca	27/03/2020	45.88
18	Alta	Ventanilla	29/03/2020	46.18
52	3.92	Roca Blanca	27/03/2020	47.33



## Análisis de BLAST

La comparación de las secuencias de citocromo b generadas en este trabajo con las disponibles en la base de datos de GenBank reveló que las muestras pertenecen a tres especies de peces: 10 de las sanguijuelas recolectadas se alimentaron de la raya águila *Rhinoptera* sp. (siendo *R. bonasus* del Atlántico el resultado más cercano) una de la raya mariposa *Gymnura crebripunctata* y cuatro de la raya redonda *Urobatis* sp. (con *U. concentricus* como taxón más cercano) (Tabla IV).

Tabla IV. Datos de colecta e identidad por BLAST de las muestras con amplificaciones exitosas.

ID de la muestra	Taxón	ID-GenBank	% Identidad
F4	<i>Rhinoptera</i> sp.	MK085599	98.62
53	<i>Rhinoptera</i> sp.	JX241053	98.36
47	<i>Rhinoptera</i> sp.	JX241053	98.56
45	<i>Rhinoptera</i> sp.	JX241053	98.14
41	<i>Urobatis</i> sp.	U27265	93.71
36	<i>Urobatis</i> sp.	U27265	93.88
35	<i>Rhinoptera</i> sp.	JX241053	98.35
33	<i>Rhinoptera</i> sp.	JX241053	98.15
28	<i>Gymnura crebripunctata</i>	FJ010573	99.76

26	<i>Urobatis</i> sp.	U27265	94.06
25	<i>Rhinoptera</i> sp.	JX241053	98.56
24	<i>Rhinoptera</i> sp.	KX151652	98.41
20	<i>Rhinoptera</i> sp.	JX241053	98.34
15	<i>Rhinoptera</i> sp.	JX241053	98.35
11	<i>Rhinoptera</i> sp.	JX241053	98.56
10	<i>Urobatis</i> sp.	U27265	93.93

### *Análisis filogenéticos*

#### *Rhinoptera* sp.

El análisis BLAST de secuencias de *cox1* y *cytb* generadas en este trabajo revelan porcentajes de similitud de 98.62% y 98.14-98.56% respectivamente con la raya gavián *Rhinoptera bonasus*. *Rhinoptera bonasus* es una especie que habita en la costa del Atlántico de América, desde Estados Unidos hasta Brasil (Robinson & Ray 1986).

Los análisis filogenéticos por Máxima Verosimilitud de secuencias de *cytb* y *cox1* revelan que las rayas del género *Rhinoptera* de las que se alimentaron las sanguijuelas en Oaxaca pertenecen a un taxón que es el grupo hermano de *R. bonasus* del Atlántico occidental (Fig. 5). Aunque la filogenia de *cox1* no está resuelta, pues existe una politomía entre *R. javanica* (Malasia), *R. bonasus* (Atlántico) y *Rhinoptera* sp. (Oaxaca) y un clado que incluye a *R. jayakari* (Bangladesh e India), *R. marginata* (Turquía), *R. steindachneri* (golfo de California) y *R. brasiliensis* (Brasil), los nodos tienen alto soporte y evidencian la presencia de un linaje distinto a *R. steindachneri* en la costa de Oaxaca. Se incluyeron

especies de *Mobula* como grupos externos con base en la topología Mobulidae+Rhinopteridae de Last *et al.* (2016).

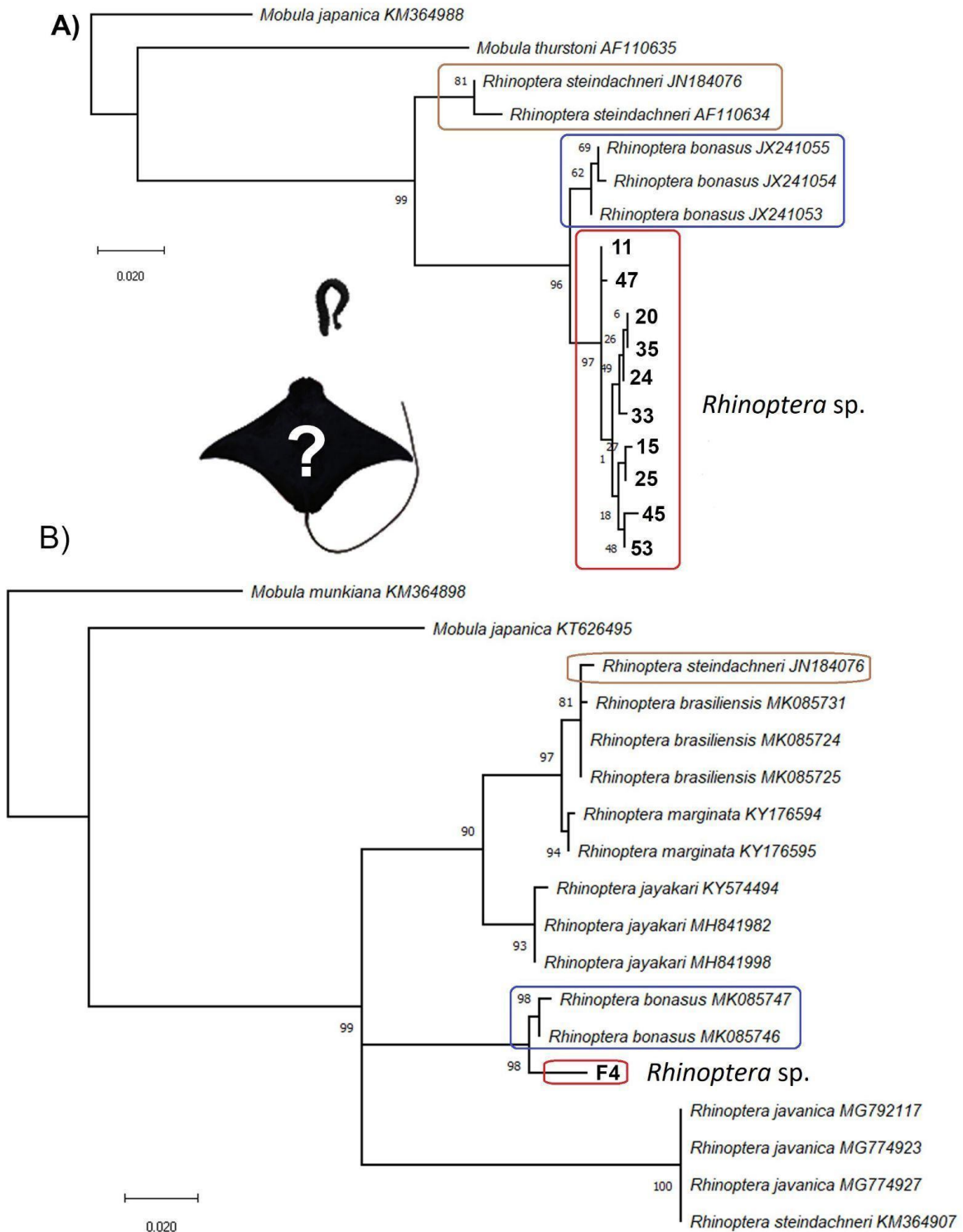


Figura 5. Hipótesis sobre las relaciones filogenéticas entre las secuencias del *cytb* (A) y *cox1* (B) de *Rhinoptera* spp. bajo el criterio de Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución General Time Reversible (GTR). Los números bajo las ramas indican el soporte de las agrupaciones, y los de las terminales la ID de las muestras. La longitud de las ramas y su escala reflejan los cambios mutacionales. Los recuadros de colores representan la posición de los taxones de interés (*R. steindachneri*, *R. bonasus* y *Rhinoptera* sp.). Grupos externos: *Mobula* spp.

*Gymnura crebripunctata* (Peters, 1869)

El análisis BLAST de *cytb* de la muestra 28 reveló un porcentaje de similitud de 99.76% con *Gymnura crebripunctata* siendo el más alto en este estudio. En la filogenia basada en secuencias de citocromo b, *Gymnura marmorata* se agrupa con *G. japonica* y *G. poecilura* + *G. australis*, mientras que *G. crebripunctata* lo hace con *G. altavela* + *G. micrura* (Fig. 6). Se incluyeron dos especies de *Urobatis* como grupos externos considerando el grupo formado por Gymnuridae y Urolophidae+Plesiobatidae (Last *et al.* 2016). Considerando la cantidad de terminales de *Gymnura*, se omitió la secuencia de Plesiobatidae para minimizar ramas largas en la filogenia.

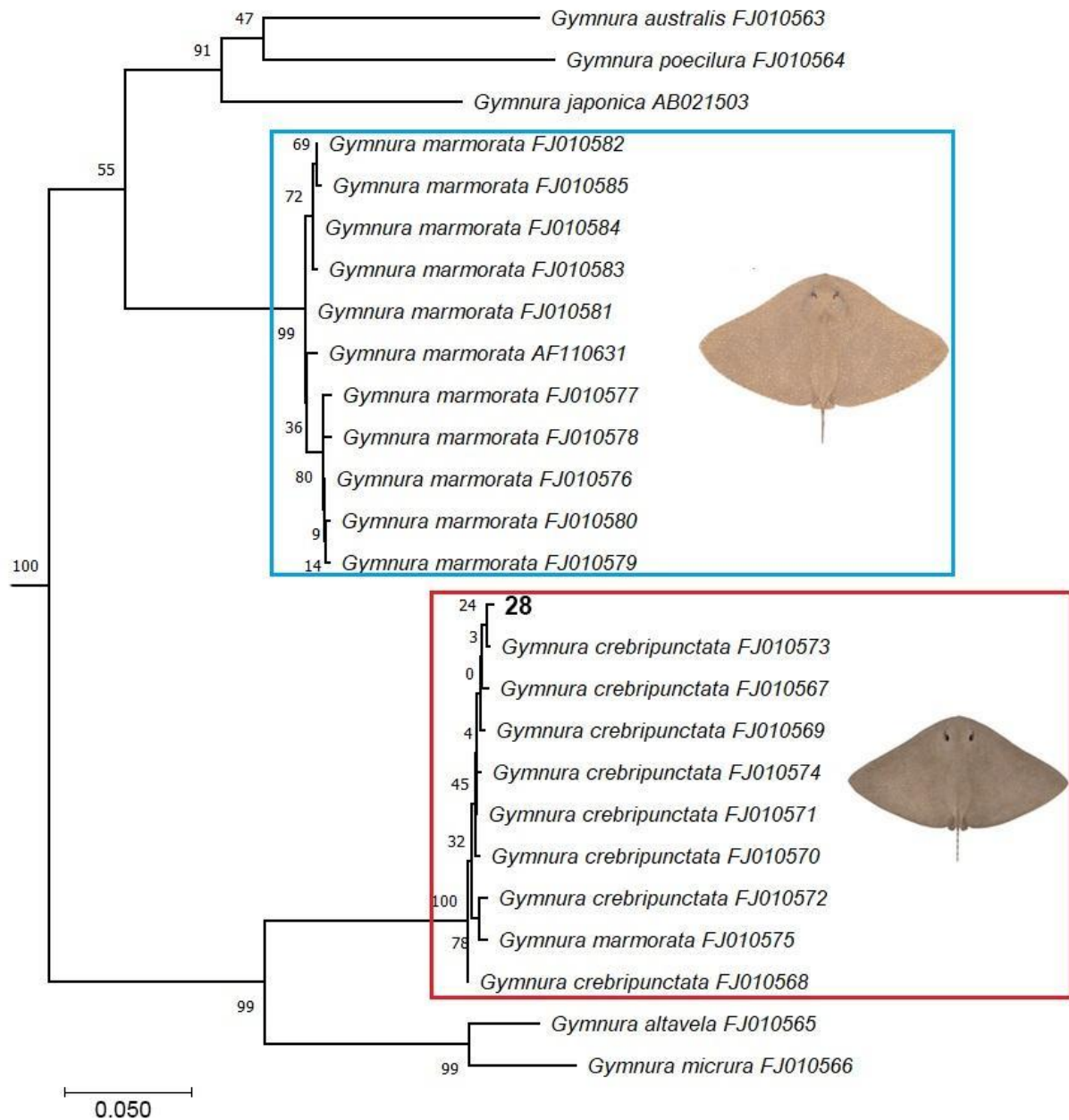


Figura 6. Hipótesis sobre las relaciones filogenéticas entre las secuencias del citocromo b de *Gymnura* spp. analizadas con el criterio de Máxima Verosimilitud y bajo el modelo de sustitución GTR+G. Los números bajo las ramas indican el soporte de las agrupaciones, y los de las terminales la ID de las muestras. La longitud de las ramas y su escala reflejan los cambios mutacionales. Grupo externo: *Urobatis concentricus*+*Urobatis halleri* (no mostrados para favorecer la visualización de las

terminales de *Gymnura* spp.). Los esquemas de las especies fueron tomados de Last *et al.* (2016).

### *Urobatis* sp.

El porcentaje de similitud de las secuencias identificadas por BLAST como *Urobatis concentricus* es de 93.88%. La otra especie del género conocida en el Pacífico sur de México, *Urobatis halleri*, tiene un porcentaje de similitud de 93.20%. La raya de la que se alimentaron las sanguijuelas analizadas en este trabajo forma el grupo hermano de *Urobatis concentricus*+*Urobatis halleri*, y las tres lo son de *Urobatis jamaicensis* del Atlántico (Fig. 7). Aunque la identidad de la presa no puede ser determinada ya que aún no está representada en los repositorios públicos, la secuencia generada en este trabajo se agrupa dentro del clado de *Urobatis*, con *U. jamaicensis* como grupo hermano.

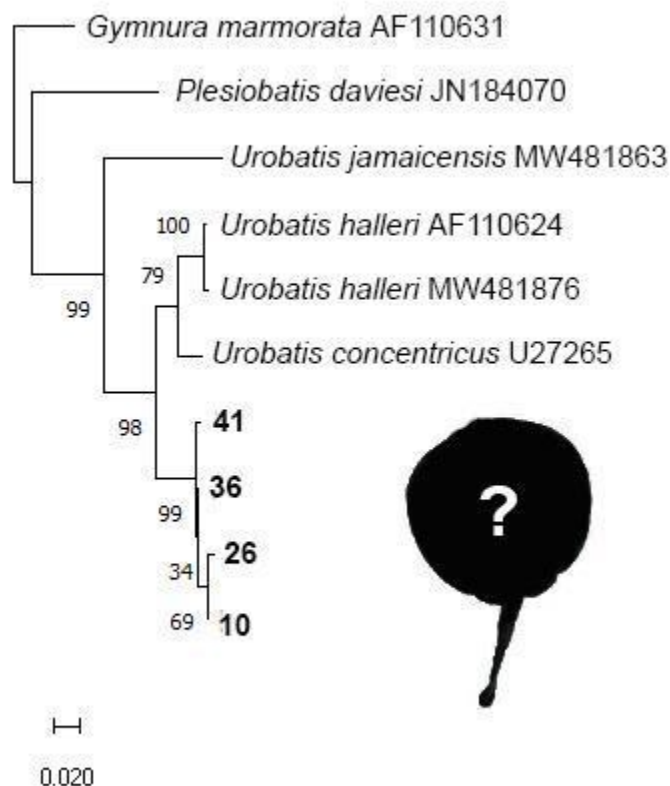


Figura 7. Hipótesis sobre las relaciones filogenéticas entre las secuencias del citocromo b de *Urobatís* spp. analizadas con el criterio de Máxima Verosimilitud y bajo el modelo de sustitución GTR+G. Los números bajo las ramas indican el soporte de las agrupaciones, y los de las terminales la ID de las muestras. La longitud de las ramas y su escala reflejan los cambios mutacionales. Grupo externo: *Gymnura marmorata*+*Plesiobatis daviesi*.

## Discusión

En total, se han registrado 46 especies de peces cartilaginosos en la costa del estado de Oaxaca (del Moral-Flores *et al.* 2017), incluyendo a 33 especies de rayas (Torres-Huerta *et al.* 2019). Del total, sólo se detectaron tres especies de rayas mediante el método de muestreo de sangre en el contenido gástrico de la sanguijuela marina *Pontobdella californiana*. Es interesante señalar que no se detectaron tiburones ni quimeras.

A pesar de la baja riqueza de especies de peces detectada en el presente trabajo, la caracterización molecular de la dieta de la sanguijuela marina *Pontobdella californiana* en la costa de Oaxaca permite discutir tres cuestiones importantes que surgen al realizar estudios basados en códigos de barras: la evaluación crítica de los porcentajes de similitud como criterio de determinación de especies, la precisión de los marcadores al separar especies, y la importancia de una buena representación taxonómica en los repositorios de genes.

### *¿Cuántas especies de Rhinoptera se distribuyen en el Pacífico mexicano?*

Notablemente, todas las secuencias asignadas al género *Rhinoptera* generadas en este trabajo se agruparon con secuencias de *R. bonasus* del Atlántico y no con las de la raya águila *Rhinoptera steindachneri* provenientes del golfo de California, cuyo porcentaje de identidad fue de 98.36% para citocromo b y 98.83% para cox1. Aunque existen pocos datos sobre la diversidad y conectividad genética de *Rhinoptera steindachneri* a lo largo del Pacífico mexicano, se ha sugerido la presencia de especies crípticas en la región, con base en el descubrimiento de linajes bien diferenciados en el golfo de California y la costa este de la península de Baja California (Sandoval-Castillo & Rocha-Olivares 2011). Estos datos no son comparables con nuestro estudio, pues se utilizó un marcador distinto

(NADH2) y ninguna de las muestras es representativa del Pacífico sur mexicano. Considerando esto y los resultados de este trabajo, es necesario explorar la diferenciación genética, morfológica y ecológica entre las distintas poblaciones que habitan el Pacífico mexicano y determinar cuántas especies existen bajo el nombre de *R. steindachneri*.

#### *Detección de especies morfológicamente similares: Gymnura marmorata vs. Gymnura crebripunctata*

Las rayas de la familia Gymnuridae son batoideos extremadamente aplanados cuya determinación taxonómica se complica debido a variaciones intraespecíficas en forma y coloración (Last *et al.* 2016). De acuerdo con estudios morfológicos y moleculares (Smith *et al.* 2009), *Gymnura crebripunctata* y *Gymnura marmorata* son especies válidas con distribución en el Pacífico oriental tropical que suelen ser confundidas por su morfología similar. De acuerdo con Smith *et al.* (2009), *G. crebripunctata* se distingue de *G. marmorata* por la ausencia de espinas en la cola, característica que puede ser difícil de distinguir para los no expertos. El iDNA de *Pontobdella californiana* comprueba ser una manera efectiva de diferenciar genéticamente estas dos especies en muestreos rápidos, considerando los porcentajes de similitud mayores a 99.5% obtenido con secuencias de *G. crebripunctata* frente al de 98.79% con *G. marmorata* y, además, su posición en la filogenia de *Gymnura* spp.

#### *Urobatis sp. y la importancia de la representación taxonómica*

El caso de *Urobatis* sp. evidencia la importancia de una buena representación taxonómica en los repositorios públicos, puesto que el porcentaje de similitud con *Urobatis concentricus* es bajo (93.88), a comparación del obtenido con *Gymnura crebripunctata* (99.76%). Hasta el momento, 37 de las 46 especies registradas en Oaxaca se encuentran representadas por al menos un marcador en GenBank (Anexo III), siendo NADH2 el mejor representado (30 spp.), seguido de *cox1* (20 spp.). El marcador usado en este trabajo, citocromo b, está representado por sólo ocho especies. El análisis filogenético confirma que las rayas de las que se alimentaron las sanguijuelas no pertenecen a *Urobatis concentricus*, sino a alguna de las especies restantes de *Urobatis* que tienen distribución



en el Pacífico oriental tropical: *Urobatis maculatus* Garman, 1913, *Urobatis pardalis* Moral-Flores, Angulo, Lopez & Bussing, 2015 y *Urobatis tumbesensis* (Chirichigno & McEachran, 1979). Sin embargo, la presencia de estas especies en Oaxaca no ha sido registrada pese a décadas de estudio (véase Bastida-Zavala *et al.* 2013) y muestreos intensivos de batoideos (*e.g.* Torres-Huerta *et al.* 2019).

#### *Errores de anotación taxonómica en GenBank*

Un aspecto a tener en cuenta cuando se utilizan bases de datos públicas es la posibilidad de que las secuencias disponibles provengan de ejemplares identificados erróneamente. El análisis filogenético de *Rhinoptera* realizado en este trabajo revela que la muestra de *Rhinoptera* tomada en Sri Lanka por Daniel Fernando (The Manta Trust, Reino Unido) y anotada como *Rhinoptera steindachneri* en GenBank (Poortvliet *et al.* 2015) en realidad corresponde a un ejemplar de *Rhinoptera javanica*. Por otro lado, uno de los ejemplares identificados como *Gymnura marmorata* por Smith *et al.* (2009) es en realidad un ejemplar de *Gymnura crebipunctata*. Es por esta razón que el análisis de BLAST debe ir acompañado de una inspección rigurosa de cada una de las secuencias obtenidas de GenBank, tomando en cuenta si existe un artículo científico que respalde la secuencia y si existen ejemplares voucher e información sobre la localidad de colecta.

#### *Consideraciones zoogeográficas y ecológicas de Pontobdella californiana*

Los registros generados en este trabajo aportan indicios importantes para entender la amplitud del ámbito de distribución de *Pontobdella californiana*, que va del sur de California, EEUU hasta Oaxaca, México. Además, se comprueban los registros que indican que las especies de *Pontobdella* se alimentan de peces cartilaginosos, y en este caso, particularmente por rayas, probablemente porque estas en su mayoría habitan o frecuentan el fondo marino donde las sanguijuelas depositan ootecas, y en consecuencia, acceden a ellas con mayor facilidad. Sin embargo, debido al nulo funcionamiento de los cebadores diseñados para peces teleósteos y condriictios (Ward *et al.* 2005) que se utilizarían en este trabajo, aún no se puede descartar inequívocamente que también se alimenten de peces teleósteos que habitan el fondo marino, como peces piedra y lenguados.

*Pontobdella californiana* fue descrita como un parásito de la raya espinuda *Platyrrhinoidea triseriata* (Jordan & Gilbert, 1880) y la raya bruja gigante *Beringraja binoculata* (Girard, 1855) para localidades del sur de California (Burreson & Passarelli 2015), región que biogeográficamente pertenece al Pacífico Norte Templado (Spalding *et al.* 2007) y que posee una fauna de elasmobranquios completamente distinta del Pacífico Oriental Tropical (Carrillo-Briceño *et al.* 2018). Aunque la descripción original aporta pocos datos acerca de la población de *Pontobdella californiana* en el sur de California, es muy posible que esta región sea un extremo en el ámbito de distribución de la especie, permitido por la expansión escalonada de su ámbito de distribución a través de la asociación de las sanguijuelas con especies de elasmobranquios altamente vágiles, como las especies de *Rhinoptera*, pues se sabe que las rayas de la familia Myliobatidae realizan migraciones estacionales geográficamente amplias (Souza *et al.* 2021). Además, los cambios estacionales en la temperatura del mar podrían ser una ventana que permitan a estas sanguijuelas habitar temporalmente en regiones típicamente templadas, ya que alcanzan promedios de  $\geq 20^{\circ}\text{C}$   $< 25^{\circ}\text{C}$  durante un par de meses (Payne *et al.* 2012), similares a la zona de transición hacia el Pacífico oriental tropical.

La presencia de ootecas de sanguijuelas depositadas en el sustrato en las muestras analizadas durante este trabajo indica que existen poblaciones de estos gusanos que se reproducen activamente a lo largo de todo el litoral del Pacífico mexicano, lo que facilita la colonización de nuevas regiones de manera escalonada, siendo además evidencia de que los individuos de esta especie de sanguijuela marina abandonan regularmente el cuerpo de sus presas con fines reproductivos, para posteriormente adherirse a un nuevo hospedero, como ha sido sugerido anteriormente (Burreson *et al.* 2007). Esto permite clasificar ecológicamente a las sanguijuelas del género *Pontobdella* como microdepredadores, a diferencia de otros parásitos estrictos dentro de la familia, como las especies de *Branchellion* (Ruiz-Escobar & Ocegüera-Figueroa 2019).

Resulta interesante hipotetizar sobre las razones por las que, a pesar de tener un número relativamente alto de sanguijuelas con sangre (36), solo 15 brindaron

amplificaciones satisfactorias de DNA. Esto puede deberse al tiempo de almacenamiento de la sangre en el buche desde la última vez que se alimentaron los ejemplares, pues, a pesar de la actividad de las bacterias endosimbióticas, el DNA contenido en la sangre tiende a degradarse con el tiempo. Además, la cantidad de sangre almacenada en los buches era notablemente desigual en muchos casos: algunas tenían buches totalmente llenos, mientras que algunas que se consideraron como sanguijuelas alimentadas tenían el equivalente a una gota de sangre coagulada en el buche. A pesar de lo anterior, debido al tamaño de estos organismos, no existe una manera práctica de reportar la cantidad de sangre contenida en el tracto digestivo de las sanguijuelas.

Con los datos generados en este trabajo no es posible asegurar si existen cambios en el espectro de presas al que puedan acceder las sanguijuelas, aunque se puede hipotetizar que preferentemente se alimentan de rayas, y los datos preliminares señalan que las sanguijuelas de tallas menores acceden a rayas con hábitos estrictamente bénticos, como las especies de *Gymnura* y *Urobatis*, cuyas secuencias fueron aportadas por las sanguijuelas más pequeñas, que medían 19.06 mm y entre 20.48-41.10 mm (n=5), respectivamente. En cambio, las sanguijuelas de mayor talla (22.78-45.67, n= 10) se alimentaron de rayas más móviles que visitan el fondo marino con fines alimenticios, como *Rhinoptera* sp. La secuenciación de DNA de nueva generación, que, a diferencia de la secuenciación Sanger, permite recuperar los códigos de barras de diferentes especies presentes en una muestra (metabarcoding), permitiría conocer de cuántas especies diferentes se alimentaron estos microdepredadores, ya que debido a la lenta digestión de la sangre por parte de las sanguijuelas, en el contenido gástrico quedan restos de sangre de individuos de especies distintas, como se ha demostrado con el metabarcoding de buches de sanguijuelas dulceacuícolas y terrestres (Lynggaard *et al.* 2022).

Por último, es importante destacar el valor de la relación costo-beneficio de las técnicas de secuenciación de DNA ambiental usadas en este trabajo frente a métodos de muestreo como los cruceros oceanográficos. El kit de secuenciación usado en este trabajo tiene un costo de 183 USD (aproximadamente 3,800 MXN). La secuenciación por Sanger de las muestras en este trabajo tuvo un costo de \$70 MXN por muestra (total=

\$1050 MXN), mientras que los ejemplares fueron obtenidos secundariamente de embarcaciones de pesca que operan con aproximadamente \$500 MXN de gasolina al día (costo absorbido por los propios pescadores). Por otro lado, el costo de la operación de un buque oceanográfico asciende a 150,000 MXN diarios (e.g. tarifas del buque Alpha Helix del CICESE, disponibles en [deo.cicese.mx/TarifasAH.html](http://deo.cicese.mx/TarifasAH.html))

## Conclusiones

Se aportaron datos para la caracterización de la dieta de la sanguijuela marina *Pontobdella californiana* y se encontró que los individuos recolectados durante 2019-2020 se alimentaron de tres taxones: *Rhinoptera* sp., *Gymnura crebripunctata* y *Urobatis* sp.

El agrupamiento de *Rhinoptera* sp. de la costa de Oaxaca con *Rhinoptera bonasus* del Atlántico y no con *Rhinoptera steindachneri* del golfo de California sugiere que en Oaxaca se distribuye un linaje independiente de *Rhinoptera*.

La baja representación de especies de la familia Urotrygonidae en las secuencias del citocromo b disponibles en GenBank impide verificar la identidad taxonómica de las secuencias obtenidas en este trabajo, con lo cual se plantea la necesidad de continuar con la caracterización molecular de la diversidad biológica mexicana.

Se aporta evidencia que las especies de *Pontobdella* son microdepredadoras de peces cartilaginosos, particularmente de rayas: se trata de sanguijuelas que abandonan el cuerpo de sus presas temporales para depositar ootecas en el fondo marino, para después adherirse a un nuevo hospedero.

Con este trabajo se comprueba que las sanguijuelas marinas aportan información valiosa acerca de la biodiversidad marina, almacenando DNA en buen estado que puede ser amplificado con el fin de conocer las especies de las que se alimentan, y de esta manera obtener un muestreo robusto a través de un organismo vivo que extrae muestras de sangre de peces de manera natural.

## Referencias

- Aschliman, N.C., M. Nishida, M. Miya, J.G. Inoue, K.M. Rosana, & G.J. Naylor. 2012. Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes: Batoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63(1): 28-42.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers & D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.
- Bastida-Zavala, J.R., M.S. García-Madrugal, F. Rosas-Alquicira, R.A. López-Pérez, F. Benítez-Villalobos, J.F. Meraz-Hernando, A.M. Torres-Huerta, J.A. Montoya-Márquez & N.A. Barrientos-Luján. 2013. Marine and coastal biodiversity of Oaxaca, Mexico. *Check List* 9: 329-390.
- Bohmann, K., A. Evans, M.T.P. Gilbert, G.R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, W.Y. Douglas & M. De Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29(6): 358-367.
- Burreson, E. A. Martínez, J. Núñez & L. Moro. 2007. Primeros registros en Canarias de sanguijuelas marinas (Hirudinea, Piscicolidae). *Revista de la Academia Canaria de Ciencias* 18(4): 61-65.
- Burreson, E.M. 2007. Hirudinida. Pp: 303-309 *In*: Carlton, J.T. (Ed.) *The Light and Smith Manual: Intertidal invertebrates from central California to Oregon*. 4a Ed. University of California Press, Berkeley, California.
- Burreson, E.M. & J.K. Passarelli. 2015. A new species of *Pontobdella* (Hirudinida: Piscicolidae) from California with a redescription of the genus *Pontobdella*. *Comparative Parasitology* 82(2): 235-239.
- Calvignac-Spencer, S., F.H. Leendertz, M.T.P. Gilbert & G. Schubert. 2013. An invertebrate stomach's view on vertebrate ecology: Certain invertebrates could be used as "vertebrate samplers" and deliver DNA- based information on many aspects of vertebrate ecology. *Bioessays* 35(11): 1004-1013.
- Carrillo-Briceño, J.D., J.D. Carrillo, O.A. Aguilera & M.R. Sanchez-Villagra. 2018. Shark and ray diversity in the Tropical America (Neotropics)—an examination of environmental and historical factors affecting diversity. *PeerJ* 6: e5313.
- Ceballos, G., P.R. Ehrlich, A.D. Barnosky, A. García, R.M. Pringle., & T.M. Palmer. 2015. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science advances*, 1(5), e1400253.

- Cervantes-Hernández, P., B. Sánchez-Meraz, S.J. Serrano-Guzmán, A. Frías-Velasco, S. Ramos-Cruz & A. Gracia. 2008. Variación interanual de la abundancia de *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes 1900) en el Golfo de Tehuantepec. *Hidrobiológica* 18(3): 215-226.
- Curran, S.S., A.J. Phillips, R.M. Overstreet, G.W. Benz, & A.D. Henningsen. 2016. *Austrobdella cairae* n. sp., an oioxenous marine leech (Clitellata: Piscicolidae) from the banded guitarfish, *Zapteryx exasperata*, in the Northeastern Pacific Ocean. *Journal of Parasitology* 102(2): 179-186.
- del Moral-Flores, L.F., V. Anislado-Tolentino, E. Martínez-Ramírez, G. Pérez-Ponce de León, E. Ramírez-Antonio, & G. González-Medina. 2017. Ictiofauna marina de Oaxaca, México: listado sistemático y afinidades zoogeográficas. *Acta Universitaria* 27(1): 3-25.
- Espinosa-Pérez, H. 2014. Biodiversidad de peces en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 450-459.
- Fahmy, M., N.F. Ravelomanantsoa, S. Youssef, E. Hekkala & M. Siddall. 2019. Biological inventory of Ranomafana National Park tetrapods using leech-derived iDNA. *European Journal of Wildlife Research* 65(5): 70.
- Ferrette, B., R.R. Domingues, M.M. Rotundo, M.P. Miranda, I.V. Bunholi, J.B. De Biasi, C. Oliveira, F. Foresti, & F.F. Mendonça. 2019. DNA Barcode Reveals the Bycatch of Endangered Batoids Species in the Southwest Atlantic: Implications for Sustainable Fisheries Management and Conservation Efforts. *Genes* 10(4): 304.
- Fontenelle, J.P., F. Portella Luna Marques, M.A. Kolmann, & N.R. Lovejoy. 2021. Biogeography of the neotropical freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygoninae) reveals effects of continent- scale paleogeographic change and drainage evolution. *Journal of Biogeography* 48(6): 1406-1419.
- Glynn, P.W., & G.E. Leyte-Morales. 1997. Coral reefs of Huatulco, West Mexico: reef development in upwelling Gulf of Tehuantepec. *Revista de Biología Tropical* 45(3): 1033-1047.
- Goater, T.M., C.P. Goater, & G.W. Esch. 2014. Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press. 487 pp.
- Gogarten, J.F., C. Hoffmann, M. Arandjelovic, A. Sachse, K. Merkel, P. Dieguez, A. Agbor, S. Angedakin, G. Brazzola & S. Jones. 2019. Fly- derived DNA and camera traps are complementary tools for assessing mammalian biodiversity. *Environmental DNA* 2: 63-76.

- Govedich, F. R., B.A. Bain, W.E. Moser, S.R. Gelder, R.W. Davies, & R.O. Brinkhurst. 2010. Annelida (Clitellata): Oligochaeta, Branchiobdellida, Hirudinida, and Acanthobdellida. Pp. 385-436 *In*: Thorp, J.A. & A.P. Covich. Ecology and classification of North American freshwater invertebrates . Academic Press.
- Graf, J. 1999. Symbiosis of *Aeromonas veronii* Biovar sobria and *Hirudo medicinalis*, the medical leech: a novel model for digestive tract associations. *Infection and Immunity* 67: 1-7.
- Guindon, S., F. Lethiec, P. Duroux & O. Gascuel. 2005. PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research* 33: W557-W559.
- Hammerschlag, N. 2006. Osmoregulation in elasmobranchs: a review for fish biologists, behaviourists and ecologists. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 39(3): 209-228.
- Hanya, G., K. Morishima, T. Koide, Y. Otani, S. Hongo, T. Honda, H. Okamura, Y. Higo, M. Hattori & Y. Kondo. 2019. Host selection of hematophagous leeches (*Haemadipsa japonica*): Implications for iDNA studies. *Ecological Research* 34(6): 842-855.
- Hayes, P.M., S.P. Lawton, N.J. Smit, W.C. Gibson & A. Davies. 2014. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector. *Parasites & Vectors* 7: 50.
- Hebert, P.D., A. Cywinska, S.L. Ball, & J.R. DeWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270(1512): 313-321.
- Jorgensen, S. 2013. *Sharks: ancient predators in a modern sea*. Firefly Books. Buffalo, Nueva York. 256 pp.
- Kashiwagi, T., A.D. Marshall, M.B. Bennett, & J.R. Ovenden. 2012. The genetic signature of recent speciation in manta rays (*Manta alfredi* and *M. birostris*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64(1): 212-218.
- Khan, R.A. 1980. The leech as a vector of a fish piroplasm. *Canadian Journal of Zoology* 58(9): 1631-1637.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz & K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549.

- Kvist, S., A. Ocegüera-Figueroa, M. Tessler, J. Jiménez-Armenta, R.M. Freeman Jr, G. Giribet & M.E. Siddall. 2016. When predator becomes prey: investigating the salivary transcriptome of the shark-feeding leech *Pontobdella macrothela* (Hirudinea: Piscicolidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 179(4): 725-737.
- Last, P., G. Naylor, B. Séret, W. White, M. de Carvalho, & M. Stehmann. 2016. *Rays of the World*. CSIRO publishing, Australia. 832 pp.
- Lemos, M., B.R. Fermino, C. Simas-Rodrigues, L. Hoffman, R. Silva, E.P. Camargo, M.M.G. Teixeira & T. Souto-Padrón. 2015. Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes from Brazilian armoured catfishes reveal high species diversity mixed infections and a new trypanosome species. *Parasites & Vectors* 8: 1-17.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomo I. Estocolmo, Suecia. 824 pp.
- Lovejoy, N.R., E. Bermingham, & A.P. Martin. 1998. Marine incursion into South America. *Nature* 396(6710): 421-422.
- Lynggaard, C., A. Ocegüera-Figueroa, S. Kvist, M.T.P. Gilbert, & K. Bohmann. 2022. The potential of aquatic bloodfeeding and nonbloodfeeding leeches as a tool for iDNA characterisation. *Molecular Ecology Resources* 22: 539-553.
- Magalhães, W.F., P. Hutchings, A. Ocegüera-Figueroa, P. Martin, R.M. Schmelz, M.J. Wetzel, H. Wiklund, N.J. Maciolek, G.Y. Kawauchi, & J.D. Williams. 2021. Segmented worms (Phylum Annelida): a celebration of twenty years of progress through Zootaxa and call for action on the taxonomic work that remains. *Zootaxa* 4979(1): 190-211.
- Manzano-Marín, A., A. Ocegüera-Figueroa, A. Latorre, L.F. Jiménez-García & A. Moya. 2015. Solving a bloody mess: B-vitamin independent metabolic convergence among gammaproteobacterial obligate endosymbionts from blood-feeding arthropods and the leech *Haementeria officinalis*. *Genome Biology and Evolution* 7(10): 2871-2884.
- Marancik, D.P., A.D. Dove & A.C. Camus. 2012. Experimental infection of yellow stingrays *Urobatis jamaicensis* with the marine leech *Branchellion torpedinis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 101: 51-60.
- Martin, A.P. 1995. Mitochondrial DNA sequence evolution in sharks: rates, patterns, and phylogenetic inferences. *Molecular Biology and Evolution* 12(6): 1114–1123.



- Meekan, M., C.M. Austin, M.H. Tan, N.-W.V. Wei, A. Miller, S.J. Pierce, D. Rowat, G. Stevens, T.K. Davies & A. Ponzio. 2017. iDNA at sea: recovery of whale shark (*Rhincodon typus*) mitochondrial DNA sequences from the whale shark copepod (*Pandarus rhincodoniscus*) confirms global population structure. *Frontiers in Marine Science* 4: 420.
- Murray, B.W., J.Y. Wang, S.C. Yang, J.D. Stevens, A. Fisk, & J. Svavarsson. 2008. Mitochondrial cytochrome b variation in sleeper sharks (Squaliformes: Somniosidae). *Marine Biology* 153(6): 1015-1022.
- Nagel, L. & S. Lougheed. 2006. A Simple Molecular Technique for Identifying Marine Host Fish by Sequencing Blood-Feeding Parasites. *Journal of Parasitology* 92(3): 665-669.
- Naylor G.J.P., J.N. Caira, K. Jensen, K.A.M. Rosana, W.T. White, P.R. Last. 2012. A DNA sequence-based approach to the identification of shark and ray species and its implications for global elasmobranch diversity and parasitology. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 367: 1–262.
- Oceguera-Figueroa, A., F. Ruiz-Escobar & G. Torres-Carrera. 2021. Hirudinida Lamarck, 1818. Pp: 347-353 *In*: de León-González, J.A. J.R. Bastida Zavala, L.F. Carrera Parra, M.E. García Garza, S.I. Salazar Vallejo, y V. Solís-Weiss, M.A. Tovar-Hernández. 2021. Anélidos marinos de México y América tropical. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.
- Ortega-García, S., J.A. Trigueros-Salmerón, R. Rodríguez-Sánchez, S. Lluch-Cota & H. Villalobos. 2000. El golfo de Tehuantepec como un centro de actividad biológica y su importancia en las pesquerías. *In*: Lluch-Belda, D. J. Elourduy-Garay, S.E. Lluch-Cota & G. Ponce-Díaz (Eds.) BAC - Centros de Actividad Biológica del Pacífico mexicano. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Ensenada.
- Payne, M.C., C.A. Brown, D.A. Reusser, & H. Lee. 2012. Ecoregional analysis of nearshore sea-surface temperature in the North Pacific. *PloS One* 7(1): e30105.
- Pérez-Flores, J., H. Rueda-Calderon, S. Kvist, M. Siddall & A. Oceguera-Figueroa. 2016. From the worm in a bottle of mezcal: iDNA confirmation of a leech parasitizing the Antillean manatee. *Journal of Parasitology* 102(5): 553-556.
- Pertsemlidis, A., & J.W. Fondon. 2001. Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). *Genome Biology* 2(10): 1-10.
- Poortvliet, M., J.L. Olsen, D.A. Croll, G. Bernardi, K. Newton, S. Kollias, J. O'Sullivan, D. Fernando, G. Stevens, F. Galván-Magaña, B. Seret, S. Wintner, & G. Hoarau. 2015.

A dated molecular phylogeny of manta and devil rays (Mobulidae) based on mitogenome and nuclear sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83: 72–85.

Pradeep, H.D., S.S. Swapnil, M. Nashad, S. Venu, K.R. Ranjan, G. Sumitha, S.M. Devi & M.K. Farejiya. 2018. First record and DNA barcoding of Oman cownose ray, *Rhinoptera jayakari* Boulenger, 1895 from Andaman Sea, India. *Zoosystema* 40(1), 67-74.

Queiroz, N., N.E. Humphries, G. Mucientes, N. Hammerschlag, F.P. Lima, K.L. Scales, P.I. Miller, L.L. Sousa, R. Seabra & D.W. Sims. 2016. Ocean-wide tracking of pelagic sharks reveals extent of overlap with longline fishing hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(6): 1582-1587.

Robins, C.R. & G.C. Ray. 1986. A field guide to Atlantic coast fishes of North America. Houghton Mifflin Company, Boston. 354 p.

Rojo-Vázquez, J.A., C. Quiñonez-Velazquez, H.A. Echavarría-Heras, G. Lucano-Ramírez, E. Godínez-Domínguez, S. Ruiz-Ramírez, V.H. Galván-Piña & O. Sosa-Nishizaki. 2008. The fish species composition and variation of catch from the small-scale gillnet fishery before, during and after the 1997-1998 ENSO event, central Mexican Pacific. *Revista de Biología Tropical* 56(1): 133-152.

Ruiz-Escobar, F. 2019. Taxonomía y filogenia molecular de sanguijuelas marinas (Euhirudinea: Piscicolidae) del sur de México. Tesis de licenciatura. Universidad del Mar. Oaxaca, México.

Ruiz-Escobar, F. & A. Ocegüera-Figueroa. 2019. A new species of *Branchellion* Savigny, 1822 (Hirudinida: Piscicolidae), a marine leech parasitic on the giant electric ray *Narcine entemedor* Jordan & Starks (Batoidea: Narcinidae) off Oaxaca, Mexico. *Systematic Parasitology* 96(7): 575-584.

Sandoval-Castillo, J. & A. Rocha-Olivares. 2011. Deep mitochondrial divergence in Baja California populations of an aquilopelagic elasmobranch: the golden cownose ray. *Journal of Heredity* 102(3): 269-274.

Sawyer, R.T. 1986. Leech biology and behaviour. Clarendon Press Oxford, 1065 pp.

Smith, W. D., J.J. Bizzarro, V.P. Richards, J. Nielsen, F. Márquez-Farías, & M.S. Shivji. 2009. Morphometric convergence and molecular divergence: the taxonomic status and evolutionary history of *Gymnura crebripunctata* and *Gymnura marmorata* in the eastern Pacific Ocean. *Journal of Fish Biology* 75(4): 761-783.

- Schnell, I.B., K. Bohmann, S.E. Schultze, S.R. Richter, D.C. Murray, M.H.S. Sinding, D. Bass, J.E. Cadle, M.J. Campbell & R. Dolch. 2018. Debugging diversity— a pan-continental exploration of the potential of terrestrial blood-feeding leeches as a vertebrate monitoring tool. *Molecular Ecology Resources* 18(6): 1282-1298.
- Siddall, M.E., M. Barkdull, M. Tessler, M.R. Brugler, E. Borda & E. Hekkala. 2019. Ideating iDNA: Lessons and limitations from leeches in legacy collections. *PloS One* 14(2): e0212226.
- Souza, B.C., V. P. Cruz, T.R. Almeida, J.B.L. Sales, L.F.S. Rodrigues-Filho, M. Vianna & F. Foresti. 2021. Genetic diversity assessment for the vulnerable migratory cownose ray *Rhinoptera bonasus* (Myliobatiformes: Rhinopteridae) from the southwestern Atlantic Ocean. *Neotropical Ichthyology* 19(4): e210077.
- Spalding, M.D., H.E. Fox, G.R. Allen, N. Davidson, Z.A. Ferdaña, M. Finlayson, B.S. Halpern, M.A. Jorge, A. Lombana & S.A. Lourie. 2007. Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of coastal and shelf areas. *BioScience* 57(7): 573-583.
- Talwar, B., E.J. Brooks, J.W. Mandelman, & R.D. Grubbs. 2017. Stress, post-release mortality, and recovery of commonly discarded deep-sea sharks caught on longlines. *Marine Ecology Progress Series* 582, 147-161.
- Tessler, M., D. Marancik, D. Champagne, A. Dove, A. Camus, M.E. Siddall & S. Kvist. 2018a. Marine leech anticoagulant diversity and evolution. *Journal of Parasitology* 104(3): 210-221.
- Tessler, M., S.R. Weiskopf, L. Berniker, R. Hersch, K.P. McCarthy, D.W. Yu & M.E. Siddall. 2018b. Bloodlines: Mammals, leeches, and conservation in southern Asia. *Systematics and Biodiversity* 16(5): 488-496
- Torres-Huerta, A.M., R.A. López-Pérez, M. Tapia-García & Gracia, A. 2019. Distribution of batoid demersal assemblages on the continental shelf of the Gulf of Tehuantepec. *Marine and Freshwater Research* 70: 1445–1458.
- Turon, M., C. Angulo-Preckler, A. Antich, K. Præbel & O.S. Wangensteen. 2020. More than expected from old sponge samples: a natural sampler DNA metabarcoding assessment of marine fish diversity in Nha Trang Bay (Vietnam). *Frontiers in Marine Science* 7: 605148.
- Utevsky, A. & I. Gordeev. 2015. New tentacled leech *Ceratobdella quadricornuta* ng, n. sp. (Hirudinida: Piscicolidae) parasitic on the starry skate *Raja georgiana* Norman from the Scotia Sea, Antarctica. *Systematic Parasitology* 91(3): 203-210.

- Ward, R.D., T.S. Zemlak, B.H. Innes, P.R. Last & P.D. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462): 1847-1857.
- Weiskopf, S.R., K.P. McCarthy, M. Tessler, H.A. Rahman, J.L. McCarthy, R. Hersch, M.M. Faisal & M.E. Siddall. 2018. Using terrestrial haematophagous leeches to enhance tropical biodiversity monitoring programmes in Bangladesh. *Journal of Applied Ecology* 55(4): 2071-2081.
- Williams, J.I. & E.M. Burreson. 2006. Phylogeny of the fish leeches (Oligochaeta, Hirudinida, Piscicolidae) based on nuclear and mitochondrial genes and morphology. *Zoologica Scripta* 35(6): 627-639.
- Yamauchi, T., Y. Ota, & K. Nagasawa. 2008. *Stibarobdella macrothela* (Annelida, Hirudinida, Piscicolidae) from elasmobranchs in Japanese waters, with new host records. *Biogeography* 10: 53-57.
- Zaidi, R., Z. Jaal, N. Hawkes, J. Hemingway & W. Symondson. 1999. Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Molecular Ecology* 8(12): 2081-2087.

## Anexo I. Trabajo de laboratorio

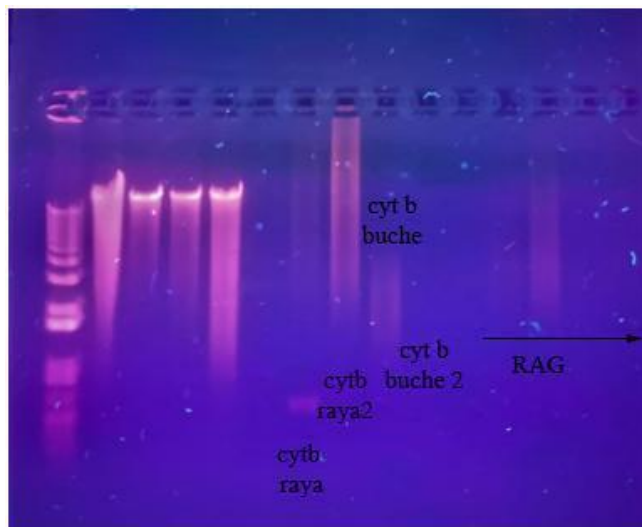
Ensayo exitoso:

11 de mayo de 2021

-Gel Elizabeth Labastida y Productos PCR de tesis (CYTB Y RAG)

Pozo 1: Escalera; 2-5: muestras de Elizabeth Labastida; 6: testigo negativo; 7-8: cyt b rayas; 9-10: cytb buche sanguijuela; 11-12: RAG rayas; 13-14: RAG buches de sanguijuela

Se corrió la reacción de PCR para citocromo b siguiendo las especificaciones de los autores, sin resultados satisfactorios (bandas tenues y/o barridas), utilizando tejidos de rayas como testigo positivo y dos muestras de buche de sanguijuela.

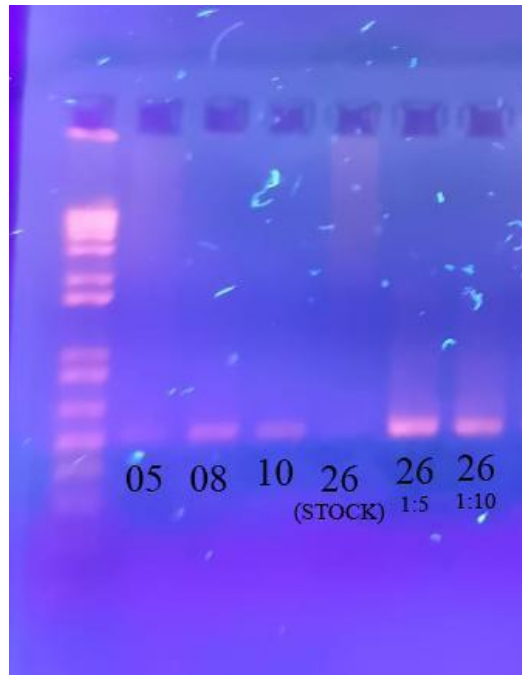


Gel de electroforesis de ensayo con citocromo b, incluyendo productos de PCR con tejidos de rayas y buches de sanguijuelas.

25 de mayo de 2021

Se programó un gradiente de temperaturas en el termociclador, con los siguientes valores: 41°C, 43°C, 45°C y 47 °C. La temperatura más alta (47°C) funcionó satisfactoriamente para las muestras de buche 05 (6.62 ng/ul) , 08 (10.4 ng/ul), 10 (2.48 ng/ul) y 26 (stock, dilución 1:5 y dilución 1:10), y por lo tanto se utilizó esta temperatura

para las PCR con el resto de muestras (18, 20, 22, 26, 32, 33, 41, 43, 45, 47, 48, 53, 15) obteniendo finalmente las 15 amplificaciones exitosas utilizadas en este trabajo.



Gel de electroforesis de ensayo con citocromo b utilizando muestras de buches de sanguijuelas con diferentes concentraciones de DNA.

Ensayos fallidos:

26 de abril de 2021

Cox1: PCR con dos muestras de buches con cebadores F1-R1

10 de mayo de 2021

Cytb: PCR con dos muestras de tejido de raya y dos de buches de *Pontobdella*.

11 de abril de 2021

RAG: Cytb: PCR con dos muestras de tejido de raya y dos de buches de *Pontobdella*.

02 de junio de 2021

Cox1: PCR con cinco muestras de buches y dos de tejidos de rayas utilizando cebadores F2R2.

08 de junio de 2021

Cox1: PCR con dos muestras de buche y cuatro con diluciones de DNA de tejido de raya

11 de junio de 2021

ND2: PCR con una muestra de tejido de raya y una de buche con curva de temperaturas (49.5°C, 51.9°C, 54.3°C y 57.1°C)

Cox1: PCR con cebadores F1R1, utilizando una muestra de buche y dos de tejido de raya con curva de temperatura (52°C, 54.3 °C y 56.6°C).

## Anexo II. Secuencias de DNA generadas en este trabajo

*Cox1*

**>F4**

CCAAAGAATCAAAGAGATGTTGGTAGAGGATGGGGTCACCACCTCCTGCTGGATC  
GAAGAAGGTTGTGTTAAGATTGCGATCTGTGAGGAGTATAGTAATACCTGCTGCTA  
GGACGGGAAGGGATAATAAGAGAAGGACAGCTGTAATTAGAATTGATCAGACAAAT  
AAGGGTGTCTGGTACTGGGAGATTGCAGGTGGTTTTTCATGTTGATAATTGTAGTAAT  
AAAGTTGATTGATGCTAGGATAGAGGAGACACCTGCCAAATGTAAGGAGAAGATGG  
TCAGATCCACAGAAGCTCCAGCATGTGCTAGGTTACCGGCTAGAGGAGGATAAACT  
GTTTCATCCGGTCCCAGCCCCAGCTTCTACTCCTGCTGAAGCTAGTAGTAAGAGGAA  
GGATGGAGGGAGAAGTCAAAGCTTATATTATTTATTCGTGGGAAGGCTATGTCTG  
GAGCACCAATTATTAAGGTACTAGTCAATTACCAAACCCGCCAATTATAATTGGTA  
TGACTATAAAGAAAATCATTACGAAAGCATGGGCAGTGACAACCACATTGTAGATCT  
GGTCATCACCTAATAAGGCTCCTGGTTGACTTAACTCTGTTTGAATCAGCAGGCTA  
AGGCCAGTACCCACTATCCCTGCTCATGCACCAAGATCAATAAAGGGTGCCAATGT  
CTT

*Cytb*

**>Buche\_53**

CTTTTCCTGGCTATACACTACACCGCAGATATCTCAACAGCATTCTCCTCAGTAGCA  
CATATCTGCCGAGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGTAATATCCACGCCAACGG  
CGCCTCCCTATTCTTTATCTGTGTCTACCTTCACATCGCTCGAGGACTTTACTATGG  
CTCTTACCTTAACAAAGAAACCTGAAACATTGGAGTAGTTATTCTAGTACTACTTATA  
GCCACCGCCTTCGTAGGATATGTCCTCCCCTGGGGCCAAATATCATTTTGAGGAGC  
AACCGTTATCACCAATTTACTATCTGCCCTCCCCTATATTGGAGACATACTTGTTCA  
ATGAATCTGAGGTGGTTTCTCAATTGACAACGCAACACTCACCCGATTCTTTACATT  
CCACTTCCTATTACCCTTTGTGGTCGCAGCCCTAACCATAATTCACCTTCTCTTCCCT  
TCATGATTCTGGTTCAAACAATCCAACCTGGCCTCATATCTGACATAGACAAAATTCC  
ATTCCACCCCT

**>Buche\_47**

GCCTTTTTCTGGCTATACACTACACCGCAGATATCTCAACAGCATTCTCCTCAGTAG  
CACATATCTGCCGAGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGTAATATCCACGCCAAC  
GGCGCCTCCCTATTCTTTATCTGTGTCTACCTTCACATCGCTCGAGGACTTTACTAT  
GGCTCTTACCTTAACAAAGAAACCTGAAACATTGGAGTAGTTATTCTAGTACTACTT  
ATAGCCACCGCCTTCGTAGGATATGTCCTCCCCTGGGGCCAAATATCATTTTGAGG  
AGCAACCGTTATCACCAATTTACTATCTGCCCTCCCCTATATTGGAGACATACTTGT  
TCAATGAATCTGAGGTGGTTTCTCAATTGACAACGCAACACTCACCCGATTCTTTAC  
ATTCCACTTCCTATTACCCTTTGTGGTCGCAGCCCTAACCATAATTCACCTTCTCTT



CCTTCATGATTCTGGTTCAAACAATCCAACCTGGCCTCATATCTGACATAGACAAAAT  
CCCATTCCACCCC

**>Buche\_45**

TTTTCTGGCTATACTACACCGCAGATATCTCAACAGCATTCTCCTCAGTAGCAC  
ATATCTGCCGAGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGTAATATCCACGCCAACGGC  
GCCTCCCTATTCTTTATCTGTGTCTACCTTCACATCGCTCGAGGACTTTACTATGGC  
TCTTACCTTAACAAAGAAACCTGAAACATTGGAGTAGTTATTCTAGTACTACTTATAG  
CCACCGCCTTCGTAGGATATGTCCTCCCCTGGGGCCAAATATCATTTTGAGGAGCA  
ACCGTTATCACCAATTTACTATCTGCCCTCCCCTATATTGGAGACATACTTGTTCAAT  
GAATCTGAGGTGGTTTCTCAATTGACAACGCAACACTCACCCGATTCTTTACATTCC  
ACTTCCTATTACCCTTTGTGGTTCGAGCCCTAACCATAATTCACCTTCTCTTCCTTC  
ATGATTCTGGTTCAAACAATCCAACCTGGCCTCATATCTGACATAGACAAAATTACAT  
TCCACCCA

**>Buche\_41**

TTTTCTGGCTATACTACACCGCAGACATTTTCATCAGCATTTCATCAATCGCACA  
CATCTGCCGAGATGTAAATTACGGCTGACTCATTTCGTAACACTCACGCCAACGGCG  
CCTCCATATTTTTTCATCTGCGTCTACATTCATATCGCTCGAGGATTATATTACGGCT  
CCTACCTAAATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTCGTAATTCTCCTACTACTTATAG  
CCACCGCCTTCGTGGGTTATGTATTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGGCA  
ACCGTCATCACCAACCTACTGTCAGCCCTTCCTTATATTGGCGATATATTAGTCCAA  
TGAATTTGGGGCGGCTTCTCAATTGATAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTT  
CACTTCCTCCTTCCATTCCCTAATTTTAGCTTTAACTATACTTCACCTTATCTTCCTTCA  
TGAAGCAGGCTCAAACAACCCAACAGGCCTCATTTCAT

**>Buche\_36**

GCCTATTTCTGGCTATACTACACCGCAGACATTTTCATCAGCATTTCATCAATCG  
CACACATCTGCCGAGATGTAAATTACGGCTGACTCATTTCGTAACACTCACGCCAAC  
GGCGCCTCCATATTTTTTCATCTGCGTCTACATTCATATCGCTCGAGGATTATATTAC  
GGCTCCTACCTAAATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTCGTAATTCTCCTACTACTT  
ATAGCCACCGCCTTCGTGGGTTATGTATTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGG  
AGCAACCGTCATTACCAACCTACTGTCAGCCCTTCCTTATATTGGCGATATATTAGT  
CCAATGAATTTGGGGCGGCTTCTCAATTGATAACGCAACATTAACCCGATTCTTCAC  
ATTTCACTTCCTCCTTCCATTCCCTAATTTTAGCTTTAACTATACTTCACCTTATCTTCC  
TTCATGAAGCAGGCTCAAACAACCCAACAGGCCTCATTTCACAACAAGATAAAATCC  
CATTCCACCCC

**>Buche\_35**

GCCTTTTTCTGGCTATACTACACCGCAGATATCTCAACAGCATTCTCCTCAGTAG  
CACATATCTGCCGAGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGTAATATCCACGCCAAC  
GGCGCCTCCCTATTCTTTATCTGTGTCTACCTTCACATCGCTCGAGGACTTTACTAT

GGCTCTTACCTTAACAAAGAAACCTGAAACATTGGAGTAGTTATTCTAGTACTACTT  
ATAGCCACCGCCTTCGTAGGATATGTCCTCCCCTGGGGCCAAATATCATTTTGAGG  
AGCAACCGTTATCACCAATTTACTATCTGCCCTCCCCTATATTGGAGACATACTTGT  
TCAATGAATCTGAGGTGGTTTCTCAATTGACAACGCAACACTCACCCGATTCTTTAC  
ATTCCACTTCTATTACCCTTTGTGGTCGCAGCCCTAACCATAATTCACCTTCTCTT  
CCTTCATGATTCTGGTTCAAACAATCCAACCTGGCCTCATATCTGACATAGATAAAAT  
CCCATTCCACCCC

**>Buche\_33**

GGCTATACACTACACCGCAGATATCTCAACAGCATTCTCCTCAGTAGCACATATCTG  
CCGAGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGTAATATCCACGCCAACGGCGCCTCCC  
TATTCTTTATCTGTGTCTACCTTCACATCGCTCGAGGACTTTACTATGGCTCTTACCT  
TAACAAAGAAACCTGAAACATTGGAGTAGTTATTCTAGTACTACTTATAGCCACCGC  
CTTCGTAGGATATGTCCTCCCCTGGGGCCAAATATCATTTTGAGGAGCAACCGTTA  
TCACCAATTTACTATCTGCCCTCCCCTATATTGGAGACATACTTGTTCATGAATCT  
GAGGTGGTTTCTCAATTGACAACGCAACACTCACCCGATTCTTTACATTCCACTTCC  
TATTACCCTTTGTGGTCGCAGCCCTAACCATAATTCACCTTCTCTTCCTTCATGATTC  
TGGTTCAAACAATCCAACCTGGCCTCATATCTGACATAGATAAAATCACATTCCACCC  
CT

**>Buche\_28**

TGGCCTTTTTCTGGCTATACACTACACCGCAGACATCTCAATAGCCTTCTCCTCAGT  
CGCACACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGATGACTTGTCCGAAACATTCACGCAA  
ACGGCGCCTCAATATTCTTCATCTGTGTATACCTTCACATCGGCCGAGGCCTCTAC  
TACGGATCCTATCTTAATAAAGAAACCTGAAATATTGGAGTAATTATTCTTATTCTCC  
TCATAGCCACAGCCTTCGTAGGCTATGTTCTCCCCTGAGGACAAATATCATTCTGA  
GGTGCCACCGTCATTAATAATTTACTCTCCGCTCTCCCTTACATTGGAGATATACTA  
GTCCAATGAATTTGAGGGGGCTTTTCAATTGACAACGCAACACTTACCCGATTTTAT  
ACATTCCACTTTCTATTCCCATTCCCTAATTGCTGCCTTTACTATAATTCACCTTCTCT  
CCTACACGAATCCGGCTCAAACAATCCCATCGGCCTCCCCTCAAACATAGACAAAA  
TCCCATTCCACCCC

**>Buche\_26**

TTCCTGGCTATACACTACACCGCAGACATTTTCATCAGCATTTTCATCAATCGCACAC  
ATCTGCCGAGATGTAAATTACGGCTGACTCATTTCGTAACACTCACGCCAACGGCGC  
CTCCATATTTTTTCATCTGCGTATACATTCATATCGCTCGAGGATTATATTACGGCTCC  
TACCTAAATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTCGTAATTCTCCTACTACTTATAGCC  
ACCGCCTTCGTGGGCTATGTATTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAAC  
CGTCATTACCAACCTACTGTCAGCCCTTCCTTATATTGGCGATATATTAGTCCAATG  
AATTTGGGGCGGCTTCTCAATTGATAACGCAACATTAACCCGATTCTTCACATTTCA

CTTCCTCCTTCCATTCCCTAATTTTAGCTTTAACTATACTTCACCTTATCTTCCTTCATG  
AAGCAGGCTCAAACAACCCAACAGGCCTCATTTCCAACACAGATAAAAA

**>Buche\_25**

TGGCCTTTTCCTGGCTATACTACACCGCAGATATCTCAACAGCATTCTCCTCAGT  
AGCACATATCTGCCGAGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGTAATATCCACGCCA  
ACGGCGCCTCCCTATTCTTTATCTGTGTCTACCTTCACATCGCTCGAGGACTTTACT  
ATGGCTCTTACCTTAACAAAGAAACCTGAAACATTGGAGTAGTTATTCTAGTACTAC  
TTATAGCCACCGCCTTCGTAGGATATGTCCTCCCCTGGGGCCAAATATCATTTTGA  
GGAGCAACCGTTATCACCAATTTACTATCTGCCCTCCCCTATATTGGAGACATACTT  
GTTCAATGAATCTGAGGTGGTTTCTCAATTGACAACGCAACACTCACCCGATTCTTT  
ACATTCCACTTCCTATTACCCTTTGTGGTTCGCAGCCCTAACCATTAATCACCTTCTC  
TTCCTTCATGATTCTGGTTCAAACAATCCAACACTGGCCTCATATCTGACATAGACAAA  
ATCCCATTCCACCCCA

**>Buche\_24**

ATACACTACACCGCAGATATCTCAACAGCATTCTCCTCAGTAGCACATATCTGCCGA  
GACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGTAATATCCACGCCAACGGCGCCTCCCTATT  
CTTTATCTGTGTCTACCTTCACATCGCTCGAGGACTTTACTATGGCTCTTACCTTAA  
CAAAGAAACCTGAAACATTGGAGTAGTTATTCTAGTACTACTTATAGCCACCGCCTT  
CGTAGGATATGTCCTCCCCTGGGGCCAAATATCATTTTGGAGGAGCAACCGTTATCA  
CCAATTTACTATCTGCCCTCCCCTATATTGGAGACATACTTGTTCAATGAATCTGAG  
GTGGTTTCTCAATTGACAACGCAACACTCACCCGATTCTTTACATTCCACTTCCTAT  
TACCCTTTGTGGTTCGCAGCCCTAACCATTAATCACCTTCTCTTCCTTCATGATTCTG  
GTTCAAACAATCCAACACTGGCCTCATATCTGACATAGATAAAAATCCCATTCC

**>Buche\_20**

TGGCTATACTACACCGCAGATATCTCAACAGCATTCTCCTCAGTAGCACATATCT  
GCCGAGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGTAATATCCACGCCAACGGCGCCTCC  
CTATTCTTTATCTGTGTCTACCTTCACATCGCTCGAGGACTTTACTATGGCTCTTAC  
CTTAACAAAGAAACCTGAAACATTGGAGTAGTTATTCTAGTACTACTTATAGCCACC  
GCCTTCGTAGGATATGTCCTCCCCTGGGGCCAAATATCATTTTGGAGGAGCAACCGT  
TATCACCAATTTACTATCTGCCCTCCCCTATATTGGAGACATACTTGTTCAATGAATC  
TGAGGTGGTTTCTCAATTGACAACGCAACACTCACCCGATTCTTTACATTCCACTTC  
CTATTACCCTTTGTGGTTCGCAGCCCTAACCATTAATCACCTTCTCTTCCTTCATGATT  
CTGGTTCAAACAATCCAACACTGGCCTCATATCTGACATAGATAAAAATCCCATTCCA

**>Buche\_15**

GGCCTTTTCCTGGCTATACTACACCGCAGATATCTCAACAGCATTCTCCTCAGTA  
GCACATATCTGCCGAGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGTAATATCCACGCCAA  
CGGCGCCTCCCTATTCTTTATCTGTGTCTACCTTCACATCGCTCGAGGACTTTACTA  
TGGCTCTTACCTTAACAAAGAAACCTGAAACATTGGAGTAGTTATTCTAGTACTACT

TATAGCCACCGCCTTCGTAGGATATGTCCTCCCCTGGGGCCAAATATCATTTTGGAG  
GAGCAACCGTTATCACCAATTTACTATCTGCCCTCCCCTATATTGGAGACATACTTG  
TTCAATGAATCTGAGGTGGTTTCTCAATTGACAACGCAACACTCACCCGATTCTTTA  
CATTCCACTTCCTATTACCCTTTGTGGTCACAGCCCTAACCATAATTCACCTTCTCT  
CCTTCATGATTCTGGTTCAAACAATCCAACCTGGCCTCATATCTGACATAGACAAAAT  
CCCATTCCACCC

**>Buche\_11**

TGGCTATACTACACCGCAGATATCTCAACAGCATTCTCCTCAGTAGCACATATCT  
GCCGAGACGTAAACTATGGTTGACTAATCCGTAATATCCACGCCAACGGCGCCTCC  
CTATTCTTTATCTGTGTCTACCTTCACATCGCTCGAGGACTTTACTATGGCTCTTAC  
CTTAACAAAGAAACCTGAAACATTGGAGTAGTTATTCTAGTACTACTTATAGCCACC  
GCCTTCGTAGGATATGTCCTCCCCTGGGGCCAAATATCATTTTGGAGGAGCAACCGT  
TATCACCAATTTACTATCTGCCCTCCCCTATATTGGAGACATACTTGTTCAATGAATC  
TGAGGTGGTTTCTCAATTGACAACGCAACACTCACCCGATTCTTTACATTCCACTTC  
CTATTACCCTTTGTGGTCGCAGCCCTAACCATAATTCACCTTCTTTCTTCATGATT  
CTGGTTCAAACAATCCAACCTGGCCTCATATCTGACATAGACAAAATCCCATTCCACC  
CC

**>Buche\_10**

GCCTTTTCTGGCTATACTACACCGCAGACATTTTCATCAGCATTTTTCATCAATCG  
CACACATCTGCCGAGATGTAAATTACGGCTGACTCATTTCGTAACACTCACGCCAAC  
GGCGCCTCCATATTTTTTCATCTGCGTCTACATTCATATCGCTCGAGGATTATATTAC  
GGCTCCTACCTAAATAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTCGTAATTCTCCTACTACTT  
ATAGCCACCGCCTTCGTGGGTTATGTATTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGG  
AGCAACCGTCATTACCAACCTACTGTCAGCCCTTCCTTATATTGGCGATATATTAGT  
CCAATGAATTTGGGGCGGCTTCTCAATTGATAACGCAACATTAACCCGATTCTTCAC  
ATTTCACTTCCTCCTTCCATTCTAATTTAGCTTTAACTATACTTCACCTTATCTTCC  
TTCATGAAGCAGGCTCAAACAACCCAACAGGCCTCATTTCCAACACAGATAAAATAA  
AA

**Anexo III. Representación taxonómica en GenBank para las especies de elasmobranquios registradas en Oaxaca**

---

Taxa	12S	18S	cox1	cytb	NADH	NADH2	NADH4
<i>Echinorhinus cookei</i>	x	x	x			x	x
<i>Heterodontus mexicanus</i>						x	
<i>Ginglymostoma unami</i>			x			x	
<i>Rhincodon typus</i>			x		x	x	
<i>Alopias pelagicus</i>	x	x	x			x	
<i>Alopias superciliosus</i>	x		x			x	
<i>Mustelus henlei</i>			x			x	x
<i>Mustelus lunulatus</i>			x			x	x
<i>Carcharhinus cerdale</i>							
<i>Carcharhinus leucas</i>							x
<i>Carcharhinus limbatus</i>	x		x			x	x
<i>Galeocerdo cuvier</i>	x	x	x			x	x





<i>Himantura pacifica</i>		x	x		
<i>Pteroplatytrygon violacea</i>	x	x		x	
<i>Gymnura marmorata</i>		x	x	x	x
<i>Gymnura crebripunctata</i>			x		
<i>Aetobatus laticeps</i>		x		x	
<i>Rhinoptera steindachneri</i>		x	x	x	
<i>Mobula japanica</i>		x		x	
<i>Mobula thurstoni</i>	x	x		x	x

---