



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Instituto de Biología**

**Diferenciación morfológica de especies del  
complejo *Helobdella stagnalis* (Euhirudinea:  
Glossiphoniidae) de México**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA

**LUIS RICARDO SALAS MONTIEL**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA

(INSTITUTO DE BIOLOGÍA)

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Salas  
Montiel  
Luis Ricardo  
56 44 20 94  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
305145709

### 2. Datos del tutor

Dr.  
Alejandro Francisco  
Oceguera  
Figuerola

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Rosario  
Mata  
López

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Fernando  
Álvarez  
Padilla

### 5. Datos del sinodal 3

M. en C.  
María Berenit  
Mendoza  
Garfias

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.  
María del Carmen  
Guzmán  
Cornejo

### 7. Datos del trabajo escrito

Diferenciación morfológica de especies del complejo *Helobdella stagnalis*  
(Euhirudinea: Glossiphoniidae) de México  
57 p  
2014

## **DEDICATORIA**

Éste trabajo está dedicado a mis padres, figuras de amor y sabiduría, ejemplos de perseverancia y optimismo que de manera incondicional me brindaron todo su apoyo, aconsejándome y escuchándome cuando necesario, siendo el pilar más importante durante mi trayectoria como universitario.

Padre, agradezco infinitamente tus enseñanzas, el haberte visto luchar durante estos años ha sido el mejor ejemplo de convicción que pude haber tenido para luchar por mis propios objetivos. Has sido de vital importancia en este proceso, nos hemos esforzado de distintas formas para hacer realidad este día y al final lo hemos conseguido. Este logro es de ambos.

Madre, gracias por tu infinita paciencia, por tus atenciones durante las horas de estudio, por escucharme noche a noche y darme ánimos para continuar, gracias sobre todo por tu inmenso amor y comprensión que sin lugar a dudas fueron parte esencial para culminar este proceso.

Padres, ustedes son los verdaderos creadores de este trabajo, yo sólo seguí sus consejos, sólo caminé por el sendero que previamente había sido trazado por ustedes dos. ¡Lo hemos logrado!

## **AGRADECIMIENTOS**

A los miembros de mí jurado Dra. Rosario Mata López, Dra. María del Carmen Guzmán Cornejo, M en C. María Berenit Mendoza Garfias y Dr. Fernando Álvarez Padilla por revisar el escrito atendiendo a mis necesidades personales y por los valiosos comentarios que realizaron para mejorar la calidad de este trabajo.

I thank to Anna Phillips and Sebastian Kvist for their comments on early versions of this work during their visit to Mexico.

Al proyecto JF045 de CONABIO que me permitió obtener material de Aljojuca, Puebla concerniente a *Helobdella atli*.

Agradezco sinceramente a Ángeles Romero por su asistencia durante el proceso de tinción, así como por sus comentarios y sugerencias que sin lugar a dudas contribuyeron a mejorar la calidad de este trabajo.

A Carlos Daniel Pinacho por su invaluable asesoramiento durante el uso del software estadístico.

A los Drs. Gerardo Pérez Ponce de León, Martín García Varela, Rosario Mata López, al M. en C. Luis García Prieto y al Biólogo David Osorio Sarabia por aceptarme en el taller “parasitología de vertebrados dulceacuícolas” y abrirme las puertas del Laboratorio de Helmintología, lugar donde tuve la oportunidad de conocer grandiosas personas que contribuyeron con mi formación como biólogo.

### **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A Alejandro (mi tutor) por invitarme a formar parte del proyecto JF045 de CONABIO y así emprender una serie de viajes al centro de nuestro país, inmiscuyéndome en el fascinante mundo de las sanguijuelas. Agradezco especialmente su gran interés en el desarrollo de este trabajo en el que sus constantes revisiones, comentarios y aportaciones, así como su invaluable asistencia en campo durante la obtención de los ejemplares fueron de gran importancia. Finalmente agradezco su gran paciencia durante mi entrenamiento en la manipulación e identificación del material hirudológico que en todo momento fue realizado bajo un ambiente amigable, favorable para mi aprendizaje y desenvolvimiento académico. Te admiro y te respeto mucho ¡gracias por todo!

A Luis García Prieto que con el paso de los años se ha convertido en una figura de confianza y una fuente de sabiduría, atendiendo amablemente a todas y cada una

de las personas que en algún momento nos incorporamos al Laboratorio de Helmintología ¡Gracias por todo tu apoyo y por todos tus consejos!

A Berenit por la preparación del colorante paracarmín de Meyer, indispensable para el procesamiento del material biológico.

A Samanta Contreras por su valiosa ayuda en la colecta de *Helobdella atli*, así como por la obtención de bibliografía especializada.

A Ángeles y Aline que compartieron conmigo, además de sus conocimientos, su espontaneidad y amplio sentido del humor, obsequiándome gratos momentos día con día.

A Nallely por sus palabras de aliento cuando el tiempo se venía encima, por escucharme siempre que lo necesité. ¡Entremos juntos al posgrado!

A Jorgito por sus acertados comentarios, por su ayuda cada vez que fue requerida y por su sentido del humor que sin lugar a dudas hizo más ameno este proceso.

A mis dos grandes amigas que me acompañaron buena parte de la licenciatura, Guadalupe Otero y Fernanda Toscano ¡gracias por todo! Jamás las olvido a pesar de la distancia. Su amistad es uno de los más grandes tesoros que tengo.

A Fanie, que junto con mis padres ha sido la persona de quién más apoyo he recibido, gracias por tu paciencia que ha tenido que ser mayor cuanto más avanzado este trabajo, hemos sacrificado bastantes cosas, sin embargo, ha sido por una buena razón. ¡Te amo! Y en buena parte mereces crédito por este manuscrito, asististe al campo con nosotros, aprendiste el procedimiento de narcotización, revisaste versiones anteriores expresando tu punto de vista. ¡Eres lo mejor!

# ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN.....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
I.I. Euhirudinea: sanguijuelas verdaderas.....	2
I.II. El género <i>Helobdella</i> .....	9
I.III. Complejo " <i>Helobdella stagnalis</i> ".....	10
I.IV. Morfometría.....	11
I.V. Antecedentes en México.....	14
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
II.I. Objetivo general.....	16
II.II. Objetivos particulares.....	17
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>19</b>
<b>V. MÉTODO.....</b>	<b>19</b>
V.I. Colecta del material biológico.....	19
V.II. Procesamiento del material hirudológico.....	20
V. III. Análisis morfométrico.....	20
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
VI.I. Descripción de <i>Helobdella "stagnalis" 2</i> .....	25
VI.II. Descripción de <i>Helobdella modesta</i> (Verril, 1872).....	29

<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>37</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>46</b>
X.I. Anexo 1. Técnica combinada de Paracarmín de Meyer-Hematoxilina de Ehrlich.....	46
X.II. Anexo 2. Caracteres medidos.....	48
X.III. Anexo 3. Valores de significancia.....	54



**RESUMEN:** Los Euhirudíneos o “sanguijuelas verdaderas” son un grupo de anélidos caracterizados por presentar 34 somitos; dos ventosas situadas una en cada extremo del cuerpo; ausencia de quetas y parápodos y celoma reducido. A pesar de que son comúnmente conocidas por sus hábitos hematófagos, la mayoría de las especies se alimentan de la hemolinfa de pequeños invertebrados como moluscos y oligoquetos. La clasificación de estos organismos ha sido compleja debido al uso de caracteres morfológicos que no reflejan sus relaciones filogenéticas. En años recientes se han explorado las relaciones filogenéticas entre los euhirudíneos mediante el uso de técnicas moleculares, dando lugar a cambios importantes en la clasificación tradicional propuesta por Sawyer en 1986. La presencia de la placa quitinoide dorsal, un carácter fácilmente observable a simple vista, fue empleado durante siglos para identificar hirudíneos como *Helobdella stagnalis*; sin embargo, análisis moleculares de diversidad genética han demostrado que bajo dicho nombre hay una enorme variabilidad genética, lo cual sugiere que en México existen al menos tres especies. Con la finalidad de corroborar dichos resultados y de asegurar que la recientemente restablecida especie norteamericana con placa quitinoide dorsal, *Helobdella modesta*, es morfológicamente distinguible de las formas mexicanas, se llevó a cabo un análisis morfométrico empleando herramientas estadísticas univariadas (ANOVA) y multivariadas (PCA) para detectar variación morfológica entre los cuatro grupos. Los resultados obtenidos permiten confirmar que en México existen tres especies escutíferas: *Helobdella atli*, *Helobdella octatensis* y *Helobdella “stagnalis”* 2, además de que *Helobdella modesta* de Estados Unidos es una especie morfológicamente diferente a las mexicanas. Los resultados presentados en este trabajo representan los primeros en resolver la situación taxonómica de un grupo complejo de hirudíneos cercanamente emparentados mediante el uso de morfometría multivariada, dando pauta a que en estudios futuros sea empleado el mismo método para resolver problemas taxonómicos similares.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.I. Euhirudínea: sanguijuelas verdaderas**

Los anélidos de manera general se caracterizan por presentar el cuerpo segmentado y por la repetición de estructuras externas e internas a lo largo del cuerpo, fenómeno llamado metamerismo (Brusca & Brusca, 2003). Es importante mencionar que dicha condición se encuentra altamente modificada en Echiura, Pogonophora y Vestimentifera, y totalmente ausente en Sipuncula, antiguos Phyla que de acuerdo con recientes análisis moleculares (Struck et al., 2007; Edgecombe et al., 2011) forman parte de Annelida, cuyo grupo hermano es incierto. Algunos autores consideran a Sipuncula ya sea como el grupo hermano de Annelida o como un poliqueto (Struck et al., 2007) mientras que otros reconocen a Mollusca como el grupo hermano de Annelida (Edgecombe et al., 2011), rechazando en cualquiera de los casos la antigua hipótesis que reconocía a Arthropoda como el grupo hermano de dicho Phylum (Eernisse et al., 1992).

Las sanguijuelas y los oligoquetos, que actualmente conforman un grupo monofilético llamado Clitellata, presentan una región glandular especializada en la secreción de ootecas llamada clitelo (de ahí su nombre); son hermafroditas; su desarrollo es de tipo directo; y la morfología de sus espermatozoides es única en el Phylum (Rouse & Fauchald, 1995). A diferencia de otros clitelados como Acanthobdellida, Branchiobdellida y Oligochaeta, los euhirudíneos presentan 34 somitos; dos ventosas situadas una en cada extremo del cuerpo las cuales son útiles tanto para la fijación como para el desplazamiento (Figura 1), ausencia de quetas y parápodos, y celoma reducido a una compleja serie de canales. De acuerdo con Sket & Trontelj (2008) existen alrededor de 680 especies de euhirudíneos en el mundo, de los cuales el 70% son dulceacuícolas y son un componente fundamental en los cuerpos de agua dulce que habitan, en donde pueden desempeñar el papel del depredador más alto en la cadena trófica (Davies et al., 1981).

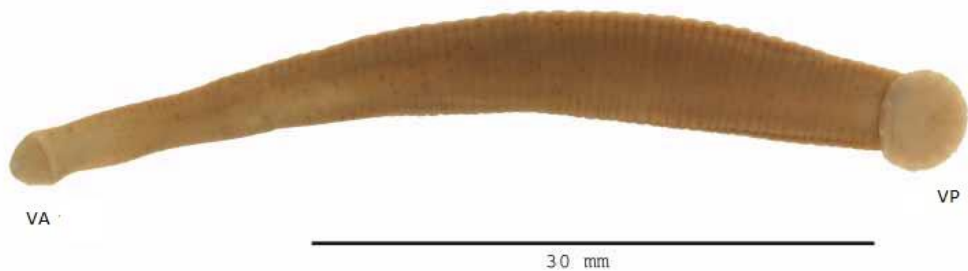


Figura 1. *Haementeria lopezi* Ocegüera-Figueroa, 2006. Vista ventral. VA: ventosa anterior, VP: ventosa

La mayoría de las sanguijuelas verdaderas son depredadoras de invertebrados de cuerpo blando como oligoquetos y pequeños moluscos (Davies et al., 1981), mientras que la hematofagia es un fenómeno poco frecuente aunque ampliamente conocido en este grupo. De acuerdo con estudios realizados por Borda & Siddall (2004a, b) el último ancestro común de los euhirudíneos debió haber sido hematófago, una condición que se perdió independientemente en al menos cinco ocasiones.

Según Sawyer (1986), se pueden reconocer dos tipos de crecimiento corporal relacionados con el tipo de alimentación; las sanguijuelas depredadoras se alimentan constantemente y como consecuencia presentan crecimiento de tipo gradual; por otra parte, las especies que se alimentan de sangre, principalmente aquellas parásitas temporales, lo hacen de manera esporádica, pudiendo pasar meses completos entre un evento alimenticio y el siguiente y como resultado, el tipo de crecimiento es saltatorio. Las especies hematófagas pueden alimentarse de un amplio espectro de vertebrados asociados a cuerpos de agua dulce o marina, incluyendo peces (Schulz et al., 2011), anfibios (Ayres & Comensaña, 2008), reptiles (Barragán-Ramírez et al., 2013; McCoy et al., 2007), aves (Ocegüera-Figueroa et al., 2010; Oosthuizen & Fourie, 1985) y mamíferos (Davies & MacLoughlin, 1996).

Las sanguijuelas no sólo forman parte importante de ecosistemas dulceacuícolas, también lo hacen en ecosistemas marinos y terrestres, y han sido

registradas en todos los continentes (Apakupakul et al., 1999), además muestran una amplia diversidad de estrategias relacionadas con el cuidado parental (Kutschera & Wirtz, 2001) y la puesta de ootecas (Mason et al., 2005) (Figura 2a). El ciclo de vida de las sanguijuelas se compone de cuatro estadios de desarrollo: huevos, crías, jóvenes y adultos (Davies, 1991). Dos estrategias reproductivas han sido descritas en este grupo: una de ellas consiste en la implantación hipodérmica de espermátóforos en la superficie corporal de la sanguijuela (Figura 2b), en la cual una vez que los espermátóforos implantados liberan espermatozoides, estos tienen la capacidad de desplazarse por el interior del cuerpo a través del celoma hasta los ovisacos, lugar en que se lleva a cabo la fertilización. La otra estrategia se refiere a la fertilización interna; el gonoporo masculino está provisto de un pene eversible, mientras que el gonoporo femenino, en contra parte, cuenta con una vagina que lo recibe (Siddall et al., 2006).

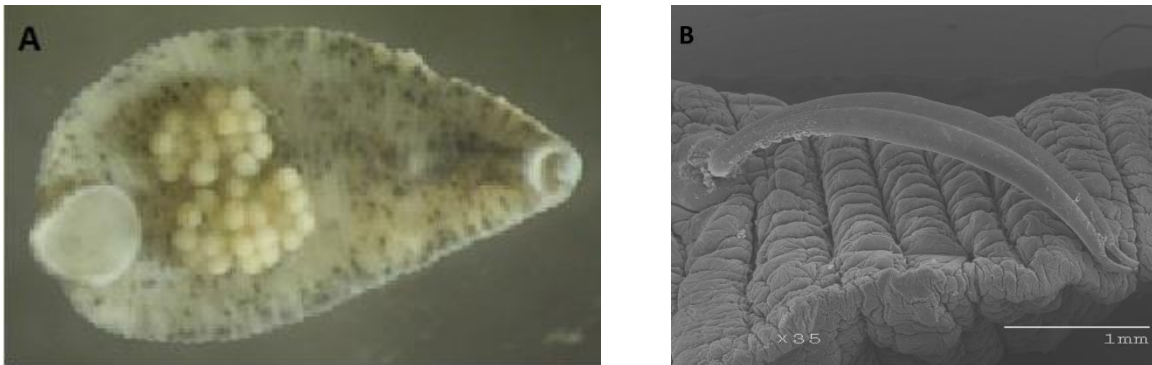


Figura 2. Vista ventral de *Helobdella virginiae* Ocegüera-Figueroa, 2007, mostrando un grupo de ootecas adheridas a la superficie corporal (A). Microscopía Electrónica de Barrido de un espermátóforo implantado en la superficie dorsal de *Haementeria officinalis* (B).

Respecto al plano corporal de los euhirudíneos, solamente 27 somitos de los 34 que los conforman pueden observarse externamente. El somito completo más sencillo está constituido por tres anillos primarios que se denominan  $a_1$ ,  $a_2$  y  $a_3$ ; el anillo medio es el  $a_2$ , el cual porta las sensilas u órganos sensoriales y refleja la localización del ganglio nervioso. Davies (1991) dividió el cuerpo de las sanguijuelas en cinco regiones (Figura 3).

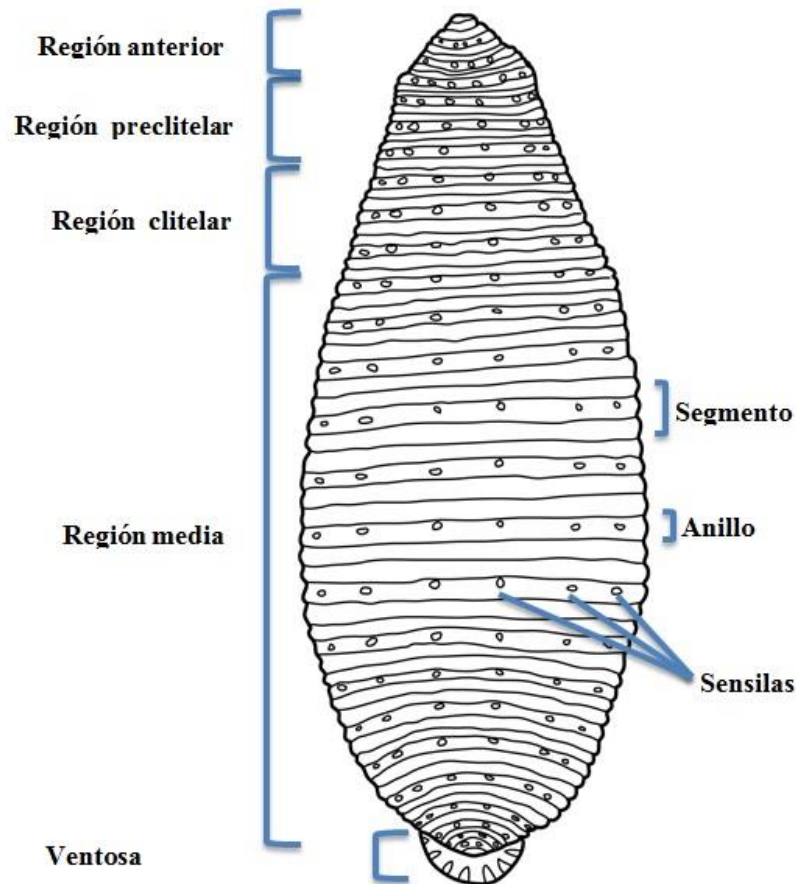


Figura 3. Esquema de *Haementeria ghilianii*. Se pueden observar las cinco regiones mencionadas por Davies (1991), así como algunas estructuras del plano corporal básico. (Modificado de Sawyer, 1986).

El aparato digestivo es completo y presenta modificaciones importantes en algunos grupos. Los miembros del orden Rhynchobdellida poseen una proboscis muscular útil para la penetración de tejido y la succión de fluidos de sus presas u hospederos. Por otra parte, en algunos miembros de la familia Hirudinidae es posible apreciar 3 mandíbulas musculares provistas de dientes arreglados ya sea en una o dos hileras (Oceguera-Figueroa et al., 2012). En algunos grupos el número de mandíbulas se ha reducido existiendo especies con dos o una mandíbulas (Borda et al., 2008; Phillips et al., 2010). El buche es una estructura tubular altamente especializada en el almacenamiento de fluidos, es común encontrar entre 6 y 11 pares de ciegos laterales. El intestino puede o no contar con pares de ciegos laterales dependiendo del grupo del que se trate, por ejemplo, los miembros de la familia Glossiphoniidae presentan cuatro pares de ciegos

intestinales (Figura 4). Finalmente, el ano se encuentra situado dorsalmente cerca de la ventosa posterior (Sawyer, 1986).

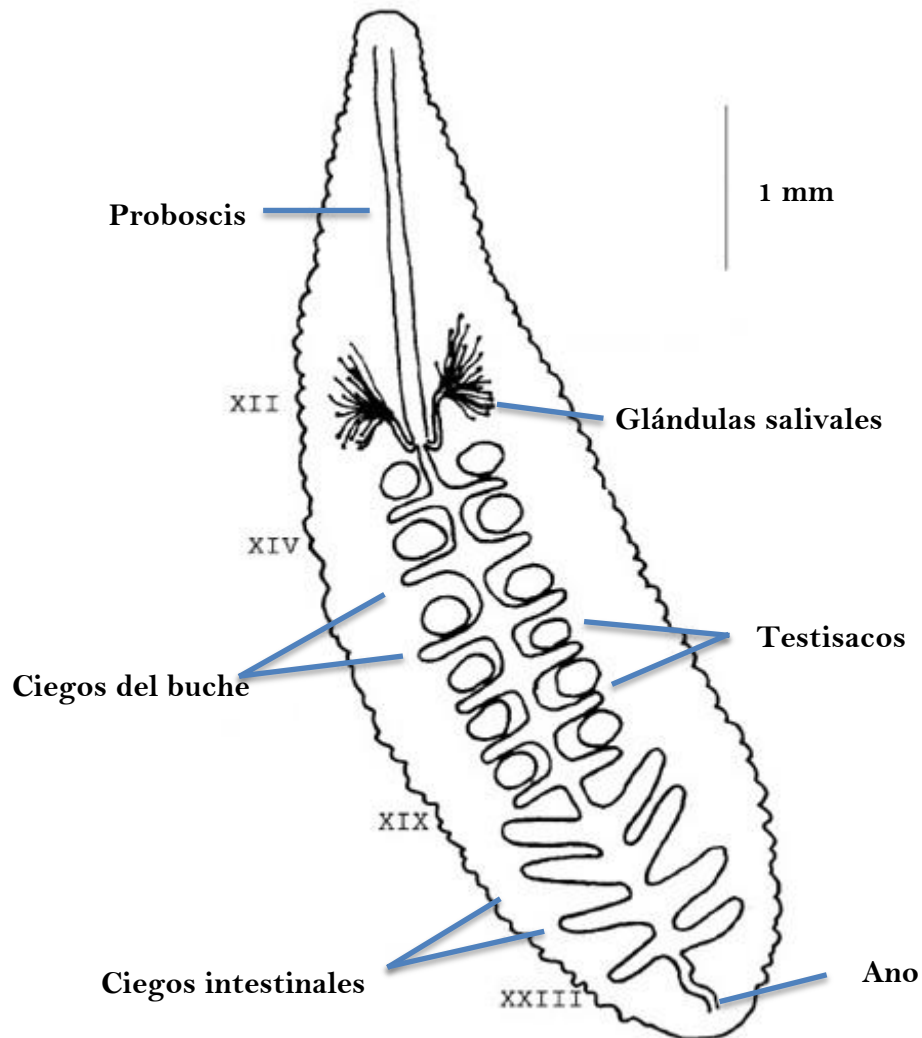


Figura 4. *Helobdella atli*. Aparato digestivo y testisacos. (Tomado de Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon, 2005).

El aparato reproductor femenino se compone de un par de ovisacos situados en el somito XII, a partir de los cuales parten un par de oviductos que convergen para formar el oviducto común cuyo extremo desemboca en el gonoporo (Singhal & Davies, 1985). Por otra parte, el aparato reproductor masculino se compone de testisacos en número variable que se sitúan en ambos costados del cuerpo de la sanguijuela, los conductos eferentes son proyectados

de cada uno de estos y se comunican con los conductos deferentes que continúan el trayecto dando lugar a los ductos eyaculatorios que cuando convergen forman el atrio común que desemboca en el gonoporo. Como regla general, el gonoporo masculino siempre es anterior al femenino y el número de anillos entre ellos es de importancia taxonómica (Siddall et al., 2006) (Figura 5).

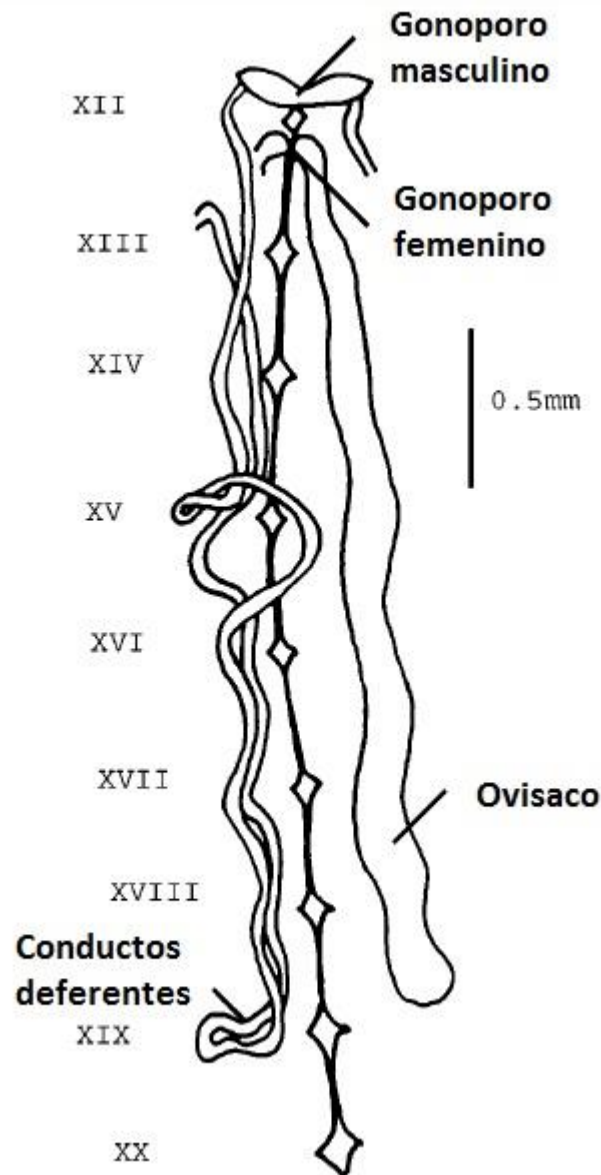


Figura 5. *Helobdella atli*. Aparato reproductor. (Tomado de Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon, 2005)

De manera tradicional, 10 familias están incluidas dentro de la subclase Euhirudinea (Cuadro 1) y se encuentran arregladas dentro de dos grandes

órdenes en función de la presencia o ausencia de una proboscis muscular. El orden Rhynchobdellida agrupa sanguijuelas provistas de una faringe muscular eversible (proboscis), mientras que Arhynchobdellida agrupa sanguijuelas provistas de mandíbulas musculares útiles para la alimentación (Sawyer, 1986).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica tradicional de los hirudíneos (Modificado de Sawyer, 1986). Los taxa en color gris incluidos en Hirudinea no son considerados sanguijuelas verdaderas.

Subphylum	Clitellata		
Clase	Hirudinea		
Subclase	Acanthobdellida Branchiobdellida Euhirudinea		
Orden	Rhynchobdellida	Arhynchobdellida	
Suborden		Erpobdelliformes	Hirudiniformes
Familia	Glossiphoniidae Ozobanchidae Piscicolidae	Erpobdellidae Salifidae	Americobdellidae Cyclicobdellidae Haemadipsidae Haemopidae Hirudinidae

En años recientes, mediante el uso combinado de información morfológica y molecular se han revisado las relaciones filogenéticas dentro de los hirudíneos, encontrando que la clasificación propuesta por Sawyer (1986) empleando únicamente caracteres morfológicos, no refleja las relaciones filogenéticas entre las sanguijuelas (Siddall & Burreson, 1998; Apakupakul et al., 1999; Borda & Siddall, 2004a, b; Ocegüera-Figueroa et al., 2011) repercutiendo de manera importante tanto en la clasificación tradicional de este grupo como en la interpretación de la evolución de caracteres morfológicos y conductuales (Cuadro 2; Figura 6). Las familias Macrobdellidae, Semiscolecidae y Xerobdellidae fueron restablecidas, mientras que la familia Americobdellidae a diferencia de la clasificación tradicional (Cuadro 1) forma parte de Erpobdelliformes (Cuadro 2). La taxonomía de todo el grupo se encuentra en proceso de revisión y es de preverse que ocurran diversos cambios en prácticamente todos los niveles.



Cuadro 2. Clasificación actual de los hirudíneos (Modificado de Sawyer, 1986; Siddall, 2002; Borda & Siddall, 2004b). Los taxa en color gris incluidos en Oligochaeta (=Clitellata) no son considerados sanguijuelas verdaderas.

Phylum	Annelida	
Clase	Oligochaeta (=Clitellata)	
Orden	Acanthobdellida Branchiobdellida Hirudinida (=Euhirudinea)	
Familia	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Glossiphoniidae</li> <li>* Ozobanchidae</li> <li>* Piscicolidae</li> <li>+ Americobdellidae</li> <li>+ Erpobdellidae</li> <li>+ Salifidae</li> <li>+ Cylicobdellidae</li> <li>+ Haemopidae</li> <li>+ Hirudinidae</li> <li>+ Macrobdellidae</li> <li>+ Haemadipsidae</li> <li>+ Semiscolecidae</li> <li>+ Xerobdellidae</li> </ul>	} Erpobdelliformes  } Hirudiniformes
		<ul style="list-style-type: none"> <li>* "Rhynchobdellida"</li> <li>+ Arhynchobdellida</li> </ul>

## I.II. El género *Helobdella*

De acuerdo con Sket & Trontelj (2008) Glossiphoniidae está constituida por 25 géneros, de los que el más diverso es *Helobdella*, agrupando 35 especies que se distribuyen en todos los continentes excepto la Antártida. Tiberti & Gentili (2010) reportaron un caso de hematofagia por parte de un miembro de este género (*H. stagnalis*); sin embargo, la hipótesis más aceptada sostiene que los organismos del género *Helobdella* dejaron los hábitos hematófagos para alimentarse de hemolinfa de pequeños invertebrados como oligoquetos y moluscos (Borda & Siddall, 2004a, b) (Figura 6).

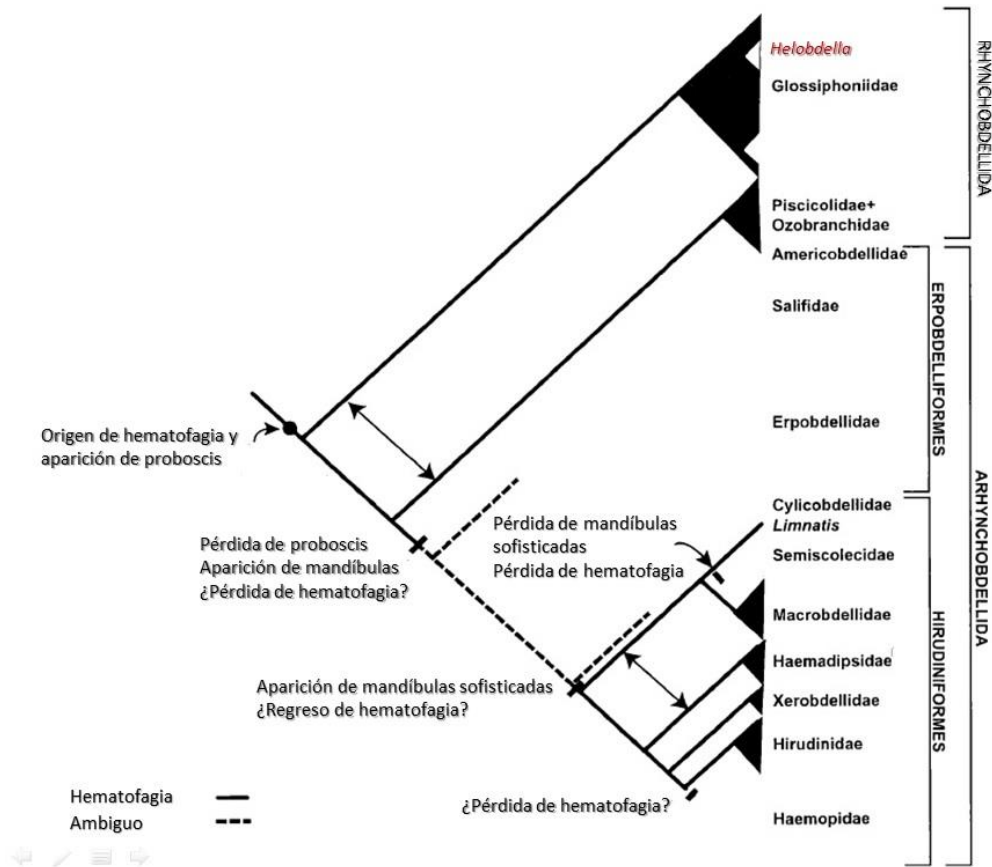


Figura 6. Reconstrucción de la evolución de las preferencias alimenticias en Euhirudinea de acuerdo con sus relaciones filogenéticas. Negro = hematófago. Punteado = ambiguo (Tomado de Borda & Siddall, 2004b).

### I.III. Complejo “*Helobdella stagnalis*”

Sawyer (1986) agrupó a las especies del género *Helobdella* en dos complejos o “series” de especies en función de la presencia o ausencia de una placa quitinoide dorsal (Figura 7). El complejo “*stagnalis*” incluye a sanguijuelas provistas de placa quitinoide dorsal, mientras que el complejo “*triserialis*” agrupa organismos carentes de la misma. Ambos grupos han resultado ser monofiléticos (Siddall & Borda, 2002; Siddall et al., 2005).

Históricamente ha existido una gran controversia taxonómica en torno a la especie *Helobdella stagnalis* Linnaeus, 1758, pues desde su descripción original realizada con base en organismos procedentes de Europa, esta especie se ha

registrado en prácticamente todos los continentes y ha sido considerada como una especie cosmopolita (Sawyer, 1986). La presencia de la placa quitinoide dorsal, un carácter fácilmente observable aún a simple vista, ha sido el principal carácter empleado para identificar a esta especie, lo cual ha ocasionado desafortunadamente, que no se preste atención a las características de otros atributos morfológicos.

Se ha sugerido con anterioridad, que la sola presencia de una placa quitinoide dorsal es un carácter insuficiente para delimitar especies, por lo que la presencia de *H. stagnalis* en todo el planeta ha sido puesta en duda (Siddall y Burrenson, 1998). Por ejemplo, en Columbus, Ohio, Estados Unidos se describió una especie de *Helobdella* con placa quitinoide dorsal bajo el nombre de *Helobdella modesta* Verrill, 1872; sin embargo, esta fue posteriormente sinonimizada con *H. stagnalis* (ver Sawyer, 1986). Posteriormente, Siddall et al. (2005), con base en caracteres moleculares y un análisis filogenético robusto, encontraron un alto grado de variación genética entre los especímenes de *H. stagnalis* de Europa y los colectados en Estados Unidos, sugiriendo que ambos linajes deben ser considerados como especies independientes, de modo que, actualmente para las formas norteamericanas se restableció el nombre propuesto por Verrill en 1872: *H. modesta*, mientras que el nombre *H. stagnalis sensu stricto* queda restringido a las formas europeas (Moser et al., 2011; Siddall y Burrenson, 1998).

#### **I.IV. Morfometría**

Desde tiempos remotos tanto la clasificación de los seres vivos como la descripción de nuevas especies se han llevado a cabo mediante el empleo de caracteres morfológicos, la comparación de rasgos anatómicos ha sido el principal criterio para distinguir entre grupos de formas morfológicas o especies diferentes (Mayr, 1996). Actualmente, mediante el análisis de información genética es posible inferir relaciones filogenéticas de manera más confiable, e incluso delimitar

especies; sin embargo, las descripciones morfológicas continúan siendo la parte medular en la descripción de éstas, lo cual ha sido objeto de debate sobre si la morfología es aún necesaria para la descripción de nuevas especies (ver Cook et al., 2010).

Durante muchos siglos la taxonomía fue netamente descriptiva, sin embargo, con el paso de los años herramientas estadísticas como el coeficiente de correlación de Pearson, análisis de varianza y análisis de componentes principales han permitido cuantificar la variación morfológica entre y dentro de las especies dando lugar a un campo llamado morfometría multivariada, o bien, morfometría tradicional (Reyment, 1985). Por sí misma, la morfometría se define como el estudio de la variación de la forma y su covariación con respecto a otras variables (Bookstein, 1991), en este sentido, la morfometría multivariada emplea medidas de distancias lineares, radios y ángulos (morfología cuantitativa) como elementos para determinar la variación en la forma de las especies a través de herramientas estadísticas (Dean et al., 2004) como el Análisis de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés).

El Análisis de Componentes Principales ha sido el método estadístico más empleado en la morfometría para discriminar entre grupos de especies ó subespecies, pues al ser un análisis multivariado es capaz de analizar grupos de datos compuestos por diversos tipos de medidas (variables) efectuadas en cada uno de los individuos de una muestra, y agruparlas en función de su grado de variación (Townend, 2002). Este análisis en particular ha sido empleado para dicho propósito en trabajos recientes (Pérez-Ponce de León, 1995; Gutiérrez & Molinari, 2008; Pinacho-Pinacho et al., 2012; Salas et al., 2012; Alcántar-Escalera et al., 2013).

En cuanto a las sanguijuelas, no existen antecedentes concernientes al uso de la morfometría multivariada para resolver problemas taxonómicos de los que se tengan noticias. Sin embargo, existen un par de trabajos en los que, por un lado, la

medición de caracteres morfológicos ha sido empleada para la construcción de matrices que se analizaron con el método de parsimonia (Bielecki et al., 2009), con la finalidad de investigar las relaciones filogenéticas entre los hirudíneos, y por el otro, como una herramienta para caracterizar o estandarizar las proporciones de la forma del cuerpo de las sanguijuelas y así facilitar su identificación taxonómica (Ahmed et al., 2009). En ambos trabajos, los caracteres medidos fueron seleccionados con base en un modelo matemático propuesto por Bielecki (1997) en el que el cuerpo de la sanguijuela está representado mediante dos elipses (ventosas) y seis trapezoides entre ellas (regiones preclitelar, clitelar y media). Dicho modelo únicamente considera la variación debida al tamaño, por lo que no es útil para análisis morfométricos multivariados (Figura 8).

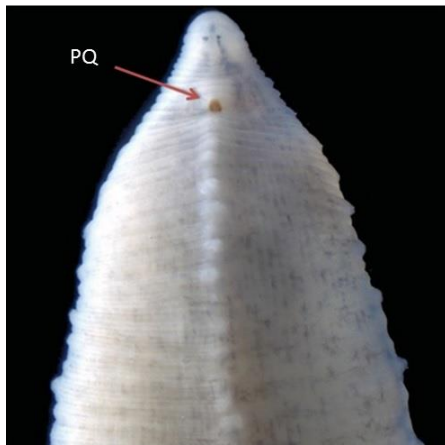


Figura 7. Vista dorsal de *Helobdella bowermani*. PQ:Placa quitinoide dorsal. (Tomado de Moser et al., 2013).

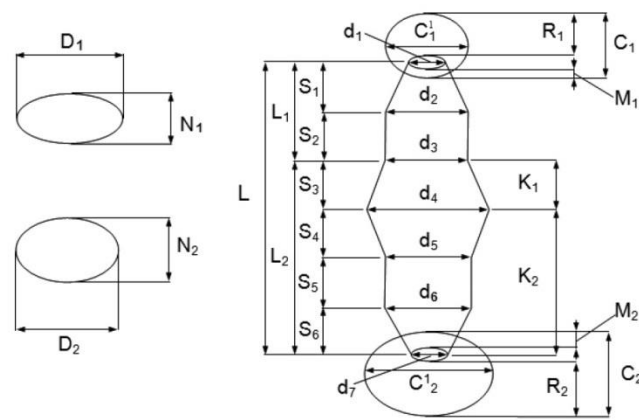


Figura 8. Modelo matemático propuesto por Bielecki (1997) para describir la forma del cuerpo de las sanguijuelas uniformemente.

En el presente trabajo, se explora el uso de análisis multivariados para evaluar la variación morfológica de caracteres morfológicos internos y externos de un grupo de sanguijuelas que han sido consideradas como integrantes del complejo *Helobdella stagnalis* con el fin de resolver problemas taxonómicos dentro del mismo.

#### **I.V. Antecedentes en México**

En México, el campo de la hirudinología tuvo sus inicios a mediados del siglo XIX con la publicación de cuatro trabajos relacionados con sanguijuelas; el primero de ellos corrió a cargo del naturalista italiano Filippo de Filippi quien, en 1849, realizó la primer descripción formal de un euhirudíneo de México; *Haementeria officinalis*. Por otra parte, Jiménez (1865; 1866) contribuyó con la publicación de dos trabajos en los que hizo alusión, principalmente, a aspectos médicos relacionados con el uso de “la sanguijuela medicinal”. Finalmente, Mendoza y Herrera (1865) publicaron un trabajo titulado “Observaciones sobre la sanguijuela que se usa en esta capital”. Otros naturalistas, en su mayoría extranjeros, contribuyeron con el conocimiento de la hirudofauna mexicana (Dugès, 1886; Moore, 1936; 1938; Richardson, 1971; Ringuelet, 1976); sin embargo, es de particular importancia el Dr. Eduardo Caballero y Caballero quién describió ocho especies nuevas de hirudíneos de México entre 1930 y 1959. Por su parte, Ringuelet (1981) elaboró una clave taxonómica para el reconocimiento de los hirudíneos de nuestro país. En la misma década, López-Jiménez (1985) realizó el estudio morfológico de 10 especies de sanguijuelas de México como parte de su tesis de licenciatura en donde además describió una especie nueva, parásita de tortugas de agua dulce. Doce años más tarde, Lamothe-Argumedo et al. (1997) enlistaron en el Catálogo de la Colección Nacional de Helmintos las 22 especies de sanguijuelas que habían sido descritas para México hasta el momento. El estudio de las sanguijuelas de nuestro país se detuvo durante aproximadamente dos décadas, pero fue retomado con la descripción de algunas especies nuevas de sanguijuelas con base en caracteres morfológicos (Oceguera-Figueroa & León-Règagnon, 2005; Oceguera-Figueroa 2006 a, b; 2007; 2008; Oceguera-Figueroa & Siddall, 2008, López-Jiménez & Oceguera-Figueroa, 2009) y con el reconocimiento de otras con base en caracteres moleculares (Oceguera-Figueroa et al., 2010; Kvist et al., 2010). Por otra parte, se ha profundizado en el estudio de las relaciones filogenéticas de algunos grupos de euhirudíneos empleando principalmente marcadores moleculares (Oceguera-Figueroa et al.,

2005; Borda et al., 2008; Ocegüera-Figueroa et al., 2010; 2011; Ocegüera-Figueroa, 2012). La publicación más reciente sobre la diversidad del grupo fue realizada por Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon (2014) quienes enlistaron 31 especies descritas para el país, distribuidas en 27 estados y el Distrito Federal. De acuerdo con estos autores, 20 especies son endémicas de México.

Ringuelet (1981) y Sawyer (1986) señalaron que en México se distribuían dos especies de *Helobdella* con placa quitinoide dorsal: *H. adiastrala* y *H. stagnalis*. Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon (2005) estudiaron los ejemplares que Ringuelet (1981) analizó y con base en los cuales realizó el registro de *H. adiastrala* en México (ejemplares en la colección personal de Serapio López Jiménez) y concluyeron que en realidad se trataban de una especie distinta: *Helobdella atli* Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon, 2005. Siddall et al. (2005) restablecieron el nombre de *H. modesta* para las formas norte americanas que anteriormente se habían sinonimizado con *H. stagnalis*, esta última quedando restringida a las formas europeas. Este cambio taxonómico dejó a los ejemplares de México registrados como *H. stagnalis* en una situación nomenclatural no resuelta ya que no habían sido estudiadas bajo esta nueva perspectiva.

Posteriormente, mediante un análisis de diversidad genética de la subunidad I del gen del Citocromo c Oxidasa (COI) realizado por Ocegüera-Figueroa et al. (2011) se puso de manifiesto la existencia de al menos tres linajes independientes de especies de *Helobdella* con placa quitinoide dorsal en México, uno de ellos corresponde a *H. atli*, otro corresponde a la especie que históricamente se había considerado como *H. stagnalis* (*Helobdella* “*stagnalis*” 2 en la figura 9) el cual forma un linaje independiente al de *H. modesta* de EUA. El tercer linaje, (*Helobdella* “*stagnalis*” 1 en la figura 9) resultó ser genéticamente próxima a una especie descrita recientemente en Taiwán como *Helobdella octatetisaca* Lai, Chang & Chen, 2009 por lo que la forma mexicana adoptaría dicho nombre (Figura 9). En resumen, 3 grupos de *Helobdella* con placa quitinoide dorsal fueron detectados con base en caracteres moleculares: *H. atli*, *H.*

*octatestisaca* y un tercer grupo sin nombre formal, distribuido en Temixco, Estado de Morelos, que será denominado *Helobdella "stagnalis" 2* siguiendo la nomenclatura empleada en Ocegüera-Figueroa et al. (2011). Ninguna de las formas mexicanas ha sido diferenciada con base en caracteres morfológicos de su contraparte de EUA, *H. modesta* (antes *H. stagnalis*), de la cual no existe una descripción morfológica completa.

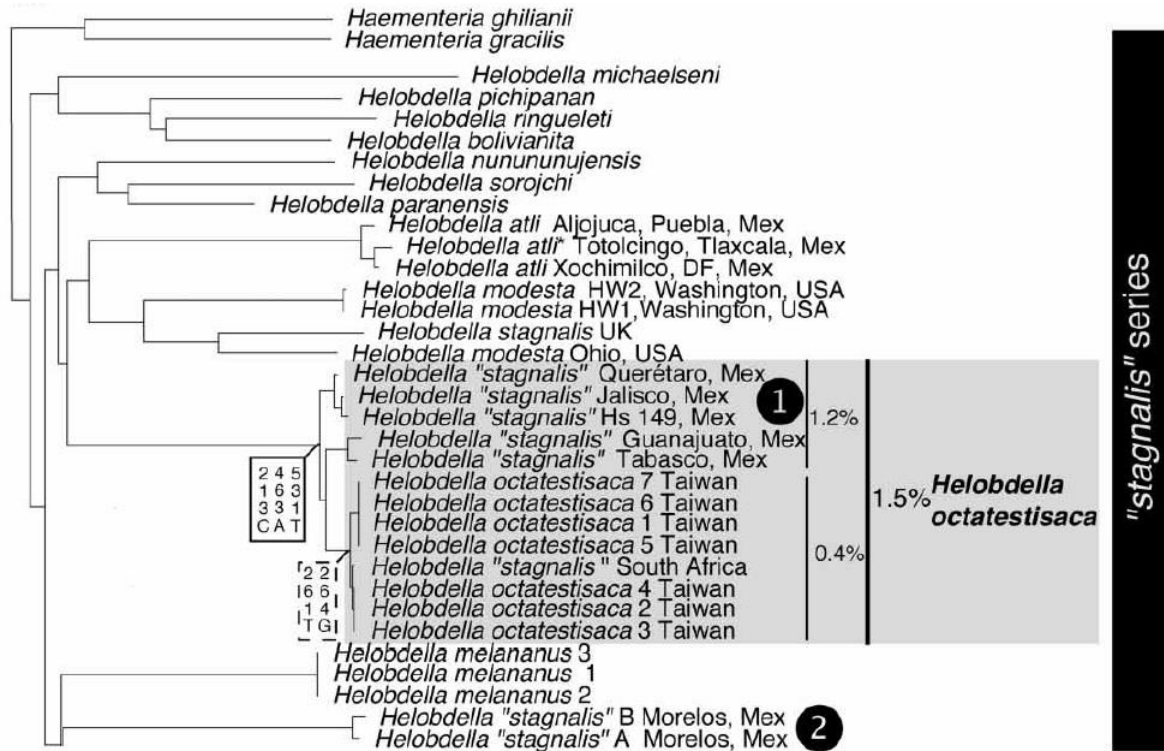


Figura 9. Árbol obtenido por Ocegüera-Figueroa et al. (2011) mediante Neighbor-joining basado en el modelo de sustitución de dos parámetros de Kimura correspondiente al locus COI de especies representativas de *Helobdella* mostrando el complejo "stagnalis". Los números frente a las líneas indican a distancia genética promedio dentro de las especies de un grupo particular.

## II. OBJETIVOS

### II.I. Objetivo general

- Contribuir con el conocimiento de los Euhirudíneos en México y evaluar el uso de herramientas de estadística multivariada para reconocer grupos taxonómicos de sanguijuelas cercanamente emparentados entre sí.



## II.II. Objetivos particulares

- Determinar si la variabilidad molecular detectada previamente en las especies mexicanas de *Helobdella* con placa quitinoide dorsal corresponde con algún tipo de variación morfológica y si esta puede ser empleada para distinguirlas como especies independientes.
- Esclarecer y actualizar la situación taxonómica de las formas incluidas en el grupo “*stagnalis*” de México.
- Recuperar, mediante un análisis multivariado de datos morfológicos, los tres linajes reconocidos molecularmente por Ocegüera-Figueroa et al. (2011).
- Corroborar que la recientemente restablecida *Helobdella modesta* de Estados Unidos es morfológicamente distinta de las formas mexicanas.

## III. JUSTIFICACIÓN

La descripción de nuevas especies empleando principalmente caracteres morfológicos ha sido, durante siglos, el método más utilizado para explorar la biodiversidad a nivel mundial, sin embargo, el uso de marcadores moleculares ha puesto de manifiesto la existencia de un alto grado de variación genética entre algunos organismos que aparentemente corresponden a la misma especie, introduciendo el concepto de “especies crípticas” para aquellas que son difíciles de reconocer empleando únicamente métodos de sistemática tradicional (Knowlton, 1986). Como consecuencia, se ha tenido que reevaluar una gran cantidad de grupos taxonómicos mediante técnicas moleculares, encontrando que en algunos casos sí existen atributos morfológicos útiles para delimitar especies, y que a pesar de ello habían sido clasificadas como una sola debido a descripciones taxonómicas ambiguas como López-Caballero et al. (2013) demostraron, o bien,

que en algunos casos, los caracteres morfológicos no son suficientes para la delimitación de las especies como en algunos representantes del género *Helobdella* (Siddall & Borda, 2002).

El complejo “*stagnalis*” es un claro ejemplo de un grupo que necesita ser reevaluado, pues desde la descripción de *H. stagnalis* Linnaeus, 1758, la clasificación taxonómica de las especies relacionadas a esta ha sido sumamente complicada. La presencia de un carácter tan conspicuo como la placa quitinoide dorsal ha imperado como un criterio de gran importancia para reconocer a las especies de dicho complejo. Siddall et al. (2005) demostraron mediante técnicas moleculares que si bien la diferenciación morfológica entre la forma de EUA (*H. modesta*) y la europea (*H. stagnalis*) no es precisamente clara, se trata de linajes que pueden ser considerados como especies independientes, de tal forma que la breve descripción morfológica realizada por Verril es actualmente respaldada con evidencia molecular.

En cuanto a las especies mexicanas, el estudio de diversidad genética realizado por Ocegüera-Figueroa et al. (2011) sugiere que existen tres linajes dentro del complejo “*stagnalis*” de los cuales, dos muestran claras diferencias morfológicas y actualmente cuentan con descripciones taxonómicas que las distinguen como especies distintas (*H. atli* y *H. octatetisaca*), mientras que el linaje restante (*Helobdella* “*stagnalis*” 2) no ha sido estudiado morfológicamente y se desconoce si se trata de una especie críptica o de una especie nueva con atributos morfológicos que la diferencien del resto de las especies del complejo. Es importante señalar que este último linaje es claramente distinto al linaje de *H. modesta* (antes *H. stagnalis*) de América del Norte con base en secuencias del COI.

Dado que la morfología es indispensable para el reconocimiento de nuevas especies, el estudio de morfometría multivariada realizado en el presente trabajo será de gran utilidad para dar soporte a la evidencia molecular encontrada

previamente, aportando, de ser el caso, una diagnosis detallada que diferencie morfológicamente a los tres linajes de sanguijuelas escutíferas mexicanas: *H. atli*, *H. octatestisaca* y *H. “stagnalis”* 2, además de la forma norteamericana *H. modesta*.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Hipótesis nula. No se encontrará variación morfológica que permita distinguir los distintos linajes detectados con la información molecular, por lo cual las muestras estudiadas en realidad constituyen un solo linaje con amplia distribución geográfica.

Hipótesis alternativa: La variación morfológica encontrada mediante el análisis multivariado estará correlacionada con los linajes detectados mediante caracteres moleculares, por lo cual las muestras deben ser consideradas como especies independientes.

#### **V. MÉTODO**

##### **V.I. Colecta del material biológico**

Se realizaron cuatro salidas a campo (Cuadro 3) en tres estados de México y uno de Estados Unidos. Los ejemplares de sanquijuelas fueron encontrados entre las raíces de vegetación acuática y adheridas debajo de rocas a las orillas de los cuerpos de agua, se colectaron manualmente y fueron depositados en recipientes plásticos con agua del medio para su traslado al laboratorio.

**Cuadro 3. Datos de colecta del material biológico.**

	Número de Ejemplares Colectados	Fecha de colecta	Localidad	Estado	País	Coordenadas
<i>Helobdella "stagnalis" 2</i>	30	21/feb/2013	Temixco	Morelos	México	18° 51' 00" N 99° 13' 57" O
<i>Helobdella modesta</i>	30	26/abr/2013	Connecticut	Hartford	Estados Unidos	41° 49' 02" N 72° 15' 33" O
<i>Helobdella atli</i>	30	19/sep/2013	Aljojuca	Puebla	México	19° 05' 25" N 97° 31' 47" O
<i>Helobdella octatestisaca</i>	30	09/ene/2014	San Juan del Río	Querétaro	México	20° 26' 53" N 100° 03' 48" O

## V.II. Procesamiento del material hirudológico

Una vez en el laboratorio, los ejemplares fueron anestesiados mediante la adición gradual de alcohol al 70%. Una vez que el movimiento de las sanguijuelas cesó completamente, fueron aplanadas entre dos portaobjetos. Los ejemplares permanecieron alrededor de dos horas entre los portaobjetos y posteriormente fueron fijadas en alcohol al 96%. Ciento veinte ejemplares, 30 de cada uno de los grupos por estudiar, fueron teñidos mediante la técnica combinada de paracarmín de Meyer-hematoxilina de Ehrlich empleada por López-Jiménez (1985) y montados en preparaciones permanentes usando bálsamo de Canadá (Anexo I).

## V. III. Análisis de morfometría tradicional

Veinte ejemplares representativos de *H. atli*, *H. octatestisaca*, *H. modesta* y del linaje considerado como *H. "stagnalis" 2* fueron seleccionados para llevar a cabo la toma de datos morfométricos de 32 caracteres, tanto de caracteres internos como externos (Anexo 2). Las mediciones de cada uno de los caracteres se realizaron en un microscopio óptico (Olympus CX40) con ocular micrométrico. El análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) es un análisis que no admite datos ausentes, de modo que en los casos en que un carácter no está presente en algún organismo de la muestra, es posible sustituirlo con el valor promedio del resto de los organismos, o bien eliminar dicha variable debido a que la variación ocasionada por un dato faltante podría sesgar los resultados (Townend, 2002). El segundo criterio fue empleando en este trabajo, de

modo que cinco variables fueron eliminadas (longitud del quinto y sexto par de ciegos del buche, distancia entre el sexto par de testisacos, y longitud de los post-ciegos izquierdo y derecho) restando sólo 27 para el análisis (Cuadro 4). Los datos de cada uno de los caracteres fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05 y una prueba de Scheffé con la finalidad de detectar caracteres que presentaran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y de esta forma, detectar y eliminar los datos que no mostraran ser estadísticamente diferentes entre sí de subsecuentes análisis. La información seleccionada bajo el criterio antes señalado fue empleada para realizar un Análisis de Componentes Principales con el objetivo de explorar los patrones de variación morfológica entre las especies. Los análisis se llevaron a cabo mediante el software STATISTICA versión 7.1. (StatSoft, 2005).

## VI. RESULTADOS

El análisis de varianza (ANOVA) reveló que con excepción de la distancia entre los ocelos (carácter 2), los 26 caracteres restantes muestran diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre al menos, la comparación de un par de los grupos. Los valores de significancia de los 162 pares de comparaciones se muestran en el anexo 3.

**Cuadro 4. Variables empleadas para los análisis estadísticos. Se muestran los promedios y rangos para cada linaje. Las medidas están dadas en milímetros.**

Carácter	Abreviación	<i>H. atli</i>	<i>H. modesta</i>	<i>H. octatetisaca</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>
1 Longitud máxima	LMÁX	6.35 4.69-8.15	8.98 6.56-11.81	8.61 6.91-10.16	10.22 7.96-13.69
2 Distancia entre ocelos	DOCELOS	0.10 0.09-0.15	0.11 0.09-0.14	0.12 0.08-0.14	0.12 0.09-0.15
3 Longitud proboscis	LPROB	1.97 1.32-2.29	1.98 1.57-2.58	1.60 1.24-1.78	2.72 2.24-3.56
4 Longitud 1er par de ciegos del buche	L1CB	0.57 0.35-0.82	0.69 0.40-0.96	1.29 0.83-1.78	1.28 0.83-1.83
5 Longitud 2do par de ciegos del buche	L2CB	0.63 0.43-0.92	0.55 0.40-0.86	1.26 0.89-1.78	1.16 0.74-1.76
6 Longitud 3er par de ciegos del buche	L3CB	0.64 0.39-0.83	0.53 0.35-0.83	1.30 0.95-1.71	1.14 0.73-1.70
7 Longitud 4to par de ciegos del buche	L4CB	0.62 0.37-0.94	0.52 0.38-0.84	1.16 0.89-1.51	0.92 0.61-1.32
8 Longitud del intestino	LINT	1.62 1.09-2.40	2.94 1.99-4.77	2.58 2.05-3.17	3.03 2.58-4.17
9 Longitud 1er par de	L1CI	0.67	1.05	1.12	1.11

	ciegos del intestino		0.37-0.86	0.83-1.26	0.80-1.47	0.89-1.46
10	Longitud 2do par de ciegos del intestino	L2CI	0.76	1.15	1.28	1.36
			0.53-1.06	1.03-1.37	0.99-1.56	1.07-1.61
11	Longitud 3er par de ciegos del intestino	L3CI	0.89	1.19	1.27	1.54
			0.62-1.13	1.04-1.44	0.99-1.59	1.19-1.96
12	Longitud 4to par de ciegos del intestino	L4CI	0.92	1.22	1.34	1.59
			0.56-1.22	0.90-1.58	1.02-1.64	1.23-2.00
13	Distancia entre 1er par de testisacos	D1T	0.65	0.93	0.96	1.17
			0.37-1.02	0.68-1.22	0.70-1.18	0.90-1.75
14	Distancia entre 2do par de testisacos	D2T	0.71	0.98	0.99	1.29
			0.42-1.12	0.74-1.22	0.69-1.18	0.89-1.98
15	Distancia entre 3er par de testisacos	D3T	0.71	0.88	1.07	1.36
			0.42-1.06	0.69-1.09	0.81-1.28	1.00-2.03
16	Distancia entre 4to par de testisacos	D4T	0.69	0.86	1.07	1.32
			0.48-1.06	0.68-1.21	0.77-1.31	0.99-1.75
17	Distancia entre 5to par de testisacos	D5T	0.64	0.87	1.01	1.18
			0.43-1.12	0.70-1.14	0.80-1.21	0.87-1.60
18	Longitud ventosa posterior	LVP	0.66	1.08	1.25	1.04
			0.53-0.83	0.83-1.31	1.00-1.48	0.73-1.31
19	Ancho ventosa posterior	AVP	0.70	1.11	1.29	1.13
			0.61-0.97	0.88-1.38	1.08-1.45	0.83-1.37
20	Largo placa quitinoide	LPQ	0.09	0.19	0.22	0.28
			0.05-1.12	0.14-0.26	0.16-0.27	0.18-0.34
21	Ancho placa quitinoide	APQ	0.11	0.29	0.31	0.28
			0.09-0.15	0.24-0.39	0.26-0.36	0.19-0.34
22	Largo cuerno atrial Izquierdo	LCAIZQ	0.18	0.23	0.33	0.46
			0.11-0.26	0.14-0.29	0.26-0.40	0.31-0.60
23	Largo cuerno atrial Derecho	LCADER	0.18	0.22	0.33	0.45
			0.11-0.31	0.16-0.28	0.27-0.40	0.33-0.59
24	Distancia entre cuernos Atriales	DCATR	0.28	0.35	0.48	0.47
			0.23-0.42	0.26-0.50	0.32-0.62	0.33-0.63
25	Anchura a la altura de gonoporo masculino	AGMASC	1.18	1.7	2.05	1.57
			0.92-1.69	1.38-2.26	1.59-2.59	1.04-2.29
26	Longitud ventosa anterior	LVA	0.18	0.28	0.18	0.26
			0.11-0.29	0.22-0.33	0.09-0.24	0.16-0.34
27	Ancho ventosa posterior	AVA	0.25	0.40	0.36	0.42
			0.16-0.34	0.34-0.48	0.29-0.42	0.34-0.54

El 77.86% de la varianza es explicada por los primeros dos componentes, mismos que evidenciaron la separación de los linajes en cuatro grupos, mostrando una clara separación de *H. modesta* y *H. atli*. Por el contrario, se observa un pequeño solapamiento entre *H. octatestisaca* y *H. "stagnalis" 2* (Figura 10). Respecto al primer componente, todos los caracteres excepto la longitud de la ventosa anterior tuvieron eigenvalores muy altos (por encima de 0.5), explicando el 66.22% de la varianza (Cuadro 5), mientras que el segundo componente explicó el 11.65% de la misma y las medidas más importantes fueron la longitud del segundo, tercer y cuarto ciegos del buche, así como el largo de la ventosa anterior (Cuadro 5). El tercer componente no tuvo un patrón claro en la delimitación de los grupos al explicar el 8.06% de la varianza, motivo por el cual no fue graficado.

**Cuadro 5. Eigenvalores obtenidos del PCA con las variables seleccionadas. Las medidas importantes están en negritas.**

CARÁCTER	PCA1	PCA2	PCA3
LMÁX	<b>-0.839728</b>	0.369489	0.059742
LPROB	<b>-0.655052</b>	0.363340	<b>0.568357</b>
L1CB	<b>-0.816038</b>	-0.451748	-0.000642
L2CB	<b>-0.703318</b>	<b>-0.632701</b>	0.021860
L3CB	<b>-0.707270</b>	<b>-0.658236</b>	-0.045136
L4CB	<b>-0.644091</b>	<b>-0.706430</b>	-0.138550
LINT	<b>-0.755728</b>	0.458908	-0.092469
L1CI	<b>-0.869116</b>	0.099017	-0.204188
L2CI	<b>-0.918754</b>	0.113986	-0.127887
L3CI	<b>-0.896419</b>	0.108027	0.140095
L4CI	<b>-0.918801</b>	0.052321	0.134505
D1T	<b>-0.893546</b>	0.023469	0.179730
D2T	<b>-0.870783</b>	0.013338	0.283061
D3T	<b>-0.898559</b>	-0.159558	0.305128
D4T	<b>-0.913499</b>	-0.186943	0.258037
D5T	<b>-0.911472</b>	-0.093771	0.156625
LVP	<b>-0.761331</b>	0.128164	<b>-0.575609</b>
AVP	<b>-0.841531</b>	0.096009	-0.482215
LPQ	<b>-0.888645</b>	0.168769	-0.027782
APQ	<b>-0.780187</b>	0.245598	-0.475804
LCAIZQ	<b>-0.864245</b>	-0.046201	0.302869
LCADER	<b>-0.857546</b>	-0.067879	0.280955
DCATR	<b>-0.833250</b>	-0.212247	-0.074961
AGMASC	<b>-0.705965</b>	-0.050961	<b>-0.578025</b>
AVA	<b>-0.786366</b>	0.444167	-0.148834
LVA	-0.425316	<b>0.733982</b>	0.151869

El análisis de varianza indicó que los caracteres con valores que se consideran estadísticamente discriminantes para los cuatro grupos ( $P < 0.05$ ) son: distancia entre el tercer, cuarto y quinto par de testisacos; y largo de la placa quitinoide dorsal (Cuadro 6, Figura 11).

Debido a que *H. atli* y *H. octatestisaca* actualmente cuentan con descripciones morfológicas completas, en el presente trabajo se realiza la descripción de *Helobdella modesta* y *Helobdella "stagnalis"* 2.

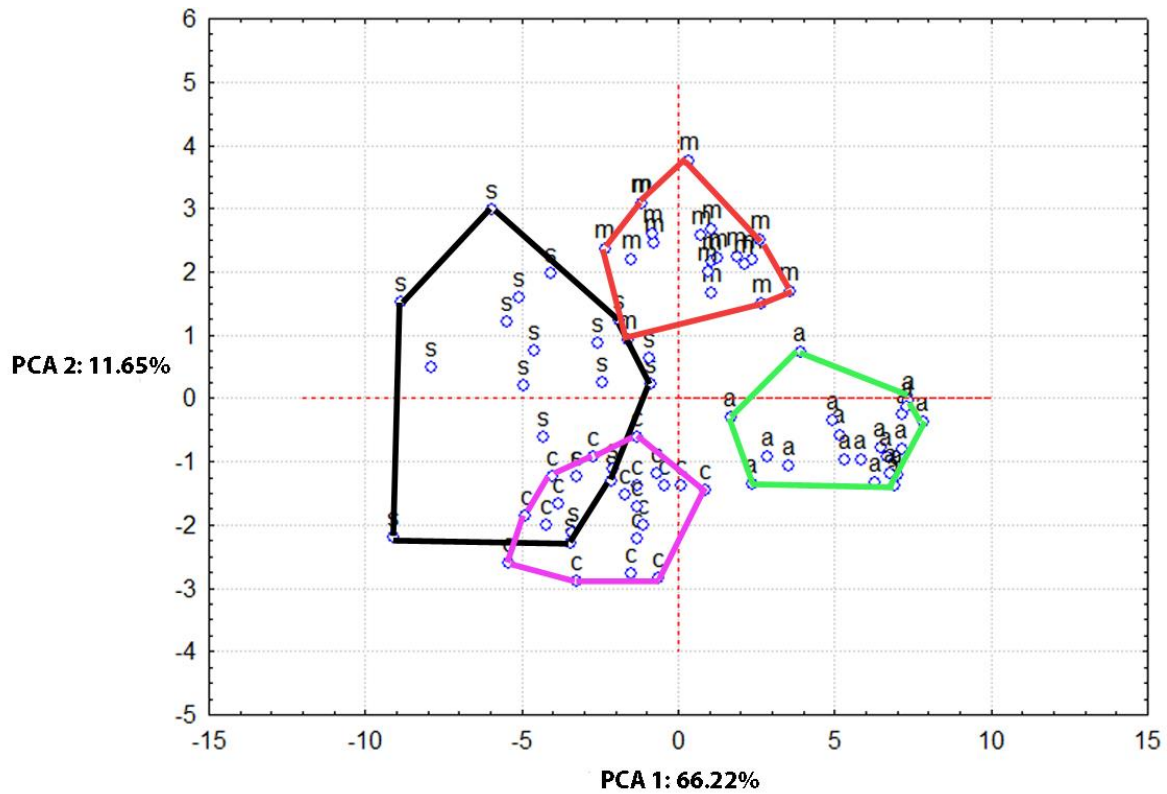


Figura 10. Análisis de componentes principales de los cuatro linajes incluidos en el complejo “*Helobdella stagnalis*”. a = *H. atli*, c = *H. octatestisaca*, m = *H. modesta*, s = *H. “stagnalis” 2*.

**Cuadro 6. Caracteres estadísticamente discriminantes para los cuatro linajes ( $P < 0.05$ ) de acuerdo con el análisis de varianza ANOVA y la prueba de Scheffé. Las medidas están dadas en milímetros.**

Caracter	Abreviación	<i>H. atli</i>	<i>H. modesta</i>	<i>H. octatestisaca</i>	<i>H. stagnalis</i>
Distancia entre 3er par de testisacos	D3T	0.71 0.42-1.06	0.88 0.69-1.09	1.07 0.81-1.28	1.36 1.00-2.03
Distancia entre 4to par de testisacos	D4T	0.69 0.48-1.06	0.86 0.68-1.21	1.07 0.77-1.31	1.32 0.99-1.75
Distancia entre 5to par de testisacos	D5T	0.64 0.43-1.12	0.87 0.70-1.14	1.01 0.80-1.21	1.18 0.87-1.60
Largo placa quitinoide dorsal	LPQ	0.09 0.05-1.12	0.19 0.14-0.26	0.22 0.16-0.27	0.28 0.18-0.34



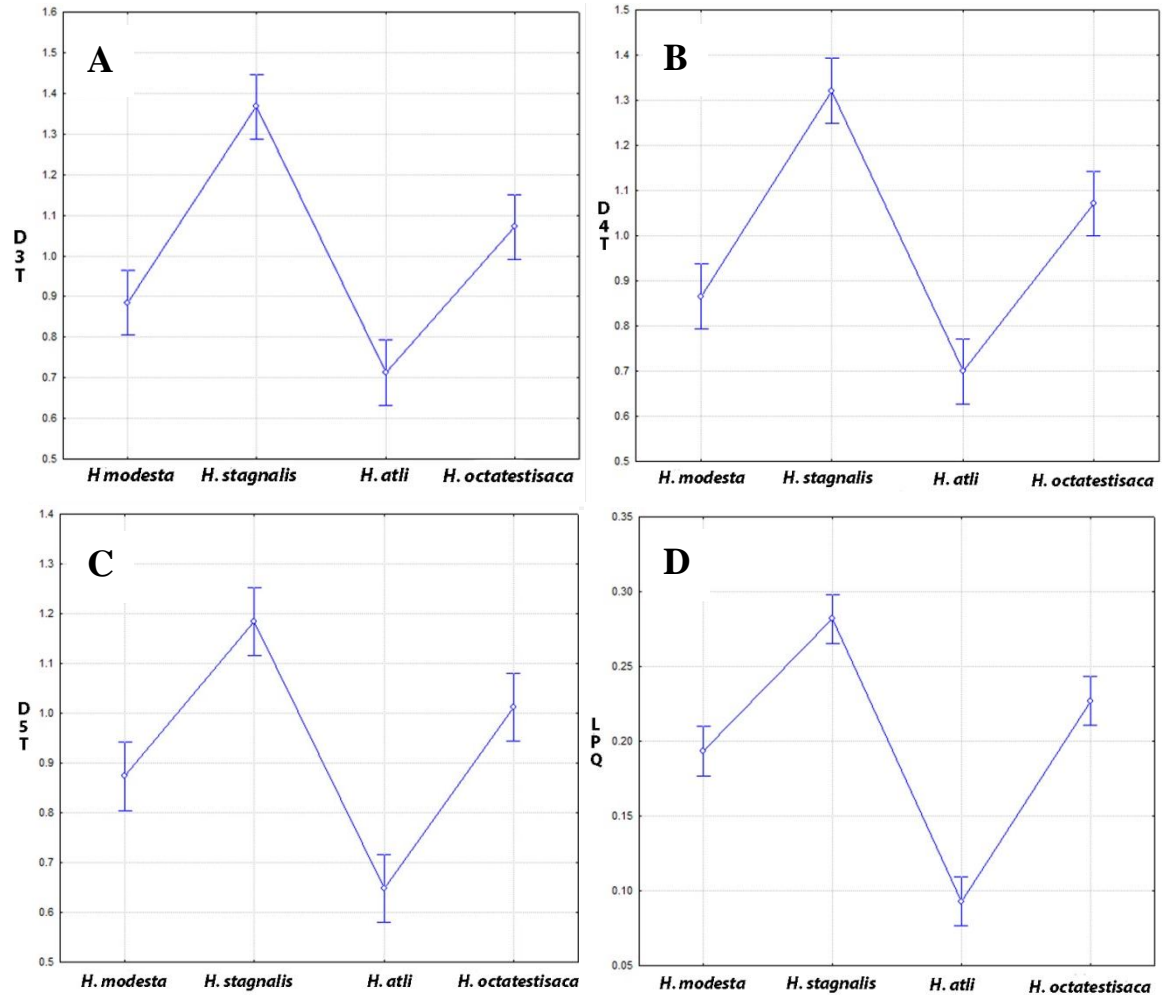


Figura 11. Caracteres estadísticamente diferentes entre los cuatro linajes ( $P < 0.05$ ). Distancia entre tercer par de testisacos (A). Distancia entre cuarto par de testisacos (B). Distancia entre quinto par de testisacos (C). Largo de la placa quitinoide dorsal (D). Las barras verticales denotan el intervalo de confianza del 95%.

## VI. I. Descripción de *Helobdella* “*stagnalis*” 2

Phylum Annelida

Familia Glossiphoniidae Vaillant, 1890

Género *Helobdella* R. Blanchard, 1896

Especie *Helobdella* “*stagnalis*” 2

Número de catálogo: CNHE 8906

La caracterización se realizó con base en 20 ejemplares adultos recolectados en Temixco, Estado de Morelos (Cuadro 3).

**Morfología externa:** Cuerpo pequeño, aplanado dorsoventralmente con el extremo anterior más adelgazado que el posterior, en forma de hoja. Longitud de 7.96-13.69 (10.22). Ancho del cuerpo a la altura del gonoporo masculino de 1.04-2.29 (1.57). Superficie dorsal con pigmentos oscuros concentrados en las regiones media y posterior, además de una línea longitudinal no pigmentada a lo largo de todo el cuerpo (Figura 12). Superficie ventral con pigmentos oscuros en las regiones media y posterior, en menor cantidad que en la superficie dorsal. Gonoporos separados por un anillo, masculino en XII a1/a2 y femenino en XII a2/a3. Un par de manchas oculares bien separadas entre sí en IV. Distancia entre las manchas oculares de 0.09-0.15 (0.12). Placa quitinoide dorsal, triangular en VIII a1/a2 de color marrón con una longitud de 0.18-0.34 (0.28) y ancho de 0.19-0.34 (0.28). Ventosa anterior más o menos circular, más ancha 0.34-0.54 (0.42) que larga 0.16-0.34 (0.26). Boca subterminal en la región anterior de la ventosa. Ventosa posterior elíptica, generalmente más ancha 0.83-1.37 (1.13) que larga 0.73-1.31 (1.04). Ano localizado en la superficie dorsal entre los somitos XXVI y XXVII.

**Anulación:** Somitos I y II fusionados, somito III unianillado, somitos IV y V bianillados, somitos VI-XXIV trianillados, somitos XXV y XXVI bianillados, somito XXVII unianillado.

**Morfología interna:** Proboscis muscular con una longitud de 2.24-3.56 (2.72). Células salivales dispersas cuyos conductos se unen y dan lugar a un conducto común que se inserta en la base de la proboscis en el somito XI. Bucle con cinco pares de ciegos de XIV a XIX. Longitud del primero 0.83-1.83 (1.28), segundo 0.74-1.76 (1.16), tercero 0.73-1.70 (1.14), cuarto 0.61-1.32 (0.92), quinto 0.47-1.11 (0.75). Post-ciegos extendiéndose hasta el somito XXIV, de los que el izquierdo mide 1.18-2.65 (2.00) y el derecho 1.53-2.53 (1.99). Intestino con una longitud de 2.58-4.17 (3.03) de XX a XXIII con cuatro pares de ciegos de los que el primero

mide 0.89-1.46 (1.11), el segundo 1.07-1.61 (1.36), el tercero 1.19-1.96 (1.54), el cuarto 1.23-2.00 (1.59). Seis pares de testisacos intersegmentales de XIII/XIV-XVIII/XIX. La distancia entre el primer par es de 0.90-1.75 (1.17), entre el segundo 0.89-1.98 (1.29), entre el tercero 1.00-2.03 (1.36), entre el cuarto 0.99-1.75 (1.32), entre el quinto 0.87-1.60 (1.18), entre el sexto 0.68-1.38 (0.98). Cuernos atriales sin recorrido ascendente, longitud del cuerno atrial izquierdo 0.31-0.60 (0.46), longitud del cuerno atrial derecho 0.33-0.59 (0.45), distancia entre cuernos atriales 0.33-0.63 (0.47). Ovisacos simples que alcanzan el somito XVII.

### **Comentarios taxonómicos**

Con base en caracteres morfológicos, *Helobdella "stagnalis" 2* puede ser diferenciada fácilmente de *Helobdella octatestisaca* debido al número de pares de testisacos, cinco en *H. octatestisaca* y seis en *H. "stagnalis" 2*. Las manchas oculares en *H. octatestisaca* son de forma triangular y se encuentran muy próximas entre sí, mientras que en *H. "stagnalis" 2* están claramente separadas y son de forma esférica. El cuarto y quinto par de ciegos del buche se encuentran muy reducidos en *H. octatestisaca*, mientras que en *H. "stagnalis" 2* sólo presenta cinco pares de ciegos del buche bien desarrollados.

*Helobdella "stagnalis" 2* es fácilmente distinguible de *H. atli* debido a la ausencia de proyecciones marginales en a2 y a3; y por la presencia de post-ciegos característicos de *H. "stagnalis" 2*. Además, el número de ciegos del buche es seis en *H. atli* y cinco en *H. "stagnalis" 2*.

*Helobdella "stagnalis" 2* es diferente de *H. modesta* en el número de ciegos del buche, *H. "stagnalis" 2* presenta cinco pares de ciegos bien desarrollados, mientras que *H. modesta* presenta cuatro pares de ciegos bien desarrollados y, en algunos casos, un quinto par poco diferenciado, además de carecer de sexto par.

En términos morfométricos, los 26 caracteres empleados para el PCA muestran diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre *H. atli* y *H. "stagnalis" 2* por lo que la diferenciación morfológica entre dichas especies es bastante sencilla. *H. "stagnalis" 2* y *H. octatetisaca* son estadísticamente diferentes en 20 caracteres, compartiendo similitudes en los caracteres 4, 5, 9, 10, 20 y 24 (Tabla 2) permitiendo delimitarlas de manera eficiente.

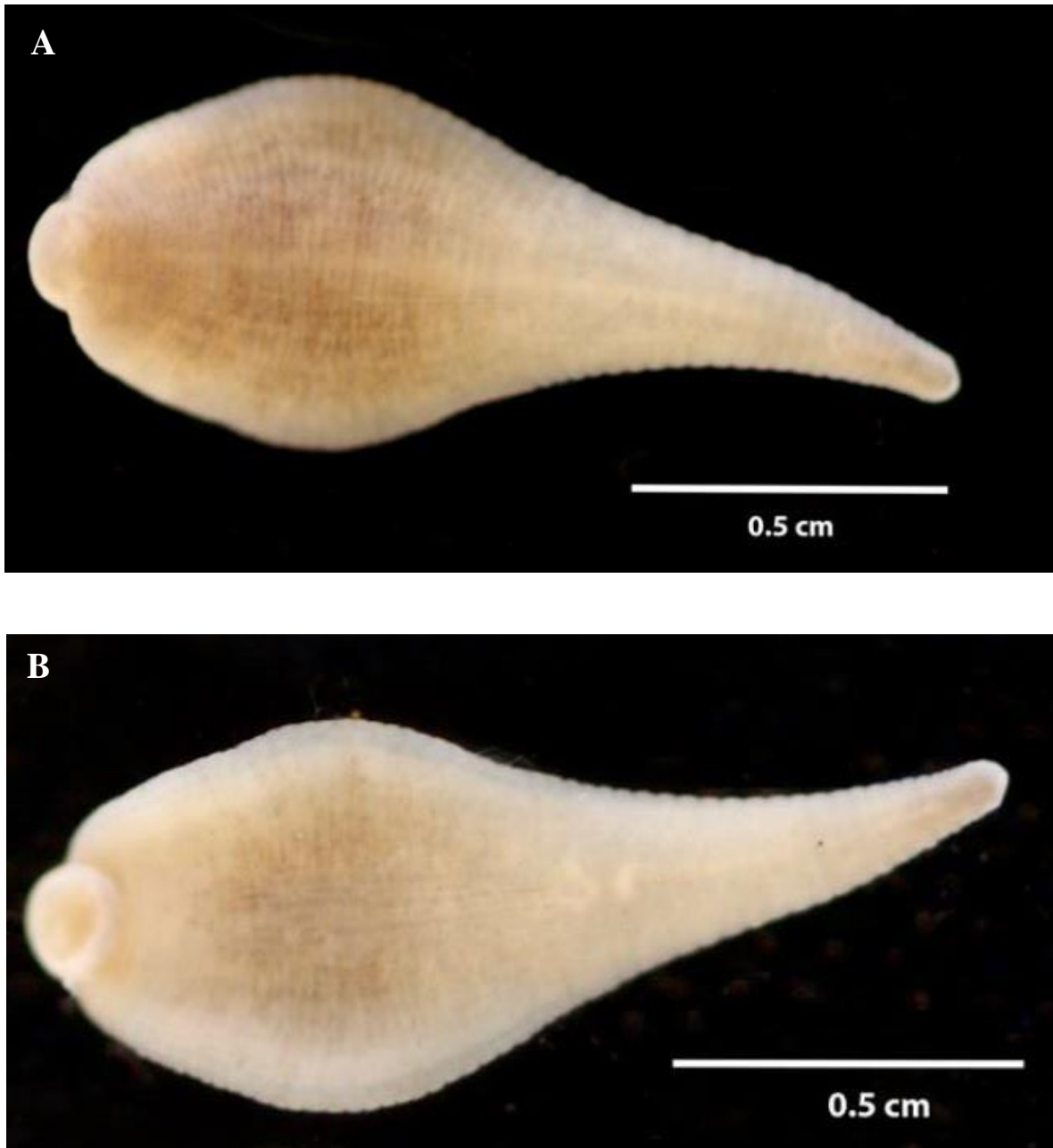


Figura 12. *Helobdella "stagnalis" 2*. Vista dorsal (A). Vista ventral (B).

## VI. II. Descripción de *Helobdella modesta* (Verril, 1872)

Número de catálogo: CNHE 8907

La caracterización se realizó con base en 20 ejemplares adultos recolectados en Connecticut, Hartford, Estados Unidos.

**Morfología externa:** Cuerpo pequeño, aplanado dorsoventralmente con el extremo anterior más adelgazado que el posterior, en forma de hoja. Longitud máxima de 6.56-11.81 (8.98). Ancho a la altura del gonoporo masculino de 1.38-2.26 (1.70). Superficie dorsal y ventral sin ningún tipo de pigmentación. Gonoporos separados por un anillo, masculino en XII a1/a2 y femenino en XII a2/a3. Un par de manchas oculares bien separadas 0.09-0.14 (0.11) en IV. Placa quitinoide dorsal triangular en VIII a1/a2 de color marrón con una longitud de 0.14-0.26 (0.19) y ancho de 0.24-0.39 (0.29). Ventosa anterior más o menos triangular, más ancha 0.34-0.48 (0.40) que larga 0.22-0.33 (0.28). Boca subterminal en la región anterior de la ventosa. Ventosa posterior elíptica, generalmente más ancha 0.88-1.38 (1.11) que larga 0.83-1.31 (1.08). Ano localizado en la superficie dorsal entre los somitos XXVI y XXVII.

**Anulación:** Somitos I y II fusionados, somito III unianillado, somitos IV y V bianillados, somitos VI-XXIV trianillados, somitos XXV y XXVI bianillados, somito XXVII unianillado.

**Morfología interna:** Proboscis muscular con una longitud de 1.57-2.58 (1.98). Células salivales dispersas cuyos conductos se unen y dan lugar a un conducto común que se inserta en la base de la proboscis en el somito XI. Buche con cuatro pares de ciegos bien diferenciados y en muy pocos casos un quinto par difícilmente apreciable (n=4), los ciegos van de XIV a XIX. Longitud del primero 0.40-0.96 (0.69), segundo 0.40-0.86 (0.55), tercero 0.35-0.83 (0.53), cuarto 0.38-0.84 (0.52), quinto (n=4) 0.36-0.39 (0.75). Post-ciegos extendiéndose hasta el somito XXIV, de los que el izquierdo mide 0.99-2.15 (1.57) y el derecho 1.16-1.99

(1.60). Intestino con una longitud de 1.99-4.77 (2.94) de XX a XXIII con cuatro pares de ciegos de los que el primero mide 0.83-1.26 (1.05), el segundo 1.03-1.37 (1.15), el tercero 1.04-1.44 (1.19), el cuarto 0.90-1.58 (1.22). Seis pares de testisacos intersegmentales de XIII/XIV-XVIII/XIX. La distancia entre el primer par es de 0.68-1.22 (0.93), entre el segundo 0.74-1.22 (0.98), entre el tercero 0.69-1.09 (0.88), entre el cuarto 0.68-1.21 (0.86), entre el quinto 0.70-1.14 (0.87), entre el sexto 0.58-1.03 (0.75). Cuernos atriales sin recorrido ascendente, longitud del cuerno atrial izquierdo 0.14-0.29 (0.23), longitud del cuerno atrial derecho 0.16-0.28 (0.22), distancia entre cuernos atriales 0.26-0.50 (0.35). Ovisacos simples que alcanzan el somito XVII.

### **Comentarios taxonómicos**

Con base en caracteres morfológicos, *Helobdella modesta* puede ser diferenciada fácilmente de *Helobdella octatestisaca* debido al número de pares de testisacos, cinco en *H. octatestisaca* y seis en *H. modesta*. El cuarto y quinto par de ciegos del buche se encuentran muy reducidos en *H. octatestisaca*, mientras que en *H. modesta* el sexto par está ausente y el quinto se observa en algunos organismos.

*Helobdella modesta* es fácilmente distinguible de *H. atli* debido a la ausencia de proyecciones marginales en a2 y a3; y por la presencia de post-ciegos en la primera. El número de ciegos del buche es seis en *H. atli* y cinco en *H. modesta*.

*Helobdella "stagnalis" 2* es diferente de *H. modesta* en el número de ciegos del buche, *H. "stagnalis" 2* presenta cinco pares de ciegos bien desarrollados, mientras que *H. modesta* presenta cuatro pares de ciegos bien desarrollados y, en algunos casos, un quinto par poco diferenciado, además de carecer de sexto par.

En términos morfométricos 20 caracteres de los 26 empleados para el PCA muestran diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) útiles para separar a *H. atli* de *H. modesta*. Los caracteres que no resultaron útiles para ello son: 4-7, 22 y 23 (Tabla, 2) permitiendo una clara separación entre las especies. Respecto a *H. octatetisaca*, los caracteres útiles para diferenciarla de *H. modesta* son: 3-7, 10, 15-20, 22-26 (Tabla 2). Finalmente, *H. modesta* y *H. "stagnalis"* 2 son fácilmente distinguibles mediante la observación de los caracteres 1, 3-7, 10-17, 20 y 22-24 (Tabla 2).

## VII. DISCUSIÓN

El estudio de la variación morfológica cuantificable entre individuos de una sola especie y entre especies cercanamente relacionadas tiene una larga tradición, principalmente en organismos con estructuras rígidas sujetas a ser medibles como vertebrados y artrópodos (Gutiérrez & Molinari, 2008; Manzari et al., 2002). Sin embargo, en el caso de los hirudíneos, el uso de este tipo de caracteres ha sido escasamente explorado debido principalmente a que se trata de organismos de cuerpo blando cuyo tamaño total, tamaño de sus órganos, así como la disposición general de los mismos en el cuerpo se encuentran fuertemente determinados por el tipo de fijadores y por el tipo de narcotización empleados originalmente. La taxonomía de los hirudíneos se ha realizado desde la época de Linnaeus con base en la disposición de las papilas, número de ocelos, número de ciegos del buche y del intestino, número de testisacos etc. Sin embargo, el uso de la morfometría para distinguir especies cercanamente emparentadas no ha sido explorado a la fecha, siendo este, el primer estudio que intenta abordar este problema.

*Helobdella stagnalis* es un claro ejemplo de una especie, supuestamente cosmopolita, que se caracteriza únicamente por la forma general de "*Helobdella*" y por la presencia de una placa quitinoide dorsal, un carácter fácilmente distinguible, aun sin el uso de un microscopio. Debido a esta supuesta simplicidad para

identificarla, se han realizado muy pocos estudios con el fin de caracterizar otros atributos morfológicos, tanto de la morfología interna como externa. El uso de caracteres moleculares evidenció, que dentro de la aparente morfología estable de “*Helobdella stagnalis*” existía una alta diversidad genética (Siddall et al., 2005; Ocegüera-Figueroa et al., 2011) sugiriendo que en realidad “*Helobdella stagnalis*” se trata de un complejo de especies cuya morfología no ha sido estudiada a detalle. Tan sólo para México y Estados Unidos han sido descritas cinco especies con placa quitinoide dorsal, todas ellas nombradas como *H. stagnalis* en algún momento (*H. atli*, *H. bowermani*, *H. californica*, *H. modesta* y *H. octatensisaca*) que a pesar de ello exhiben un alto grado de variación morfológica tanto de sus rasgos internos como externos, demostrando que la placa quitinoide dorsal por sí misma no es útil para delimitar a una sola especie, tal como Siddall & Burreson (1998) mencionaron con anterioridad.

Dada la necesidad de explorar la variación morfológica de un número mayor de caracteres, empleamos métodos de morfometría multivariada, enfrentándonos al problema inicial de que la mayoría de los caracteres potencialmente útiles son altamente susceptibles a la modificación de su forma y tamaño durante la fijación de los organismos. Por lo cual desarrollamos un método estandarizado que permitiera procesar a todos los individuos desde la colecta hasta la toma de datos en el que se modificaran uniformemente los caracteres morfológicos en todos los individuos estudiados. Esto se logró mediante el diseño de un protocolo en el que todos los organismos se aplanaron entre dos portaobjetos bajo las mismas condiciones. De esta forma, aseguramos que las medidas tomadas en cada organismo fueran realizadas bajo el mismo criterio, impidiendo que diferencias debidas a la modificación de la forma por agentes externos fueran introducidas al análisis.

A pesar de que el análisis morfométrico fue realizado entre especies cercanamente emparentadas, que de hecho en algún momento se pensó que se trataba de la misma especie, los datos obtenidos a partir del análisis de varianza



(ANOVA) sugieren que existe una gran variabilidad morfológica entre los cuatro grupos analizados, misma que al ser sometida a un análisis de componentes principales mostró distribuirse en cuatro grupos bien definidos dentro del espacio multivariado, cada uno correspondiente a cada una de las muestras estudiadas en este trabajo, evidenciando que sin considerar la placa quitinoide dorsal, el resto de los caracteres morfológicos son altamente variables y aportan información útil para considerar como especies independientes a cada uno de los grupos sometidos al análisis, razón por la que la especie nombrada *H. "stagnalis" 2* en Ocegüera-Figueroa et al. (2011) es en efecto una nueva especie con placa quitinoide dorsal cuya descripción morfológica formal será realizada posteriormente.

Otro aspecto interesante que puede inferirse del PCA dada la distribución espacial de los datos, es que a pesar de que la variación morfológica entre las cuatro especies es muy alta, *H. atli*, *H. modesta* y *H. octatetisaca* forman grupos muy compactos (Figura 10), lo que biológicamente representa un alto grado de homogeneidad morfológica, dicho de otra forma se trata de grupos con poca variación intraespecífica, caso contrario a *H. "stagnalis" 2*. Es interesante mencionar que de acuerdo con Ocegüera-Figueroa et al. (2011), *H. atli* y *H. modesta* son el par de especies más cercanamente emparentadas en términos de distancia genética (Figura 9), sorpresivamente, el análisis multivariado mostró que dichas especies son muy distintas en términos morfológicos, agrupándolas totalmente separadas (Figura 10). Paradójicamente, *H. "stagnalis" 2* y *H. octatetisaca*, dos especies genéticamente distantes (Figura 9) resultaron levemente sobrelapadas en el análisis multivariado (Figura 10), lo cual sólo representa un leve grado de similitud morfológica en algunos representantes de ambas especies, misma que no implica ningún tipo de dificultad para diferenciarlas fácilmente.

*Helobdella modesta* de Estados Unidos fue considerada como *Helobdella stagnalis* durante siglos, en lo que constituye un caso similar al de la forma mexicana *Helobdella "stagnalis"*. Al ser demostrado por Siddall et al. (2005) que la

supuesta especie cosmopolita *H. stagnalis* era en realidad *H. modesta* (Siddall et al., 2005) repercutió directamente sobre la clasificación de las especies norteamericanas, de manera que en la actualidad la especie que históricamente había sido considerada como la única con placa quitinoide dorsal, no figura más dentro de la hirudofauna estadounidense (Moser et al., 2013). A pesar del restablecimiento de *H. modesta* no existe una descripción morfológica formal útil para diferenciarla de otras especies, por lo que su caracterización morfológica fue presentada como uno de los resultados de este trabajo, señalando claramente que es fácilmente distinguible de las especies escutíferas mexicanas empleando caracteres morfológicos.

En México, inicialmente se consideraba a *Helobdella stagnalis* como el único registro de una especie escutífera en nuestro país. Más tarde, Ringuelet (1981) y Sawyer (1986) mencionaron la presencia de *Helobdella adiastrata* que posteriormente Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon (2005) reevaluaron prestando atención en sus caracteres morfológicos internos y externos encontrando que se trataba de una nueva especie con placa quitinoide dorsal: *Helobdella atli*. Por su parte Lai et al. (2009) conscientes del problema taxonómico relacionado con la especie cosmopolita, describieron una nueva especie escutífera con base en caracteres morfológicos y moleculares de ejemplares recolectados en Taiwan, a la que llamaron *Helobdella octatestisaca*. Esta especie, resultó ser molecularmente muy próxima a uno de los linajes de *Helobdella* con placa quitinoide dorsal de México, por lo que la forma de nuestro país recibió el nombre de *H. octatestisaca*, la cual se encuentra ampliamente distribuida en México. Finalmente, con el análisis multivariado realizado en el presente trabajo se provee la descripción de una nueva especie escutífera: *Helobdella "stagnalis" 2*. De esta forma, lo que en un principio se pensaba correspondía a *Helobdella stagnalis* por la sola presencia de la placa quitinoide dorsal, actualmente, gracias al análisis de caracteres morfológicos y moleculares se sabe son tres especies independientes: *H. atli*, *H. octatestisaca* y *H. "stagnalis" 2*, esclareciendo la situación taxonómica de

este complejo que, de manera similar al de Estados Unidos, no cuenta más con *Helobdella stagnalis* dentro de su hirudofauna.

A pesar de que la morfometría no había sido empleada para resolver problemas taxonómicos concernientes a hirudíneos, arrojó excelentes resultados reconociendo las tres especies moleculares que habían sido detectadas por Ocegüera-Figueroa et al. (2011) y diferenciándolas de la recién restablecida *Helobdella modesta*, proporcionando caracterizaciones útiles para la separación entre los cuatro grupos y ofreciendo caracteres diagnósticos para cada una. Este método podría ser empleado para la futura descripción de nuevas especies de hirudíneos con placa quitinoide dorsal o simplemente para la solución de problemas taxonómicos relacionados con sanguijuelas empleando el método estandarizado propuesto en este trabajo para su procesamiento anterior a la toma de datos. El uso del análisis de varianza y el PCA son herramientas realmente útiles, sin embargo, aquellos caracteres que no muestran diferencias estadísticamente significativas y aquellos con valor de cero que, por tanto, no pueden ser empleados en el PCA no deben descartarse totalmente de las caracterizaciones morfológicas, pues en taxonomía tradicional la ausencia de un carácter puede representar una característica diagnóstica o un carácter muy importante para la diferenciación entre dos o más especies (ausencia de post-ciegos en *H. atli*), mientras que la forma característica de un carácter que no muestre diferencias estadísticamente significativas puede ser considerado útil para la separación entre dos especies (forma de los ocelos en *H. octatestisaca*). Por lo que para algunos taxónomos tal vez resulte conveniente el uso de una combinación entre ambos métodos.

Como un comentario adicional, durante la toma de datos morfométricos de *H. octatestisaca* fueron observados 10 testisacos y no 8 como Lai et al. (2009) mencionaron entre los caracteres diagnósticos de *H. octatestisaca* (y por lo cual fue nombrada de esa forma). Si bien un par de testisacos son difíciles de observar,

no significa que sólo presente cuatro pares. De cualquier forma el hecho de que no sean fácilmente observables la distingue del resto de las especies.

## VIII. CONCLUSIONES

1) El análisis morfométrico nos permite concluir que las muestras analizadas no constituyen una sola especie con amplia distribución geográfica, sino que pueden ser consideradas como especies independientes molecular y morfológicamente.

2) Proponemos el primer método estandarizado para el estudio de la variación intraespecífica en hirudíneos.

3) Éste trabajo representa el primero en emplear herramientas de morfometría multivariada para esclarecer problemas taxonómicos entre hirudíneos.

4) El análisis de varianza (ANOVA) junto con el análisis de componentes principales (PCA) son herramientas estadísticas muy útiles para detectar y explorar los patrones de variación incluso en especies cercanamente emparentadas como el complejo "*stagnalis*".

5) En México existen al menos tres especies escutíferas fácilmente distinguibles empleando tanto caracteres morfológicos como moleculares: *Helobdella atli*, *Helobdella octatestisaca* y *Helobdella "stagnalis"* 2.

6) Los resultados de este trabajo sugieren que la especie supuestamente cosmopolita *Helobdella stagnalis* no existe dentro de la hirudofauna mexicana.

7) El estudio morfométrico apoya y amplía la descripción morfológica de *Helobdella modesta* diferenciándola de las especies mexicanas.

8) Se confirma que la placa quitinoide dorsal no es un caracter útil para la delimitación de especies.

## IX. LITERATURA CITADA

Ahmed, R. B., E. Ropelewska, A. Bielecki & J. Cichocka. 2009. *Batracobdella algira* Moquin-Tandon, 1846 (Hirudinida: Glossiphoniidae) – morphometric analysis and internal morphology. *Wiadomooci Parazytologiczne* **55**: 353–358.

Alcántar-Escalera, F. J., M. García-Valera, E. Vázquez-Domínguez & G. Pérez-Ponce de León. 2013. Using DNA barcoding to link cystacanth and adults of the acanthocephalan *Polymorphus brevis* in central Mexico. *Molecular Ecology Resources* **13**: 1116–1124.

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

Ayres, C. & J. Comensaña. 2008. Leech presence on Iberian Brown Frog, *Rana iberica*, (Amphibia: Anura: Ranidae) from north-western Spain. *Acta Herpetologica* **3**: 155-159.

Barragán-Ramírez, J. L., A. Ocegüera-Figueroa, J. D. J. Ascencio-Arrayga, F. Rodríguez-Ramírez & J. L. Navarrete-Heredia. 2013. *Kinosternon integrum* (Mexican mud turtle) ectoparasites. *Herpetological Review* **44**: 305-306.

Bielecki, A. 1997. Fish leeches (Hirudinea: Piscicolidae: Piscicolinae) of Poland in relation to the Palearctic piscicolines. *Genus* **2**: 223-375.

Bielecki, A., K. Palińska & J. Cichocka. 2009. Body form of leeches (Hirudinida: Piscicolidae) parasitizing fishes. *Wiadomooci Parazytologiczne* **55**: 359–365.

Bookstein, F. L. 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press, Cambridge.

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

Borda, E. & M. E. Siddall. 2004b. Review of the evolution of life history strategies and phylogeny of the Hirudinida (Annelida: Oligochaeta). *Lauterbornia* **52**: 5-25.

Borda, E., A. Oceguera-Figueroa & M. E. Siddall. 2008. On the classification, evolution and biogeography of terrestrial haemadipsoid leeches (Hirudinida: Arhynchobdellida: Hirudiniformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **46**: 142-154.

Brusca, R. C. & J. G. Brusca. 2003. Invertebrates. Sinauer Associates. Massachusetts.

Cook, L. G., R. D. Edwards, M. D. Crisp & N. B. Hardy. 2010. Need morphology always be required for new species descriptions?. *Invertebrate Systematics* **24**: 322-326.

Davies, R. W. 1991. Annelida: leeches, polychaetes and acanthobdellids. *In: Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*, J. H. Thorp & A. P. Covich (eds.). San Diego, CA. p. 437-479.

Davies, R. W. & N. MacLoughlin. 1996. The effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Freshwater Biology* **36**: 563-568.

Davies, R. W., F. J. Wrona, L. Linton & J. Wilkialis. 1981. Inter and intraspecific analyses of the food niches of two sympatric species of Erpobdellidae (Hirudinoidea) in Alberta, Canada. *Oikos* **37**: 105-111.

Dean, C. A., F. J. Rohlf & D. E. Slice. 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* **71**: 5-16.

Dugès, E. 1886. Una nueva sanguijuela: *Nephele mexicana*. *Anales de la Sociedad Larrey (México)* **2**: 166.

Edgecombe, G. D., G. Giribet, C. W. Dunn, A. Hejnol, R. M. Kristensen, R. C. Neves, G. W. Rouse, K. Worsaae & M. V. Sørensen. 2011. Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Organisms Diversity & Evolution* **11**:151-172.

Eernisse, D. J., J. S. Albert & F. E. Anderson. 1992. Annelida and Arthropoda are not sister taxa: a phylogenetic analysis of spiralian metazoan morphology. *Systematic Biologist*: **41**:305-330.

Gutiérrez, E. E. & J. Molinari. 2008. Morphometrics and taxonomy of bats of the genus *Pteronotus* (Subgenus *Phyllodia*) in Venezuela. *Journal of Mammalogy* **89**: 292-305.

Jiménez, L. M. 1865. Apuntes sobre algunas de las especies de sanguijuela de México. *Gaceta Médica de México* **1**: 483.

Jiménez, L. M. 1866. Otro envenenamiento por la *Glossiphonia*. *Gaceta Médica de México* **2**: 267.

Knowlton, N. 1986. Cryptic and sibling species among the decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* **6**, 356–363.

Kutschera, U. & P. Wirtz. 2001. The evolution of parental care in freshwater leeches. *Theory in Biosciences* **120**: 115-137.

Kvist, S., A. Ocegüera-Figueroa, M. E. Siddall & C. Erséus. 2010. Barcoding, types and the *Hirudo* files: Using information content to critically evaluate the identity of DNA barcodes. *Mitochondrial DNA* **21**: 198-205.

Lai, Yi-Te, C. Chang & J. Chen. 2009. Two new species of *Helobdella* Blanchard 1896 (Hirudinida: Rhynchobdellida: Glossiphoniidae) from Taiwan, with a checklist of hirudinea fauna of the island. *Zootaxa* **2068**: 27–46.

Lamothe-Argümedo, R., L. García-Prieto, D. Osorio-Sarabia & G. Pérez-Ponce de León. 1997. Catálogo de la Colección Nacional de Helmintos. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 211 pp.

López-Caballero, J., A. Ocegüera-Figueroa & V. León- Røgagnon. 2013. Detection of multiple species of human *Paragonimus* from Mexico using morphological data and molecular barcodes. *Molecular Ecology Resources* **13**: 1125-1136.

López-Jiménez, S. 1985. Estudio taxonómico de algunos hirudíneos de México. Tesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 182 p.

López-Jiménez, S. & A. Ocegüera-Figueroa. 2009. A new species of Rhynchobdellid leech (Hirudinea: Glossiphoniidae): a parasite of turtles from Chiapas, Mexico. *Journal of Parasitology* **95**: 1356-1359.

Manzari, S., A. Polaszek, R. Belshaw, D. L. Quicke. 2002. Morphometric and molecular analysis of the *Encarsia inaron* species-group (Hymenoptera:



Aphelinidae), parasitoids of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). Bulletin of Entomological Research. **92**:165-175.

Mason, T. A., C. W. Sayers, T. L. Paulson, J. Coleman & D. H. Shain. 2005. Cocoon deposition and hatching in the aquatic leech, *Theromyzon tessulatum* (Annelida, Hirudinea, Glossiphoniidae). American Midland Naturalist **154**: 78-87.

Mayr, E. 1996. What is a species, and what is not?. Philosophy of Science **63**: 262-277.

McCoy, J. C., E. L. Failey, S. J. Price & M. E. Dorcas. 2007. An assessment of leech parasitism on semi-aquatic turtles in the Western Piedmont of North Carolina. Southeastern Naturalist **6**: 191-202.

Mendoza, G. & A. Herrera. 1865. Observaciones sobre la sanguijuela que se usa en esta capital. México, D.F. 8 pp.

Moore, J. P. 1936. Hirudinea from Yucatán. Publications of the Carnegie Institution of Washington **457**: 41-137.

Moore, J. P. 1938. Hirudinea from Yucatán. Publications of the Carnegie Institution of Washington **491**: 67-70.

Moser, W. E., D. J. Richardson, C. I. Hammond & E. Lazo-Wasem. 2011. Molecular characterization of *Helobdella modesta* (Verrill, 1872) (Hirudinida: Glossiphoniidae) from its type locality, West River and Whitneyville Lake, New Haven County, Connecticut, USA. Zootaxa **2834**: 65-68.

Moser, W. E., S. V. Fend, D. J. Richardson, C. I. Hammond, E. A. Lazo-Wasem, F. R. Govedich & B. S. Gullo. 2013. A new species of *Helobdella* (Hirudinida: Glossiphoniidae) from Oregon, USA. Zootaxa **3718**: 287–294

Oceguera-Figueroa, A. 2006a. A new species of freshwater leech of the genus *Haementeria* (Annelida: Glossiphoniidae) from Jalisco State, Mexico. *Zootaxa* **1110**: 39-45.

Oceguera-Figueroa, A. 2006b. A new leech species of *Semiscolex* (Arhynchobdellida: Semiscolecidae) from Lake Catemaco, Veracruz, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **77**: 199-203.

Oceguera-Figueroa, A. 2007. Especie nueva de sanguijuela del género *Helobdella* (Rhynchobdellida: Glossiphoniidae) del Lago de Catemaco, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana* **23**: 15-22.

Oceguera-Figueroa, A. 2008. A new Glossiphoniid leech from Catemaco Lake, Veracruz, México. *Journal of Parasitology* **94**: 375-380.

Oceguera-Figueroa, A. 2012. Molecular phylogeny of the New World bloodfeeding leeches of the genus *Haementeria* and reconsideration of the biannulate genus *Oligobdella*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **62**: 508-514.

Oceguera-Figueroa, A. & V. León Règagnon. 2005. A new freshwater leech species of *Helobdella* (Annelida: Glossiphoniidae) from Central Mexico. *Zootaxa* **976**: 1-8.

Oceguera-Figueroa, A. & V. León-Règagnon. 2014. Biodiversidad de sanguijuelas (Annelida: Euhirudinea) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**: S183-S189.

Oceguera-Figueroa, A. & M. E. Siddall. 2008. *Placobdella lamothei* (Hirudinea: Glossiphoniidae), a new leech parasite of freshwater turtles from Estado de México, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **79**: 135-139.

Oceguera-Figueroa, A., V. León-Règagnon & M. E. Siddall. 2005. Phylogeny and revision of Erpobdelliformes (Annelida, Arhynchobdellida) from Mexico based on nuclear and mitochondrial gene sequences. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **76**: 191-198.

Oceguera-Figueroa, A., V. León-Règagnon & M. E. Siddall. 2010a. DNA barcoding reveals Mexican diversity within the freshwater leech genus *Helobdella* (Annelida: Glossiphoniidae). *Mitochondrial DNA* **21**: 24-29.

Oceguera-Figueroa, A., S. Kvist, S. C. Watson, D. F. Sankar, R. M. Overstreet & M. E. Siddall. 2010b. Leech collections from Washington State, with the description of two new species of *Placobdella* (Annelida: Glossiphoniidae). *American Museum Novitates* **3701**: 1-14.

Oceguera-Figueroa, A., A. J. Phillips, B. M. Pacheco-Chaves W. K. Reeves & M. E. Siddall. 2011. Phylogeny of macrophagous leeches of the suborder Erpobdelliformes (Hirudinea, Clitellata) based on molecular dataset. Considerations about classification and barcoding. *Zoologica Scripta* **40**: 194-203.

Oceguera-Figueroa, A., A. K. Barrio, M. I. Aldea-Guevara & M. E. Siddall. 2012. Description of a new blood-feeding species of *Oxyptychus* (Annelida: Hirudiniformes) from the Peruvian Amazon and evaluation of the evolution of jaw morphology in New World hirudiniform leeches. *Invertebrate Systematics* **26**: 17-24.

Oosthuizen, J. H. & F. L. Fourie. 1985. Mortality amongst waterbirds caused by the African duck leech *Theromyzon-cooperi*. *South African Journal of Wildlife Research* **15**: 98-106.

Pérez-Ponce de León, G. 2005. Host-Induced morphological variability in adult *Posthodiplostomum minimum* (Digenea: Neodiplostomidae). *The Journal of Parasitology* **81**: 818-820.

Phillips, A. J., R. Arauco-Brown, A. Ocegüera-Figueroa, G. P. Gómez, M. Beltrán, Y. Lai & M. E. Siddall. 2010. *Tyrannobdella rex* n. gen. n. sp. and the evolutionary origins of mucosal leech infestations. *PLoS ONE* **5**: e10057.

Pinacho-Pinacho, C. D., G. Pérez-Ponce de León & M. García-Varela. 2012. Description of a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of *Dormitator latifrons* from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters. *Parasitology International* **61**: 634-644.

Reyment, R. A. 1985. Multivariate morphometrics and analysis of shape. *Mathematical Geology* **17**: 591-609.

Richardson, L. R. 1971. A new species from Mexico of the nearctic genus *Percymoorensis* and remarks on the family Haemopidae (Hirudinoidea). *Canadian Journal of Zoology* **49**: 1095-1103.

Ringuelet, R. A. 1976. Los caracteres endosomáticos de *Haementeria officinalis* de Filippi, diagnosis del género y un estudio de antiguos ejemplares de *Nepheleis mexicana* Duges 1886 (Hirudinea). *Limnobiología* **1**: 12-136.

Ringuelet, R. A. 1981. Clave para el reconocimiento de los hirudíneos de México. *Anales del Instituto de Biología* **52**: 89-97.

Rouse, G. W. & K. Fauchald. 1995. The articulation of annelids. *Zoologica Scripta* **24**: 269-301.

Salas, D., D. Véliz & S. Scott. 2012. Diferenciación morfológica en especies del género *Cheirodon* (Ostariophysi: Characidae) mediante morfometría tradicional y geométrica. *Gayana* **76**: 142-152.

Sawyer, R. T. 1986. Leech biology and behavior. Vol. I, II y III. Feeding Biology, Ecology and Systematics. Clarendon Press. Oxford. 793 p.

Schulz, C. A., M. V. Thomas, S. Fitzgerald & M. Faisal. 2011. Leeches (Annelida: Hirudinida) parasitizing fish of lake St. Clair, Michigan, USA. *Parasitology* **78**: 73-83.

Siddall, M. E. 2002. Phylogeny of the leech family Erpobdellidae (Hirudinida: Oligochaeta). *Invertebrate Systematics* **16**: 1-6.

Siddall, M. E. & E. M. Bureson. 1998. Phylogeny of leeches (Hirudinea) based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **9**: 156-162.

Siddall, M. E. & E. Borda. 2002. Phylogeny of the leech genus *Helobdella* (Glossiphoniidae) based on mitochondrial gene sequences and morphological data and a special consideration of the *triserialis* complex. *Zoologica Scripta* **32**: 23-33.

Siddall, M. E., R. B. Budinoff & E. Borda. 2005. Phylogenetic evaluation of systematics and biogeography of the leech family Glossiphoniidae. *Invertebrate Systematics* **19**: 105-112.

Siddall, M. E., A. E. Bely & E. Borda. 2006. Hirudinida. *In: Reproductive biology and phylogeny of Annelida*, G. Rouse & F. Pliejel (eds.). Enfield, New Hampshire. p. 393-429.

Siddall, M. E., K. Apakupakul, E. M. Bureson, K. A. Coates, C. Erséus, S. R. Gelder, M. Källersjö & H. Trapido-Rosenthal. 2001. Validating Livanow: Molecular

data agree that leeches, branchiobdellidans and *Acanthobdella peledina* form a monophyletic group of oligochaetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**: 346-351.

Singhal, R. N. & R. W. Davies. 1985. Description of the reproductive organs of *Nephelopsis obscura* and *Erpobdella punctata* (Hirudinoidea: Erpobdellidae). *Freshwater Invertebrate Biology* **5**: 91-97.

Sket, B. & P. Trontelj. 2008. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia* **595**: 129-137.

StatSoft Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).2005.

Struck, T. H., N. Schult, T. Kusen, E. Hickman, C. Bleidorn, D. McHugh & K. M. Halanych. 2007. Annelid phylogeny and the status of Sipuncula and Echiura. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 57.

Tiberti, R. & A. Gentilli. 2010. First report of freshwater leech *Helobdella stagnalis* (Rhynchobdellida: Glossiphoniidae) as a parasite of an anuran amphibian. *Acta Herpetologica* **5**: 255-258.

Townend, J. 2002. *Practical statistics for environmental and biological scientists*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. 276 p.

## **X. ANEXOS**

Anexo 1. Técnica combinada de Paracarmín de Meyer-Hematoxilina de Ehrlich

a) Lavar en alcohol al 70% (10 minutos)

b) Lavar en alcohol al 96% (10 minutos)

- c) Teñir con paracarmín de Meyer durante 2 minutos
- d) Lavar en alcohol al 96% (10 minutos)
- e) Hidratar en alcoholes graduales 70%, 50%, 25% y agua destilada (10 minutos en cada uno)
- f) Teñir con hematoxilina de Ehrlich durante 2 minutos
- g) Lavar en agua destilada
- h) Diferenciar en agua acidulada al 2% con ácido clorhídrico hasta que adquieran un color rosa pálido (de 2 a 3 horas aproximadamente)
- i) Lavar en agua destilada
- J) Virar en agua de la llave agregando unas gotas de carbonato de litio, hasta que tomen un color azul morado
- k) Lavar en agua destilada (10 minutos)
- l) Deshidratar en alcoholes graduales hasta alcohol absoluto (10 minutos en cada alcohol y 20 en el absoluto)
- m) Aclarar en salicilato de metilo
- n) montar en bálsamo de Canadá, etiquetar y poner a secar

Anexo 2. Caracteres morfológicos medidos. M = *Helobdella modesta*, S = *Helobdella "stagnalis" 2*, A = *Helobdella atli*, O = *Helobdella octatestisaca*

	LMÁX	DOCELOS	LPROB	L1CB	L2CB	L3CB	L4CB	L5CB	L6CB	LINT	L1CI	L2CI	L3CI	L4CI	D1T	D2T
M1	7.1131	0.1079	2.2825	0.6474	0.5727	0.6142	0.5229	0	0	2.7058	1.162	1.2616	1.1288	1.0873	1.0126	0.9628
M2	6.7396	0.1162	1.743	0.4067	0.498	0.4897	0.5063	0	0	2.5564	0.8383	1.0458	1.0458	0.9047	0.6806	0.747
M3	10.4746	0.1411	2.5481	0.7387	0.5312	0.5146	0.5146	0	0	3.3366	1.0292	1.2533	1.3446	1.4691	1.2201	1.0458
M4	11.8192	0.1245	1.8675	0.7138	0.5644	0.4814	0.4482	0	0	3.6354	1.1952	1.2367	1.3197	1.3031	1.0873	1.079
M5	9.7027	0.1328	2.0086	0.7055	0.5312	0.4233	0.5893	0	0	3.0295	1.1537	1.0624	1.1288	1.1952	0.9462	1.1869
M6	9.4288	0.1162	1.7347	0.7055	0.5727	0.5312	0.5727	0	0	2.905	0.9545	1.0956	1.0956	1.3446	0.9711	0.9628
M7	9.0719	0.1162	1.6683	0.6723	0.498	0.4482	0.5229	0	0	4.7725	0.9545	1.0956	1.0707	1.0956	0.83	1.0873
M8	6.6317	0.0996	1.577	0.6225	0.4482	0.4482	0.415	0	0	2.0833	0.9545	1.0873	1.0873	1.0956	0.8383	0.8632
M9	8.8727	0.1162	1.909	0.747	0.5478	0.4897	0.4565	0	0	2.8967	0.8549	1.0624	1.2118	1.2284	0.9462	0.7885
M10	9.5284	0.1328	2.241	0.8881	0.6972	0.664	0.5146	0	0	3.0046	1.0956	1.2948	1.328	1.4359	0.913	1.1786
M11	8.6154	0.1162	1.9505	0.8217	0.6474	0.5478	0.498	0	0	2.324	1.0375	1.1122	1.1039	1.1288	0.9047	0.8798
M12	8.8644	0.0996	1.6517	0.5063	0.4067	0.3569	0.415	0	0	2.8054	0.9462	1.0375	1.0956	1.1786	0.7885	0.8383
M13	9.8023	0.1079	2.0086	0.9628	0.8632	0.83	0.8466	0	0	3.1125	1.2533	1.3363	1.2367	1.3861	1.0873	1.2284
M14	10.2422	0.1245	2.5813	0.747	0.5478	0.5644	0.5644	0.3735	0	2.9382	1.1122	1.1952	1.2782	1.3197	1.0541	1.1952
M15	10.9975	0.1245	2.3655	0.7885	0.5976	0.498	0.5478	0.3652	0	3.569	1.2699	1.3778	1.4442	1.5853	0.9462	1.0043
M16	10.4663	0.1494	2.1995	0.9628	0.7387	0.7387	0.7055	0	0	3.3117	1.1205	1.2699	1.4276	1.4857	1.0541	1.0956
M17	6.5653	0.1079	1.6434	0.5229	0.4067	0.415	0.415	0.3984	0	1.992	1.0292	1.1039	1.0873	0.996	0.8715	0.8549
M18	9.213	0.1079	1.909	0.6806	0.4565	0.4648	0.3818	0.3735	0	3.1125	1.1205	1.079	1.1288	1.1703	0.7968	1.0043
M19	7.9597	0.1245	1.8094	0.5395	0.4814	0.6059	0.5229	0	0	2.822	0.8881	1.0624	1.1039	1.0956	0.8466	0.8134
M20	7.6609	0.1162	1.9256	0.5478	0.4067	0.4897	0.498	0	0	2.0833	1.1122	1.0624	1.1786	1.0707	0.8383	0.8549
S1	12.7239	0.1577	2.9465	0.8632	1.0126	0.7387	0.6142	0.7304	0	3.4943	0.9462	1.5023	1.6683	1.6351	1.2367	1.162
S2	8.8727	0.1079	2.241	1.2284	1.2782	1.162	1.0873	0.8134	0	2.6477	1.1039	1.079	1.411	1.577	1.2699	1.3197
S3	13.695	0.1411	3.569	1.162	1.1869	1.1454	1.0292	0.6225	0	4.1749	1.328	1.6185	1.9671	2.0003	1.4027	1.6185
S4	12.4168	0.1162	3.237	1.2865	1.0624	1.3944	1.0126	0.9794	0	3.9259	1.0624	1.4442	1.4276	1.4193	1.162	1.4027
S5	11.6615	0.1162	2.49	1.6019	1.2948	1.1371	0.7968	0.664	0	3.4445	1.2035	1.4525	1.6268	1.66	1.1786	1.3944



<b>S6</b>	11.3461	0.1328	2.8635	1.3363	0.7885	1.3114	1.2201	0.7719	0	3.3283	1.411	1.4691	1.8509	1.8924	1.4193	1.7264
<b>S7</b>	9.2296	0.1245	2.905	0.9628	0.747	0.8881	0.83	0.8466	0	2.5979	1.2533	1.4027	1.6019	1.6766	0.996	1.0292
<b>S8</b>	9.4537	0.1494	2.49	1.2201	1.0375	0.8964	0.8217	0.4731	0	2.822	1.1786	1.5936	1.8509	1.6932	1.1952	1.3529
<b>S9</b>	10.2588	0.1079	2.49	1.2035	1.1205	1.1288	1.0209	0.7968	0	2.8884	0.9213	1.0707	1.3363	1.2367	1.0043	1.0624
<b>S10</b>	9.5201	0.1162	2.241	0.83	0.83	0.913	0.747	0.5561	0	2.7224	0.9877	1.2533	1.4276	1.5023	0.9047	0.9628
<b>S11</b>	9.3126	0.1328	2.6228	1.3944	1.0873	0.913	0.7221	0.6474	0	2.9548	0.9047	1.2035	1.1952	1.411	1.0126	1.0126
<b>S12</b>	9.213	0.0996	2.49	1.4857	1.4691	1.3695	0.9213	0.6889	0	2.7224	1.079	1.3363	1.245	1.411	1.0292	1.2699
<b>S13</b>	9.7857	0.1494	2.573	1.1122	0.8466	0.9462	0.7387	0.5146	0	2.8635	1.0209	1.3695	1.4442	1.4691	0.9711	0.8964
<b>S14</b>	8.8146	0.1162	3.1789	1.3612	1.2782	1.162	0.9794	0.8051	0	2.6726	1.0956	1.4857	1.6849	1.8094	1.2035	1.4442
<b>S15</b>	8.4494	0.1245	2.5315	1.6434	1.5687	1.4774	1.3031	1.0956	0	2.7058	1.0707	1.3861	1.743	1.5355	1.0624	1.3197
<b>S16</b>	11.9188	0.1162	2.905	1.8343	1.7679	1.7098	1.328	1.1122	0	3.1789	1.4608	1.328	1.7347	1.8675	1.7513	1.9837
<b>S17</b>	11.9271	0.1328	2.988	1.162	1.162	1.2616	0.747	0.5063	0	3.3366	1.2284	1.4442	1.7513	1.6268	1.162	1.1952
<b>S18</b>	7.968	0.1079	2.5813	1.3363	1.2616	1.245	1.079	1.0126	0	2.6809	0.8964	1.1371	1.3197	1.6019	1.3861	1.4525
<b>S19</b>	9.5616	0.1079	2.739	1.328	1.2367	0.9711	0.6391	0.6225	0	2.9963	1.079	1.2865	1.411	1.3695	0.9047	1.0375
<b>S20</b>	8.3913	0.1162	2.3655	1.3778	1.2948	1.0873	0.9545	0.7885	0	2.5896	1.1454	1.3446	1.2035	1.411	1.3114	1.2533
<b>A1</b>	7.8518	0.1577	2.2908	0.8217	0.8549	0.83	0.7968	1.1039	0.6806	2.407	0.8632	1.0624	0.9877	0.9545	1.0209	0.9462
<b>A2</b>	6.6151	0.0996	1.6102	0.6474	0.6474	0.7055	0.6308	0.5727	0.4316	1.6849	0.7387	0.8632	1.079	1.079	0.6723	0.7138
<b>A3</b>	6.1005	0.0913	1.577	0.3901	0.4482	0.5063	0.5395	0.4316	0.5644	1.7181	0.3735	0.5395	0.6225	0.5644	0.5063	0.5727
<b>A4</b>	6.6732	0.0996	1.992	0.6059	0.664	0.6806	0.6308	0.6723	0.5976	1.8426	0.7553	0.8466	0.8964	1.0043	0.6308	0.7719
<b>A5</b>	7.3538	0.0996	1.909	0.7138	0.6225	0.8383	0.9462	0.7885	0.4731	1.909	0.8466	0.8466	1.0292	1.2284	0.913	0.9877
<b>A6</b>	7.0052	0.1079	1.909	0.6972	0.9296	0.8134	0.8051	0.6889	0.4731	1.8094	0.7802	0.7553	0.8134	1.079	0.7885	1.0043
<b>A7</b>	6.0258	0.0996	1.66	0.5312	0.6391	0.6142	0.6059	0.5893	0.4565	1.577	0.664	0.7387	0.996	0.9545	0.5561	0.5893
<b>A8</b>	5.4033	0.0913	1.577	0.5478	0.5893	0.5644	0.5229	0.6723	0.5395	1.4525	0.7055	0.7968	0.7885	0.8881	0.5644	0.5893
<b>A9</b>	6.1254	0.1245	1.494	0.5893	0.7055	0.6723	0.6225	0.5976	0.6225	1.5023	0.5561	0.6225	0.7719	0.8798	0.6474	0.6723
<b>A10</b>	5.7104	0.1245	1.328	0.664	0.747	0.7968	0.6391	0.6557	0.5395	1.411	0.6059	0.6474	0.9379	0.7968	0.6806	0.747
<b>A11</b>	6.3495	0.1079	1.411	0.6059	0.6474	0.6474	0.6225	0.6142	0.4233	1.4442	0.6391	0.7138	0.8632	0.913	0.6391	0.7055
<b>A12</b>	8.1506	0.1411	1.66	0.581	0.6972	0.6308	0.5146	0.4648	0.5146	2.241	0.7636	0.913	0.9462	1.079	0.7387	0.8549
<b>A13</b>	7.0052	0.1079	1.66	0.5229	0.5478	0.5561	0.5312	0.4482	0.3154	2.0584	0.664	0.7304	0.8383	0.83	0.4565	0.5146
<b>A14</b>	4.8555	0.0913	1.328	0.4482	0.5063	0.5395	0.5976	0.6142	0.4482	1.3114	0.5312	0.6391	0.7221	0.7221	0.4565	0.581

<b>A15</b>	4.6978	0.1162	1.328	0.3735	0.5146	0.5727	0.6225	0.6142	0.3569	1.2616	0.5727	0.747	0.8798	0.7138	0.5561	0.6806
<b>A16</b>	5.561	0.0996	1.328	0.5644	0.5727	0.6308	0.5976	0.5312	0.498	1.4525	0.6059	0.6142	0.747	0.8466	0.5976	0.6474
<b>A17</b>	6.4823	0.0996	1.411	0.6308	0.6474	0.6972	0.6225	0.5561	0.4067	1.5936	0.7055	0.8466	1.0292	1.0624	0.6723	0.7138
<b>A18</b>	7.2708	0.1245	1.66	0.6972	0.8798	0.7553	0.7304	0.5727	0.4731	1.0956	0.8217	0.8549	1.1371	1.0956	1.0043	1.1288
<b>A19</b>	6.1918	0.0913	1.4525	0.3569	0.4482	0.3984	0.3735	0.4565	0.3569	1.4525	0.5644	0.7221	0.9213	0.9213	0.6142	0.4731
<b>A20</b>	5.6025	0.1245	1.411	0.4814	0.4399	0.4316	0.5312	0.5976	0.3486	1.3529	0.6723	0.7221	0.8964	0.913	0.3735	0.4233
<b>O1</b>	9.3005	0.1246	1.78	1.3439	1.2638	1.3083	1.1659	0	0	2.9548	1.3083	1.4596	1.4329	1.513	0.9167	0.9701
<b>O2</b>	9.612	0.1157	1.78	1.3261	1.3172	1.4062	1.2282	0	0	2.9726	1.1837	1.5041	1.4329	1.4863	1.1837	1.157
<b>O3</b>	9.968	0.1246	1.78	1.0324	0.9968	1.1125	1.068	0	0	2.9103	1.1392	1.2638	1.0947	1.2816	0.7031	0.7476
<b>O4</b>	8.4995	0.1335	1.602	1.7889	1.6109	1.6554	1.3528	0	0	2.7234	1.4329	1.5041	1.424	1.5931	1.157	1.1837
<b>O5</b>	10.1638	0.1424	1.691	1.78	1.6109	1.4151	1.2727	0	0	3.0883	1.4774	1.4596	1.5931	1.4685	1.1303	1.1481
<b>O6</b>	8.366	0.1246	1.4685	1.335	1.2193	1.2193	1.0858	0.9256	0	2.403	1.0858	1.2727	1.3795	1.424	0.89	1.0146
<b>O7</b>	9.5942	0.1424	1.513	1.4685	1.4685	1.4507	1.2638	0	0	3.0438	1.1659	1.3795	1.246	1.2816	1.1125	1.1481
<b>O8</b>	9.3895	0.1157	1.78	1.1036	1.157	1.2905	1.1481	0	0	3.1773	1.068	1.335	1.2727	1.4418	0.979	0.979
<b>O9</b>	8.1702	0.1068	1.691	0.8366	0.8989	1.1303	1.1036	0	0	2.3852	1.0324	1.2015	1.0858	1.0235	0.7031	0.6942
<b>O10</b>	7.6095	0.089	1.4418	0.8989	0.9256	0.9523	0.9345	0.89	0	2.2695	0.9968	1.0413	1.0502	1.2104	0.8455	0.8544
<b>O11</b>	8.3304	0.1157	1.602	1.3795	1.2371	1.2638	1.0591	1.3884	0	2.2962	1.1392	1.2727	1.2015	1.2193	0.8277	0.8455
<b>O12</b>	8.5974	0.1068	1.6465	1.1036	1.2015	1.1926	1.1659	0	0	2.6878	0.89	1.2282	1.2994	1.3884	1.0502	1.068
<b>O13</b>	7.654	0.1335	1.424	1.2193	1.1748	1.1392	0.8989	0	0	2.4208	1.1748	1.2104	1.2371	1.2905	0.9434	1.0235
<b>O14</b>	8.989	0.1157	1.691	1.513	1.78	1.7177	1.513	0	0	2.67	1.157	1.0858	0.9968	1.157	0.801	1.0858
<b>O15</b>	8.4906	0.1335	1.6821	1.4596	1.4685	1.3795	1.246	0	0	2.0559	1.1659	1.5664	1.5575	1.4418	1.1303	1.0769
<b>O16</b>	7.2535	0.1246	1.513	0.9078	1.1748	1.3528	1.1303	0	0	2.1093	0.979	1.1659	1.1125	1.6465	0.979	0.9879
<b>O17</b>	9.345	0.1157	1.602	1.4062	1.1837	1.1926	0.979	0	0	2.2428	1.0324	1.1926	1.2282	1.3439	0.979	0.9701
<b>O18</b>	6.9687	0.1068	1.246	1.513	1.3884	1.2905	1.246	0	0	2.4208	1.0769	1.3795	1.513	1.246	0.9701	1.068
<b>O19</b>	6.9153	0.1157	1.513	1.3172	1.246	1.335	1.1748	0	0	2.3585	0.801	0.9968	1.0947	1.2371	1.0235	0.979
<b>O20</b>	9.078	0.1157	1.691	1.1125	1.0324	1.2104	1.1926	0	0	2.5365	1.1303	1.2015	1.246	1.2994	0.9167	0.89

## Anexo 2. Continuación

	D3T	D4T	D5T	D6T	LVP	AVP	LPQ	APQ	LCAIZQ	LCADER	DCATR	AGMASC	LPCIZQ	LPCDER	AVA	LVA
<b>M1</b>	0.9711	0.9213	0.83	0.7885	1.0043	0.996	0.166	0.2656	0.2324	0.166	0.3901	1.6932	1.6185	1.3861	0.3735	0.2656
<b>M2</b>	0.7553	0.6806	0.7387	0.747	1.0126	0.9545	0.1411	0.2822	0.1411	0.1909	0.3237	1.3861	1.2201	1.3612	0.3486	0.2573
<b>M3</b>	1.0126	1.0292	1.1454	1.0375	1.1288	1.1952	0.2075	0.3735	0.2573	0.2656	0.5063	1.9754	1.9505	1.7928	0.3569	0.2241
<b>M4</b>	1.0292	0.913	0.8383	0.7636	1.1869	1.2699	0.249	0.332	0.2656	0.2822	0.4233	1.8343	1.8675	1.6351	0.4067	0.2822
<b>M5</b>	0.8383	0.7138	0.83	0.581	1.0873	1.1703	0.1577	0.2656	0.2158	0.2573	0.3486	1.6185	1.66	1.6434	0.415	0.2988
<b>M6</b>	0.8217	0.6972	0.8798	0.664	1.1371	1.1537	0.1826	0.2822	0.2241	0.2739	0.2656	1.5438	1.66	1.8675	0.415	0.2656
<b>M7</b>	0.7636	0.7719	0.9213	0.6972	1.1454	1.1537	0.2324	0.3486	0.1992	0.2324	0.3237	1.7181	1.4276	1.7181	0.4814	0.332
<b>M8</b>	0.83	0.7719	0.7221	0.5976	1.1122	1.0043	0.2158	0.3403	0.1826	0.1826	0.2988	1.4857	1.3031	1.4525	0.415	0.2905
<b>M9</b>	0.8217	0.8881	0.83	0.6225	1.0707	1.1039	0.1743	0.2822	0.2407	0.1909	0.332	1.7928	1.7098	1.7015	0.4482	0.2573
<b>M10</b>	0.8715	0.996	0.9213	0.7802	1.1454	1.2284	0.2075	0.2822	0.2988	0.249	0.3569	1.7098	0.996	1.7513	0.3984	0.332
<b>M11</b>	0.8466	0.8383	0.8383	0.7885	1.0624	1.0458	0.2158	0.3071	0.2573	0.2739	0.3403	1.5936	1.4027	1.4442	0.4565	0.2822
<b>M12</b>	0.6972	0.747	0.7055	0.6225	0.9047	0.9047	0.1494	0.2573	0.2324	0.249	0.3652	1.4691	1.4608	1.4442	0.3652	0.2988
<b>M13</b>	1.0541	1.2118	0.996	0.8632	1.1537	1.245	0.2407	0.2905	0.2573	0.2324	0.3901	1.6019	1.7762	1.9754	0.3735	0.2573
<b>M14</b>	1.079	0.9379	0.9545	0.83	1.1703	1.245	0.2158	0.2905	0.2822	0.2573	0.3403	2.0252	1.7513	1.6683	0.4648	0.332
<b>M15</b>	1.0292	0.9296	0.9047	0.7719	1.162	1.2118	0.1909	0.249	0.2905	0.1909	0.3237	1.7347	2.158	1.992	0.3486	0.2656
<b>M16</b>	1.0956	0.9213	0.8798	0.8383	1.3197	1.3861	0.2656	0.3984	0.249	0.249	0.415	2.2659	1.8758	1.7347	0.4565	0.2905
<b>M17</b>	0.8217	0.8632	1.0043	0.8383	0.8383	0.8881	0.1411	0.2573	0.1992	0.1992	0.3735	1.6351	1.1952	1.162	0.3901	0.2573
<b>M18</b>	0.7968	0.83	0.9462	0.7636	0.9213	1.1288	0.1743	0.2988	0.2407	0.2407	0.3652	1.7679	1.7513	1.6268	0.3818	0.2988
<b>M19</b>	0.83	0.8466	0.8383	0.7055	1.1371	1.0873	0.1909	0.2988	0.1743	0.1743	0.3154	1.6102	1.3446	1.577	0.4067	0.2905
<b>M20</b>	0.7304	0.7885	0.7387	0.747	1.0873	1.0209	0.1494	0.2822	0.2075	0.2075	0.3735	1.66	1.3695	1.245	0.3984	0.2905
<b>S1</b>	1.4525	1.3695	1.2865	1.1288	1.2782	1.3114	0.3486	0.3486	0.5893	0.5976	0.498	2.1165	1.9505	1.9173	0.5478	0.3403
<b>S2</b>	1.5604	1.4359	1.3031	1.1122	0.8383	1.0043	0.1826	0.2324	0.5312	0.5063	0.6225	1.5604	1.7845	1.7181	0.3486	0.166
<b>S3</b>	1.6268	1.6766	1.6019	1.3114	1.2782	1.3778	0.332	0.332	0.6059	0.5644	0.5561	2.0916	2.3655	2.49	0.4565	0.2905
<b>S4</b>	1.4774	1.3529	1.2616	1.0873	1.2201	1.2948	0.3154	0.2822	0.4482	0.4731	0.4648	1.7264	2.656	2.5315	0.4482	0.332
<b>S5</b>	1.3861	1.2699	1.1371	0.8217	1.162	1.2118	0.2739	0.2988	0.498	0.498	0.4316	1.743	2.5564	2.3323	0.3818	0.2573
<b>S6</b>	1.66	1.5438	1.328	1.1288	1.3114	1.245	0.332	0.3154	0.5561	0.5229	0.6059	2.2908	2.1912	2.241	0.5395	0.2573
<b>S7</b>	1.2699	1.2035	1.1786	1.0292	1.162	1.245	0.332	0.3237	0.498	0.5312	0.4482	1.5604	1.8592	1.5355	0.5395	0.3154

<b>S8</b>	1.3446	1.2616	1.1537	0.9047	1.0541	1.2201	0.332	0.3237	0.498	0.4897	0.4565	1.5604	1.1869	1.577	0.4482	0.249
<b>S9</b>	1.2616	1.1952	1.0126	0.8798	0.913	1.2284	0.2905	0.2822	0.4316	0.4565	0.4731	1.2118	1.7845	1.8841	0.4399	0.3071
<b>S10</b>	1.0043	1.0707	0.9794	0.6889	1.0541	1.1039	0.2822	0.2988	0.4897	0.498	0.4897	1.3861	1.7264	1.66	0.415	0.2988
<b>S11</b>	1.0541	1.0458	0.8715	0.747	0.9545	0.9379	0.1909	0.1909	0.4399	0.4067	0.415	1.3612	2.0086	1.8924	0.3486	0.2822
<b>S12</b>	1.2699	1.2284	1.0375	0.8798	0.747	1.0209	0.2656	0.249	0.3652	0.3486	0.3818	1.2948	1.826	1.992	0.3652	0.2241
<b>S13</b>	1.0873	1.0956	0.996	0.8466	1.1952	1.2201	0.3237	0.2988	0.5063	0.498	0.4067	1.3778	1.9505	1.9007	0.4482	0.2075
<b>S14</b>	1.494	1.411	1.2035	1.0707	0.996	1.0292	0.2075	0.2324	0.4648	0.4233	0.581	1.2865	1.909	2.0169	0.3735	0.2739
<b>S15</b>	1.3695	1.4525	1.2865	1.0624	0.9296	0.913	0.1992	0.249	0.332	0.332	0.3735	1.4525	2.2742	1.992	0.3735	0.249
<b>S16</b>	2.0335	1.7596	1.5853	1.2035	0.9047	1.1039	0.3154	0.2905	0.5893	0.581	0.6308	1.9339	2.158	2.324	0.415	0.2656
<b>S17</b>	1.0956	1.3197	0.9379	0.7802	1.2865	1.328	0.3403	0.332	0.4482	0.415	0.5478	1.5853	2.324	2.1497	0.498	0.2905
<b>S18</b>	1.5687	1.3778	1.4276	1.2284	1.0375	1.0624	0.2573	0.2656	0.3154	0.332	0.415	1.6019	1.66	1.8094	0.3486	0.2573
<b>S19</b>	1.0126	0.996	0.9047	0.83	0.7304	0.8383	0.2822	0.2407	0.3569	0.3652	0.3486	1.0458	2.0667	2.1829	0.3735	0.2739
<b>S20</b>	1.3197	1.3529	1.2035	1.0126	0.8964	0.9711	0.2324	0.2241	0.3735	0.3569	0.332	1.3197	1.7928	1.8343	0.3403	0.2324
<b>A1</b>	0.9213	1.0375	1.1205	0.9379	0.7055	0.9711	0.0996	0.0996	0.2407	0.2739	0.3984	1.5189	0	0	0.3486	0.249
<b>A2</b>	0.747	0.7055	0.6391	0.5478	0.664	0.6225	0.0913	0.0996	0.1743	0.1743	0.2822	1.245	0	0	0.249	0.2075
<b>A3</b>	0.6142	0.5395	0.4399	0.3818	0.7304	0.664	0.1079	0.1328	0.1245	0.1328	0.249	1.0458	0	0	0.1992	0.166
<b>A4</b>	0.747	0.6474	0.6059	0.4814	0.7138	0.7387	0.1162	0.1577	0.1577	0.166	0.249	1.3861	0	0	0.3154	0.1494
<b>A5</b>	1.0541	0.9545	0.83	0.6391	0.8383	0.8466	0.0913	0.1245	0.1826	0.1826	0.2988	1.4691	0	0	0.3403	0.1743
<b>A6</b>	0.9213	0.8715	0.7636	0.7138	0.7802	0.7719	0.1162	0.1577	0.2241	0.2241	0.3071	1.2367	0	0	0.3154	0.1826
<b>A7</b>	0.5893	0.5976	0.5893	0.4482	0.5395	0.6225	0.083	0.1245	0.1743	0.166	0.2407	1.1537	0	0	0.1992	0.1743
<b>A8</b>	0.5395	0.6142	0.664	0.5561	0.6806	0.6225	0.0664	0.0913	0.1328	0.1494	0.249	1.0624	0	0	0.1909	0.1162
<b>A9</b>	0.664	0.581	0.5146	0.498	0.6308	0.6474	0.083	0.1162	0.1411	0.1162	0.2656	1.0873	0	0	0.249	0.1826
<b>A10</b>	0.6557	0.6308	0.5146	0.3901	0.6806	0.6806	0.0996	0.1328	0.1826	0.1245	0.2573	1.0126	0	0	0.2241	0.1743
<b>A11</b>	0.7055	0.6225	0.5395	0.5063	0.6474	0.664	0.0913	0.1245	0.249	0.249	0.3071	1.0458	0	0	0.249	0.1743
<b>A12</b>	0.7968	0.664	0.6059	0.5146	0.6806	0.747	0.1245	0.0996	0.2656	0.249	0.3818	1.328	0	0	0.2905	0.2988
<b>A13</b>	0.5395	0.4814	0.4814	0.4565	0.5395	0.6142	0.083	0.1079	0.1992	0.1328	0.2324	0.9213	0	0	0.166	0.1826
<b>A14</b>	0.6391	0.6889	0.6723	0.5312	0.6723	0.7055	0.083	0.1577	0.1494	0.1162	0.249	1.1952	0	0	0.249	0.1743
<b>A15</b>	0.6889	0.7636	0.6806	0.5312	0.581	0.6308	0.0581	0.0913	0.1411	0.2075	0.332	1.0126	0	0	0.2241	0.1494
<b>A16</b>	0.6889	0.7138	0.6225	0.5727	0.6142	0.6557	0.0747	0.1079	0.1494	0.1743	0.249	1.0375	0	0	0.249	0.1494

<b>A17</b>	0.747	0.7138	0.6474	0.5561	0.6474	0.6225	0.0913	0.0996	0.1743	0.1992	0.3071	1.2118	0	0	0.249	0.1743
<b>A18</b>	1.0624	1.0624	0.8798	0.6391	0.7138	0.8715	0.1079	0.1245	0.2656	0.3154	0.4233	1.6932	0	0	0.2573	0.2241
<b>A19</b>	0.4233	0.4814	0.5395	0.4316	0.6225	0.6806	0.0913	0.1245	0.1826	0.1494	0.2324	1.0209	0	0	0.2324	0.1411
<b>A20</b>	0.5146	0.6225	0.6142	0.3818	0.6474	0.6225	0.0996	0.1162	0.1162	0.1162	0.249	0.9628	0	0	0.2241	0.2075
<b>O1</b>	1.157	1.0502	0.979	0	1.3439	1.3884	0.2136	0.3115	0.3204	0.3471	0.5785	2.136	2.2695	2.0648	0.4005	0.2047
<b>O2</b>	1.1392	1.1659	1.1125	0	1.4863	1.4596	0.2136	0.3026	0.2937	0.3293	0.4895	2.5988	2.0292	2.0114	0.4094	0.2225
<b>O3</b>	0.8633	0.9612	0.9879	0	1.2727	1.2905	0.2403	0.2848	0.4094	0.356	0.5429	1.9224	2.0915	2.0737	0.356	0.2047
<b>O4</b>	1.2638	1.3172	1.2193	1.0858	1.4062	1.424	0.1958	0.3649	0.4005	0.4005	0.623	2.4297	2.047	2.136	0.4094	0.2403
<b>O5</b>	1.1125	1.1659	1.0858	0	1.3795	1.4596	0.267	0.356	0.3115	0.3204	0.5963	2.2784	2.3318	2.1805	0.3738	0.2136
<b>O6</b>	1.0502	1.0324	0.979	0	1.068	1.0858	0.2136	0.2937	0.356	0.356	0.5696	1.7889	1.7978	1.5575	0.3827	0.2314
<b>O7</b>	1.2104	1.2905	1.1659	0	1.2994	1.3528	0.2314	0.3382	0.4005	0.4005	0.623	2.314	2.1805	2.0025	0.4272	0.2136
<b>O8</b>	1.1659	1.1303	1.1125	0.979	1.424	1.3617	0.267	0.3293	0.3649	0.3115	0.4094	2.1449	1.9491	1.9135	0.356	0.1958
<b>O9</b>	0.8188	0.7743	0.801	0	1.1214	1.1125	0.2314	0.2759	0.3026	0.356	0.4539	1.5931	1.5664	1.5664	0.3026	0.1335
<b>O10</b>	0.9523	0.9078	0.89	0	1.1748	1.2015	0.2581	0.2937	0.3738	0.356	0.534	1.78	1.5664	1.602	0.3115	0.1424
<b>O11</b>	0.8722	0.9345	0.8989	0	1.0057	1.1926	0.2314	0.2848	0.2759	0.3026	0.3738	1.6465	1.9135	1.869	0.356	0.2225
<b>O12</b>	1.2549	1.246	0.979	0.89	1.1659	1.1837	0.1869	0.2937	0.3026	0.356	0.445	1.6198	1.9135	1.8156	0.2937	0.1335
<b>O13</b>	1.0502	0.89	0.8455	0	1.2282	1.246	0.1602	0.267	0.3115	0.2937	0.4361	1.9936	1.6376	1.6465	0.356	0.2136
<b>O14</b>	1.2816	1.246	1.2193	0	1.1392	1.4062	0.2759	0.3382	0.3738	0.3382	0.4895	2.0292	2.0915	1.8779	0.4005	0.2492
<b>O15</b>	1.068	1.1036	1.0324	0	1.3795	1.4329	0.2403	0.356	0.356	0.3204	0.5073	2.5365	1.8779	1.869	0.4183	0.2403
<b>O16</b>	1.1036	1.1125	1.068	0	1.2371	1.2727	0.2314	0.2937	0.267	0.2759	0.3204	2.403	1.78	1.602	0.4005	0.1335
<b>O17</b>	1.0324	0.89	0.8544	0	1.3172	1.3884	0.2314	0.3115	0.356	0.356	0.445	1.7088	1.9135	1.8957	0.3115	0.1958
<b>O18</b>	1.0324	1.1125	1.0235	0	1.0502	1.157	0.2047	0.2848	0.267	0.2848	0.4005	2.2873	1.869	1.8156	0.3827	0.1424
<b>O19</b>	1.0235	1.0591	0.9968	0	1.246	1.2015	0.2314	0.3382	0.267	0.2848	0.445	2.0114	1.691	1.6554	0.356	0.0979
<b>O20</b>	0.979	1.0324	0.9879	0	1.2905	1.3083	0.2136	0.2848	0.3204	0.356	0.4539	1.9313	1.7533	1.8245	0.3649	0.1246

Anexo 3. Valores de significancia de los 162 pares de comparaciones entre *H. atli*, *H. modesta*, *H. octatestisaca* y *H. "stagnalis" 2*. Los valores en rojo muestran diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

<b>Largo Máximo</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0352954334	0.0000003226	0.8435920910
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0352954334		0.0000000000	0.0028556795
<i>H atli</i>	0.0000003226	0.0000000000		0.0000116085
<i>H octatestisaca</i>	0.8435920910	0.0028556795	0.0000116085	
<b>Distancia entre los ocelos</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.8251209825	0.3152269939	0.9972861095
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.8251209825		0.0514125606	0.9106570800
<i>H atli</i>	0.3152269939	0.0514125606		0.2235896871
<i>H octatestisaca</i>	0.9972861095	0.9106570800	0.2235896871	
<b>Largo de la proboscis</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000000000	0.0005544954	0.0007288647
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000000000		0.0000000000	0.0000000000
<i>H atli</i>	0.0005544954	0.0000000000		0.9998523767
<i>H octatestisaca</i>	0.0007288647	0.0000000000	0.9998523767	
<b>Longitud del primer par de ciegos del buche</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000000000	0.3201376794	0.0000000000
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000000000		0.0000000000	0.9998122802
<i>H atli</i>	0.3201376794	0.0000000000		0.0000000000
<i>H octatestisaca</i>	0.0000000000	0.9998122802	0.0000000000	
<b>Longitud del segundo par de ciegos del buche</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000000000	0.5856058020	0.0000000000
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000000000		0.0000000000	0.4527839625
<i>H atli</i>	0.5856058020	0.0000000000		0.0000000000
<i>H octatestisaca</i>	0.0000000000	0.4527839625	0.0000000000	
<b>Longitud del tercer par de ciegos del buche</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000000000	0.2315610715	0.0000000000
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000000000		0.0000000000	0.0435743428
<i>H atli</i>	0.2315610715	0.0000000000		0.0000000000
<i>H octatestisaca</i>	0.0000000000	0.0435743428	0.0000000000	
<b>Longitud del cuarto par de ciegos del buche</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000001410	0.0000102293	0.1902621887

<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000001410		0.0000000000	0.0006030942
<i>H atli</i>	0.0000102293	0.0000000000		0.0000000012
<i>H octatestisaca</i>	0.1902621887	0.0006030942	0.0000000012	
<b>Longitud del intestino</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.9463655261	0.0000000000	0.1050988936
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.9463655261		0.0000000000	0.0260616607
<i>H atli</i>	0.0000000000	0.0000000000		0.0000001237
<i>H octatestisaca</i>	0.1050988936	0.0260616607	0.0000001237	
<b>Longitud del primer par de ciegos intestinales</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.5644544022	0.0000000001	0.5261937121
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.5644544022		0.0000000000	0.9999211303
<i>H atli</i>	0.0000000001	0.0000000000		0.0000000000
<i>H octatestisaca</i>	0.5261937121	0.9999211303	0.0000000000	
<b>Longitud del segundo par de ciegos intestinales</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0002313686	0.0000000000	0.0383065868
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0002313686		0.0000000000	0.4113399404
<i>H atli</i>	0.0000000000	0.0000000000		0.0000000000
<i>H octatestisaca</i>	0.0383065868	0.4113399404	0.0000000000	
<b>Longitud del tercer par de ciegos intestinales</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000001940	0.0000114695	0.5090740541
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000001940		0.0000000000	0.0000737998
<i>H atli</i>	0.0000114695	0.0000000000		0.0000000245
<i>H octatestisaca</i>	0.5090740541	0.0000737998	0.0000000245	
<b>Longitud del cuarto par de ciegos intestinales</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000001410	0.0000102293	0.1902621887
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000001410		0.0000000000	0.0006030942
<i>H atli</i>	0.0000102293	0.0000000000		0.0000000012
<i>H octatestisaca</i>	0.1902621887	0.0006030942	0.0000000012	
<b>Distancia entre primer par de testisacos</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0002086885	0.0000249270	0.9525860247
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0002086885		0.0000000000	0.0014617567
<i>H atli</i>	0.0000249270	0.0000000000		0.0000026790
<i>H octatestisaca</i>	0.9525860247	0.0014617567	0.0000026790	
<b>Longitud entre el segundo par de testisacos</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000530983	0.0006451274	0.9984425620
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000530983		0.0000000000	0.0001020701

<i>H atli</i>	0.0006451274	0.0000000000		0.0003507999
<i>H octatestisaca</i>	0.9984425620	0.0001020701	0.0003507999	
<b>Longitud entre el tercer par de testisacos</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000000000	0.0329068866	0.0167008653
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000000000		0.0000000000	0.0000322798
<i>H atli</i>	0.0329068866	0.0000000000		0.0000004313
<i>H octatestisaca</i>	0.0167008653	0.0000322798	0.0000004313	
<b>Longitud entre el cuarto par de testisacos</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000000000	0.0200945225	0.0019784898
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000000000		0.0000000000	0.0001122659
<i>H atli</i>	0.0200945225	0.0000000000		0.0000000093
<i>H octatestisaca</i>	0.0019784898	0.0001122659	0.0000000093	
<b>Longitud entre el quinto par de testisacos</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000002744	0.0002545909	0.0488949283
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000002744		0.0000000000	0.0077896771
<i>H atli</i>	0.0002545909	0.0000000000		0.0000000031
<i>H octatestisaca</i>	0.0488949283	0.0077896771	0.0000000031	
<b>Longitud de la ventosa posterior</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.7947490184	0.0000000000	0.0027330874
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.7947490184		0.0000000000	0.0000911585
<i>H atli</i>	0.0000000000	0.0000000000		0.0000000000
<i>H octatestisaca</i>	0.0027330874	0.0000911585	0.0000000000	
<b>Ancho de la ventosa posterior</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.9898560289	0.0000000000	0.0006403586
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.9898560289		0.0000000000	0.0019256290
<i>H atli</i>	0.0000000000	0.0000000000		0.0000000000
<i>H octatestisaca</i>	0.0006403586	0.0019256290	0.0000000000	
<b>Largo de la placa quitinoide dorsal</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000000021	0.0000000000	0.0467941924
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000000021		0.0000000000	0.0002008169
<i>H atli</i>	0.0000000000	0.0000000000		0.0000000000
<i>H octatestisaca</i>	0.0467941924	0.0002008169	0.0000000000	
<b>Ancho de la placa quitinoide dorsal</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.4117151671	0.0000000000	0.8013074057
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.4117151671		0.0000000000	0.0708763399
<i>H atli</i>	0.0000000000	0.0000000000		0.0000000000



<i>H. octatestisaca</i>	0.8013074057	0.0708763399	0.0000000000	
<b>Longitud del cuerno atrial izquierdo</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000000000	0.0586410598	0.0000156104
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000000000		0.0000000000	0.0000000052
<i>H. atli</i>	0.0586410598	0.0000000000		0.0000000002
<i>H. octatestisaca</i>	0.0000156104	0.0000000052	0.0000000002	
<b>Longitud del cuerno atrial derecho</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000000000	0.0815689873	0.0000018865
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000000000		0.0000000000	0.0000000323
<i>H. atli</i>	0.0815689873	0.0000000000		0.0000000000
<i>H. octatestisaca</i>	0.0000018865	0.0000000323	0.0000000000	
<b>Longitud entre cuernos atriales</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.0000720500	0.0307603212	0.0000089012
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.0000720500		0.0000000003	0.9572524449
<i>H. atli</i>	0.0307603212	0.0000000003		0.0000000000
<i>H. octatestisaca</i>	0.0000089012	0.9572524449	0.0000000000	
<b>Ancho a la altura del gonoporo masculino</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.5035939334	0.0000008443	0.0014036815
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.5035939334		0.0002764797	0.0000057673
<i>H. atli</i>	0.0000008443	0.0002764797		0.0000000000
<i>H. octatestisaca</i>	0.0014036815	0.0000057673	0.0000000000	
<b>Ancho de la ventosa anterior</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.7553446060	0.0000000000	0.1640028399
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.7553446060		0.0000000000	0.0132893839
<i>H. atli</i>	0.0000000000	0.0000000000		0.0000000063
<i>H. octatestisaca</i>	0.1640028399	0.0132893839	0.0000000063	
<b>Largo de la ventosa anterior</b>				
	<i>H. modesta</i>	<i>H. "stagnalis" 2</i>	<i>H. atli</i>	<i>H. octatestisaca</i>
<i>H. modesta</i>		0.7064353445	0.0000000004	0.0000000024
<i>H. "stagnalis" 2</i>	0.7064353445		0.0000000625	0.0000003375
<i>H. atli</i>	0.0000000004	0.0000000625		0.9823035523
<i>H. octatestisaca</i>	0.0000000024	0.0000003375	0.9823035523	