



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

**A HOTSPOT FOR MITOCHONDRIAL *trnD* DUPLICATION-DELETION EVENTS IN
THE LEECH GENUS *Placobdella* (ANNELIDA: CLITELLATA: GLOSSIPHONIIDAE)**

TESIS POR ARTÍCULO CIENTÍFICO
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIÓL. DIEGO JOSSUÉ JIMÉNEZ ARMENTA

TUTOR

DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

DR. HUGO HARLAN MEJÍA MADRID
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., AGOSTO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

SISTEMÁTICA

DUPLICACIÓN DE *trnD* MITOCONDRIAL EN SANGUIJUELAS DEL GÉNERO

***Placobdella*. UN ENFOQUE FILOGENÉTICO.**

TESIS

(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)

**A HOTSPOT FOR MITOCHONDRIAL *trnD* DUPLICATION-DELETION EVENTS IN
THE LEECH GENUS *Placobdella* (ANNELIDA: CLITELLATA: GLOSSIPHONIIDAE)**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. DIEGO JOSSUÉ JIMÉNEZ ARMENTA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. HUGO HARLAN MEJÍA MADRID
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

MÉXICO, CDMX. AGOSTO, 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

SISTEMÁTICA

DUPLICACIÓN DE *trnD* MITOCONDRIAL EN SANGUIJUELAS DEL GÉNERO

***Placobdella*. UN ENFOQUE FILOGENÉTICO.**

TESIS

(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)

**A HOTSPOT FOR MITOCHONDRIAL *trnD* DUPLICATION-DELETION EVENTS IN
THE LEECH GENUS *Placobdella* (ANNELIDA: CLITELLATA: GLOSSIPHONIIDAE)**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. DIEGO JOSSUÉ JIMÉNEZ ARMENTA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. HUGO HARLAN MEJÍA MADRID
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM**

MÉXICO, CDMX. AGOSTO, 2019

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de mayo del 2019 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Ecología** del alumno **JIMÉNEZ ARMENTA DIEGO JOSSUÉ** con número de cuenta **308133464** por la modalidad de graduación de **tesis por artículo científico** titulado: **"A hotspot for mitochondrial *trnD* duplication-deletion events in the leech genus *Placobdella* (Annelida: Clitellata: Glossiphoniidae)"**, que es producto del proyecto realizado en la maestría que lleva por título: **"Duplicación de *trnD* mitocondrial en sanguijuelas del género *Placobdella*. Un enfoque filogenético"**, ambos realizados bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
Vocal: DRA. RUBI NELSI MEZA LÁZARO
Secretario: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
Suplente: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
Suplente: DRA. CAROLINA GRANADOS MENDOZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de junio de 2019

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACyT y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo financiero otorgado durante la realización de este trabajo. Igualmente, al Apoyo a Proyectos de Investigación PAPIIT (Número IN210318 a AO-F).

Al Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa por la orientación, apoyo y enseñanza brindada durante el proceso de este proyecto.

A los miembros del comité tutor por su valiosa contribución al desarrollo de este proyecto:

Dr. José Martín García Varela

Dr. Hugo Harlan Mejía Madrid

Dedicatoria

A mis 'apás, Martha y Tacho por siempre creer en cada proyecto que decido llevar a cabo y otorgarme el apoyo que necesito y mucho más. Son unos padres ejemplares.

A Dan. De todos los descubrimientos, el que más atesoro es el mundo que descubrimos juntos y que cada día exploramos y construimos. Te amo muchísimo.

Al Dr. Ocegüera, por la confianza, las enseñanzas y haber sido mi guía en la exploración de un nanopedacito de este universo. Estoy muy orgulloso de lo que hemos hecho juntos.

A Ger, Chuy, Gis y Yanet. Lo más hermoso de este trayecto es que no lo recorrí solo. Es una maravilla contar con personas con su nivel de empatía. Su amistad es de lo mejor que me dio este posgrado.

Al equipo de investigadores y estudiantes de la CNHE. Este laboratorio está lleno de mentes brillantes y carreras prometedoras en construcción. A donde les lleve el camino, tengan mucho éxito y cuentan conmigo.

Al Dr. Kvist y sus estudiantes. Su calidad humana y entrega a la ciencia me dio unas de las mejores experiencias de mi vida como científico y no puedo dejar de agradecerles.

A los doctores García Varela y Mejía Madrid por ayudarme a elevar la calidad de este proyecto con sus observaciones y curtir mi personalidad como científico.

A los miembros del jurado por sus apropiados comentarios. Un honor que mi trabajo sea evaluado por personas de tal nivel humano y profesional.

A todxs lxs profesores que me han educado y formado a lo largo de mi vida. Mucho de lo que soy y hago se los debo a ustedes.

A todxs las personas cuir a quienes han hecho sentir que no pertenecen en el ambiente académico. Estamos aquí y no nos vamos a ir. La ciencia se nutre de la diversidad. Merecemos ser visibles.

Tabla de contenido

Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Generalidades de Hirudinida.....	3
El género <i>Placobdella</i>	9
Los ácidos ribonucleicos.....	12
Los RNA de transferencia.....	13
El DNA mitocondrial	15
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares	22
A hotspot for mitochondrial <i>trnD</i> duplication-deletion events in the leech genus <i>Placobdella</i> (Annelida: Clitellata: Glossiphoniidae).....	23
Discusión y conclusiones.....	50
Bibliografía citada.....	54

Resumen

Con pocas excepciones conocidas, los genomas mitocondriales animales están altamente conservados en términos del arreglo de los genes. En algunos casos, partes específicas del genoma presentan niveles altos de variación en el orden de los genes al interior de taxa específicos. A estas regiones se denominan *hotspots* y un ejemplo es la región WANCY, que presenta rearrreglos en diferentes grupos de vertebrados. En himenópteros, así como a través del phylum Annelida, se ha detectado un *hotspot* en la región entre los genes *cox2* y *atp8*, el cuál es particularmente conspicuo en miembros del género de sanguijuelas hematófagas *Placobdella*, donde se ha encontrado una duplicación del gen *trnD* en esa región.

En el presente trabajo, se llevó a cabo un muestreo de 21 especies de *Placobdella* y 13 especies externas. Mediante *primers* especialmente diseñados, se amplificó y secuenció el fragmento del genoma mitocondrial entre los genes *atp8* y *cox2*, con el objetivo de determinar la extensión de la duplicación del gen *trnD*, analizar si hay diferencias entre taxa y reconstruir la historia filogenética de la misma.

Las secuencias producidas revelaron que la duplicación está restringida al género *Placobdella*, dentro del cual se ha perdido hasta cinco veces. 15 especies del género poseen un *trnD* duplicado y varias fuentes de variación pueden observarse. Ambas copias del gen (nombradas *trnD1* Y *trnD2*) pueden encontrarse contiguas entre sí o presentar una inserción entre ellas con una longitud entre 6 y 59 pb. El origen de *trnD2* a partir de *trnD1* está sustentado por la presencia de una firma molecular de 12 pb conservados entre ambos genes. En algunas especies, ambas copias recuperan estructuras secundarias regulares, sin embargo, hay varios casos en que *trnD2* es aparentemente no funcional y sólo un caso en que *trnD1* se ha degradado y perdido su funcionalidad. Igualmente es detectable una sustitución del anticodón presente en el producto de *trnD2* en tres especímenes, donde el anticodón canónico para *trnD2* en el código genético mitocondrial de invertebrados, GUC ha sido reemplazado por GUA, GUU o ACU. Dentro de las especies *Placobdella ringueleti* y *Placobdella rugosa* fue detectada variación intraespecífica, donde diferentes poblaciones presentan diferentes configuraciones de genes entre *atp8* y *cox2*. Un ejemplar de *Placobdella rugosa*, así como *Placobdella montifera*, presentan un gen codificante de tRNA altamente degradado además de *trnD1* y *trnD2* en la región estudiada, cuyo origen no está establecido. Estos pseudogenes adicionales fueron denominados *trnD3* y *trnD4*.

Los análisis de reconstrucción de estados ancestrales no son concluyentes en cuanto al estado en el ancestro común de *Placobdella*, sin embargo, el segundo clado más grande de *Placobdella* presenta un ancestro en el que sin ambigüedad puede inferirse la presencia *trnD2* en su genoma mitocondrial.

Al realizar inferencias filogenéticas utilizando todos los genes hallados entre *cox2* y *atp8* (*trnD1-4*), queda descartada la posibilidad de evolución concertada en esta parte del genoma y se sugiere que mecanismos particulares de evolución están ocurriendo en las copias del gen *trnD*.

Este estudio representa la primera ocasión en que se reporta una duplicación en tándem de un solo gen codificante de tRNA mitocondrial. Además, presenta niveles de variación sin precedentes y abre cuestionamientos sobre la forma en que evolucionan los genomas mitocondriales y el fenómeno de los *hotspots* dentro de los mismos.

De esta investigación se desprende el artículo "A hotspot for mitochondrial *trnD* duplication-deletion events in the leech genus *Placobdella* (Annelida: Clitellata: Glossiphoniidae)".

Abstract

With few known exceptions, animal mitochondrial genomes are highly conserved in terms of gene arrangement. In some cases, specific parts of the genome exhibit high levels of variation in gene order inside specific taxa. These regions are called “hotspots” and an example is the WANCY region, which has rearranged in different vertebrate groups. In hymenopterans, as well as across the phylum Annelida, a hotspot has been detected between genes *cox2* and *atp8*, which is particularly conspicuous in members of the leech genus *Placobdella*, where a duplication of the *trnD* gene has been found.

In the present work, 21 species of *Placobdella* and 13 outgroups were sampled. Using specially designed primers, the fragment of the mitochondrial genome between *atp8* and *cox2* was amplified and sequenced to determine the extension of the *trnD* duplication, analyze differences between taxa and reconstruct its phylogenetic history.

The sequences generated revealed the restriction of the duplication to genus *Placobdella*, where it has been lost up to five times. 15 species of the genus possess a duplicated *trnD* and several variation levels can be observed. Both copies of the gene (*trnD1* and *trnD2*) were found contiguous to each other or present an insertion between them of 6-59 bp. The origin of *trnD2* from *trnD1* is supported by the presence of a molecular signature of 12 bp, which are conserved between both genes. In some species, both copies produce regular secondary structures, however, there are some cases in which *trnD2* is apparently non-functional and only one case in which *trnD1* has degraded and lost functionality. A substitution of the anticodon present in the *trnD2* product was found in 3 specimens, where the canonical anticodon for *trnD* in the invertebrate mitochondrial genetic code (GUC) has been replaced by GUA, GUU or ACU. Within the species *Placobdella ringueleti* and *Placobdella rugosa* intraspecific variation was detected, where different populations present different gene configurations between *cox2* and *atp8*. An individual of *Placobdella rugosa*, as well as the *Placobdella montifera* sample, present a highly degraded tRNA-coding gene additional to *trnD1* and *trnD2* in the studied region, whose origin is not established. These additional pseudogenes were called *trnD3* and *trnD4*.

Ancestral state reconstruction analyses are inconclusive regarding the state in *Placobdella*'s common ancestor, however, the second biggest *Placobdella* clade has an ancestor in which we can unambiguously infer the presence of *trnD2* in its mitochondrial genome.

When performing phylogenetic inferences using all *trnD1-trnD4* genes, the possibility of concerted evolution in this part of the genome is discarded. We suggest that particular evolution mechanisms are occurring in *trnD* copies.

This study represents the first time a tandem duplication of a single tRNA coding gene is reported. Furthermore, unprecedented variation levels are presented, and questions are opened regarding the way mitochondrial genomes evolve and the hotspot phenomenon.

This research led to the production of the article “A hotspot for mitochondrial *trnD* duplication-deletion events in the leech genus *Placobdella* (Annelida: Clitellata: Glossiphoniidae)”.

Introducción

Generalidades de Hirudinida.

La clase Clitellata (en la que se ubican las sanguijuelas), junto con Polychaeta, Echiuridae, Sipuncula y Siboglinidae conforman el phylum Annelida (Struck *et al.*, 2007; Dunn *et al.*, 2008). El phylum está compuesto por animales bilaterales, tripoblásticos, celomados, con cuerpo vermiforme y en la mayoría de los casos, segmentado, que presentan homología serial, es decir, la mayoría de las partes corporales se repiten en cada segmento. La homología serial se ha perdido de manera secundaria en grupos como Echiuridae y Sipuncula (Halanych *et al.*, 2002). Presentan un aparato digestivo completo, aparato circulatorio cerrado, sistema nervioso bien desarrollado con un ganglio cerebral y nefridios como estructuras de excreción (Brusca & Brusca, 2016). La clase Clitellata incluye al orden Hirudinida (Tessler, 2018) junto con los oligoquetos, branquiobdélidos y acantobdélidos (Siddall *et al.*, 2001; Erséus & Källersjö, 2004). Son organismos hermafroditas que presentan una estructura llamada clitelo, una región glandular que secreta ootecas (cápsulas de quitina) para el empaquetamiento de los huevos.

Los hirudínidos o sanguijuelas presentan varias sinapomorfías dentro de Annelida. Por ejemplo, presentan un número constante de somitos en su plan corporal básico: 34. De manera general, cada somito se subdivide superficialmente en de 3 a 5 anillos, pero pueden llegar a ser hasta 10 o en algunos casos solo dos, siendo este carácter de importancia taxonómica (Sawyer, 1986; Sket & Trontelj, 2008).

Las sanguijuelas presentan un cuerpo aplanado dorsoventralmente, aunque varias especies pueden ser circulares o semicirculares en corte transversal. No poseen las quetas que los oligoquetos usan para la locomoción y han desarrollado dos ventosas musculares: una en posición anterior y una caudal. En la ventosa anterior se encuentra la boca. El ano es dorsal y se ubica en el extremo posterior del cuerpo. En oligoquetos y poliquetos, la cavidad celómica está llena de fluido y conforma un esqueleto hidrostático, pero en las sanguijuelas está ocupado por tejido mesenquimático, por lo cual se forma un sistema de canales angostos por los que circula el fluido celómico (vasos circulatorios) (Sawyer, 1986) (Fig. 1).

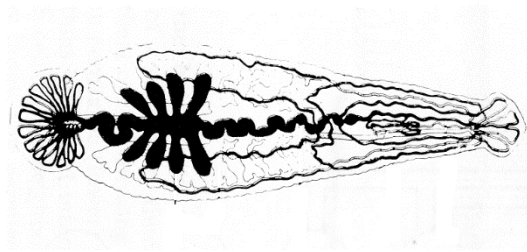


Fig. 1. Vasos circulatorios de *Hemiclepsis marginata* Müller, 1774

Las sanguijuelas poseen un ganglio en cada somito corporal, además de un ganglio cerebroide anterior, que resulta de la fusión de seis ganglios nerviosos, y un cordón nervioso que se extiende longitudinalmente en la superficie ventral. En el extremo posterior, los últimos siete ganglios se fusionan formando una única masa (Fig. 2). Tienen órganos sensoriales epidermales y entre 2 y 10 manchas oculares de complejidad variable (Sawyer, 1986)

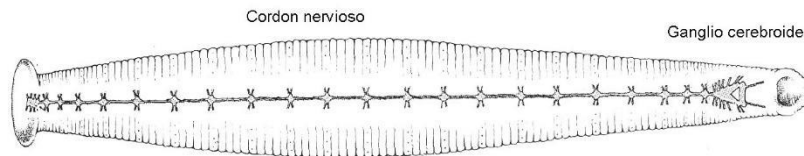


Fig. 2. Sistema nervioso de *Hirudo* sp.

El aparato reproductor masculino se encuentra provisto de entre 5 y 10 pares de testisacos unidos mediante ductos espermáticos a un órgano copulador llamado atrio, ubicado en el gonoporo masculino (Sawyer, 1986) (Fig. 3). El aparato reproductor femenino consta de un par de ovisacos de los cuáles se extienden oviductos que se unen en la vagina, y desembocan en el gonoporo femenino (Sawyer, 1986). La fertilización es interna y cruzada. Algunas especies poseen un pene para la transferencia espermática. Otras especies producen espermátóforos que son introducidos de manera traumática en la epidermis de un individuo, desde donde el esperma viaja por el sistema circulatorio hacia los ovarios (Świątek, 2007; Salas-Montiel *et al.*, 2017). La excreción se realiza a través de órganos llamados metanefridios asociados a los vasos circulatorios celómicos (Quijada-Rodríguez *et al.*, 2017).

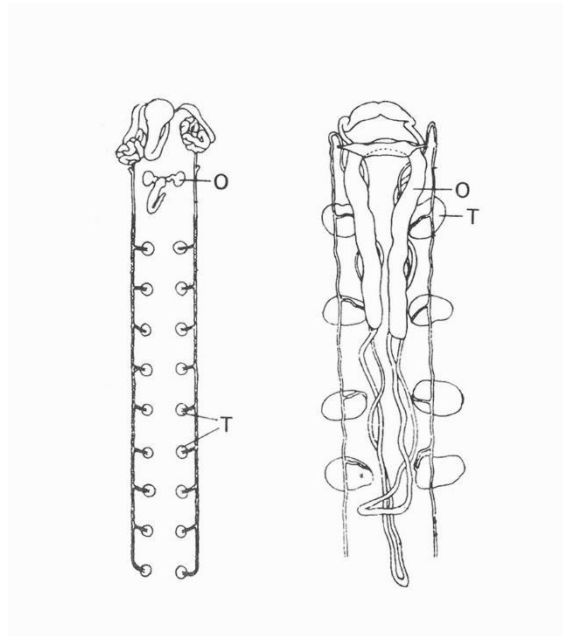


Fig. 3. Aparato reproductor de dos especies de sanguijuelas Derecha, *Hirudo medicinalis*.
Izquierda, *Glossiphonia complanata*.

O = ovisacos T= testisacos. Modificado de Sawyer (1986)

Las sanguijuelas miden, de manera general, entre 0.5 y 5 cm, aunque una especie de la cuenca del Amazonas, *Haementeria ghilianii* de Filippi, 1849 alcanza una longitud de hasta 50 cm (Sawyer *et al.*, 1981). Aproximadamente, el 30% de las 680 especies descritas de sanguijuelas a nivel mundial son hematófagas, parásitas de vertebrados, siendo la hemoglobina su principal fuente energética (Sawyer, 1986; Sket & Trontelj, 2008). El resto son liquidosomatófagas, es decir, se alimentan de fluidos internos y tejidos blandos de moluscos u otros anélidos, o bien son macrófagas, carroñeras o depredadoras de pequeños invertebrados (Sket & Trontelj, 2008; Ocegüera-Figueroa *et al.*, 2010). Algunas de las especies parásitas funcionan como vectores de protozoarios apicomplexos y tripanosomátidos, así como hospederos intermediarios de digéneos, (Vojtek *et al.*, 1967; Barta & Desser, 1989; Siddall & Desser, 1993; Hayes *et al.*, 2014). Las sanguijuelas hematófagas han desarrollado características únicas a nivel morfológico, bioquímico, ecológico y celular dadas las características de su dieta.

En cuanto a características morfológicas, el buche en las especies hematófagas es flexible y está provisto de divertículos que funcionan como almacén de alimento a largo plazo. También presenta una pared corporal fuerte que resiste el ensanchamiento del

cuerpo. En especies que no se alimentan de sangre, el buche es un tubo muscular que aparentemente tritura los alimentos ingeridos. En el caso de las sanguijuelas hematófagas, el almacenamiento del alimento se lleva a cabo mediante la concentración de las células sanguíneas por eliminación del plasma y osmolitos a través de los metanefridios. Debido al exceso de agua y sales adquirido con el alimento, una sanguijuela puede eliminar el equivalente a su propia masa en orina en las primeras 24 horas después de la ingesta (Boroffka, 1968). Estas características son importantes dado el hecho de que las sanguijuelas pueden ingerir hasta 8 veces su peso en sangre y pueden pasar períodos de entre 6 y 12 meses sin alimentarse (Sawyer, 1986)

Se ha determinado que algunas sanguijuelas estrictamente hematófagas de la familia Glossiphoniidae han establecido relaciones simbióticas con bacterias. La naturaleza de dichas relaciones ha comenzado a esclarecerse y se conoce que los simbiositos bacterianos han jugado un papel fundamental en la evolución y éxito alimenticio del grupo, así como ocurre en muchos organismos monófagos, con dietas difíciles de digerir como lo son la savia, la madera y sangre (Munson *et al.*, 1991; Aksoy, 1995; Siddall *et al.*, 2004; Kvist *et al.*, 2011; Manzano-Marín *et al.*, 2015).

La mayoría de las especies de sanguijuelas son acuáticas, de hábitos marinos o dulceacuícolas, con algunas representantes terrestres (Sket & Trontelj, 2007). Existe una amplia diversidad en cuanto a especificidad hospedatoria de las sanguijuelas hematófagas: la sanguijuela medicinal *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 ha sido reportada como parásito de diferentes clases de vertebrados, incluyendo reptiles, anfibios y mamíferos (Keim, 1993). Por otro lado, *Placobdella biannulata* Moore, 1900 sólo se ha reportado alimentándose de salamandras de la subfamilia Desmognathinae (Moser *et al.*, 2005).

Siddall *et al.* (2001) reconocieron que las sanguijuelas forman un clado junto con las familias Branchiobdellidae (Oder, 1823) y Acanthobdellidae (Grube, 1851). Estos tres grupos, junto con Lumbriculidae (Vejdovský, 1884) constituyen el grupo hermano del resto de Oligochaeta, lo que deja a este último grupo como parafilético (Fig. 5) Sawyer (1986), siguiendo las clasificaciones previas, dividió a la subclase Hirudinea en dos órdenes: Rhyncobdellida Blanchard, 1894 o sanguijuelas con proboscis muscular y Arhyncobdellida Blanchard, 1894, que incluye a las sanguijuelas sin proboscis que, en cambio, pueden presentar mandíbulas o estiletos, o bien, presentar una faringe muscular sin

ornamentaciones. Las hipótesis filogenéticas con base en datos morfológicos han sugerido que los dos grupos son naturales (Siddal & Burreson, 1995). Sin embargo, los estudios que emplean datos moleculares señalan que el orden Rhynchobdellida es parafilético (Apakupakul *et al.*, 1999; Borda & Siddall, 2004). Tessler *et al.* (2018) propusieron que Hirudinida tiene el mismo nivel que Branchiobdellida y Acanthobdellida. Particularmente, Hirudinida, de acuerdo con un análisis molecular que incluyó 5 marcadores moleculares, está dividido en 5 subórdenes sugeridos: Oceanobdelliformes y Glossiphoniformes, que corresponden a la antigua Rhynchobdellida y Americobdelliformes, Erpobdelliformes e Hirudiniformes, que corresponden a Arrhynchobdellida (Fig. 5).

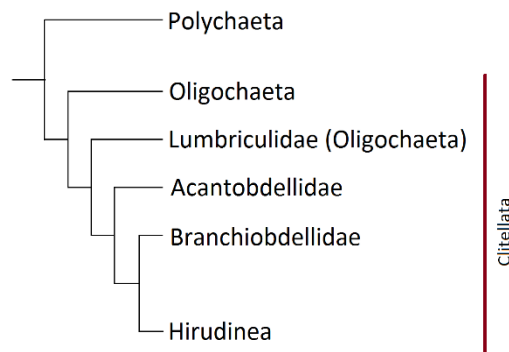


Fig. 5. Posición filogenética de Hirudinida. Modificado de Siddall *et al.* (2001)

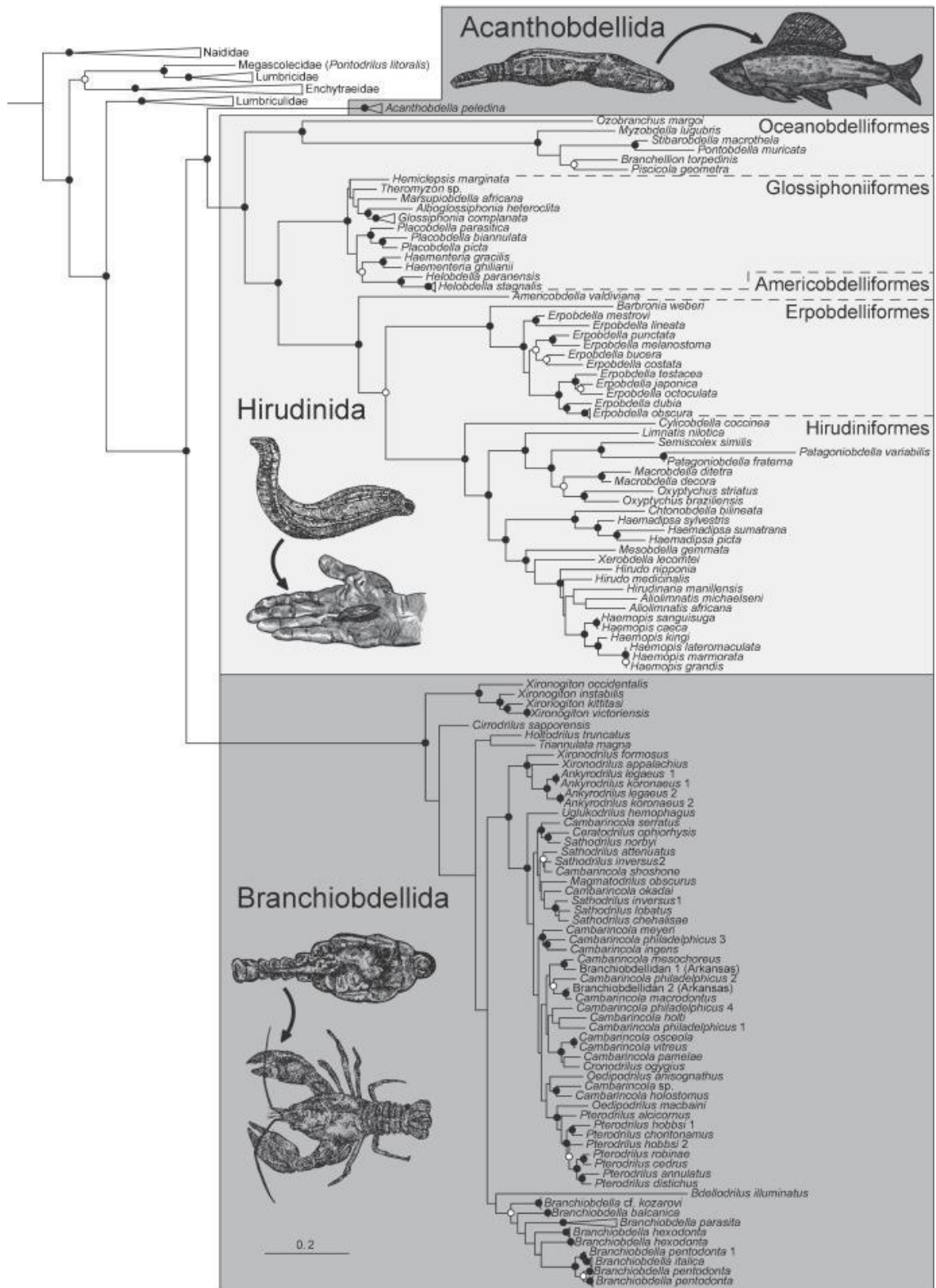


Fig. 5. Relaciones filogenéticas de los cinco subórdenes que conforman el orden Hirudinida, así como de este con los órdenes Branchiobdellida y Acanthobdellida.

Hasta el momento han sido registradas 33 especies de sanguijuelas en México, las cuales pertenecen a 10 de las 14 familias propuestas (Oceguera-Figueroa & León-Règagnon, 2014; Salas-Montiel *et al.*, 2014; Tessler *et al.*, 2018). En México, han sido registradas en 28 entidades federativas del país, ya que Campeche, Baja California, Quintana Roo y Zacatecas no poseen reportes. De las especies conocidas, 22 están restringidas a México mientras que el resto se distribuye en los países circundantes (Oceguera-Figueroa & León-Règagnon, 2014; Salas-Montiel *et al.*, 2014; Tessler *et al.*, 2018).

En los últimos años se han realizado estudios filogenéticos de diversos grupos de sanguijuelas, algunos grupos han sido recuperados consistentemente como clados. Sin embargo, no se les ha asignado un nombre formal. Uno de estos grupos es el conformado por los géneros *Haementeria*, *Helobdella* y *Placobdella*. Tanto *Placobdella* como *Haementeria* incluyen especies estrictamente hematófagas, mientras que *Helobdella* incluye especies liquidosomatófagas. Los 3 géneros están bien representados en México, *Helobdella* con 6 especies, y *Haementeria* y *Placobdella*, con 3 cada uno (Oceguera-Figueroa & León-Règagnon, 2014; Salas-Montiel *et al.*, 2014). El grupo de estudio en el presente proyecto es el género *Placobdella*.

El género *Placobdella*

Placobdella Blanchard, 1893 es un género de sanguijuelas ubicado dentro de la familia Glossiphoniidae, en el orden Arhyncobdellida. Se trata de organismos hematófagos que parasitan anfibios, reptiles, peces y pueden encontrarse de manera oportunista en aves y mamíferos. Las especies del género se caracterizan por presentar somitos con tres anillos, con excepción de *P. biannulata* y *P. brasiliensis* Cordero, 1937, que únicamente presentan dos (Oceguera-Figueroa, 2012). Igualmente, poseen dos pares de ocelos (uno de los cuáles está fusionado), ovarios bilobulados y un par de órganos que albergan endosimbiontes bacterianos asociados al esófago (llamados bacteriomas) (Sawyer, 1986; Siddall *et al.*, 2005).

Hasta la fecha, se han descrito 16 especies en América del Norte, de las cuales 3 se distribuyen en México: *Placobdella lamothei* Oceguera-Figueroa & Siddall 2008, *Placobdella ringueleti* López-Jiménez & Oceguera-Figueroa, 2009 y *Placobdella mexicana* Moore 1898 Sawyer, 1986, Oceguera-Figueroa & León-Regagnon, 2014. Trece especies

se distribuyen en EUA y Canadá, mientras que en Europa se ha descrito sólo una especie: *Placobdella costata* Müller 1864.

La sistemática del género *Placobdella* ha sido controversial debido a la reducida cantidad de caracteres morfológicos informativos y a la imprecisión de algunas descripciones. Por este motivo, especies como *P. ornata* Verrill, 1872, *P. rugosa* Verrill, 1874, *P. cryptobranchii* Johnson & Klemm, 1977 y *P. hollensis* Whitman, 1892 han sido recientemente redescritas utilizando caracteres morfológicos detallados y secuencias de DNA para la delimitación de especies (Moser *et al.*, 2012a, 2012b, 2013, 2014). Además, estudios filogenéticos recientes que combinan caracteres morfológicos y moleculares resultaron en la sinonimización de los géneros *Oligobdella* y *Desserobdella* con *Placobdella* (Siddall *et al.*, 2005).

DeCarle *et al.* (2017), realizaron un análisis filogenético del género basado en tres marcadores moleculares mitocondriales (*cox1*, *nd1* y 12S) y uno nuclear (ITS), empleando diferentes aproximaciones metodológicas. La matriz analizada por los autores incluyó 20 especies nominales de *Placobdella* y 4 especies sin describir. La hipótesis filogenética reveló la monofilia del género y lo situó como grupo hermano de un clado formado por los géneros *Haementeria* y *Helobdella*. Las relaciones profundas al interior del género presentan valores de soporte bajos. Sin embargo, las relaciones a niveles someros son más estables. Las relaciones filogenéticas profundas, así como la identidad del grupo de divergencia más temprana del género es variable entre diferentes métodos de inferencia. (Fig. 6 y Fig. 7).

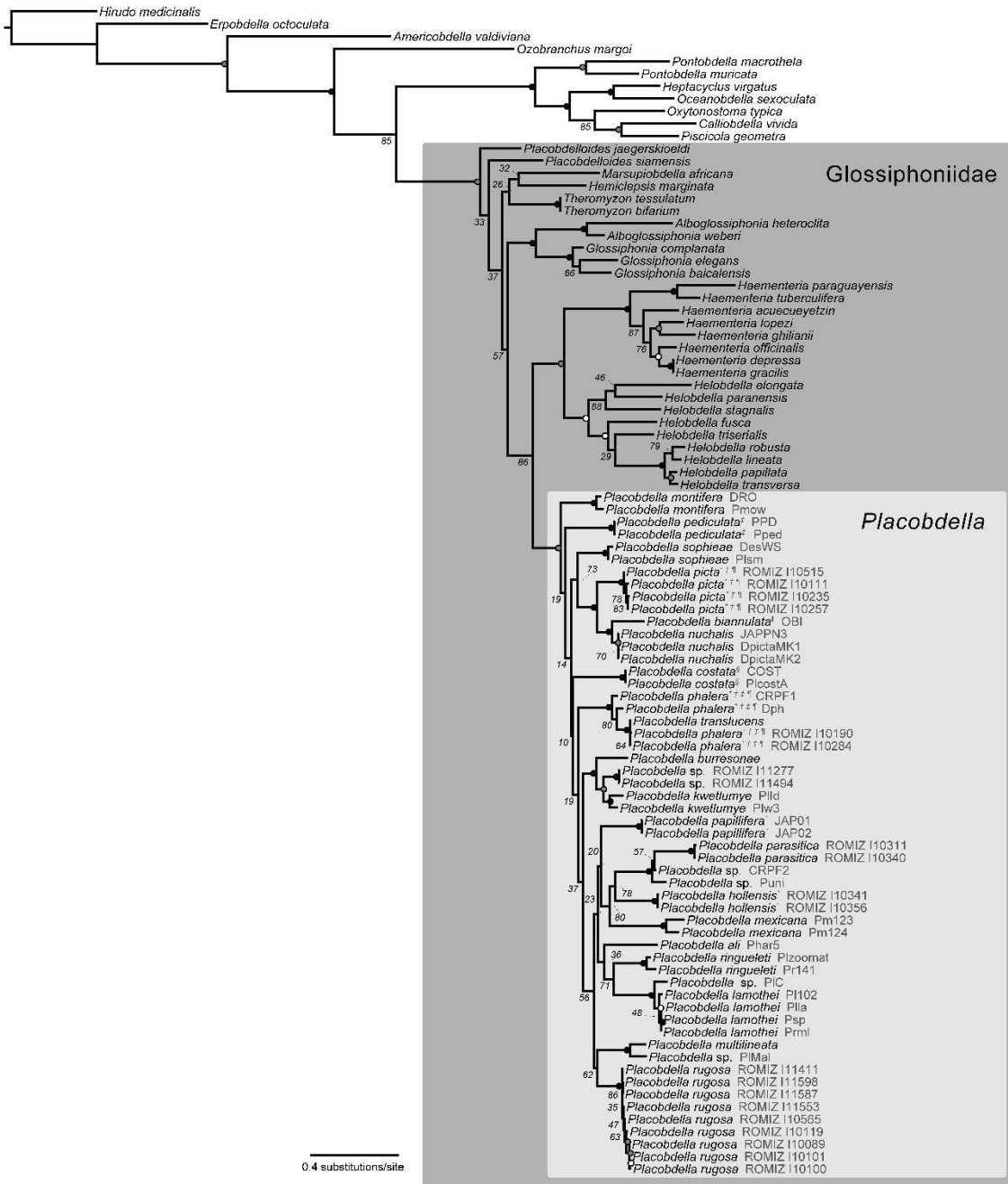


Fig. 6. Árbol de Máxima Verosimilitud obtenido por DeCarle *et al.* (2017) que muestra las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Placobdella* mediante el análisis de secuencias concatenadas de los genes COI, ND1, 12S y los ITS 1 y 2 bajo el modelo de sustitución GTR + GAMMA.

conformadas por uno o dos anillos de carbono y algunos átomos adicionales de nitrógeno. El RNA utiliza 4 diferentes bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U). En el DNA, se utiliza timina (T) en lugar de uracilo (Elliott & Lodomery, 2017). Según fue descrito por Watson & Crick (1953), la estructura secundaria del DNA consiste en una doble hélice formada por dos hebras antiparalelas. Por otro lado, las moléculas de RNA son de cadena sencilla y también establecen estructuras secundarias mediante la formación de puentes de hidrógeno entre pares de bases nitrogenadas complementarias. Específicamente, se pueden formar 2 puentes entre A y U y 3 puentes entre G y C que generan diferentes tipos de estructuras a lo largo de la molécula. También pueden ocurrir apareamientos no regulares de bases nitrogenadas, como los pares G-U y A-A, que originan distorsiones en la estructura de la cadena (Elliott & Lodomery, 2017).

La síntesis de proteínas involucra tres tipos de RNA: los RNA mensajeros (mRNA), los RNA de transferencia (tRNA) y los RNA ribosomales (rRNA). Los mRNAs contienen las secuencias de codones que serán leídas por los tRNAs en el proceso de traducción, el cuál es catalizado por los rRNAs. En los mRNAs, la secuencia de nucleótidos en si misma cumple la función biológica de la molécula. Por otro lado, en los tRNAs y rRNAs, es la estructura resultante del plegamiento de las moléculas la que determina la actividad biológica (Westhof & Auffinger, 2012). En la traducción, los ribosomas (estructuras formadas generalmente por un 65% de rRNA Y 35% de proteínas) utilizan la información codificada en los mRNAs (que son sintetizados con base en la secuencia de los genes en el DNA) para la síntesis de un polipéptido. Los tRNAs son adaptadores moleculares que asocian un codón (secuencia de tres bases nitrogenadas) en el mRNA con un aminoácido específico (Elliott & Lodomery, 2011).

Los RNA de transferencia.

Los RNA de transferencia (tRNA) son altamente conservados, presentan generalmente una cadena de alrededor de 70 nucleótidos que se pliega en cuatro asas formando una estructura de “trébol” (Fig. 8). En una de esas asas se encuentra un anticodón: una secuencia de 3 bases que es complementaria a un codón del mRNA. Los dos extremos de una molécula de tRNA conforman un brazo receptor con la capacidad de cargar el aminoácido correspondiente al codón según el código genético correspondiente. Un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones. Los codones que codifican un

mismo aminoácido pueden variar en la tercera posición, sin alterar el polipéptido resultante. A este fenómeno se le conoce como degeneración del código genético. La adición del aminoácido específico al tRNA es llevado a cabo por una familia de enzimas llamadas aminoacil tRNA sintetasas (Elliott & Lodomery, 2017). La estructura de la molécula de Trna se completa con un par de brazos adicionales, conformados por las asas D y T, cada una con su respectivo tallo. Estos brazos interactúan para formar la estructura terciaria del tRNA y tienen un papel en el reconocimiento de la molécula por diversas enzimas, así como en su interacción con el ribosoma (Smith & Yarus, 1989; Gu & Santi, 1991; Hardt *et al.*, 1993; Graifer & Karpova, 2015) (Fig. 8).

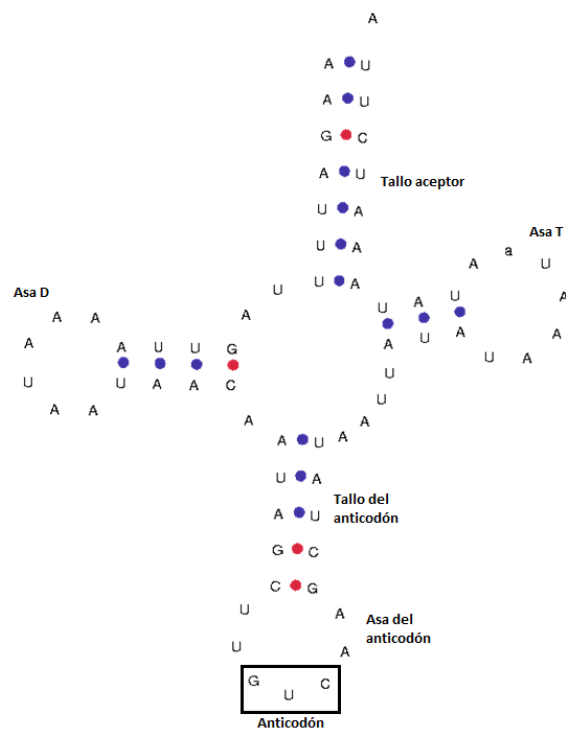


Fig. 8. Estructura secundaria del tRNA codificado por el gen mitocondrial *tmD* de *Placobdella parasitica* Say, 1824, donde se señala la nomenclatura de las asas y tallos que lo conforman.

Desde un punto de vista evolutivo, los tRNAs son moléculas que aparecieron en una etapa temprana de la evolución celular, ya que están presentes en todos los organismos de los tres dominios de la vida (Archaea, Bacteria y Eukarya) (Di Giulio, 2012). El modelo que explica el origen de los tRNAs tiene sus bases en la teoría de exones. Esta teoría explica que los tRNAs se originaron a partir de un gen que codificaba un RNA con estructura de asa y tallo, la cual contenía un anticodón y la capacidad de cargar un aminoácido en su extremo 3'. Este gen habría pasado una duplicación que permitiera la existencia de

estructuras de dos asas y posteriormente, un intrón habría unido las dos copias en una sola unidad transcripcional para originar un gen de tRNA actual (Di Giulio, 2012). Existe en el genoma de la arqueobacteria *Nanoarchaeum equitans* un paso intermedio que concuerda con lo descrito en el modelo, donde un tRNA es codificado por dos genes cuyos productos se unen postranscripcionalmente (Randau *et al.*, 2005). Farías (2003) concluyó mediante la construcción de hipótesis filogenéticas y reconstrucción de secuencias ancestrales que la diversificación histórica de los tRNAs se ha dado inicialmente por cambios en la segunda base del anticodón y posteriormente en la primera y tercera bases.

Las mitocondrias, como organelos semiautónomos, utilizan conjuntos completos y funcionales de tRNAs para la traducción de sus genes codificantes de proteínas. En algunos casos, los genes de tRNAs han sido parcial o totalmente transferidos al genoma nuclear. Por otro lado, con frecuencia se encuentra que todos los genes codificantes de tRNAs han sido retenidos en el genoma mitocondrial. En genomas mitocondriales animales suelen encontrarse 22 genes que codifican tRNAs (Salinas-Giegé *et al.*, 2019; Boore, 1999).

El DNA mitocondrial

Las mitocondrias son organelos que poseen su propio genoma y contienen la maquinaria molecular para abastecer de energía en forma de ATP a las células. Están involucradas en funciones celulares como la regulación del metabolismo, control del ciclo celular, desarrollo y muerte celular (McBride *et al.*, 2006). El DNA mitocondrial (mtDNA) animal es un genoma pequeño con una longitud entre 15,000 y 17,000 pb, aunque se han descubierto valores extremos de 11,423 pb en el quetognato *Paraspadella gotoi*, que sólo presenta 14 genes mitocondriales (Helfenbein *et al.*, 2004) y 43,079 pb en el placozoo *Trichoplax adhaerens* (Dellaporta *et al.*, 2006), que presenta grandes espacios intergénicos. En la mayoría de las especies animales se trata de un genoma circular, sin embargo, en las clases Cubozoa, Scyphozoa e Hydrozoa, pertenecientes al phylum Cnidaria, está conformado como un cromosoma lineal (Bridge *et al.*, 1992). Las dos cadenas de nucleótidos que conforman la molécula del DNA mitocondrial se nombran cadena ligera (*light strand*) y cadena pesada (*heavy strand*), conceptos que se definen por el peso molecular de las mismas, el cual es influenciado por la proporción de purinas y pirimidinas presentes en cada cadena. Las purinas, por la presencia de un anillo adicional, son más pesadas que las pirimidinas. Debido a la complementariedad de las bases, si en una cadena ocurre un exceso de

purinas, la otra tendrá exceso de pirimidinas, ocasionando un contraste entre las masas de las cadenas (Kasamatsu & Vinograd, 1974).

El genoma mitocondrial animal contiene regularmente 37 genes: 13 codifican para proteínas, dos para RNAs ribosomales (rRNAs) y 22 para RNAs de transferencia (tRNAs) (Fig. 9). Además, suele presentar una región no codificante que contiene secuencias de iniciación para su transcripción y replicación, llamada región control o “D-loop region” (Boore, 1999). Los centros de origen de la replicación reciben los nombres de O_L para la cadena ligera y O_H para la cadena pesada. Estas regiones tienen la característica de generar estructuras secundarias de asas y tallos y, aunque son competitivamente dominantes como orígenes de replicación, también se usan otras regiones con esta estructura como orígenes alternativos, principalmente genes de tRNAs (Stanton *et al.*, 1994; Macey *et al.*, 1997).

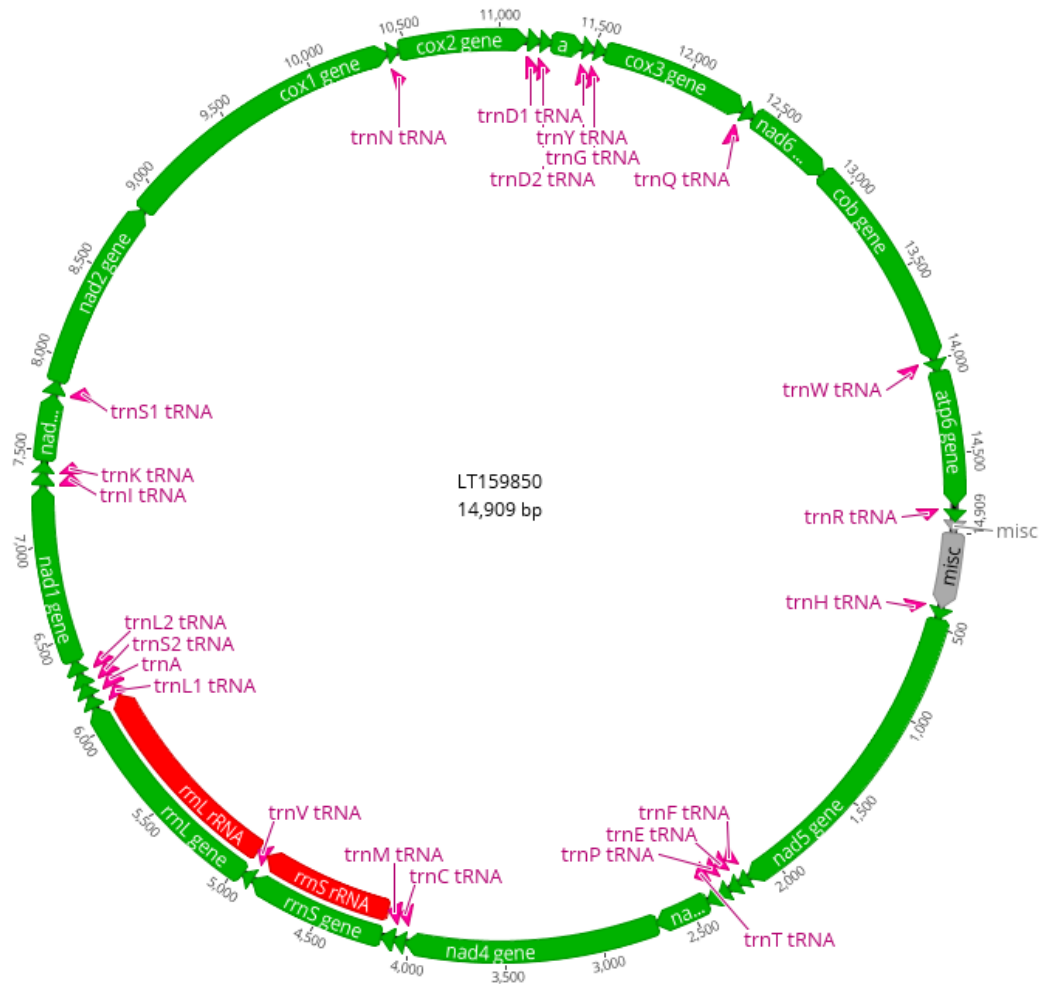


Fig. 9. Representación del genoma mitocondrial de *Placobdella parasitica*. Los genes codificantes de proteínas se muestran en verde. En magenta, los codificantes de tRNAs y en rojo las subunidades ribosomales. La porción gris representa regiones no codificantes.

En algunos grupos taxonómicos existen modificaciones en la composición genética del mtDNA, ya sea por la presencia de genes supernumerarios, resultantes de fenómenos de duplicación o por la ausencia de algún gen. Por ejemplo, en los nemátodos como *Onchocerca volvulus* o *Caenorhabditis elegans* carecen del gen *atp8* (Okimoto *et al.*, 1992; Keddie *et al.*, 1998). Este fenómeno también ocurre en el bivalvo *Mytilus edulis*, que además posee un gen para tRNA adicional (Hoffman *et al.*, 1992). En la anémona *Metridium senile*, sólo se presentan 2 tRNAs (Beagley *et al.*, 1997). El orden o arreglo de los genes mitocondriales suele estar muy conservado al interior de los phyla (Jacobs *et al.*, 1989). Sin embargo, en algunos casos han sido reportados rearrreglos de genes. Dada la escasa ocurrencia de estos rearrreglos, se les considera caracteres de alta importancia como fuente de información filogenética (Boore *et al.*, 1995; Kumazawa & Nishida, 1995; Macey *et al.* 1997).

El modelo de duplicación en tándem y pérdida aleatoria (*tandem duplication-random loss* o TDRL) se ha utilizado para explicar una fracción importante de los rearrreglos de genes mitocondriales (Boore, 2000). Dicho modelo consiste en varios pasos: inicialmente, se duplica en tándem una porción del DNA, lo cuál puede ocurrir por distintos mecanismos. Uno de ellos se conoce como desacoplamiento de hebra (*slipped-strand mispairing* o *replication slippage*), ilustrado en la Fig. 10A. Durante la replicación de dos segmentos de secuencias similares (N y N') puede suceder que tras el desacoplamiento de las hebras, ocurra un realineamiento anómalo, de manera que N' de la hebra que se está sintetizando se acopla con N de la hebra original. Al continuar la replicación, se genera una segunda copia de N' (Macey *et al.* 1997).

Otro mecanismo que puede generar duplicaciones en tándem en la mitocondria es la terminación imprecisa de la replicación (Fig. 10B) (Macey *et al.* 1997). De manera ideal, el punto de origen y terminación de la replicación coinciden de forma precisa. Sin embargo, si el punto de terminación se encuentra más allá del punto de origen, se generará una duplicación en tándem de segmento del genoma cercano al punto de origen.

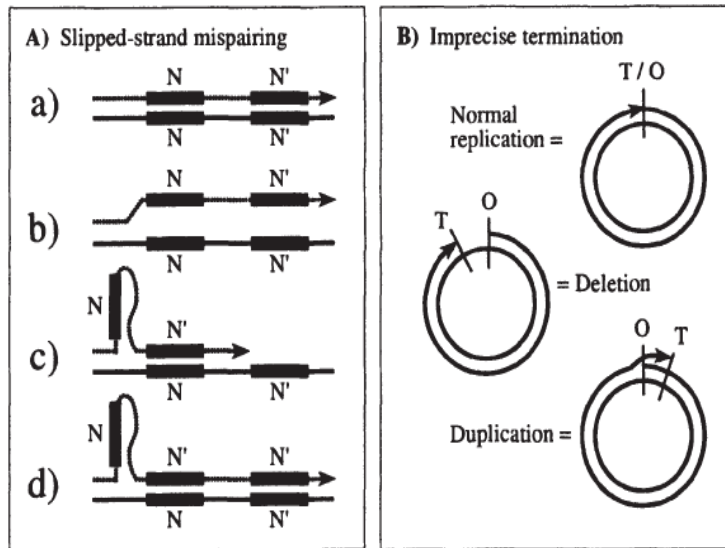


Fig. 10 Representación gráfica de los mecanismos que pueden originar duplicaciones en tándem en los genomas mitocondriales. A) Desacoplamiento de hebra (*slipped-strand mispairing*) B) Terminación imprecisa (*imprecise termination*) (Modificada de Macey *et al.* 1997)

Una vez ocurrida la duplicación en tándem de uno o más genes, el modelo de TDRL indica que ocurre una delección aleatoria de algunos de los genes duplicados, que evita la redundancia de poseer dos genes idénticos. Los genes que se pierden son determinados por la acumulación de mutaciones aleatorias que impiden su funcionamiento regular, dando origen a pseudogenes (Boore, 2000).

Para que un rearrreglo de genes se considere consistente con el modelo de TDRL debe tratarse de un rearrreglo local, donde los genes se mueven dentro de unos límites restringidos (típicamente dentro de un clúster de genes de tRNAs) sin cambiar de hebra dentro del DNA mitocondrial. Las inversiones y traslocaciones de amplio rango no son producto de este modelo (Dowton *et al.*, 2009). La presencia de pseudogenes o espacios intergénicos cerca de genes reacomodados es evidencia fuerte del acontecimiento de un evento de TDRL (San Mauro *et al.*, 2005).

Por otro lado, también han sido reportados rearrreglos mitocondriales que son consistentes con otros mecanismos. Por ejemplo, las inversiones (cambio de un gen de una hebra a otra en el genoma mitocondrial) son explicables mediante el fenómeno de recombinación intramitocondrial (Dowton & Campbell, 2001), un fenómeno poco estudiado

con evidencia indirecta hallada en diferentes grupos animales (Kajander *et al.*, 2000; Rokas *et al.*, 2003).

Entre los vertebrados, el acomodo o disposición de los genes mitocondriales está conservado entre los distintos grupos, incluyendo peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, con algunas excepciones hasta ahora detectadas: la lamprea marina *Petromyzon marinus* posee una traslocación del *cytb* y cambios en la posición de regiones no codificantes (Lee & Kocher, 1995). Algunos marsupiales (Phalangeridae y Didelphidae) poseen un rearrreglo en el orden de cinco tRNAs de *trnW-trnA-trnN-trnC-trnY* a *trnA-trnC-trnW-trnN-trnY*. Estos cinco genes componen la región del genoma conocida como WANCY, que también presenta reacomodos de genes en cuatro especies de cecilias (Amphibia: Gymnophiona) cercanamente emparentadas, así como en las salamandras *Batrachoseps attenuatus* e *Hydromantes brunus* y el pez *Chauliodus sloani* (San Mauro *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2004; Miya *et al.*, 2001). Dado que esta región flanquea al origen de replicación de la cadena ligera (O_L), es posible que se esté presentando una terminación imprecisa de la replicación, haciendo que los genes presentes en esta región tengan una elevada propensión a reorganizarse, por lo cual se le denomina un *hotspot* en el que varios linajes presentan rearrreglos independientemente producidos por el modelo TDRL (San Mauro *et al.*, 2005).

En el reptil *Bipes biporus* se encuentra la única duplicación en tándem de genes codificantes de tRNAs conocida en vertebrados, la cual consiste en la repetición de los genes *trnT* y *trnP* y está ubicada entre *cytb* y la región control (Macey *et al.*, 1998).

En otros grupos de animales se han reportado cambios en el arreglo de los genomas mitocondriales, por ejemplo, se ha detectado una traslocación del gen *trnL* en insectos y crustáceos que los relaciona como grupos hermanos (Boore *et al.*, 1998). En un estudio en el que se analizaron especies de 42 géneros del orden Hymenoptera fueron detectados en la región entre los genes *atp8* y *cox2*, siete arreglos diferentes de genes de tRNAs que surgieron de forma independiente, por lo que se le considera un *hotspot* para los rearrreglos de genes (Dowton & Austin, 1999) (Fig. 11). Estos rearrreglos no son enteramente compatibles con el modelo TDRL y se ha sugerido que el poco estudiado fenómeno de recombinación intramitocondrial tuvo un papel en su origen (Dowton & Campbell, 2001)

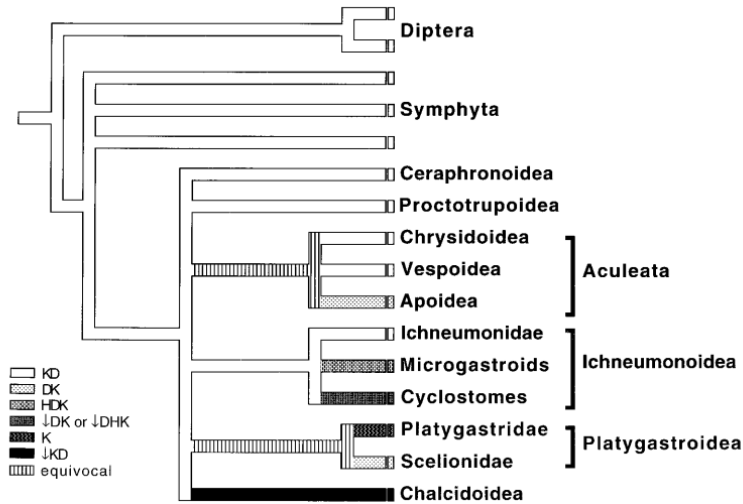
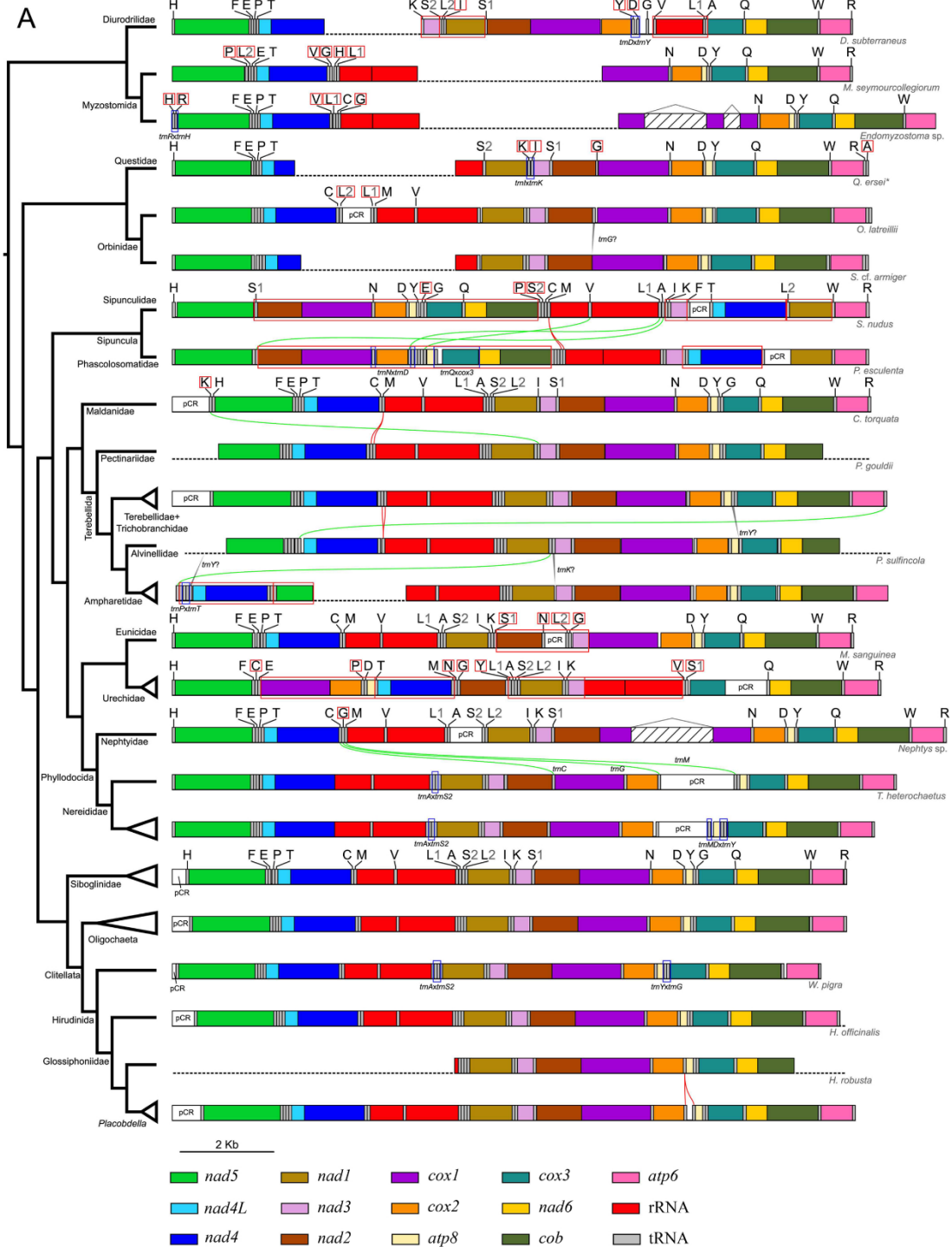


Fig. 11 Diferentes arreglos de genes presentes entre los genes *atp8* y *cox2* en el orden Hymenoptera. La flecha vertical (↓) indica que los genes cambiaron de cadena dentro de la molécula del DNA mitocondrial (Dowton & Austin, 1999).

De manera similar, se detectaron diferentes arreglos de genes entre *atp8* y *cox2* en especies del phylum Annelida (Fig. 12) (Oceguera-Figueroa, *et al.*, 2016). La condición plesiomórfica y de mayor prevalencia es la presencia de una sola copia de *trnD* entre *cox2* y *atp8*. Sin embargo, se han encontrado combinaciones alternativas en algunos grupos: algunas especies de la familia Urechidae (equiúridos) exhiben una traslocación de *trnP* junto al gen *trnD*. En la familia Nereididae fue detectada una traslocación del gen *trnM* y la región control (pCR). En Myzostomida, el gen *trnD* está totalmente ausente entre *cox2* y *atp8*, dejando estos genes uno junto al otro, mientras que en sipuncúlidos de la familia Phascolosomatidae los genes *trnL*, *trnN*, *trnY*, *trnG*, *trnE* y *trnV* ocupan esa posición.

Dentro de las sanguijuelas, la condición dominante es la de una sola copia de *trnD* entre *cox2* y *atp8*. Sin embargo, en *P. lamothei* y *P. parasitica* fue encontrada una duplicación del gen *trnD*, también ubicada entre los genes *atp8* y *cox2*. Esta duplicación no está presente en ningún otro genoma mitocondrial del phylum Annelida publicado a la fecha. Ambas copias del gen dan origen a tRNAs con estructura secundaria regular y completamente funcionales en apariencia. Sin embargo, mientras que en *P. parasitica* no se observó ningún espaciamiento entre ambas copias, en *P. lamothei* existe un espacio de 128 pares de bases no codificantes entre ellas. Mientras que en *P. parasitica* ambas copias

contienen un anticodón GUC, en *P. lamothei* una de ellas se ha modificado y posee el anticodón AUC (Fig. 13) (Oceguera-Figueroa *et al.*, 2016).



A hotspot for mitochondrial *trnD* duplication-deletion events in the leech genus *Placobdella* (Annelida: Clitellata: Glossiphoniidae)

Jiménez-Armenta J^{1,2}, Kvist S^{3,4} and Ocegüera-Figueroa A²

¹ Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, México, C.P. 04510.

² Laboratorio de Helmintología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer circuito s/n, Ciudad Universitaria, Copilco, Coyoacán, Ciudad de México, México, C.P. 04510.

³ Department of Natural History, Royal Ontario Museum, 100 Queen's Park, Toronto, Ontario M5S 2C6, Canada.

⁴ Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Toronto, 25 Willcocks Street, Toronto, Ontario, M5S 2B4, Canada.

Corresponding author: Ocegüera-Figueroa A, aocegüera@ib.unam.mx

Abstract

With few exceptions, animal mitochondrial genomes are impressively conserved with regards to gene arrangement. In some instances, specific genomic “hotspot” regions present elevated levels of accumulation of gene order variation for certain taxonomic groups. This is the case for the region between the genes *cox2* and *atp8* across Annelida and is especially conspicuous in members of the genus *Placobdella*, for which duplications and deletions of *trnD* were detected. Sampling of 21 species of *Placobdella* broadly collected in Canada, USA, Mexico and Portugal, revealed that the *trnD* duplication is restricted to the species of the genus and has been independently lost on five occasions. In species with the duplicated *trnD*, great variation in the size of insertions between both copies, in the secondary structure of the *trnD* products, and in their respective anticodon were found. In *Placobdella rugosa*, *Placobdella ringueleti* and *Placobdella lamothei*, samples collected from different localities exhibit different gene arrangements, revealing an unexpected amount of intraspecific variation. We report the first empirical case of a hotspot for tRNA genes duplication-deletion at the species level and, to our knowledge, the first study of such changes in a phylogenetic context.

Keywords: Mitochondrial genes, gene rearrangement, *trnD*, hotspot, *Placobdella*, leeches

Introduction

Most animal mitochondrial genomes are circular molecules composed of approximately 15,000 base pairs (bp) and containing 37 coding genes: 13 protein coding genes, 2 rRNA subunits and 22 tRNAs [1]. The order and arrangement of mitochondrial genes is typically fully conserved across animal diversity, although some rearrangements do exist [1-2]. One of the mechanisms that has been proposed to explain mitochondrial gene rearrangements is the so-called “tandem duplication-random loss model” (TDRL), which consists of the duplication of a gene or group of genes followed by the disappearance of redundant copies via the accumulation of random mutation in any one of the copies [3-4]. This model has been invoked particularly in cases that involve movement of tRNAs within restricted boundaries and without changing strands in the mitochondrial genome [5]. Presence of pseudogenes or intergenic nucleotides is considered evidence for the TDRL model [6]. Rearrangements in support of the TDRL model have been detected in the five tRNAs that form the WANCY region in species of mammals, amphibians and fishes [6-8]. Another example is found in the reptile *Bipes biporus* Cope, 1894, in which a tandem repetition of the genes *trnT* and *trnP*, located between *cytb* and the control region, has been characterized [3].

In a previous study involving species of 42 genera from Hymenoptera, a “hotspot” for mitochondrial gene rearrangements was detected between *cox2* and *atp8* involving seven fully different arrangements arisen independently [9], which were ascribed to events of intramitochondrial recombination [10]. A similar phenomenon has been detected across species of Annelida, where rearrangements were also detected between the *cox2* and *atp8* genes [11]. The plesiomorphic, and most prevalent, condition in Annelida is the presence of a single copy of the *trnD* gene between *cox2* and *atp8*. However, alternative combinations were detected for some groups (see [11]). In two leech species of the genus *Placobdella*: *Placobdella parasitica* Say, 1824 and *Placobdella lamothei* Ocegüera-Figueroa and Siddall, 2008, a duplication of *trnD* was found between *cox2* and *atp8*, with both copies forming a typical tRNA secondary structure [11]. However, whereas both *trnD* copies in *P. parasitica* were found next to each other without separating nucleotides, in *P. lamothei* a sequence of

128 bp was found between the two copies. Furthermore, whereas both *trnD* copies contain a GUC anticodon in *P. parasitica*, in *P. lamothei*, the second copy following 5'-3' direction has an AUC anticodon. This is the only instance of duplication of *trnD* that has so far been detected in Annelida.

The genus *Placobdella* resides within the family Glossiphoniidae and currently includes around 24 nominal species, all of which are strictly haematophagous and are distributed across North America (including Canada, USA and Mexico), with a single species recorded from Europe (*Placobdella costata* Müller, 1846) [12-15]. Species of *Placobdella* feed mainly on freshwater turtles and opportunistically on amphibians, birds and mammals [16-18]

In the present study, we aim to investigate the potential of the *trnD* duplication found between the *cox2* and *atp8* genes as a synapomorphy for the genus *Placobdella* including almost all of the recognized species diversity, as well as to characterize the variation of this duplication for each taxon and to provide a phylogenetic framework to understand this variation. Also, we aim to provide further information through the characterization of this specific mitochondrial region of several leech species representing the major clades of Hirudinea to test if the presence of this *trnD* duplication is restricted to *Placobdella*.

Material and Methods

Specimen collection

Specimens were collected during field collection trips from 2015 to 2018 to several Canadian provinces, and states in the US and Mexico – individuals were commonly collected from the undersides of rocks and other debris or attached to turtles. In addition, several specimens of *Placobdella* spp. were donated from the collections at the American Museum of Natural History. All specimens were identified using taxonomic keys and specialized literature [17, 19-22]. Five specimens belong to undescribed species, and these are labeled here as *Placobdella* sp. 1 - 5 followed by an acronym of their collection locality.

Sequencing and gene predictions

Total DNA was extracted using a DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA) in accordance with the manufacturers protocol from 43 individuals, representing 21 species of *Placobdella*, and 15 non-*Placobdella* species. The region between the genes *cox2* and *atp8* was amplified using two pairs of primers designed specifically for the present study (Table 1). Primers were designed based on previously published mitochondrial genomes of *Placobdella parasitica* Say, 1824, *Placobdella lamothei* Ocegüera-Figueroa and Siddall 2008 and *Haementeria officinalis* de Filippi, 1849 (GenBank accession numbers LT159849, LT159850 and LT159848, respectively). Different tools were used to design the primers, including Primer-BLAST [23], FastPCR v 6.6.28 [24] and manual comparison of sequences to find primers targeting coding genes upstream and downstream from the area of interest. Forward primers were located in *cox2* and *trnN* and reverse primers were located in *cox3* and *trnY*. Primers *TrnDF* and *TrnDR* were used together and as an alternative to *F_trnN* and *R_trnY*. Details can be found in Table 1. Polymerase chain reactions (PCR) were conducted to amplify the selected fragments; the thermoprofile was as follows: an initial denaturation at 94 °C (2 min), followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C (30 sec), annealing at 52 °C (40 sec) and extension at 72 °C (1 min), with a final extension of 4 min at 72 °C for all samples. PCRs were performed in a 12.5 µl volume containing 1.25 µl Buffer EH, 0.28 µl dNTPs, 0.5 µl of each primer, and 0.05 µl Platinum™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). PCR products were purified using ExoSAP-IT (Affymetrix) following the protocol suggested by the manufacturer before performing cycle sequencing with BigDye, ethanol precipitation and sequencing of both strands on an ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). DNA sequences were reconciled and edited in Geneious 11.1.3 (<https://www.geneious.com>). All DNA sequences generated by the present study were deposited in GenBank under accession numbers MK789600-MK789637. Additionally, the dataset was augmented by the addition of seven complete leech mitochondrial genomes, available on GenBank (Table 2).

Table 1. Primers designed for this study

Primer name	Sequence	Matching site
<i>TrnDF</i>	5' – ATAGATGCAATTCCAGGCCG – 3'	<i>cox2</i>
<i>TrnDR</i>	5' – AGAGCGGATGTTARRGGYCATGG – 3'	<i>cox3</i>
<i>F_trnN</i>	5' – AAAGCAAATAAATTGCACCTA – 3'	<i>trnN</i>
<i>R_trnY</i>	5' – ACAGTTTACTGTYTATAWTTTCRACCATCT – 3'	<i>trnY</i>

Table 2. Species used in the present study, including the collection locality and GenBank accession numbers.

Species	Locality	Reference	GenBank accession number
Family Glossiphoniidae			
<i>Placobdella burresonae</i>	USA	This study	MK789618
<i>Placobdella costata</i>	Portugal	This study	MK789621
<i>Placobdella hollensis</i>	Frontenac Provincial Park, Ontario, Canada	This study	MK789606
<i>Placobdella kwetlumye</i>	Idaho, USA	This study	MK789622
<i>Placobdella lamothei</i>	Nuevo Urecho, Michoacán, Mexico	This study	MK789619
<i>Placobdella mexicana</i>	Querétaro, Mexico	This study	MK789623
<i>Placobdella montifera</i>	Friends Landing, Washington, USA	This study	MK789625

<i>Placobdella multilineata</i>	Cay Creek Wetlands, Georgia USA	This study	MK789603
<i>Placobdella nuchalis</i>	New York, USA	This study	MK789617
<i>Placobdella papillifera</i>	John Allen Pond, New York, USA	This study	MK789616
<i>Placobdella parasitica</i> (1)	Pearkes Lake, Ontario, Canada	This study	MK789604
<i>Placobdella parasitica</i> (2)	Algonquin Provincial Park, Ontario, Canada	This study	MK789605
<i>Placobdella phalera</i>	Clear Lake, Ontario, Canada	This study	MK789601
<i>Placobdella picta</i>	Kenny Lake, Ontario, Canada	This study	MK789609
<i>Placobdella ringueleti</i> (1)	Chiapas, Mexico	This study	MK789613
<i>Placobdella ringueleti</i> (2)	Yucatán, Mexico	This study	MK789626
<i>Placobdella rugosa</i> (1)	Moosomin Regional Park, Saskatchewan, Canada	This study	MK789610
<i>Placobdella rugosa</i> (2)	Paquette Lake, Ontario, Canada	This study	MK789600
<i>Placobdella rugosa</i> (3)	Kenny Lake, Algoma, Ontario, Canada	This study	MK789602
<i>Placobdella rugosa</i> (4)	South Frontenac, Ontario, Canada	This study	MK789607

<i>Placobdella rugosa</i> (5)	Duck Mountain Provincial Park, Manitoba, Canada	This study	MK789612
<i>Placobdella rugosa</i> (6)	Swan Lake, Nebraska, USA	This study	MK789608
<i>Placobdella sophieae</i>	Washington, USA	This study	MK789615
<i>Placobdella</i> sp.1 AL	Adams Lake, Saskatchewan, Canada	This study	MK789611
<i>Placobdella</i> sp. 2 CR	Canopus Ramp, New York, USA	This study	MK789627
<i>Placobdella</i> sp. 3 MA	Maryland, USA	This study	MK789624
<i>Placobdella</i> sp. 4 XX	----	This study	MK789620
<i>Placobdella</i> sp. 5 PC	Presa El Cuchillo, Nuevo León, Mexico	This study	MK789614
<i>Haementeria acuecuyetzin</i>	Yucatán, Mexico	This study	MK789636
<i>Haementeria officinalis</i>	Amealco, Querétaro, Mexico	This study	MK789634
<i>Helobdella elongata</i>	Tres Lagunas, Chiapas, Mexico	This study	MK789631
<i>Helobdella adiaastola</i>	Cocaná, Tabasco, Mexico	This study	MK789632
<i>Helobdella adiaastola</i>	Río San Juan, Nuevo León, Mexico	This study	MK789635

<i>Helobdella</i>	Catemaco,	This study	MK789630
<i>virginiae</i>	Veracruz, Mexico		
<i>Helobdella</i>	----	[37]	AF178680
<i>robusta</i>			
Family Piscicolidae			
<i>Zeylanicobdella</i>	----	[38]	NC035308
<i>arugamensis</i>			
Family Ozobranchidae			
<i>Ozobranchus</i>	Isla Aguada,	This study	MK789637
<i>branchiatus</i>	Campeche, Mexico		
<i>Ozobranchus</i>	Jieyang,	[39]	KY861060
<i>jantseanus</i>	Guangdong, China		
Family Hirudinidae			
<i>Hirudinaria</i>	-	-	KC688268
<i>manilensis</i>			
<i>Hirudo nipponia</i>	-	[40]	KC667144
<i>Hirudo</i>	Volkovo, Saratov,	[41]	KU672396
<i>medicinalis</i>	Russia		
<i>Hirudo verbana</i>	Manych Lake,	[41]	
	Stavropol Krai,		
	Russia		
Family Erpobdellidae			
<i>Erpobdella</i>	Xochimilco,	This study	MK789629
<i>ochoterenai</i>	CDMX, Mexico		
<i>Erpobdella</i>	Michoacán, Mexico	This study	MK789633
<i>kwente</i>			

Gene predictions were performed in the MITOS Web Server (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>) [25]. Secondary structure of each tRNA was inferred using the invertebrate mitochondrial genetic code in tRNAScan-SE

(<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) [26]. All alignments employed MAFFT ver. 7 [27] as implemented in Geneious 11.1.3, with default settings.

Phylogenetic analysis

Three phylogenetic trees were generated for two different datasets: (i) a maximum likelihood-based species-level phylogeny for *Placobdella* using four separate loci; (ii) a maximum likelihood-based phylogeny using each of the inferred *trnDs* (*trnD1-4*) as terminals; and (iii) a Bayesian inference-based (BI) phylogeny for *trnD1-4*. For inferring the phylogenetic relationships between studied leeches, we used a modified version of the data matrix constructed by de Carle et al. [19], consisting of three mitochondrial (*cox1*, *nd1* and 12S rDNA) and one nuclear (Internal Transcribed Spacer [ITS]) marker. Our matrix included 25 *Placobdella* species as well as every non-*Placobdella* species for which we had complementary data for the region between *atp8* and *cox2*; the trees were rooted using *Acanthobdella peledina* following Tessler et al. [28]. The alignment was performed using MAFFT ver. 7 and default settings. For the ML analyses, PartitionFinder ver. 1.1.1 [29] was used to determine the best-fitting models of nucleotide evolution. All loci were separately assessed, and, for coding genes, each codon position was partitioned. A general time reversible (GTR) model and GAMMA distribution of rate heterogeneities with an estimated proportion of invariable sites was suggested for all partitions. The phylogenetic analysis was performed in RAxML ver. 8 [30], employing 1000 iterations with 25 initial GAMMA rate categories and final optimization using four GAMMA shape categories. Branch support was estimated using 1000 rapid bootstrap replicates.

Additionally, ML and BI analyses were performed based on all available leech sequences for *trnD1-4* and the tree was rooted using the oligochaete *Pontoscolex corethrurus* Müller, 1857. The best-fitting model of nucleotide evolution was obtained using JModelTest 2.1[31], which suggested an HKY model and GAMMA distribution of rate heterogeneities. This dataset was analyzed using maximum likelihood in PhyML 3.0 [32] using Nearest Neighbor Interchanges method for branch swapping and a starting tree inferred from a neighbor-joining algorithm. The BI analysis was conducted in MrBayes 3.2 [33], using the same model of nucleotide evolution, as well as prior settings suggested by

JModelTest. The heuristic search consisted of 10 million generations with trees sampled every 1000 generations and burn-in set to 25%.

Ancestral state reconstruction

The species-level phylogenetic hypothesis, resulting from the ML analysis detailed above, was used for the ancestral state reconstructions. We included the newly compiled duplication data for the 29 *Placobdella* specimens (representing 21 species), as well as 16 additional leech species for which a single copy of the *trnD* has previously been confirmed. We used both parsimony and ML-based reconstruction methods in Mesquite 3.51 [34] for the ancestral states, employing the MK1 model for the latter. A character state matrix was constructed considering two states: evidence of any sort of *trnD* duplication *versus* a single *trnD* copy.

Results and Discussion

Sequence variability, composition and secondary structure

In total, 40 leech samples representing 37 species of Hirudinida were sequenced for the region between *cox2* and *atp8*. A total of 21 species of the genus *Placobdella* are represented in the final dataset. In addition, 16 sequences representing non-*Placobdella* species were included. Gene arrangements of the mitochondrial genome segment running from *cox2* to *atp8* mapped on the phylogenetic tree we built can be found in Fig. 1. All the non-*Placobdella* samples presented a single copy of the *trnD* gene (hereinafter named *trnD1*). A second copy (*trnD2*, following 5'-3' direction) was detected in 17 species of *Placobdella*, making it the only leech taxon in which such rearrangements can be found. In addition, a single copy of *trnD* (*trnD1*) was also found in six species of *Placobdella*: *P. nuchalis*, *P. ringueleti*, *P. rugosa*, *P. phalera*, *P. sophieae* and *Placobdella* sp. 5 PC (undescribed species); in *P. phalera* and *P. sophieae*, an insertion of 57 and 72 bp, respectively, was detected between *trnD1* and *atp8*; in *P. nuchalis* a sequence of only 6 bp was detected in this intergenic region but in *P. ringueleti*, *P. rugosa* and *Placobdella* sp. 5 PC, *atp8* immediately follows *trnD*, without any nucleotide insertions.

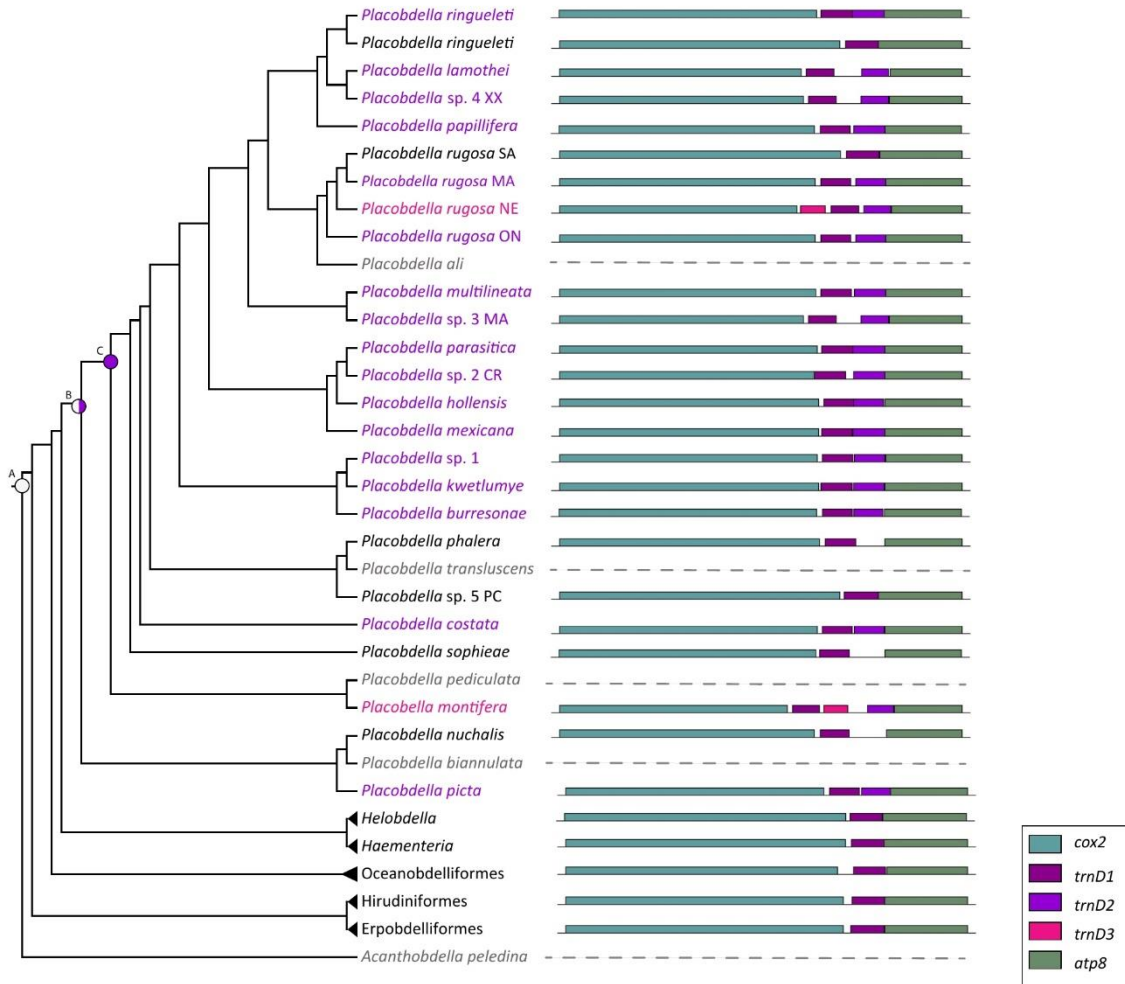


Fig. 1. Maximum Likelihood tree built based on 4 concatenated molecular markers (*cox1*, *nad1*, ITS and 12S). Tip names colored purple correspond to specimens un which *trnD2* was found. Those in pink possess, additionally, a *trnD3* or *trnD4* locus. Those in black possess only *trnD1* and the grey ones indicate lack of data. Each tip presents a diagram representing the order and length of genes between *atp8* and *cox2*. *Cox2* segment displayed is invariably 530 bp long and the sizes of the other genes in each diagram are proportional to it. Pie charts in specific nodes represent the character state predicted for that node, where purple indicates presence of *trnD2* and white, its absence.

The secondary structure of *trnD1* shows minimal differences between the sampled leeches, including *Placobdella* and non-*Placobdella* species. That is, all the *trnD1* copies possess the canonical anticodon for aspartic acid used in the invertebrate mitochondrial code

(GUC). In contrast, *trnD2* displays different levels of sequence variation and, consequently, differences in the predicted products.

The first level of variation is intraspecific: for *P. parasitica*, *P. ringueleti* and *P. rugosa*, two, two and six individuals were sequenced, respectively. Both samples of *P. parasitica* have *trnD* duplications with identical nucleotide composition and lacking any insertion between them. In *P. ringueleti*, one sample possessed a *trnD* duplication, though no secondary structure could be recovered for *trnD2*; the second sample had a single *trnD* copy without any separating nucleotide insertion between itself and *atp8*. The most remarkable finding occurs in *P. rugosa*, where five out of the six samples presented *trnD2* with a GUA anticodon (contrary to the GUC anticodon of *trnD1*) and one of them, collected in Nebraska, USA, shows traces of a third degenerated tRNA (*trnD3*) between *cox2* and *trnD1*; this third locus is only 57 bp in length. The sixth sample of *P. rugosa*, collected in Saskatchewan, Canada, lacks *trnD2* and *trnD3*, and does not possess any nucleotide insertions between *trnD1* and *atp8*. Note that these *P. rugosa* specimens have previously been shown to belong to the same species using a variety of data [19, 35].

Regarding the highly variable *trnD2*, only four species possess the conventional GUC anticodon characteristic of *trnD1*: *P. hollensis*, *P. multilineata*, *P. mexicana* and *P. parasitica*. The latter presents an abnormal loop in the anticodon stem caused by the mismatch between 2 uracil residues. Interestingly, in our multilocus phylogenetic analysis (Fig. 1), the first three species form a monophyletic group that may suggest that natural selection is acting against changes at least in that clade. In the remaining *Placobdella* species with duplicated *trnDs*, the anticodons in *trnD1* and *trnD2* are different (Fig. 2); in *P. rugosa* collected in Ontario, Manitoba and Nebraska, the anticodon GUA (corresponding to tyrosine) was detected in *trnD2* with a short anticodon stem, consisting of only 2 bp, as opposed to the 3 bp or 4 bp that are usually present. The maintained functionality of this tRNA is arguable. In addition, a GUU anticodon, corresponding to asparagine, is predicted for *trnD2* from *Placobdella* sp.1 AL (undescribed species), and the gene product displays a regular secondary structure and is presumably functional. In *P. kwetlumye*, *trnD2* possesses an ACU anticodon (corresponding to serine) and displays a regular secondary structure, making it the most divergent *trnD2* that still apparently maintains functionality. This pattern strongly suggests that purifying

selection is particularly strong in *trnD1*, precluding any mutation, whereas it is relaxed in additional copies, probably due to gene redundancy. In the remaining seven species, *trnD2* was detected by MITOS, but tRNAScan-SE was unable to recover a predicted secondary structure. This seems to be a product of the accumulation of random mutations at a magnitude that would preclude the maintenance of regular tRNAs.

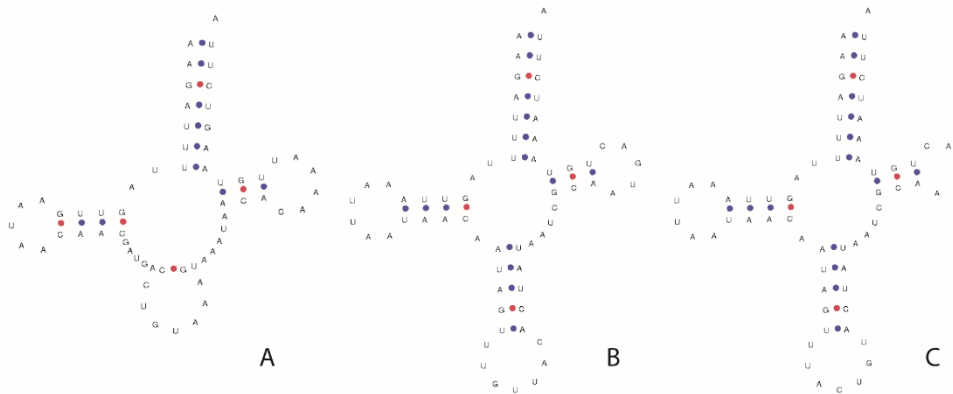


Fig. 2. Predicted secondary structures of the products of *trnD2* in samples that present substitutions in the GUC canonical anticodon. (A) *P. rugosa*, samples from Ontario, Manitoba and Nebraska; (B) *Placobdella* sp. 1 AL; (C) *P. kwetlumye*.

Surprisingly and contrary to the condition found in all other cases, we detected only one case (*Placobdella* sp. 2 CR) in which *trnD1* has accumulated mutations and *trnD2* has not. In this case, no secondary structure can be recovered for *trnD1*, even though the gene was detected. The *trnD* alignment revealed that in *Placobdella* sp. 2 CR, a fragment of 19 bp of *trnD1* was apparently translocated from the 3' end to the 5' end, making it non-functional but still recognizable. Also, the first 8 bp of *trnD1* overlap with the 5'-end of *cox2*. This is consistent with the TDRL model, yet it is still unknown why *trnD2*, and not *trnD1*, is most frequently targeted for the process of pseudogenization.

A *Placobdella*-specific combination of 12 nucleotides was found in all *trnD1* and *trnD2* sequences, representing a molecular signature that can be used to distinguish these from other tRNA coding genes. Six of the 12 nucleotides are contiguous (TTAGTT) (Fig. 3 and Fig. 4). This signature is present in all *trnD1* and *trnD2* but absent in *trnD3* and *trnD4*.

It is also absent in all the other tRNAs of leech mitochondria analyzed to date. The presence of this genetic signature strongly supports the notion that *trnD2* is the outcome of a tandem duplication event of *trnD1* and not the result of a translocation event of another mitochondrial tRNA with subsequent modification to structure, as might be suggested. Discarding the possibility of *trnD2* resulting from a translocation event, analyses of two complete mitochondrial genomes reported in Ocegüera-Figueroa et al. (2016) show, that in addition to all taxa having a *trnD1* + *trnD2* makeup, all the remaining 21 tRNAs are present as single copies with conserved positions across Clitellata (with two tRNA inversions in *Whitmania pigra*). It is worth noting that, in *P. sophieae* and *P. phalera*, where we could only detect a single *trnD* copy, this copy is separated from *cox2* by an insertion that lacked the defining signature otherwise present in *trnD2*.

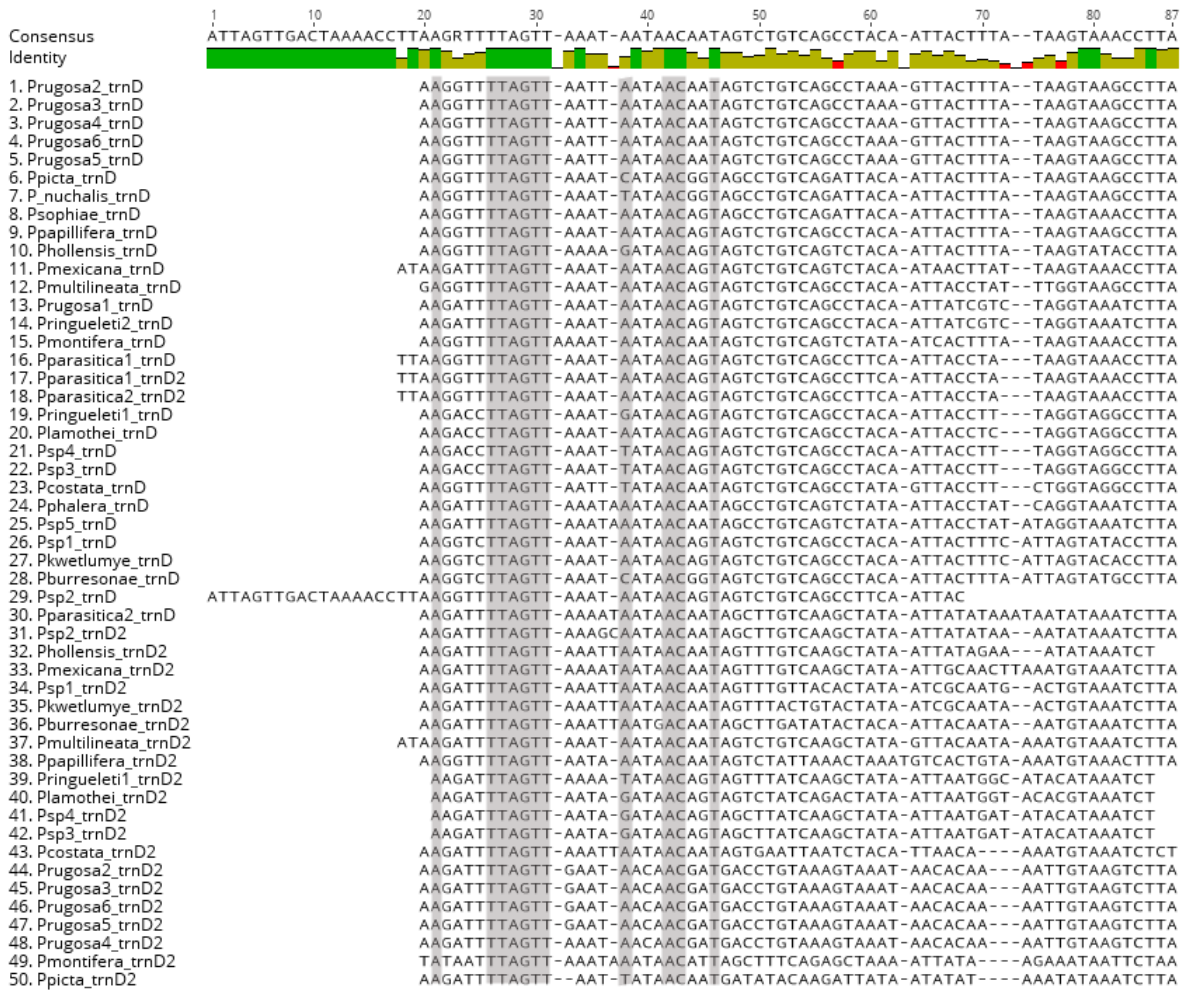


Fig 3. Genetic signature of the *trnD1/trnD2* genes of *Placobdella* species highlighted in an alignment.

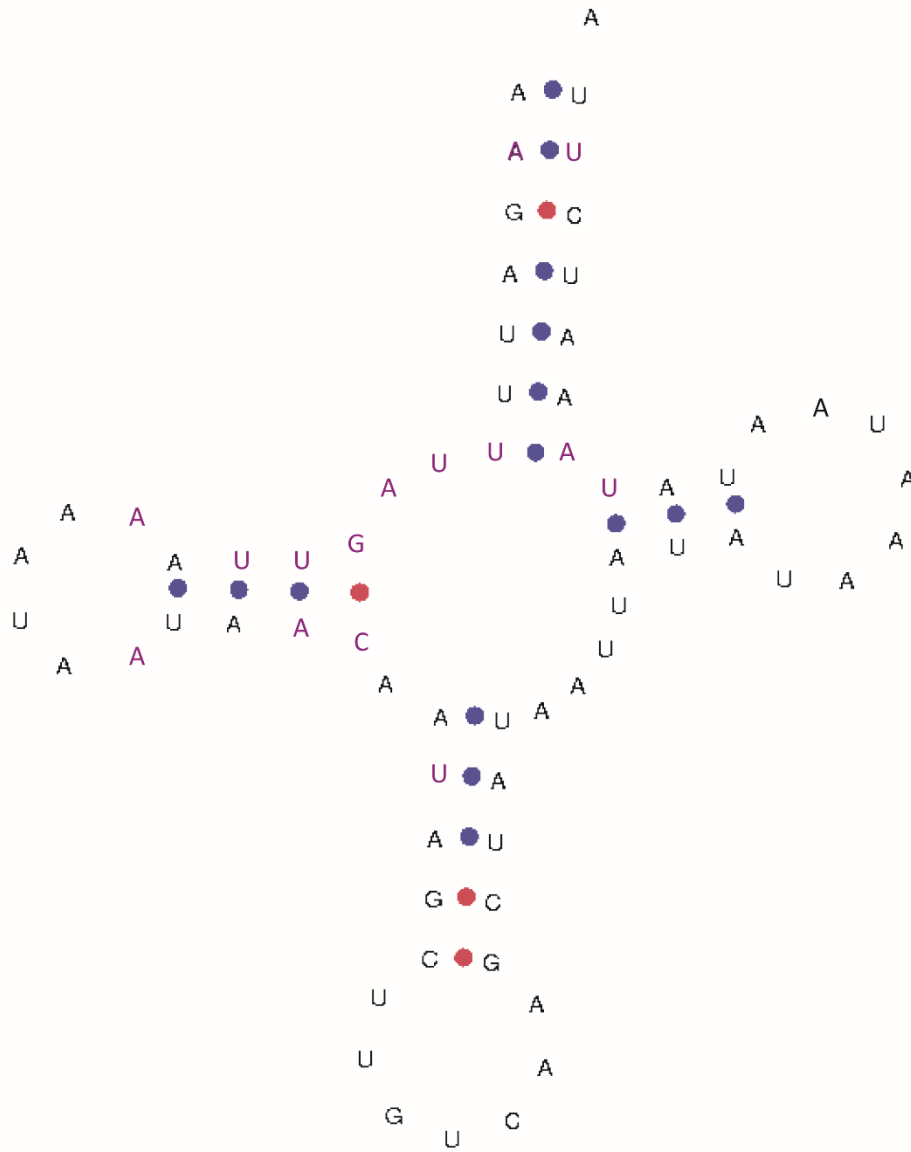


Fig. 4. Position of the conserved nucleotides in the *P. parasitica* *trnD* product (highlighted in purple).

In addition to the signature of a third copy of *trnD* in *P. rugosa* from Nebraska, we also found signature of an additional, highly degraded tRNA coding gene in *P. montifera*. These loci are labeled *trnD_{sio3}* and *trnD₄*, respectively. Whereas in *P. rugosa*, the *trnD₃* is located between *atp8* and *trnD₁*, in *P. montifera*, *trnD₄* is located between *trnD₁* and *trnD₂*. It is interesting to note that *P. rugosa* and *P. montifera* are not sister taxa in the phylogenetic hypothesis, suggesting that these conditions may have evolved independently. These *trnD* copies do not possess the 12 bp signature that otherwise unambiguously identifies *trnD₁* and *trnD₂* and, as a result, the origin of the third copy cannot with certainty be attributed to the TDRL model but is possibly a product of pseudogenization, such that the signature has been completely eroded.

Phylogenetic signal in the gene order

Based on a phylogenetic tree recovered from a maximum likelihood (ML) analysis of 4 concatenated genes (*cox1*, *nad1*, 12s and ITS), including 29 *Placobdella* samples in addition to 16 non-*Placobdella* leeches (most of which also carried information regarding the region between *cox2* and *atp8*), we mapped and inferred the evolutionary changes of the *trnD* region (Fig. 1). In an ancestral state reconstruction analysis, two states were codified (presence or absence of genes additional to *trnD₁* between *cox2* and *atp8*). In this analysis, *P. sophiae* and *P. phalera* were coded as possessing a *trnD₂* locus due to the intergenic space putatively suggesting its previous presence. The most parsimonious character history optimization for the last common ancestor of *Placobdella* was ambiguous (Fig. 1; node B), whereas the ML optimization analysis returned a 54% probability of an additional *trnD* gene being present in the most recent common ancestor of the genus. In the second most-inclusive node within the *Placobdella* clade, both parsimony and ML state reconstruction methods recover a duplication of *trnD* as the inferred ancestral state (Fig. 1, node C).

In this phylogenetic context, interpretation of the unexpected variation in the number and diversity in and between the various *trnD* copies detected across *Placobdella* clearly suggests that the presence of either a single *trnD* copy or three *trnD* copies (or pseudogenes) have arisen by independent events from a two-copy plesiomorphic condition in a common ancestor. The fact that *Placobdella* species with a single *trnD* (including *P. nuchalis*, *P.*

ringueleti, *P. rugosa*, *P. phalera*, *P. sophieae* and *Placobdella* sp. 5 PC), as well as species with a third *trnD* copy (including *P. montifera* and one sample of *P. rugosa*) do not form reciprocally monophyletic groups is partially compatible with the random gene loss notion of the TDRL model of evolution. However, losses of function is chiefly restricted to *trnD2*, *trnD3* or *trnD4* with one exception: *trnD1* is apparently not functional in *Placobdella* sp. 2.

The paucity of mitochondrial gene rearrangements in animals, coupled with the fact that *Placobdella* is the only taxon in which a tandem duplication of any mitochondrial tRNA gene has been detected, further supports the notion that the common ancestor of the species of the genus possessed two copies of *trnD*; this is also suggested by the ML-based ancestral state reconstruction methods presented herein (Fig. 1.; node B), and partially by the parsimony optimization that resulted in an ambiguous (50%) assignment for the most ancestral node. Furthermore, in the second most inclusive node in the *Placobdella* clade (Fig. 1; node C) our analyses unambiguously predicted an ancestral state of two copies of *trnD* – with subsequent losses, as well as gains of a third *trnD* copy. In all of our 16 DNA sequences derived from non-*Placobdella* species, including members of all currently recognized suborders of Hirudinida (*sensu* Tessler et al. 2018) except for Americobdelliformes for which no information is available, a single copy of the *trnD* gene was detected between *cox2* and *atp8*. Indeed, this is the case also for the sister group of *Placobdella*, which is comprised of the genera *Helobdella* and *Haementeria* [19]. Therefore, whereas the *trnD* duplication is not present in all individuals of *Placobdella* sampled, all the available information supports that the plesiomorphic condition for the whole genus is the two copies state, that subsequently transformed to a single or 3-4 copies.

Relationships between trnD copies

We also performed phylogenetic analyses (Bayesian inference [BI] and ML) using each *trnD* as a separate terminal regardless of its position in the mitochondrial genome, with 69 terminals in total, 52 of which belonged to *Placobdella* spp. These analyses failed to recover

sequences obtained from the same individual/species as monophyletic groups, as could be expected if concerted evolution between copies of *trnD* was a significant driver of change. Furthermore, both phylogenetic methods failed to recover monophyletic groups formed exclusively by *trnD1*, *trnD2*, *trnD3* or *trnD4*, further supporting the notion that these copies were formed by duplication events, rather than independent acquisitions of the copies. In the ML analysis, *Helobdella trnD* sequences of four species appeared in different positions within the *Placobdella* clade; *trnD1* and *trnD2* from different species appear together in the same clade; and sequences from the same species appear in different places of the tree (Fig. 5). In the BI topology (Fig. 6), almost all *trnD1*, *trnD2* and *trnD3* copies form a polytomy, with only minor subclades showing signs of support. Neither of the inference methods show trees in which *trnD2* is a monophyletic group separate from *trnD1*, nor do any of them show a sister taxon relationship between *trnD1* and *trnD2* copies derived from the same species (except for *P. parasitica*).

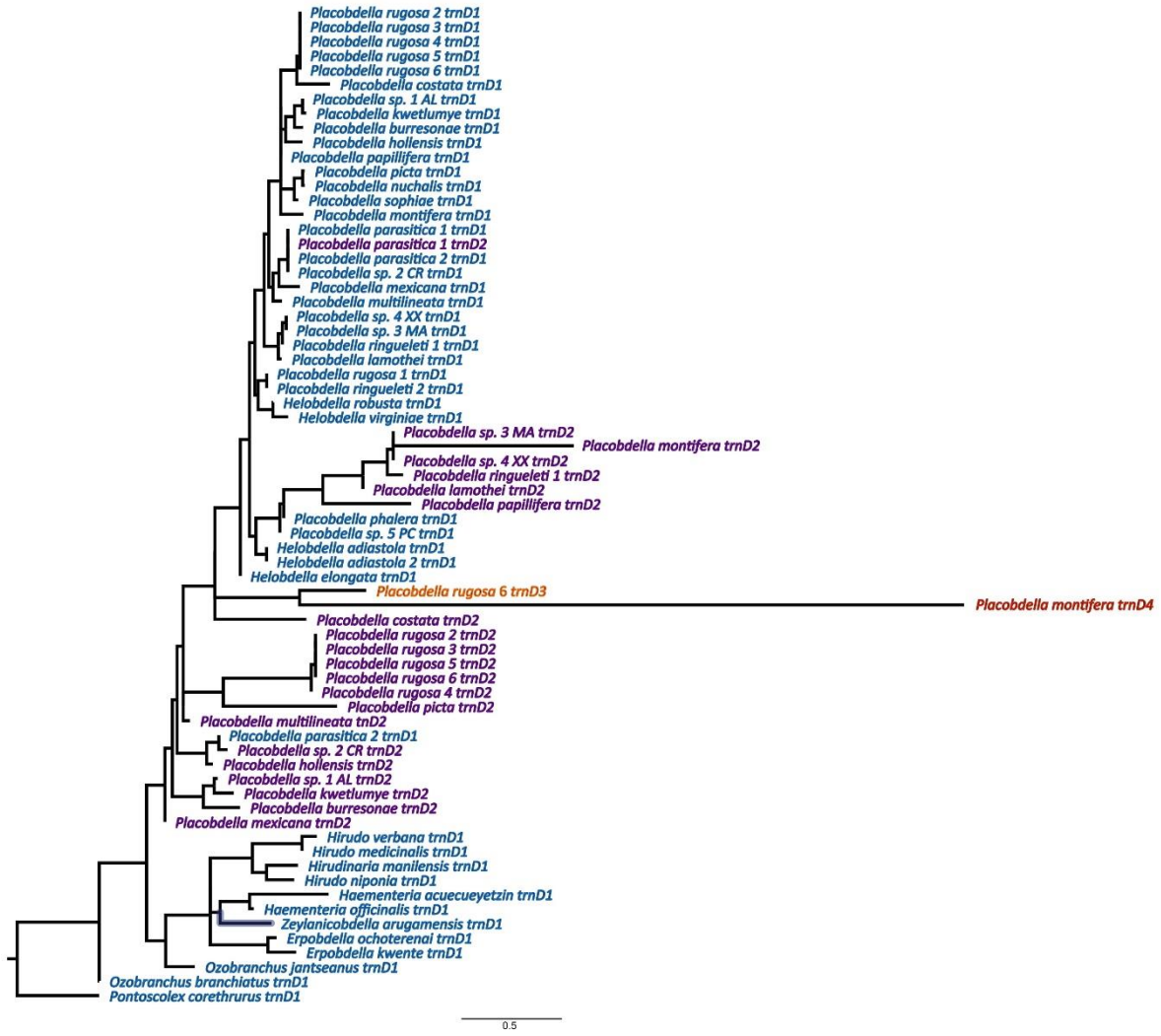


Fig. 5. Maximum Likelihood inferred relationships for all the *trnD1-4* sequences known to date.

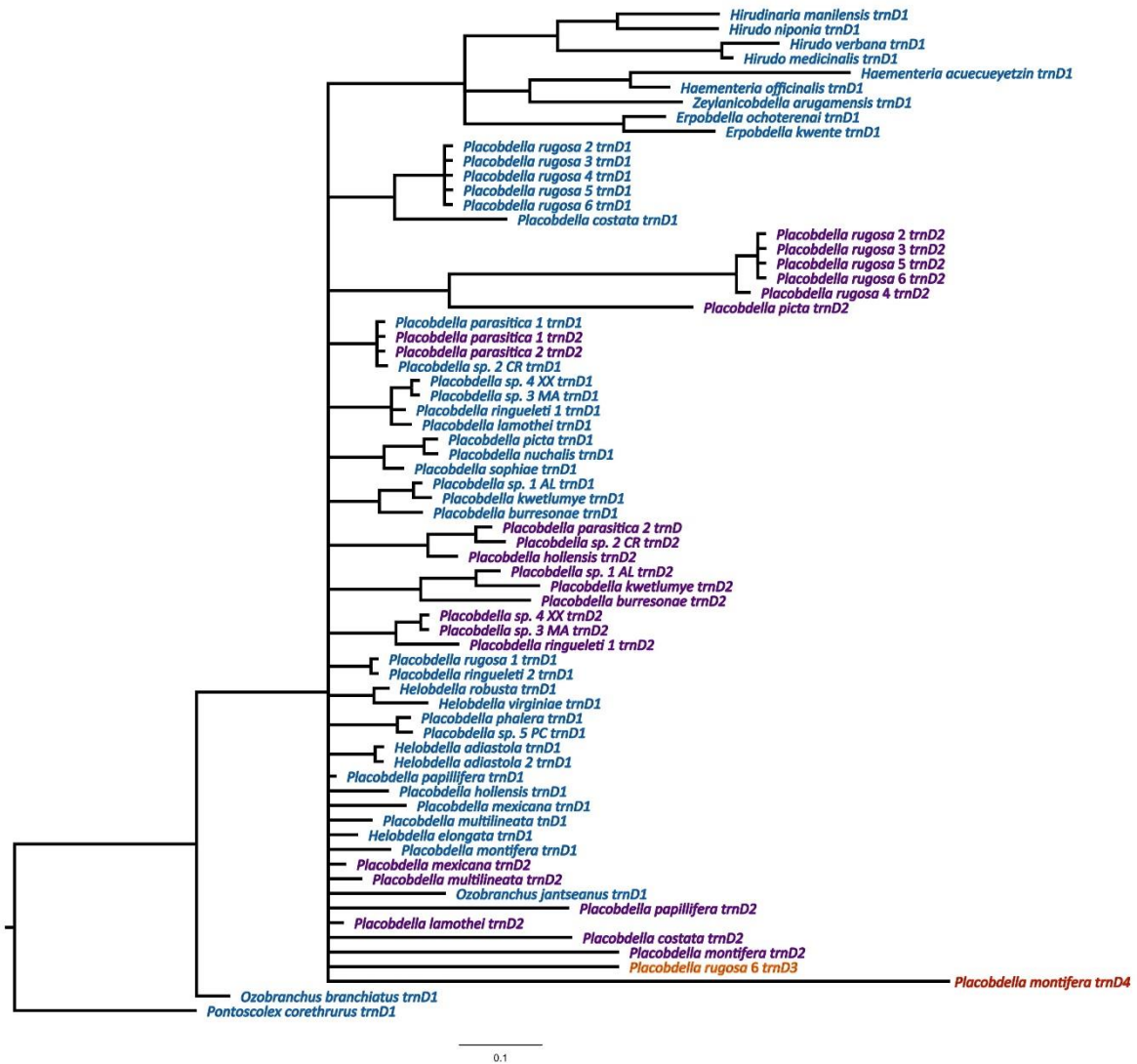


Fig. 6. Bayesian Inference relationships obtained for all the *trnD1-4* sequences known to date.

Under the assumption that all genes within a single mitochondrion are linked and that the organelles function as single chromosomes, coupled with the hypothesis that duplicated genes undergo concerted evolution to the point that gene copies are virtually identical within a single species (see [36]), it is expected that a phylogenetic analysis using each copy of *trnD* as a terminal would result in a tree with different *trnD* copies grouped according to their respective species. If a tree with no structure or different arrangement is recovered, a different explanation should be provided for the differentiated evolution of copies. Our phylogenetic

analysis using *trnD1*, *trnD2*, *trnD3* and *trnD4* as terminals discards the possibility of concerted evolution in this part of the genome and, more importantly, suggests that different mechanisms of evolution occur in different copies of the *trnD* gene, even though they are physically present in the same genome and are located next to each other. The fact that sequences from the same species are not grouped as sisters strongly suggests the random process of pseudogenization.

The fact that all *trnD* copies are located on the same strand of the mitochondrial genome, that these duplicated genes are arranged in tandem, and the evidence of strong pseudogenization, particularly in *trnD2*, clearly correspond to a TDRL model [5] of evolution for this particular region. The frequency at which gene rearrangements seem to be occurring (we recovered different arrangements even between populations of the same species) is arguably elevated enough to consider this region a hotspot for gene rearrangements. Interestingly, this very same hotspot is shared by other groups of animals [9], although at a less-frequent rate of change than that identified in *Placobdella* species.

Acknowledgments

Andrea Jiménez Marín, Ofelia Delgado Hernández, Laura Márquez Valdelamar, Nelly López Ortíz, Oliver Haddrath and Kristen Choffe assisted in the generation of DNA sequences. Mark Siddall (AMNH) kindly provided several DNA samples of *Placobdella* species that were used in this study. This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (grant number IN210318 to AO-F); Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant number 220408 to AO-F, scholarship to JJ-A); Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (number); Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant (grant number 2016-06125 to SK). This work is a requirement to obtain the degree of Master in Biological Sciences the field of knowledge of Systematics in the Posgrado en Ciencias Biológicas of the UNAM.

References

1. Boore, JL. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*, 27:1767–1780. (doi:10.1093/nar/27.8.1767)
2. Jacobs HT, Asakawa S, Araki T, Miura KI, Smith MJ, Watanabe K. 1989. Conserved tRNA gene cluster in starfish mitochondrial DNA. *Curr Genet*, 15:193-206. (doi. 10.1007/bf00435506)
3. Macey JR, Schulte JA, Larson A, Papenfuss TJ. 1998. Tandem duplication via light-strand synthesis may provide a precursor for mitochondrial genomic rearrangement. *Mol Biol Evol*, 15: 71–75. (doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025849)
4. Boore JL, Macey JR, Medina M. 2005. Sequencing and Comparing Whole Mitochondrial Genomes of Animals. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data*, 311–348. (doi:10.1016/s0076-6879(05)95019-2)
5. Downton M, Cameron SL, Dowavic JI, Austin AD, Whiting MF. 2009. Characterization of 67 Mitochondrial tRNA Gene Rearrangements in the Hymenoptera Suggests That Mitochondrial tRNA Gene Position Is Selectively Neutral. *Mol Biol Evol*, 26:1607–1617. (doi:10.1093/molbev/msp072)
6. San Mauro D, Gower DJ, Zardoya R, Wilkinson M. 2005. Hotspot of Gene Order Rearrangement by Tandem Duplication and Random Loss in the Vertebrate Mitochondrial Genome. *Mol Biol Evol*, 23:227–234. (doi:10.1093/molbev/msj025)
7. Mueller RL, Boore JL. 2005. Molecular Mechanisms of Extensive Mitochondrial Gene Rearrangement in Plethodontid Salamanders. *Mol Biol Evol*, 22: 2104–2112. (doi:10.1093/molbev/msi204).
8. Miya M, Kawaguchi A, Nishida M. 2001. Mitogenomic Exploration of Higher Teleostean Phylogenies: A Case Study for Moderate-Scale Evolutionary Genomics with 38 Newly Determined Complete Mitochondrial DNA Sequences. *Mol Biol Evol*, 18:1993–2009. (doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003741)
9. Downton M, Austin AD. 1999. Evolutionary dynamics of a mitochondrial rearrangement “hot spot” in the Hymenoptera. *Mol Biol Evol*, 16: 298–309. (doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026111)

10. Downton M. 2001. Intramitochondrial recombination – is it why some mitochondrial genes sleep around? *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 269–271. (doi:10.1016/s0169-5347(01)02182-6)
11. Ocegüera-Figueroa A, Manzano-Marín A, Kvist S, Moya A, Siddall ME, Latorre A. 2016. Comparative Mitogenomics of Leeches (Annelida: Clitellata): Genome Conservation and Placobdella-Specific trnD Gene Duplication. *PLOS ONE*, 11(5), e0155441. (doi:10.1371/journal.pone.0155441)
12. Bielecki A, Cichočka J, Jabłoński A, Jeleń I, Ropelewska E, Biedunkiewicz A, et al. 2012. Coexistence of *Placobdella costata* (Fr. Müller, 1846) (Hirudinida: Glossiphoniidae) and mud turtle *Emys orbicularis*. *Biologia*, 67(4). (doi:10.2478/s11756-012-0069-y)
13. Arizza V, Sacco F, Russo D, Scardino R, Arculeo M, Vamberger M, Marrone F. 2016. The good, the bad and the ugly: *Emys trinacris*, *Placobdella costata* and *Haemogregarina stepanowi* in Sicily (Testudines, Annelida and Apicomplexa). *Folia Parasitologica*, 63. (doi:10.14411/fp.2016.029)
14. Ocegüera-Figueroa A, Pacheco-Chaves B. 2012. Registros de sanguijuelas de Costa Rica y clave para la identificación de las especies con redescrición de *Cylicobdella costaricae*. *Rev Mex Biodivers*, 83:946-957. (doi: 10.7550/rmb.31623)
15. Siddall ME, Budinoff RB, Borda E. 2005. Phylogenetic evaluation of systematics and biogeography of the leech family Glossiphoniidae. *Invert Syst*, 19:105-112. (doi:10.1071/is04034)
16. Moser WE, Bowerman J, Hovingh, P, Pearl CA, Ocegüera-Figueroa A. 2014. New Host and Distribution Records of the Leech *Placobdella sophieae* Ocegüera-Figueroa et al., 2010 (Hirudinida: Glossiphoniidae). *Comp Parasitol*, 81(2), 199–202. doi:10.1654/4678.1
17. Ocegüera-Figueroa A, Kvist S, Watson SC, Sankar DF, Overstreet RM, Siddall M E. 2010. Leech Collections from Washington State, with the Description of Two New Species of *Placobdella* (Annelida: Glossiphoniidae). *Am Mus Novit*, 3701:1–14. (doi:10.1206/3701.2)
18. Siddall ME, Gaffney ES. 2004. Observations on the leech *Placobdella ornata* feeding from bony tissues of turtles. *J Parasitol*, 90, 1186-1188. (doi:10.1645/ge-277r)

19. De Carle D, Ocegüera-Figueroa A, Tessler M, Siddall ME, Kvist S. 2017. Phylogenetic analysis of *Placobdella* (Hirudinea: Rhynchobdellida: Glossiphoniidae) with consideration of COI variation. *Mol Phylogenet Evol*, 114, 234-248. (doi:10.1016/j.ympev.2017.06.017)
20. Moser, WE, Govedich FR, Ocegüera-Figueroa A, Richardson DJ, Phillips AJ. 2016. Clitellata: Hirudinida and Acanthobdellida. Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, Fourth Edition. Volume II Keys to Nearctic Fauna. Edited by James H. Thorp and D. Christopher Rogers. Academic Press. (10.1016/b978-0-12-385026-3.00023-1)
21. Ocegüera-Figueroa A, Siddall ME. 2008. *Placobdella lamothei* n. sp. (Hirudinea: Glossiphoniidae), a new leech parasite of freshwater turtles from Estado de México, Mexico. *Rev Mex Biodivers*, 79.
22. Sawyer RT. 1986. Leech Biology and Behaviour: Feeding biology, ecology, and systematics. Oxford University Press.
23. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13,134. (doi:10.1186/1471-2105-13-134)
24. Kalendar R, Khassenov B, Ramankulov Y, Samuilova O, Ivanov KI. 2017. FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*, 109, 312–319. (doi:10.1016/j.ygeno.2017.05.005)
25. Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritsch G, Pütz J, Middendorf M, Stadler F. 2013. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol Phylogenet Evol*. 69:313-319. (doi:10.1016/j.ympev.2012.08.023)
26. Lowe TM, Chan PP. 2016. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res*, 44, W54-W57. (doi:10.1093/nar/gkw413)
27. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*, bbx108. (doi:10.1093/bib/bbx108)

28. Tessler M, De Carle D, Voiklis ML, Gresham OA, Neumann JS, Cios S, Siddall M E. 2018. Worms that suck: Phylogenetic analysis of Hirudinea solidifies the position of Acanthobdellida and necessitates the dissolution of Rhynchobdellida. *Mol Phylogenet Evol*, 127, 129-134. (doi:10.1016/j.ympev.2018.05.001)
29. Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B. 2016. PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution*, msw260. (doi:10.1093/molbev/msw260)
30. Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 1312-1313. (doi:10.1093/bioinformatics/btu033)
31. Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772–772. doi:10.1038/nmeth.2109
32. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O. 2005. PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res*, 33(Web Server), W557–W559. (doi:10.1093/nar/gki352)
33. Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*, 61, 539-542. (doi:10.1093/sysbio/sys029)
34. Maddison W, Maddison D. 2007. Mesquite 2. A modular system for evolutionary analysis. Available from <http://mesquiteproject.org>.
35. Mack, J., de Carle, D. & Kvist, S. Prey, populations, and the Pleistocene: evidence for low COI variation in a widespread North American leech. *Mitochondrial DNA Part A*, Accepted pending revisions.
36. Eberhard JR, Wright TF, Bermingham E. 2001. Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. *Mol Biol Evol*, 18, 1330-1342. (doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003917)
37. Boore JL, Brown WM. 2000. Mitochondrial genomes of *Galathealinum*, *Helobdella*, and *Platynereis*: sequence and gene arrangement comparisons indicate that

- Pogonophora is not a phylum and Annelida and Arthropoda are not sister taxa. *Mol Biol Evol*, 17, 87-106. (doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026241)
38. Wang Y, Huang M, Wang R, Fu L. 2018. Complete mitochondrial genome of the fish leech *Zeylanicobdella arugamensis*. *Mitochondrial DNA B*, 3, 659-660. (doi:10.1080/23802359.2017.1372699)
39. Liu X, Luo D, Zhao Y, Zhang Q, Zhang J. 2017. Complete mitochondrial genome of *Ozobranchus jantseanus* (Hirudinida: Arhynchobdellida: Ozobranchidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 2:232-233. (doi:10.1080/23802359.2017.1318684)
40. Xu Y, Nie J, Hou J, Xiao L, Lv P. 2016. Complete mitochondrial genome of *Hirudo nipponia* (Annelida, Hirudinea). *Mitochondrial DNA A*, 27, 257-258. (doi:10.3109/19401736.2014.883614)
41. Nikitina A, Babenko V, Akopian T, Shirokov D, Manuvera V, Kurdyumov A, [Kostryukova](#) E, Lazarev V. 2016. Draft mitochondrial genomes of *Hirudo medicinalis* and *Hirudo verbana* (Annelida, Hirudinea). *Mitochondrial DNA B*, 1, 254-256. (doi:10.1080/23802359.2016.1157774)

Discusión y conclusiones

A pesar de los niveles de variación a nivel interpoblacional e interespecífico hallados en la región estudiada del genoma mitocondrial de diferentes hirudínidos, al observar la filogenia es evidente que el fenómeno de rearrreglo génico está restringido al grupo monofilético *Placobdella*, lo que convierte a este género en el único grupo taxonómico en el que se ha observado la duplicación en tándem de un solo gen codificante para tRNA en el DNA mitocondrial. El estudio de Ocegüera-Figueroa *et al.* (2016) ofreció una primera aproximación a este fenómeno y la primera evidencia de variación en esta región. El presente estudio profundiza sobre el fenómeno, revelando un nivel de variación no observado previamente.

Las especies externas al género *Placobdella* que fueron incluidas en este estudio representan 4 de los 5 subórdenes dentro de Hirudinida propuestos por Tessler *et al.* (2018), exceptuando Americobdelliformes. En todos estos casos, se presenta una sola copia del gen *trnD* (*trnD1*) en una configuración *cox2 – trnD1 – atp8*. En la mayoría de los ejemplares de *Placobdella* es detectable una segunda copia de *trnD* (*trnD2*), generalmente en una configuración *cox2 – trnD1 – trnD2 - atp8* (Fig. 1 del artículo).

Todos los genes *trnD1* y *trnD2* conocidos de *Placobdella* comparten en su secuencia 12 pb en la misma posición, de los cuales 6 son contiguos (TTAGTT). Consideramos esta evidencia una fuerte señal del origen de *trnD2* por duplicación de *trnD*, al no haber hallado esta combinación de pb en ningún otro tRNA conocido para sanguijuelas y lo denominamos una firma genética que permite la diferenciación de estos genes de otros codificantes de tRNAs.

Por otro lado, es notable la pérdida de *trnD2* en 6 especies del género *Placobdella*. De estas, en *P. nuchalis*, *P. ringueleti* (2), *P. rugosa* (1) y *Placobdella* sp. 5 PC, la distancia entre *trnD1* y *atp8* es igual o menor a 6 pb por lo que de haber habido un gen *trnD2* en ese sitio, sufrió una delección total. Por otro lado, en *P. phalera* y *P. sophieae*, la separación entre *trnD1* y *atp8* es de 57 y 72 pb, respectivamente, lo que admite la posibilidad de que haya existido un gen *trnD2* en esa posición, el cual habría acumulado una gran cantidad de mutaciones, de manera que su secuencia no es reconocible por la herramienta de anotación utilizada. Cabe mencionar que en estos espacios intergénicos no se presenta la firma genética que permitiría asignarlos como producto de una pseudogenización de *trnD2*, sin

embargo, su presencia es congruente con un modelo de TDRL. Sobre la filogenia se puede observar que la pérdida de *trnD2* ha ocurrido de forma independiente en hasta 5 ocasiones.

En los casos donde la duplicación está presente, se pueden encontrar varias fuentes de variación. Por ejemplo, la estructura de los productos que *trnD2* produciría, así como el anticodón que portarían. En 4 especies (*P. hollensis*, *P. multilineata*, *P. mexicana* y *P. parasitica*), se halla el anticodón canónico para ácido aspártico en el código genético mitocondrial de invertebrados: GUC, que es el que de manera regular portan los productos del gen *trnD1*. Sin embargo, sólo en las primeras tres se predice un producto con una estructura secundaria regular, por lo que se infiere que forman parte activa del metabolismo celular en estos grupos. Estas tres especies no conforman un grupo monofilético. La estructura predicha para *P. parasitica* contendría un asa en el tallo del anticodón ocasionada por la falta de apareamiento entre dos residuos de uracilo, lo que podría alterar su correcta funcionalidad.

Por otro lado, existen casos donde los productos de *trnD2* poseen un anticodón distinto al encontrado en *trnD1* (GUC). Esto ocurre en las muestras de *P. rugosa* colectadas en Ontario y Manitoba, donde *trnD2* presenta el anticodón GUA, que corresponde al aminoácido tirosina. El mismo fenómeno se observa en *P. rugosa* proveniente de Nebraska donde, además, en una posición anterior a *trnD* y *trnD2*, fue detectado un relicto de un tercer gen codificante para tRNA, del que se hablará posteriormente. En el producto de *trnD2* predicho para estas muestras el tallo del anticodón es más corto de lo esperado en un tRNA regular, al contener sólo un par de bases apareadas a diferencia de las 3 o 4 que suelen estar presentes. Otro caso ocurre en *Placobdella* sp1, donde se predice un anticodón GUU para *trnD2*, el cuál corresponde a asparagina. En este caso, se encuentra un tallo del anticodón relativamente largo, con 5 pb y un asa en la base del brazo aceptor del aminoácido, razón por la cuál se cuestiona su funcionalidad. Los casos anteriores se explican por el acontecimiento de una mutación puntual en la tercera posición del codón en el gen *trnD2*. Por otro lado, el gen *trnD2* secuenciado de un ejemplar de *P. kwetlumye* genera un anticodón ACU, correspondiente a serina, lo cual implica una sustitución total del codón y hace de esta molécula la más divergente de *trnD2* en la que aparentemente se mantiene la funcionalidad, ya que la estructura secundaria es totalmente regular.

En algunos casos la herramienta tRNAscan-SE no logró predecir una estructura secundaria para el gen *trnD2*, y se atribuye a que la secuencia posee una cantidad de

sustituciones nucleotídicas tal que no permite el origen de un producto regular. Esto ocurre para las secuencias obtenidas de 9 especies.

Un hecho que añade complejidad al fenómeno es la detección de un tercer gen codificante de tRNA en dos muestras. Una de ellas, ya mencionada, es una *P. rugosa* proveniente del Lago Swan en Nebraska, EUA, en la cual este tercer gen se encuentra precediendo a *trnD* y *trnD2* y posee sólo 56 pb. Por otro lado, en *P. montifera* también se presenta un gen adicional que, en este caso, se halla insertado entre *trnD* y *trnD2* y tiene una longitud de 55 pb. El origen de estos pseudogenes no está esclarecido, sin embargo, no comparten la firma que encontramos en *trnD*, por lo que no puede atribuirse con certeza a un evento de duplicación de este.

Otro caso particularmente interesante es el de la especie *Placobdella* sp. 2 CR, en la cual *trnD1* es la copia que ha acumulado mutaciones hasta convertirse en un pseudogen. En el alineamiento se puede observar que este posee 19 pb adicionales en el extremo 3', mismas que están ausentes en el extremo 5', lo cual podría sugerir una traslocación. Adicionalmente, los primeros 8 pb corresponden simultáneamente a la terminación del gen *cox2*.

Por último, es destacable el hallazgo de variación intraespecífica en 3 especies diferentes de *Placobdella* en cuanto a la configuración de genes en la región estudiada. La mayor diversidad hallada se encuentra al interior de *P. rugosa*, en la cual los especímenes provenientes de Ontario y Manitoba poseen dos copias del gen *trnD* y la de Nebraska posee evidencia de un tercer gen para tRNA. Unido a esto, un individuo proveniente del Lago Adams en Saskatchewan, Canadá, ha perdido por completo el gen *trnD2* y presenta únicamente el gen *trnD* original.

La especie *P. ringueleti* se presenta con dos genotipos mitocondriales distintos. El ejemplar de Chiapas presenta la duplicación, con 44 pb entre ambas copias, mientras que está ausente en el de Yucatán, en el cuál *trnD2* ha sido eliminado por completo del genoma. Nuestros datos para *P. lamothei* indican la presencia de la duplicación y una separación de 59 pb entre las dos copias, lo cual no es concordante con el mitogenoma publicado por Ocegüera-Figueroa et al. (2016), en el cuál la separación entre las copias es de 128 pb.

Estos 3 casos de variación intraespecífica pueden ser evidencia de genotipos mitocondriales fijados localmente, que representan regiones geográficas diferenciadas. Otra posible explicación sería la heteroplasmia de los genomas mitocondriales: podríamos

estar observando solo uno de varios genomas mitocondriales diferentes. La heteroplasmia es frecuentemente un producto de mutaciones puntuales, como se ha demostrado en las chinches de cama *Cimex lectularius* (Robinson *et al.* 2005), aunque también puede deberse a la duplicación en tándem de varios genes en una fracción de las mitocondrias del individuo, como en el ave marina *Puffinus lherminieri* (Torres *et al.* 2018). Esta posibilidad podría evaluarse si se secuenciaban por completo los genomas mitocondriales de las especies en busca de ensamblajes con longitudes diferentes. Sin embargo, dado el marcado patrón geográfico hallado principalmente en *P. rugosa* y respaldado por varios individuos, tenemos fuerte evidencia de que nos encontramos ante diferentes configuraciones del genoma mitocondrial fijadas en poblaciones distintas. El patrón geográfico encontrado para los diferentes genotipos mitocondriales de *P. rugosa* (Ontario-Manitoba/Saskatchewan/EUA) es congruente con el reportado con otros marcadores en sanguijuelas del género *Erpobdella* (Anderson & Kvist, no publicado).

Al observar la reconstrucción de la historia de los diferentes arreglos sobre la filogenia, el estado de carácter en el ancestro del género se recupera de manera ambigua. Sin embargo, debido a lo poco común de los rearrreglos de genes mitocondriales en animales, aunado al hecho de que *Placobdella* es el único grupo taxonómico en que ha sido observada la duplicación de un solo gen codificante de tRNA, es razonable asumir que el estado del ancestro correspondía a la presencia de dos copias del gen *trnD* y los estados en los que ciertas poblaciones de *Placobdella* manifiestan pérdida de *trnD2* o aparición de un tercer gen (posteriormente degradado) codificante de tRNA son derivados del mismo.

Previamente han sido detectados eventos de múltiples rearrreglos de genes mitocondriales entre los genes *cox2* y *atp8* en otros taxa de invertebrados, particularmente en himenópteros, (Dowton & Austin, 1999) y esta región fue denominada un *hotspot* para los rearrreglos de genes. Sin embargo, mientras en Hymenoptera las diferencias se establecen entre diferentes géneros o incluso familias, este estudio representa el primer reporte de variación intraespecífica en cuanto a arreglos de genes relacionada a la distribución geográfica de la especie.

Esta duplicación de genes ocurre de manera sinapomórfica en el género *Placobdella* y las diferentes formas en que se presentan no muestran un patrón filogenético reconocible. La duplicación en cada linaje ha sufrido destinos diferentes, llegando a perderse por completo hasta en 5 ocasiones de manera independiente. Esto queda evidenciado al mapear los diferentes arreglos presentes en el género y en otros grupos de sanguijuelas en

la filogenia elaborada para tal fin. De igual manera, los dos casos en que ha aparecido un tercer gen en esta región han surgido de manera independiente.

Los arreglos de genes hallados en este estudio son congruentes con el modelo de TDRL ya que se trata de duplicaciones en tándem sobre la misma hebra del genoma mitocondrial y limitados a una región pequeña. La presencia de pseudogenes y espacios no codificantes en algunas muestras son evidencia de estados intermedios del proceso de pérdida de genes, mientras que aquellas que carecen de los mismos o que muestran una pérdida total y sin rastros del gen *trnD2* se encuentran en una etapa avanzada del proceso. Sin embargo, no puede decirse lo mismo de todos los rearrreglos de genes mitocondriales observados en el resto del phylum Annelida, donde han ocurrido diferentes traslocaciones.

Las relaciones inferidas entre los loci *trnD1*, *trnD2*, *trnD3* y *trnD4* rechazan la existencia de evolución concertada, fenómeno por el cual las copias de genes son virtualmente idénticas dentro de la misma especie y se espera que se agrupen juntas en un análisis filogenético (Eberhard, 2001). En el caso presente, las copias aparentemente evolucionan de forma independiente entre ellas y la acumulación de mutaciones se encuentra sesgada hacia *trnD2*, aunque en un caso se altera principalmente *trnD1*. Se desconoce el motivo por el cual es generalmente *trnD2* y no *trnD1* el gen que acumula mayor cantidad de sustituciones y, en algunos casos, se ha convertido en un pseudogen.

El presente estudio corresponde al primer caso reportado de una duplicación en tándem de un solo gen codificante de tRNA mitocondrial. Además, presenta niveles de variación sin precedentes y abre cuestionamientos sobre la forma en que evolucionan los genomas mitocondriales y el fenómeno de los *hotspots* dentro de los mismos.

Bibliografía citada

Aksoy, S. (1995). *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 848-851.

Apakupakul, K., Siddall, M. E., & Burreson, E. M. (1999). Higher level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12(3), 350-359.

Barta, J. R., & Desser, S. S. (1989). Development of *Babesiosoma stableri* (Dactylosomatidae; Adeleida; Apicomplexa) in its leech vector (*Batracobdella picta*) and the relationship of the dactylosomatids to the piroplasms of higher vertebrates. *The Journal of Protozoology*, 36(3), 241-253.

Bielecki, A., Cichocka, J. M., Jabłoński, A., Jeleń, I., Ropelewska, E., Biedunkiewicz, A., ... & Szlachciak, J. (2012). Coexistence of *Placobdella costata* (Fr. Müller, 1846)(Hirudinida: Glossiphoniidae) and mud turtle *Emys orbicularis*. *Biologia*, 67(4), 731-738.

Boore, J. L. (2000). The duplication/random loss model for gene rearrangement exemplified by mitochondrial genomes of deuterostome animals. In *Comparative genomics* (pp. 133-147). Springer, Dordrecht.

Boore, J. L., & Brown, W. M. (2000). Mitochondrial genomes of Galathealium, Helobdella, and Platynereis: sequence and gene arrangement comparisons indicate that Pogonophora is not a phylum and Annelida and Arthropoda are not sister taxa. *Molecular Biology and Evolution*, 17(1), 87-106.

Boore, J. L., Lavrov, D. V., & Brown, W. M. (1998). Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature*, 393, 667–668.

Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic acids research*, 27(8), 1767-1780.

Boore, J. L., Collins, T. M., Stanton, D., Daehler, L. L., & Brown, W. M. (1995). Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature*, 376(6536), 163-165.

Borda, E., & Siddall, M. E. (2004). Arhynchobdellida (Annelida: Oligochaeta: Hirudinida): phylogenetic relationships and evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(1), 213-225.

Boroffka, I. (1968). Osmo-und Volumenregulation bei *Hirudo medicinalis*. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 57(4), 348-375.

Brusca, R. C., Moore, W. & Shuster, S. (2016). *Invertebrates*. Sunderland, Massachusetts.

De Carle, D., Ocegüera-Figueroa, A., Tessler, M., Siddall, M. E., & Kvist, S. (2017). Phylogenetic analysis of *Placobdella* (Hirudinea: Rhynchobdellida: Glossiphoniidae) with consideration of COI variation. *Molecular phylogenetics and evolution*, 114, 234-248.

Desjardins, P., & Morais, R. (1990). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates. *Journal of molecular biology*, 212(4), 599-634

Di Giulio, M. (2004). The origin of the tRNA molecule: implications for the origin of protein synthesis. *Journal of theoretical biology*, 226(1), 89-93.

Di Giulio, M. (2012). The 'recently' split transfer RNA genes may be close to merging the two halves of the tRNA rather than having just separated them. *Journal of theoretical biology*, 310, 1-2.

Di Giulio, M. (2013). A polyphyletic model for the origin of tRNAs has more support than a monophyletic model. *Journal of theoretical biology*, 318, 124-128.

Dowton, M., & Austin, A. D. (1999). Evolutionary dynamics of a mitochondrial rearrangement "hot spot" in the Hymenoptera. *Molecular Biology and Evolution*, 16(2), 298-309.

- Dowton, M., & Campbell, N. J. (2001). Intramitochondrial recombination—is it why some mitochondrial genes sleep around?. *Trends in ecology & evolution*, 16(6), 269-271.
- Dowton, M., Cameron, S. L., Dowavic, J. I., Austin, A. D., & Whiting, M. F. (2009). Characterization of 67 mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral. *Molecular Biology and Evolution*, 26(7), 1607-1617.
- Dunn, C. W., Hejnol, A., Matus, D. Q., Pang, K., Browne, W. E., Smith, S. A. & Sørensen, M. V. (2008). Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*, 452(7188), 745-749.
- Eberhard, J. R., Wright, T. F., & Bermingham, E. (2001). Duplication and concerted evolution of the mitochondrial control region in the parrot genus *Amazona*. *Molecular Biology and Evolution*, 18(7), 1330-1342.
- Elliott, D., & Ladomery, M. (2017). *Molecular biology of RNA*. Oxford University Press.
- Erséus, C., & Källersjö, M. (2004). 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida). *Zoologica Scripta*, 33(2), 187-196.
- Farias, S. T. (2013). Suggested phylogeny of tRNAs based on the construction of ancestral sequences. *Journal of theoretical biology*, 335, 245-248.
- Graifer, D., & Karpova, G. (2015). Interaction of tRNA with eukaryotic ribosome. *International journal of molecular sciences*, 16(4), 7173-7194.
- Gu, X., & Santi, D. V. (1991). The T-arm of tRNA is a substrate for tRNA (m5U54)-methyltransferase. *Biochemistry*, 30(12), 2999-3002.
- Halanych, K. M., Dahlgren, T. G., & McHugh, D. (2002). Unsegmented annelids? Possible origins of four lophotrochozoan worm taxa. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 678-684.
- Hardt, W. D., Schlegl, J., Erdmann, V. A., & Hartmann, R. K. (1993). Role of the D arm and the anticodon arm in tRNA recognition by eubacterial and eukaryotic RNase P enzymes. *Biochemistry*, 32(48), 13046-13053.
- Hayes, P. M., Lawton, S. P., Smit, N. J., Gibson, W. C., & Davies, A. J. (2014). Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector. *Parasites & vectors*, 7(1), 50.
- Hoffmann, R. J., Boore, J. L., & Brown, W. M. (1992). A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics*, 131(2), 397-412.
- Jacobs, H. T., Asakawa, S., Araki, T., Miura, K. I., Smith, M. J., & Watanabe, K. (1989). Conserved tRNA gene cluster in starfish mitochondrial DNA. *Current genetics*, 15(3), 193-206.
- Jennings, R. M., & Halanych, K. M. (2004). Mitochondrial genomes of *Clymenella torquata* (Maldanidae) and *Riftia pachyptila* (Siboglinidae): evidence for conserved gene order in Annelida. *Molecular Biology and Evolution*, 22(2), 210-222.

Kajander, O. A., Rovio, A. T., Majamaa, K., Poulton, J., Spelbrink, J. N., Holt, I. J., & Jacobs, H. T. (2000). Human mtDNA sublimons resemble rearranged mitochondrial genomes found in pathological states. *Human Molecular Genetics*, 9(19), 2821-2835.

Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A. H. (2009). FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3(1), 1-14.

Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

Kasamatsu, H., & Vinograd, J. (1974). Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry*, 43(1), 695-719.

Keddie, E. M., Higazi, T., & Unnasch, T. R. (1998). The mitochondrial genome of *Onchocerca volvulus*: sequence, structure and phylogenetic analysis. *Molecular and biochemical parasitology*, 95(1), 111-127.

Kumazawa, Y., & Nishida, M. (1995). Variations in mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. *Molecular Biology and Evolution*, 12(5), 759-772.

Lee, W. J., & Kocher, T. D. (1995). Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization. *Genetics*, 139(2), 873-887.

Liu, X., Luo, D., Zhao, Y., Zhang, Q., & Zhang, J. (2017). Complete mitochondrial genome of *Ozobranchus jantseanus* (Hirudinida: Arhynchobdellida: Ozobranchidae). *Mitochondrial DNA Part B*, 2(1), 232-233.

Macey, J. R., Schulte 2nd, J. A., Larson, A., & Papenfuss, T. J. (1998). Tandem duplication via light-strand synthesis may provide a precursor for mitochondrial genomic rearrangement. *Molecular biology and evolution*, 15(1), 71-75.

Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.51 <http://www.mesquiteproject.org>

Mann, K. H. (2013). *Leeches (Hirudinea): their structure, physiology, ecology and embryology* (Vol. 11). Elsevier.

Manzano-Marín, A., Ocegüera-Figueroa, A., Latorre, A., Jiménez-García, L. F., & Moya, A. (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.

Marrone, F., Sacco, F., Kehlmaier, C., Arizza, V., & Arculeo, M. (2016). Some like it cold: the glossiphoniid parasites of the Sicilian endemic pond turtle *Emys trinacris* (Testudines,

- Emydidae), an example of 'parasite inertia'?. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 54(1), 60-66.
- McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology*, 16(14), R551-R560.
- Mei, Y., Stonestrom, A., Hou, Y. M., & Yang, X. (2010). Apoptotic regulation and tRNA. *Protein & cell*, 1(9), 795-801.
- Mindell, D. P., Sorenson, M. D., & Dimcheff, D. E. (1998). Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10693-10697.
- Moser, W. E., Richardson, D. J., Hammond, C. I., & Lazo-Wasem, E. A. (2012). Redescription of *Placobdella ornata* (Verrill, 1872) (Hirudinida: Glossiphoniidae). *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, 53(1), 325-330.
- Moser, W. E., Richardson, D. J., Hammond, C. I., Govedich, F. R., & Lazo-Wasem, E. A. (2012). Resurrection and redescription of *Placobdella rugosa* (Verrill, 1874) (Hirudinida: Glossiphoniidae). *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, 53(2), 375-381.
- Moser, W. E., Bowerman, J., Hovingh, P., Pearl, C. A., & Ocegüera-Figueroa, A. (2014). New host and distribution records of the leech *Placobdella sophieae* Ocegüera-Figueroa et al., 2010 (Hirudinida: Glossiphoniidae). *Comparative Parasitology*, 81(2), 199-202.
- Moser, W. E., Briggler, J. T., Richardson, D. J., Schuette, C. D., Hammond, C. I., Hopkins, W. A., & Lazo-Wasem, E. A. (2013). Redescription and molecular characterization of *Placobdella cryptobranchii* (Johnson & Klemm, 1977) (Glossiphoniidae, Hirudinida). *ZooKeys*, (338), 1.
- Moser, W. E., Richardson, D. J., Hammond, C. I., & Lazo-Wasem, E. A. (2014). Redescription and Molecular Characterization of *Placobdella hollensis* (Whitman, 1892) (Hirudinida: Glossiphoniidae). *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, 55(1), 49-54.
- Munson, M. A., Baumann, P., & Kinsey, M. G. (1991). *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(4), 566-568.
- Nikitina, A., Babenko, V., Akopian, T., Shirokov, D., Manuvera, V., Kurdyumov, A., ... & Lazarev, V. (2016). Draft mitochondrial genomes of *Hirudo medicinalis* and *Hirudo verbana* (Annelida, Hirudinea). *Mitochondrial DNA Part B*, 1(1), 254-256.
- Ocegüera-Figueroa, A., & León-Règagnon, V. (2014). Biodiversidad de sanguijuelas (Annelida: Euhirudinea) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 183-189.
- Ocegüera-Figueroa, A., & Pacheco-Chaves, B. (2012). Registros de sanguijuelas de Costa Rica y clave para la identificación de las especies con redescipción de *Cylicobdella costaricae*. *Revista mexicana de biodiversidad*, 83(4), 946-957.

- Okimoto, R., Macfarlane, J. L., Clary, D. O., & Wolstenholme, D. R. (1992). The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics*, *130*(3), 471-498.
- Pääbo, S., Thomas, W. K., Whitfield, K. M., Kumazawa, Y., & Wilson, A. C. (1991). Rearrangements of mitochondrial transfer RNA genes in marsupials. *Journal of molecular evolution*, *33*(5), 426-430.
- Quijada-Rodriguez, A. R., Adlimoghaddam, A., & Weihrauch, D. (2017). Nitrogen Excretion in Nematodes, Platyhelminthes, and Annelids. In *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates* (pp. 127-150). Springer, Cham.
- Quinn, T. W., & Mindell, D. P. (1996). Mitochondrial gene order adjacent to the control region in crocodile, turtle, and tuatara. *Molecular phylogenetics and evolution*, *5*(2), 344-351.
- Raina, M., & Ibba, M. (2014). tRNAs as regulators of biological processes. *Frontiers in genetics*, *5*.
- Randau, L., Pearson, M., & Söll, D. (2005). The complete set of tRNA species in *Nanoarchaeum equitans*. *FEBS letters*, *579*(13), 2945-2947.
- Robison, G. A., Balvin, O., Schal, C., Vargo, E. L., & Booth, W. (2015). Extensive mitochondrial heteroplasmy in natural populations of a resurging human pest, the bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of medical entomology*, *52*(4), 734-738.
- Rokas, A., Ladoukakis, E., & Zouros, E. (2003). Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, *18*(8), 411-417.
- Salas-Montiel, R., Phillips, A. J., De Leon, G. P. P., & Ocegüera-Figueroa, A. (2014). Description of a new leech species of *Helobdella* (Clitellata: Glossiphoniidae) from Mexico with a review of Mexican congeners and a taxonomic key. *Zootaxa*, *3900*(1), 077-094.
- Salas-Montiel, R., Phillips, A. J., Contreras-Mirón, S., & Ocegüera-Figueroa, A. (2017). Prevalence, Abundance, and Intensity of Implanted Spermatophores in the Leech *Haementeria officinalis* (Glossiphoniidae: Hirudinida) from Guanajuato, Mexico. *Journal of Parasitology*, *103*(1), 47-51.
- Salinas-Giegé, T., Giegé, R., & Giegé, P. (2015). tRNA biology in mitochondria. *International journal of molecular sciences*, *16*(3), 4518-4559.
- San Mauro, D., Gower, D. J., Zardoya, R., & Wilkinson, M. (2005). A hotspot of gene order rearrangement by tandem duplication and random loss in the vertebrate mitochondrial genome. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(1), 227-234.
- Sawyer, R.T. (1986). *Leech Biology and Behaviour: Feeding biology, ecology, and systematics*. Clarendon Press.
- Sawyer, R. T., Lepont, F., Stuart, D. K., & Kramer, A. P. (1981). Growth and reproduction of the giant glossiphoniid leech *Haementeria ghilianii*. *The Biological Bulletin*, *160*(2), 322-331.
- Siddall, M. E., & Burreson, E. M. (1995). Phylogeny of the Euhirudinea: independent evolution of blood feeding by leeches?. *Canadian Journal of Zoology*, *73*(6), 1048-1064.

- Siddall, M. E., & Bureson, E. M. (1998). Phylogeny of Leeches (Hirudinea) based on mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9(1), 156-162.
- Siddall, M. E., & Desser, S. S. (1993). Cytopathological changes induced by Haemogregarina myoxocephali in its fish host and leech vector. *The Journal of parasitology*, 297-301.
- Siddall, M. E., Apakupakul, K., Bureson, E. M., Coates, K. A., Erséus, C., Gelder, S. R., ... & Trapid-Rosenthal, H. (2001). Validating Livanow: molecular data agree that leeches, branchiobdellidans, and Acanthobdella peledina form a monophyletic group of oligochaetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(3), 346-351.
- Siddall, M. E., & Bowerman, J. (2006). A new species of glossiphoniid leech from Rana pretiosa (Amphibia: Ranidae) in Oregon. *Journal of Parasitology*, 92(4), 855-857.
- Siddall, M. E., Budinoff, R. B., & Borda, E. (2005). Phylogenetic evaluation of systematics and biogeography of the leech family Glossiphoniidae. *Invertebrate Systematics*, 19(2), 105-112.
- Siddall, M. E., & Gaffney, E. S. (2004). Observations on the leech Placobdella ornata feeding from bony tissues of turtles. *Journal of Parasitology*, 90(5), 1186-1188.
- Siddall, M. E., Perkins, S. L., & Desser, S. S. (2004). Leech mycetome endosymbionts are a new lineage of alphaproteobacteria related to the Rhizobiaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(1), 178-186.
- Sket, B., & Trontelj, P. (2008). Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 129-137.
- Smith, D., & Yarus, M. (1989). Transfer RNA structure and coding specificity: I. Evidence that a D-arm mutation reduces tRNA dissociation from the ribosome. *Journal of molecular biology*, 206(3), 489-501.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stanton, D. J., Daehler, L. L., Moritz, C. C., & Brown, W. M. (1994). Sequences with the potential to form stem-and-loop structures are associated with coding-region duplications in animal mitochondrial DNA. *Genetics*, 137(1), 233-241.
- Struck, T. H., Schult, N., Kusen, T., Hickman, E., Bleidorn, C., McHugh, D., & Halanych, K. M. (2007). Annelid phylogeny and the status of Sipuncula and Echiura. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 57.
- Świątek, P., Bielecki, A., & Klag, J. (2007). Structure of the vector tissue in piscicolid leeches (Annelida, Hirudinea, Rhynchobdellida, Piscicolidae). *Journal of morphology*, 268(1), 64-73.
- Torres, L., Welch, A. J., Zanchetta, C., Chesser, R. T., Manno, M., Donnadieu, C., ... & Pante, E. (2018). Evidence for a duplicated mitochondrial region in Audubon's shearwater based on MinION sequencing. *Mitochondrial DNA Part A*, 1-8.
- Vojtek, J., Opravilová, V., & Vojtková, L. (1967). The importance of leeches in the life cycle of the order Strigeidida (Trematoda). *Folia parasitologica*, 14(2), 107-119.

Wang, Y., Huang, M., Wang, R., & Fu, L. (2018). Complete mitochondrial genome of the fish leech *Zeylanicobdella arugamensis*. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(2), 659-660.

Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 248(5451), 765.

Wolstenholme, D. R., Koike, K., & Cochran-Fouts, P. (1974). Replication of mitochondrial DNA: replicative forms of molecules from rat tissues and evidence for discontinuous replication. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 38, pp. 267-280). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Xu, Y., Nie, J., Hou, J., Xiao, L., & Lv, P. (2016). Complete mitochondrial genome of *Hirudo nipponia* (Annelida, Hirudinea). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(1), 257-258.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1), 134.