



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

Sistemática

**Diversidad de especies del género *Helobdella* en un contexto
filogenético**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Torres Carrera Gerardo

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Alejandro Ocegüera Figueroa

Laboratorio de Helminología, Instituto de Biología, Universidad Nacional
Autónoma de México

COMITÉ TUTOR: Dra. Rosario Mata López

Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional
Autónoma de México

M. en C. Luis García Prieto

Laboratorio de Helminología, Instituto de Biología, Universidad Nacional
Autónoma de México

MÉXICO, CD. MX. Julio, 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

Sistemática

**Diversidad de especies del género *Helobdella* en un contexto
filogenético**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Torres Carrera Gerardo

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Alejandro Ocegüera Figueroa

Laboratorio de Helminología, Instituto de Biología, Universidad Nacional
Autónoma de México

COMITÉ TUTOR: Dra. Rosario Mata López

Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional
Autónoma de México

M. en C. Luis García Prieto

Laboratorio de Helminología, Instituto de Biología, Universidad Nacional
Autónoma de México

MÉXICO, CD. MX. Julio, 2019

OFICIO CPCB/688/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

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

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas, Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de mayo de 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **TORRES CARRERA GERARDO** con número de cuenta **308109278** con la tesis titulada "**Diversidad de especies del género *Helobdella* en un contexto filogenético**", realizada bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA**:

Presidente: DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
Vocal: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
Secretario: DRA. ROSARIO MATA LÓPEZ
Suplente: DRA. MAGALI BLANCA ISABEL HONEY ESCANDÓN
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUZMÁN CORNEJO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 6 de junio de 2019.



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU 814372) durante la duración del programa de posgrado (semestres 2017-2 al 2019-1) que me permitió estudiar el Posgrado.

Al proyecto IN 210318 PAPIIT: Biodiversidad y filogenia molecular de sanguijuelas del género *Helobdella*; a cargo del Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa, que permitió la colecta de material biológico y la obtención de datos de este trabajo.

Al proyecto CONACYT 220408 “Especificidad hospedatoria de helmintos de anuros y lagartijas del occidente de México” a cargo del Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa.

Al Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP) de la UNAM, por el recurso proporcionado para realizar una estancia de investigación en la Universidad de La Plata, en Bs. As., Argentina.

A Alejandro Ocegüera Figueroa tutor principal

A los miembros del Comité Tutor:

Dra. Rosario Mata López

M. en C. Luis García Prieto

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres que siempre me han brindado su apoyo para que continúe con mi formación académica.

A mi familia que siempre ha estado ahí echándome porras y alegrándose de mis logros.

A mi tutor Alex Ocegüera, por estar siempre pendiente de que este proyecto saliera adelante, por sus consejos y su buen sentido del humor.

A mis amigos Libia, Guadalupe (Pynk) y Gil que siempre están conmigo.

A Jossue, Nancy, Gisela, Yanet V., Bere y Fer E., por los buenos momentos dentro y fuera de la academia, su compañía ha sido fundamental durante este proceso.

A Albeza Rivera (mi parce) por su amistad transfronteriza, conocerme fue de los sucesos más geniales de viajar a la Argentina.

A Brenda Atziri por sus comentarios y su ayuda incondicional.

A Ana Santacruz, por sus sugerencias y autentico interés.

A los compañeros del Lab. Andrés VB, Andrés C., Mauricio, Victor, John y a los compañeros ocasionales Andréa R., Angel H., Paco y Eric, por los buenos ratos.

A la M. en C. Berenit Mendoza Garfias, a cargo del Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad (1) del IBUNAM, por su ayuda con el procesamiento de muestras de Microscopía Electronica de Barrido y por los ratos de buenas charlas.

Al M. en C. Luis García Prieto por su ayuda y comentarios durante la gestación de este trabajo y por su ayuda en la incorporación del material biológico a la Colección Nacional de Helmintos, IBUNAM.

A la Biol. Ofelia Delgado Hernández, por compartirnos tus conocimientos sobre las técnicas moleculares así como su ayuda constante en el laboratorio, gracias Ofe en gran medida lo que sé es por tus enseñanzas.

A la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar y a la Biol. Nelly López Ortiz por su asistencia en la obtención de las secuencias genéticas.

A la Biol. Susana Guzmán Gómez, responsable del laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad (2) del IBUNAM, por su asistencia durante la fotodocumentacion de los ejemplares colectados.

A la Dra. Cristina Damborenea del Museo de la Plata, Argentina, por su recibimiento y disponibilidad para realizar trabajo de campo, gracias al cual se enriqueció este trabajo.

A Moni y Hugo del Museo de La Plata, por todo el apoyo otorgado facilitando el material biológico de la colección.

A la Dra. Bettina Gullo, por el material biológico donado que sin duda nos plantea retos en la investigación de la diversidad de este grupo de sanguijuelas.

Al colega Javier V. y a Wilmer y Ronald, épa chamos!

A “Las Letis” porque su buena onda y apoyo nos ayuda como estudiantes a rifarnos más.

A Andrea Rubi Jiménez Marín, por su ayuda dentro del laboratorio de Biología Molecular.

A los miembros del jurado, Dr. Juan José Morrone Lupi, Dra. Rosario Mata López, Dr. Gerardo Pérez Ponce De León, Dra. Magali Blanca Isabel Honey Escandón y la Dra. María del Carmen Guzmán Cornejo, que con sus comentarios enriquecieron substancialmente este trabajo.

A Dios por el Rock and Roll

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
Historia taxonómica de Hirudinea	5
Características generales de Hirudinea	6
Clasificación y filogenia de Hirudinea	8
Historia taxonómica del género <i>Helobdella</i>	10
Complejo de especies “ <i>Helobdella triserialis</i> ”	12
Sistemática molecular	14
OBJETIVOS GENERALES	16
OBJETIVOS PARTICULARES	16
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	16
Recolecta del material biológico	16
Análisis morfológico	17
Extracción de DNA	17
Amplificación de marcadores moleculares	17
Secuenciación de DNA	19
Organización de la presente tesis	19
CAPÍTULO I. RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>HELOBDELLA</i> BLANCHARD, 1896 CON BASE EN CARACTERES MOLECULARES	20
Introducción	20
Materiales y Métodos	22
Recolecta del material biológico	22
Alineamiento de secuencias genéticas	23
Análisis filogenéticos	23
Resultados	29
Análisis filogenético con base en el criterio de Parsimonia (P)	30
Análisis filogenético con base en el criterio de inferencia Bayesiana (BI)	31

Discusión	32
CAPÍTULO II. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO	
<i>HELOBDELLA</i> DE MÉXICO	35
Introducción	35
Objetivo	35
Materiales y Métodos	35
Resultados	36
<i>Helobdella adiaastola</i> Ringuelet 1972 (= <i>Helobdella octatensis</i> Lai & Chang, 2009)	36
<i>Helobdella elongata</i> linaje 1	41
<i>Helobdella socimulcensis</i> s. s. (Caballero, 1931)	44
<i>Helobdella socimulcensis</i> linaje 2	49
DISCUSIÓN GENERAL	54
Filogenia de las especies del género <i>Helobdella</i>	54
Riqueza de especies en México	58
Riqueza de especies en Sudamérica	58
CONCLUSIONES	59
CAPÍTULO III. Traveling with leeches. I pity snails, and all that carry their homes on their backs. J. R. R. Tolkien, The fellowship of the ring.	
ANEXOS	76
ANEXO 1. Láminas con los ejemplares (vista dorsal y ventral) de <i>Helobdella</i> recolectados en este trabajo e incluidos en la filogénia	76
ANEXO 2. Método de tinción Paracarmin-Hematoxilina de Delafield	86
ANEXO 3. Script: ModelTest en R.	87
ANEXO 4. Hipótesis filogenéticas con cada gen (COI, NADH-I e ITS) y de evidencia total (en extenso) bajo el criterio de IB	88
LITERATURA CITADA	91

RESUMEN

Introducción: El género *Helobdella* es el más diverso de sanguijuelas en cuanto al número de especies. A nivel mundial se han descrito más de 80 especies, sin embargo, el primer estudio sobre las relaciones filogenéticas dentro de *Helobdella* incluyó 21 terminales representando únicamente 15 especies. Dicho trabajo se realizó con base en 9 caracteres morfológicos y dos marcadores moleculares (DNA mitocondrial) y se logró esclarecer el estatus taxonómico de las especies del complejo “*Helobdella triserialis*” en Norteamérica así como de la especie nominal *Helobdella stagnalis* evidenciando su distribución únicamente en Europa. El grupo más abundante de especies se distribuye en Sudamérica y hasta ahora, no ha sufrido cambios nomenclaturales, a pesar de los numerosos cambios que han tenido las especies del mismo género en otras partes del continente. Estudios preliminares en México sobre la variación del gen mitocondrial Citocromo C oxidasa (COX1) en este género de sanguijuelas, han detectado una alta variación entre algunos ejemplares de distintas localidades asignados al mismo taxón, lo que sugiere en primera instancia, que la riqueza de especies podría ser mayor a la contemplada hasta ahora, sin embargo no se han realizado estudios formales sobre la variación morfológica asociada a la variación molecular. **Objetivos generales:** 1) Investigar las relaciones filogenéticas de especies de sanguijuelas del género *Helobdella* a partir de evidencia genética. 2) Poner a prueba la monofilia del género, así como de otros taxones propuestos previamente. **Objetivos particulares:** 1) Caracterizar la riqueza de especies del género *Helobdella* en México a partir de información morfológica y molecular. 2) Generar e incluir secuencias de especies de *Helobdella* de diversas localidades de América Latina a la filogenia del grupo y realizar un análisis de evidencia total. **Materiales y Métodos:** Se llevaron a cabo recolectas de ejemplares en cuerpos de agua dulce localizados en la región Neártica y Neotropical de México y en los alrededores de La Plata, Argentina. Para el análisis molecular se amplificaron los genes mitocondriales COI y NDHI y la región nuclear ITS, de taxones representativos de cada taxón y localidad. Los análisis filogenéticos se realizaron siguiendo dos métodos: Inferencia Bayesiana (MrBayes) y Parsimonia (TNT). La matriz analizada bajo ambos enfoques incluyó 2200 caracteres y 214 terminales que representaron a 35 especies nominales. El análisis morfológico se realizó con ejemplares recién recolectados y procesados para su estudio morfológico. **Resultados y Conclusiones:** El árbol resultado del análisis de Inferencia Bayesiana mostró más resolución que el de Parsimonia y con valores de apoyo más altos en la mayoría de los nodos. Adicionalmente no se recupera completamente la misma topología en ambos métodos. Bajo ambos criterios recuperamos a *Helobdella* como un género monofilético cuyo género hermano es *Haementeria*. *Helobdella octatestisaca* Lai y Chang, 2009, es sinónima de *Helobdella adiaastola* Ringuelet, 1972. Se actualiza el registro de especies de este género en nuestro país con 6 especies descritas, *H. adiaastola*, *H. atli*, *H. austinensis*, *H. socimulcensis* s. s., *H. temiscoensis* y *H. virginiae* y 4 especies potencialmente nuevas *H. socimulcensis* linaje 1 y linaje 2 y *Helobdella elongata* linaje 1 y linaje 2. Los ejemplares de *Helobdella triserialis* de Argentina, Cuba y Bolivia posiblemente se tratan de especies independientes que necesitan una revisión morfológica más profunda. *Helobdella triserialis* var *lineata* necesita una descripción formal y su elevación a nivel de especie. El número de líneas en el dorso resultó ser un carácter útil para diferenciar entre los miembros del complejo “*Helobdella triserialis*” en México; sin

embargo, se necesita evaluar su utilidad en el resto de las formas que comprenden este complejo de especies distribuidas en el continente Americano. Con este trabajo logramos resolver parte del problema dentro del complejo "*triserialis*" sin embargo, para entender las relaciones filogenéticas del género es claro que hace falta realizar un muestreo más amplio para incluir a las poco más de 40 especies restantes de Sudamérica de las cuales no se cuenta con información genética. Un buen punto de partida puede ser la inclusión de las 16 especies que Raúl Adolfo Ringuelet describió durante su trayectoria académica; de este modo, podremos incrementar nuestro conocimiento sobre las relaciones que existen entre las especies del género más diverso de sanguijuelas.

ABSTRACT

Introduction: *Helobdella* is the most diverse genus of leeches in terms of the number of species. Worldwide, more than 80 species have been described. The first phylogeny of *Helobdella* included 21 terminals representing 15 species and was based on 9 morphological characters and two molecular markers (mitochondrial DNA). In this work, it was possible to clarify the taxonomic status of North American species of the "*triserialis*" complex, as well as of *H. stagnalis* delimiting its distribution only in Europe. Most species are distributed in South America and has not been changed nomenclaturally, despite the many changes that have taken species of the same genus in other parts of America. Preliminary studies in Mexico on the variation of the mitochondrial gene Cytochrome C oxidase (COX1) have detected a high variation among some specimens assigned to the same taxon, which suggests, in the first instance, that the richness of species could be greater than previously contemplated. However, no formal studies have been conducted on the morphological variation associated with molecular variation. **General objectives:** 1) To investigate the phylogenetic relationships of species of leeches of the genus *Helobdella* based on genetic evidence. 2) Test the monophyly of the genus, as well as, other previously proposed taxa. **Particular objectives:** 1) Characterize the species richness of the genus *Helobdella* in Mexico based on morphological and molecular information. 2) Generate and include sequences of *Helobdella* species from diverse localities in Latin America to the phylogeny of the group and perform a total evidence analysis. **Materials and Methods:** Specimen collections were carried out in freshwater bodies located in the Nearctic and Neotropical regions of Mexico and around La Plata, Argentina. For molecular analysis and NDHI COI mitochondrial and nuclear genes ITS region of representative taxa taxon locations and amplified. The phylogenetic analyzes were carried out following two methods: Bayesian inference (MrBayes) and parsimony (TNT). The matrix analyzed under both approaches includes 2200 characters and 214 terminals representing 35 nominal species. The morphological analysis was carried out with specimens recently collected and processed for morphological study. **Results and Conclusions:** The results of the analysis of Bayesian Inference tree showed more resolution than Parsimony and higher support values in most nodes. Additionally, the same topology is not fully recovered in both methods. Under both criteria we recovered *Helobdella* as a monophyletic genus whose sister genus is *Haementeria*. *Helobdella octatestisaca* Lai and Chang, 2009; is synonymous with *Helobdella adiaistola* Ringuelet, 1972. The record of species of this genus in our country is updated with 6 species described, *H. adiaistola*, *H. atli*, *H. austinensis*, *H. socimulcensis s. s.*, *H. temiscoensis* and *H. virginiae* and 4 potentially new species *H. socimulcensis* lineage 1 and lineage 2 and *Helobdella elongata* lineage 1 and lineage 2. The specimens of *Helobdella triserialis* from Argentina, Cuba and Bolivia are possibly independent species that they need a deeper taxonomic revision. *Helobdella triserialis* var. *lineata* needs a formal description and its elevation at the species

level. The number of lines on the back turned out to be a useful character to differentiate between the members of the complex "*triserialis*" in Mexico; however, its usefulness needs to be evaluated in the rest of the forms that comprise this species complex. With this work we solve part of the problem within the "*triserialis*" complex and clearly needed a more comprehensive to include just over 40 remaining species sampling of South America. A good starting point may be the inclusion of the 16 species that Raúl Adolfo Ringuelet described during his academic career; in this way, we can increase our knowledge about the relationships that exist between species of the most diverse genus of leeches.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Historia taxonómica de Hirudinea

Las sanguijuelas o hirudíneos conforman una clase denominada Hirudinida Lamarck, 1818 que forma parte del phylum Annelida Lamarck, 1809. Todas las especies del grupo se caracterizan por presentar 34 somitos, dos ventosas, una en cada extremo del cuerpo, y al igual que los oligoquetos, acantobdélidos y braquiobdélidos poseen una estructura reproductiva glandular denominada clitelo (Brusca & Brusca, 2003). Hay más de 680 especies descritas a nivel mundial con representantes en todos los continentes con excepción de la Antártida (Sket & Trontelj, 2008).

El primer registro sobre las sanguijuelas data del antiguo Egipto y coincide con el inicio de la civilización de Oriente medio. Se pueden encontrar sanguijuelas representadas en las paredes de la sepultura de los faraones de la dinastía 18 (1567-1308 a.C.). El primer dato de su uso medicinal se remonta a la antigua Grecia (200-130 a. C.), con el poema médico Alexipharmaca, de Nicandro de Colofón (Wells et al. 1993). Durante el primer siglo después de Cristo existen numerosos registros del uso medicinal descritos en la literatura sánscrita, persa y árabe. Sin embargo, fue bajo la influencia de Broussais (1772-1832), médico de Napoleón, que el uso medicinal de las sanguijuelas se esparció rápidamente. Este médico propuso que las enfermedades eran resultado de un exceso en la acumulación de sangre y el alivio de esta condición consistía en una potente hirudoterapia e inanición (Rolleston 1959). A finales del siglo XVIII y principios del XIX se hizo extensivo el uso de las sanguijuelas como terapia para diversas afecciones, particularmente en los países europeos, representando un agente terapéutico por excelencia. El uso de estos organismos, principalmente de *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 fue tan popular que esta especie llegó a estar en peligro de extinción en algunas localidades de Europa (Whitaker et al., 2004). El uso de sanguijuelas en la medicina disminuyó posteriormente, pero en la actualidad, su aplicación se ha extendido desde tratar hematomas hasta el estudio de proteínas con propiedades analgésicas, vasodilatadoras, anticoagulantes y antiinflamatorias que se han detectado en su saliva, así como su uso en microcirugías y en la reimplantación de órganos (Walton et al., 1998; Whitaker et al., 2004).

Características generales de Hirudinea

Las sanguijuelas son hermafroditas, presentan reproducción cruzada y fertilización interna. Los huevos fertilizados se recubren con una membrana proteica secretada por el clitelo; en la mayoría de las especies dicha membrana forma un capullo u ooteca, cuya función es proteger los huevos en desarrollo. En la mayoría de las especies, las ootecas son depositadas en sustrato duro dentro o fuera del agua, o bien adheridos sobre la superficie de sus hospederos. En las especies de la familia Glossiphoniidae, esa membrana es flexible y mantiene a los huevos adheridos al vientre de la sanguijuela progenitora hasta que terminan su desarrollo, representando uno de los pocos casos de cuidado parental conocidos dentro de Annelida (Kutschera & Wirtz, 1986; Sawyer, 1986). El desarrollo ontogenético es directo, es decir, no cuenta con estadios larvarios (Sket & Troneteli, 2008; Weisblat & Kuo, 2014).

El número de somitos en el cuerpo es constante, siempre 34, y cada uno de ellos presenta un patrón de anillamiento superficial altamente variable entre especies pero constante a nivel de especie. Los somitos de la región media del cuerpo se denominan somitos completos y pueden presentar 2, 3, 5 o más anillos por somito. De acuerdo con Moore (1898), los somitos del cuerpo se numeran del extremo anterior al posterior, desde el somito I hasta el XXVII, los últimos 7 somitos se encuentran fusionados y forman la ventosa posterior. Por consenso, los somitos son denominados empleando números romanos (Fig. 1A). La nomenclatura para referirse a cada uno de los anillos que componen los somitos se deriva del patrón más básico formado por tres anillos primarios, denominados a1, a2 y a3; el anillo a2 es el anillo neural y coincide internamente con cada uno de los ganglios conectados por un cordón nervioso ventral. Las subdivisiones subsecuentes de a1, a2 y a3 dan lugar a anillos (b1+b2) (b3+b4) (b5+b6) respectivamente, cada uno de los anillos “b” puede subdividirse consecutivamente en dos anillos “c”. Un somito completo estaría compuesto por 12 anillos “c” y así sucesivamente con cada anillo “c” (Fig. 1B). De acuerdo con la anatomía interna, los somitos I al V dan lugar a la región anterior, en esta se ubican las manchas oculares, la ventosa anterior y la boca; los somitos VI al IX forman la región preclitelar, los somitos X al XIII conforman la región clitelar; la región media está compuesta por los somitos XIV al XXIV y finalmente la región anal incluye los somitos XXV-XXVII (Ringuelet, 1985; Davies, 1991).

La mayoría de las sanguijuelas habitan ambientes dulceacuícolas y son particularmente abundantes en lagos y en cuerpos de agua estancada, aunque también son

comunes en ríos de agua lenta y arroyos. También existe un grupo considerable de especies marinas, algunas son de ambientes salobres y finalmente, algunas son consideradas terrestres. Existen algunas especies de sanguijuelas que viven permanentemente adheridas a sus hospederos, sin embargo, la mayoría de ellas son de vida libre y se adhieren a sus hospederos por espacios de tiempo breves (Oceguera-Figueroa & Kvist, 2019).

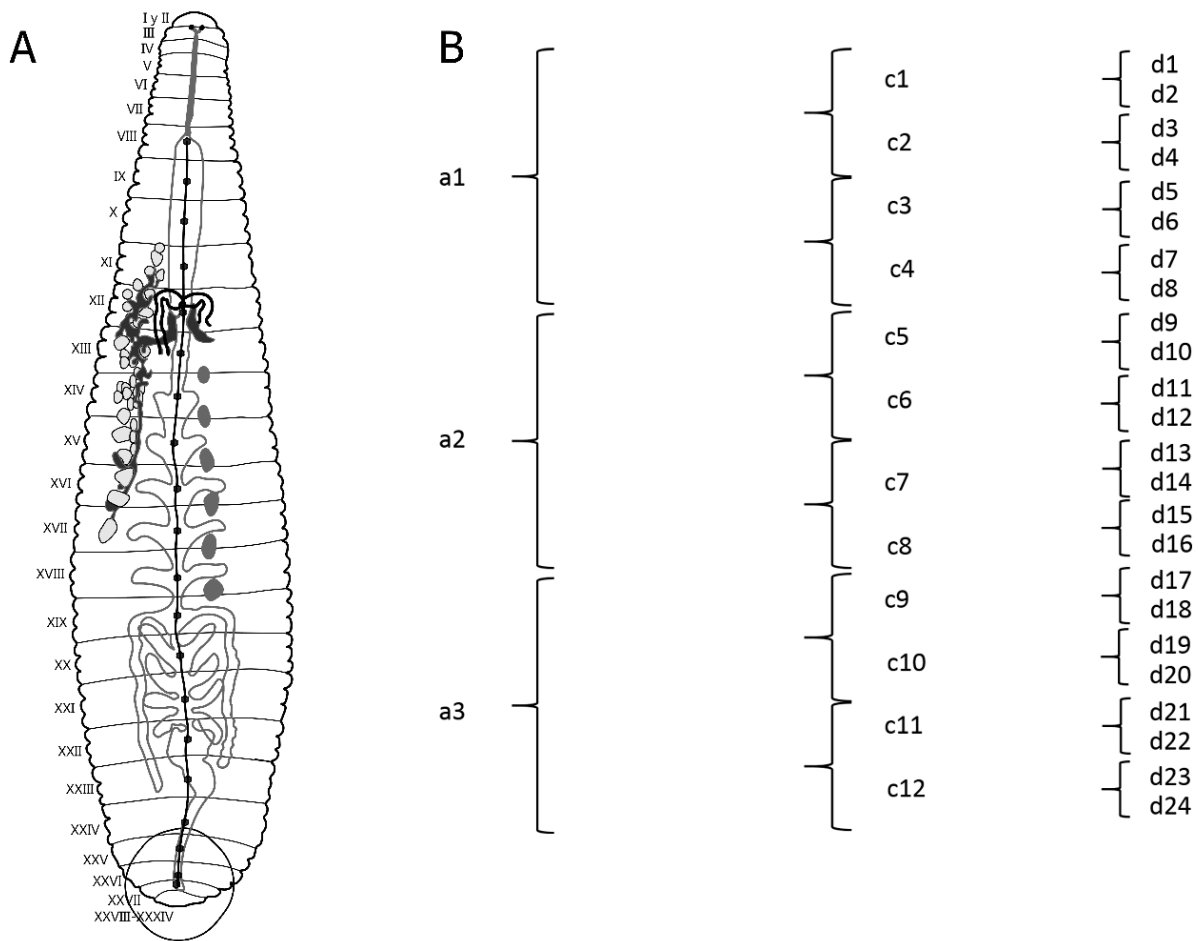


Figura 1. Esquema de la numeración de los somitos y la nomenclatura de los anillos propuesta por Moore, (1988). La figura A es una modificación de *Helobdella fusca* realizado por Castle (1900) en el cual se representa la morfología interna.

Clasificación y filogenia de Hirudinea

Tessler et al. (2018) realizaron un análisis filogenético en el que resuelven algunos problemas sistemáticos de grupos no naturales, los cuales ya habían sido evidenciados en estudios previos (Apakupakul et al., 1999). La principal inconsistencia entre filogenia y clasificación se relaciona con la división tradicional de las sanguijuelas en dos grandes grupos, Rhynchobdellida Blanchard, 1893 para especies con proboscis (parafilético) y Arhynchobdellida Blanchard, 1894 para especies sin proboscis (monofilético). Tessler et al. (2018) propusieron una redefinición de Hirudiniformes Caballero 1952 y Erpobdelliformes Sawyer, 1986, así como el establecimiento de tres nuevos subórdenes: Glossiphoniiformes, Americobdelliformes y Oceanobdelliformes, con el fin de reflejar con la clasificación nuestro conocimiento sobre las relaciones filogenéticas del grupo.

Conforme a la nueva clasificación, dos grupos incluyen especies con la faringe modificada en una proboscis evertible: Oceanobdelliformes y Glossiphoniiformes. De acuerdo con Sawyer (1986) dentro del grupo ahora denominado Glossiphoniiformes (Glossiphoniidae en Sawyer, 1986) se encuentran tres subfamilias, definidas con base en el número de manchas oculares y tipo de reproducción: Glossiphoniinae (6 géneros), Theromyzinae (1 género) y Haementerinae (15 géneros) (Cuadro 1). Análisis filogenéticos con base en caracteres morfológicos y moleculares han demostrado que de las tres subfamilias, solamente Theromyzinae es monofilética, evidenciando que se requiere de una revisión formal de Glossiphoniinae y Haementerinae (Light & Siddall, 1999).

Cuadro 1. Miembros de la familia Glossiphoniiformes

Subfamilia	Género	Estatus actual	Sinonimia
Theromyzinae	<i>Theromyzon</i>	Válido	
Glossiphoniinae	<i>Glossiphonia</i>	Válido	
	<i>Hemiclepsis</i>	Válido	
	<i>Placobdella</i>	Válido	
	<i>Baicaloclepsis</i>	Válido	
	<i>Parabdella</i>	Válido	
	<i>Torix</i>	Válido	
Haementeriinae	<i>Haementeria</i>	Válido	
	<i>Batracobdella</i>	Válido	
	<i>Maiabdella</i>	Válido	
	<i>Marsupiobdella</i>	Válido	
	<i>Placobdelloides</i>	Válido	
	<i>Actinobdella</i>	Válido	
	<i>Oligobdella</i>	Sinónimo	<i>Placobdella/Haementeria</i>
	<i>Helobdella</i>	Válido	
	<i>Adaetobdella</i>	Sinónimo	<i>Helobdella</i>
	<i>Gloiobdella</i>	Sinónimo	<i>Helobdella</i>
	<i>Marvinmeyeria</i>	Válido	
	<i>Tribothrynobdella</i>	Válido	
	<i>Alboglossiphonia</i>	Válido	
	<i>Oosthuizobdella</i>	Válido	
	<i>Paraclepsis</i>	Válido	

El género *Helobdella* Blanchard, 1896, incluido en la subfamilia Haementeriinae (sensu Sawyer, 1986), constituye el género de sanguijuelas más diverso, con más de 80 especies descritas a la fecha (Sket & Trontelj, 2008, Christoffersen, 2011). La diversidad más alta del grupo se encuentra en América del Sur y se hipotetiza que en esta región se originaron y posteriormente se han desplazado a prácticamente todas las regiones del

mundo, ya sea de forma natural o provocada por el ser humano (Ringuelet, 1985; Reyes-Prieto et al., 2013; Sawyer, 1986; Siddall et al., 2005).

El género *Helobdella* está conformado por sanguijuelas exclusivamente dulceacuícolas que se caracterizan por presentar por lo general el cuerpo aplanado dorsoventralmente, aunque algunas especies pueden ser semicirculares en corte transversal (i. e. *Helobdella elongata*). A diferencia otras especies de la misma familia que son estrictamente hematófagas, las especies del género *Helobdella* se alimentan de hemolinfa y tejidos blandos (liquidomatofagia) de invertebrados de agua dulce, principalmente de moluscos aunque también se han reportado alimentándose de oligoquetos y otros invertebrados (Sawyer, 1986). Se caracterizan por presentar un par de manchas oculares anteriores en IV a veces entre III y IV, un anillo entre los gonoporos y por carecer de bacteriomas (Siddall & Borda, 2003). Otros caracteres que definen al género son: cuerpo aplanado, ligeramente lanceolado, somito completo tri-anillado, anillos subdivididos o simples, ventosa anterior (cápula) formada por los primeros 4 somitos, 6 pares de testisacos, a veces 4 ó 5 pares, siempre dispuestos entre los somitos. Buche provisto con 5 o 6 pares de ciegos laterales, aunque algunas especies sólo presentan un par de post-ciegos, intestino con 4 pares de ciegos y recto corto que finaliza en el ano localizado en la región dorsal cerca de la ventosa posterior (Ringuelet, 1985).

Historia taxonómica del género *Helobdella*

Helobdella Blanchard, 1896 tiene como especie tipo a *Helobdella stagnalis* (Linnaeus, 1758), la cual fue descrita originalmente como *Hirudo stagnalis*, con base en ejemplares europeos sin una localidad claramente especificada (Iwama et al., en revisión). *Helobdella stagnalis* presenta una estructura conspicua denominada placa quitinoide dorsal en la región anterior del cuerpo, estructura que fue utilizada para asignar en esta especie a todas las sanguijuelas con placa quitinoide independientemente de su sitio de recolecta o de variación en otros caracteres. En Estados Unidos, *Helobdella modesta* (Verrill, 1872) fue descrita con base en ejemplares recolectados en Whitneyville en el Estado de Connecticut, sin embargo, al no identificarse caracteres morfológicos que claramente permitieran diferenciarla de la forma europea, Sawyer (1986) decidió considerar el morfotipo del continente americano como sinónima de la forma europea. Siddall y Borda (2003) reconocieron una elevada

distancia genética entre las formas de ambos continentes, sugiriendo que ésta es suficiente para distinguir a las dos como especies independientes.

Durante el siglo XX se describieron la mayoría de las especies del género, principalmente con base en ejemplares recolectados en el Nuevo Mundo, particularmente en Argentina, Brasil, México y Estados Unidos (Christoffersen, 2011). Ringuelet (1978a) al estudiar la enorme diversidad de formas principalmente de Argentina, subdividió *Helobdella* en cuatro géneros: *Adaëtobdella* Ringuelet, 1978, *Acritobdella* Ringuelet, 1978, *Dacnobjdella* Ringuelet, 1978 y *Gloibdella* Ringuelet, 1978.

Estos géneros se definieron con base en los siguientes caracteres: *Acritobdella* contiene especies con anillos subdivididos y sin placa y/o glándula nugal (una especie). La única especie incluida en *Dacnobjdella* tiene glándula nugal, anillos indivisos y glándulas salivales compactas. Las 3 especies de *Adaëtobdella* cuentan con anillos indivisos y glándulas salivales compactas, pero carecen de placa y/o glándula nugal. Finalmente, *Gloibdella* reúne 2 especies con buche simple, sin ciegos (Fig. 2).

Sawyer (1986) independientemente del trabajo de Ringuelet, subdividió el género *Helobdella* con base en la presencia/ausencia de placa quitinoide dorsal, y agrupó a las especies del género en dos series de especies: “*stagnalis*” (que incluye a las especies con placa quitinoide dorsal) y “*triserialis*” (sin dicha placa). En este esquema, los géneros propuestos por Ringuelet, *Acritobdella* y *Dacnobjdella*, no fueron considerados válidos, sin embargo, *Gloibdella* y *Adaëtobdella* si lo fueron.

Estudios sistemáticos que incluyen datos moleculares (secuencias de DNA) demostraron que las características tomadas por Ringuelet (1978a) y por Sawyer (1986) no definen grupos naturales y que el reconocimiento de estos dejaría a *Helobdella* como parafilético, por lo cual este último es actualmente el único género válido, cuyo grupo hermano es el género *Haementeria* (Siddall & Borda, 2003; Siddall et al., 2005).

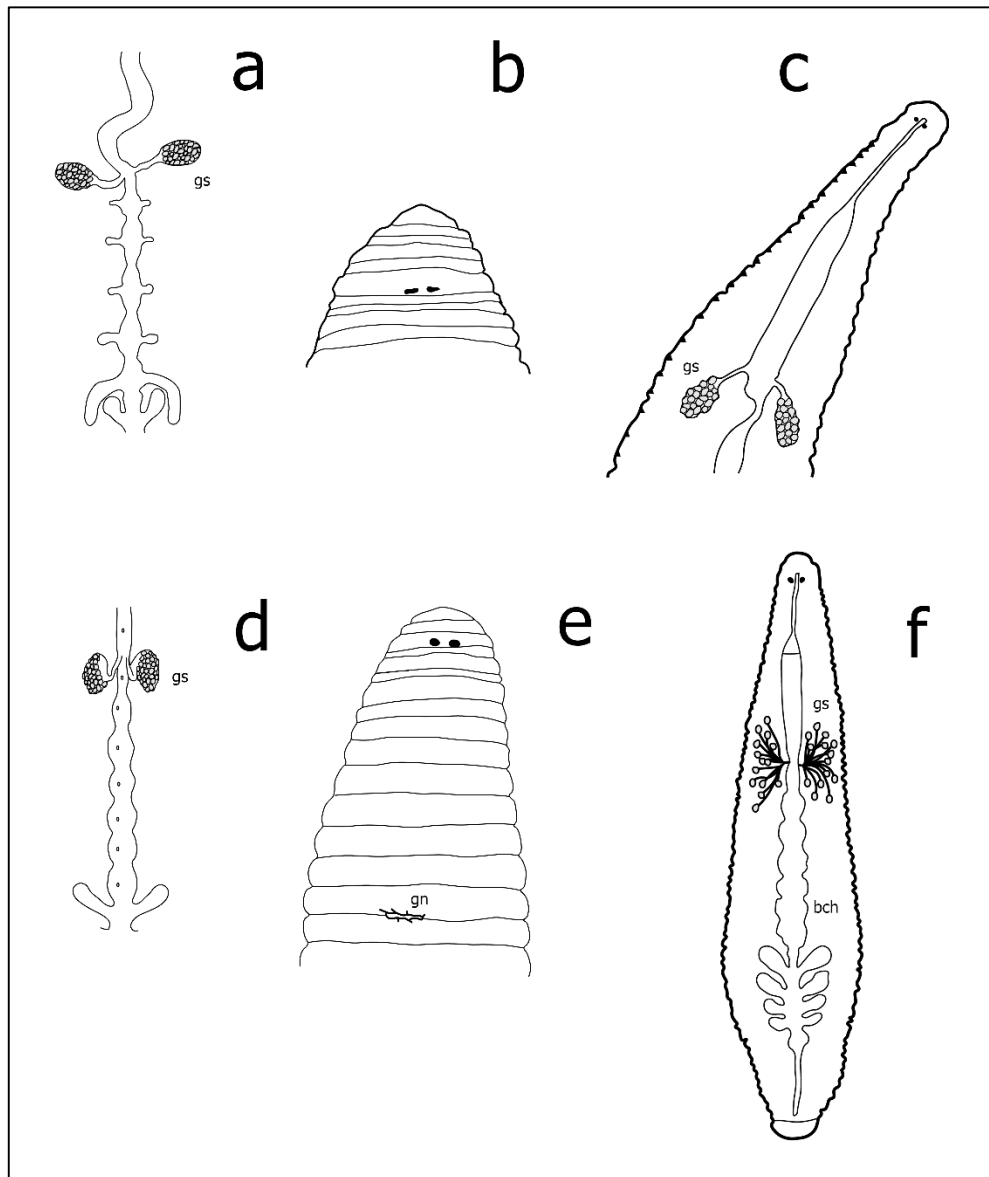


Figura 2. Esquemas de la morfología de algunas especies de *Helobdella*: Glándulas salivales (gl), Glándula nucal (gn), Buche simple (bch) y los anillos subdivididos que presenta *A. longicollis*. Los cuatro géneros representados en esta figura son modificaciones de Ringuelet (1978) y Ringuelet (1985): **a.**- *Helobdella chaquensis* (= *Adaëtobdella chaquensis*), **b.**- *H. malviniensis* (= *Adaëtobdella malviniensis*) **c.**- *H. longicollis* (= *Acritobdella longicollis*), **d** y **e.**- *H. xenoica* (= *Dacnobdella xenoica*) **f.**- *Helobdella obscura* (= *Gloiobdella obscura*).

Complejo de especies “*Helobdella triserialis*”

Helobdella triserialis (Blanchard, 1849) fue descrita con base en material recolectado en Carelmapú, Maullín, Chile. Este taxón ha sido recolectado en diversas localidades y se ha considerado como polimórfico dada la elevada variación en los patrones de pigmentación, número de líneas longitudinales o la presencia de manchas y cromatóforos (Ringuelet, 1943). La distribución geográfica de *H. triserialis* incluye Argentina, Brasil, Chile, Costa

Rica, Guatemala, Guyana Francesa, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela, aunque también se ha registrado en EUA y Canadá (Ringuelet, 1985).

Hasta mediados del siglo XX, se habían descrito diversas especies similares morfológicamente a *H. triserialis* (p. ej. *H. fusca*, *H. lineata*, *H. papillata* y *H. socimulcensis*). Ringuelet (1943) agrupó las formas en 5 variedades: *H. triserialis triserialis* s. s. para formas de América Central y Sudamérica: *Helobdella triserialis* var. *cordobensis*, *Helobdella tris.* var. *unilineata*, *Helobdella tris.* var. *striata*, *Helobdella tris.* var. *nigricans* y *Helobdella tris.* var. *lineata*. Este autor señaló más tarde que las formas norteamericanas descritas como *Glossiphonia fusca* Castle, 1900 (= *Helobdella lineata* y *Helobdella papillata*) pertenecen a *Helobdella tris.* var. *lineata* (Ringuelet, 1985). Para el caso de las variedades *cordobensis* y *striata* análisis morfológicos posteriores condujeron a su elevación a nivel de especie (Ringuelet, 1968 y Ringuelet, 1978b).

Siddall y Borda (2003) al incluir datos morfológicos y moleculares al estudio de las relaciones filogenéticas del grupo, lograron diferenciar las formas del complejo “*triserialis*” de Norteamérica de las de América del Sur, revalidando a nivel de especies a las especies norteamericanas *Helobdella papillata* y *H. fusca*. Siddall y Borda (2003) señalaron que *H. triserialis sensu stricto* es muy distinta molecularmente a las variedades de este complejo que se distribuyen en Norteamérica; a pesar que *H. triserialis* de América del Sur y *H. fusca* y *H. papillata* de América del Norte son similares morfológicamente. La forma sudamericana de *H. triserialis* exhibe interrupciones transversales en la pigmentación longitudinal anterior al somito genital y cerca de las manchas oculares; estos autores apuntaron que la dificultad de agrupar a los miembros del complejo “*H. triserialis*” se originó a partir de la observación de las líneas oscuras y de las papilas de la región dorsal, caracteres difíciles de diferenciar y que se modifican después de la fijación de los especímenes.

Gran parte del conocimiento sobre hirudíneos de México y en particular sobre el género *Helobdella* fue realizado por el Dr. Eduardo Caballero y Caballero. Caballero (1931) describió *Glossiphonia socimulcensis* Caballero, 1931 del lago de Xochimilco en la Ciudad de México; posteriormente describió *Helobdella moorei* Caballero, 1933, de León, Guanajuato. Las diferencias entre las dos formas mexicanas se fundamentan en la variación del patrón metamérico de los cromatóforos y las papilas, así como de las líneas longitudinales de la superficie dorsal. Finalmente, Caballero (1941) describió la tercera

especie, *Glossiphonia conchata* Caballero, 1941, recolectada en el Estado de Morelos. En otro trabajo también reportó la presencia de *Glossiphonia fusca* en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán y en Lagunas de Zumpango, México (Caballero, 1935). En general, las descripciones de Caballero no son uniformes y son poco detalladas, lo cual dificulta su identificación, así como, las características que les dan validez como especies.

Ringuelet (1982), tras una estadía en México en la que revisó parte de la hirudofauna de nuestro país, llegó a la conclusión de que *H. socimulcensis* en realidad se trataba de *Helobdella triserialis* var. *lineata*. Respecto a las otras especies de este complejo descritas por Caballero, a *H. moorei* la propuso como *specie inquirenda*, por presentar aparentemente dos anillos separando los gonoporos, un carácter inusual en el género; mientras que a *H. conchata* la mantuvo como válida distinguiéndola por poseer el anillo medio subdividido secundariamente. Más tarde, López-Jiménez (1985) caracterizó morfológicamente a ejemplares de *H. socimulcensis* y al igual que Ringuelet, concluyó que se trataba de *H. triserialis* var. *linneata*. Sin embargo, mencionó que existe variación en el tamaño del cuerpo, en los pares de ciegos laterales (5 o 6) y en el número de testisacos (4 o 5 pares) entre ejemplares de distintas localidades.

Estudios sobre la diversidad molecular de las especies de *Helobdella* de México, principalmente del gen mitocondrial citocromo *c* oxidasa subunidad I o COI, mostraron muy baja diversidad genética entre los ejemplares recolectados en las localidades tipo reportadas para las tres especies: *H. socimulcensis* (Caballero, 1931) *H. moorei* Caballero, 1933 y *H. conchata* (Caballero, 1941), por lo que se sugirió que el grupo entero podría ser considerado una sola especie del complejo “*H. triserialis*” para México, pero distinta de *H. triserialis* s. s., debido a que las formas mexicanas constituyeron un linaje independiente (Oceguera-Figueroa et al., 2010). Dada la prioridad nomenclatural de *H. socimulcensis* (Caballero, 1931) para el linaje mexicano, esta fue la denominación mantenida para estas formas en México (Oceguera-Figueroa et al., 2010).

Sistemática molecular

El gen mitocondrial citocromo *c* oxidasa subunidad I (COI) ha sido ampliamente utilizado para investigar la diversidad de especies de una gran variedad de grupos, uno de ellos las sanguijuelas (Hebert et al., 2003b; DeSalle et al., 2005; Bely & Weisblat, 2006; Oceguera-Figueroa et al., 2010). El uso de este gen se fundamenta en las siguientes razones:

1) por su amplia representación en las bases de datos genéticas (BOLD y Genbank), 2) ha demostrado ser funcional como “código de barras” en animales, ya que permite evidenciar las diferencias en variación inter e intraespecífica, 3) se ha usado ampliamente como una potente evidencia molecular para la validación a nivel de especie (Bely & Weisblat, 2006; DeWit & Erseus, 2010; Hebert et al. 2003b; Kvist et al. 2010 y Ocegüera-Figueroa et al., 2010) y 4) permite el reconocimiento de especies invasoras e introducidas (Siddall & Budinoff, 2005; Reyes-Prieto et al., 2013; Garduño-Montes de Oca et al., 2016). Se ha inferido que la tasa de mutación del DNA mitocondrial es más alta que en el genoma nuclear, por ello, es factible encontrar variación molecular aún entre especies filogenéticamente muy cercanas; por lo tanto, este marcador también ha sido extensivamente usado para investigar las relaciones filogenéticas a niveles jerárquicos bajos, cercanos a especie (Sharma & Kobayashi, 2014). Al igual que otros genes, las secuencias COI han sido usadas para inferir filogenias a nivel de especie y población, debido a la alta tasa de sustitución, particularmente en la tercera posición de cada codón (Liu & Beckenbach 1992; Frati et al. 1997).

Los *primers* o cebadores universales diseñados por Folmer et al. (1994), LCO 1490 y HCO 2198, con 26 pares de bases de longitud cada uno, son ampliamente usados para la amplificación de muestras de organismos pertenecientes al Reino Animal. El par de *primers* de Folmer amplifica la primera mitad del gen COI, la cual es un fragmento de longitud aproximada de 680 pb. La tasa de éxito de amplificación de los *primers* en especies animales divergentes ha sido alta debido a la conservación del extremo 3' (Folmer et al. 1994).

El uso de una sola fuente de evidencia para realizar inferencias filogenéticas, ya sea molecular, morfológica, conductual u otra ha sido puesta en duda reiteradamente (DeSalle et al., 2005; Achurra & Erséus, 2013; Prendini, 2005) por lo que en la actualidad, la práctica filogenética incluye el análisis simultáneo de datos de distinto origen. Por lo cual, en el presente trabajo se utilizaron otros dos marcadores, el gen mitocondrial Nicotinamida Adenina Dinucleótido Deshidrogenasa subunidad I o NADH-I de 650 pb, el cual es el segundo con mayor representación en Genbank para este grupo de sanguijuelas y el marcador nuclear, espaciador interno transcrito o ITS de 1100 pb, el cual ha sido sugerido recientemente como un “barcode” alternativo para animales y que pudiera ser complementario al COI para la identificación de especies (Källersjö et al., 2005; Li et al., 2010; Yao et al., 2010).

OBJETIVOS GENERALES

- Investigar las relaciones filogenéticas de especies de sanguijuelas del género *Helobdella* a partir de evidencia genética.
- Poner a prueba la monofilia del género, así como de otros taxones propuestos previamente.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar la riqueza de especies del género *Helobdella* en México a partir de información morfológica y molecular.
- Generar e incluir secuencias de especies de *Helobdella* de diversas localidades de América Latina a la filogenia del grupo y realizar un análisis de evidencia total

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolecta del material biológico

Las sanguijuelas se encontraron adheridas a rocas y raíces sumergidas en cuerpos de agua dulce de varias localidades del país, tanto en lagunas, ríos, riachuelos, canales, presas y acequias. Los ejemplares se recolectaron directamente con las manos o empleando pinceles finos y fueron almacenados en contenedores de plástico con agua del sitio de colecta y transportadas a laboratorio.

Para el análisis morfológico, las sanguijuelas se anestesiaron aplicando alcohol al 70% de forma gradual hasta que los movimientos cesaran completamente. Posteriormente, algunos ejemplares se aplanaron para lo cual se colocaron entre dos portaobjetos, primero incluyendo entre éstos un trozo de papel absorbente con la finalidad de remover el mucus y posteriormente sin el papel. Los ejemplares se mantuvieron entre los portaobjetos sumergidos en alcohol entre 10 y 20 minutos y finalmente se almacenaron en viales con alcohol al 70%, en donde permanecieron hasta su procesamiento. El material utilizado para la extracción de DNA fue fijado directamente en alcohol al 96° y se mantuvo refrigerado a 4°C.

Ejemplares representativos fueron fotodocumentados inmediatamente después de su fijación con ayuda de una cámara Leica DFC 490 acoplada a un microscopio Leica Z16AP0A en el Laboratorio Nacional de la Diversidad (LANABIO) en el Instituto de

Biología, UNAM (Ver Anexo 1).

Análisis morfológico

Los ejemplares se tiñeron con una mezcla de paracarmín de Mayer y hematoxilina de Ehrlich siguiendo el protocolo descrito en el Anexo 2; posteriormente se montaron en preparaciones permanentes con bálsamo de Canadá. Las ilustraciones de las características externas de ejemplares seleccionados se realizaron en un microscopio de campo claro a mano y posteriormente fueron mejoradas en Illustrator y Photoshop (Adobe Systems Inc). Los ejemplares estudiados en el presente trabajo se depositaron en la Colección Nacional de Helmintos, Instituto de Biología, UNAM.

Extracción del DNA

La extracción del DNA total se realizó a partir del tejido de la ventosa posterior; este tejido se utiliza con el fin de evitar contaminación con DNA de los alimentos que se pudiera localizar en el tubo digestivo. Para la extracción se utilizaron los kits DNeasy Blood and Tissue kit (Quiagen), Wizard Genomic DNA Purification kit (PROMEGA) y Animal and Fungi DNA Preparation kit (Jena Bioscience) siguiendo los protocolos sugeridos por los fabricantes.

Amplificación de marcadores moleculares

Los *primers* utilizados para amplificar cada gen se muestran en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Marcadores utilizados en este estudio, secuencias y autores de los mismos.

Gen	Primer	Dirección	Secuencia	Autor(es)
COI	LCO 1490	Forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer, et al. (1994)
	HCO 2198	Reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAT	
NADH-I	LND300	Forward	TGGCAGAGTAGTGCATTAGG	Light & Siddall (1999)
	HND1932	Reverse	CCTCAGCAAAATCAAATGG	
ITS	ITS4	Forward	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. (1990)
	ITS5	Reverse	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
	SF	Forward	CGCAGCCAGCTGCGTGAATTAATGT	Källersjö et al., (2005)
	SR	Reverse	GATGTGCGATGTTCAATGTGTCCTGC	

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) del gen COI se llevaron a cabo con el siguiente perfil térmico: 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C (45 seg), 46°C (45 seg), y 72°C (45 seg) y extensión final a 72°C (7 min). En casos en los que no se logró amplificar el marcador deseado se modificó el perfil de 46°C en la temperatura de alineamiento a 48°C y en unos casos a 43°C. En los casos en los que las bandas en el gel de electroforesis fueron muy tenues, se incrementó el número de ciclos a 35.

La subunidad 1 del gen nicotinamida adenina dinucleotido deshidrogenasa (NADH-I) se amplificó con el siguiente perfil térmico: 94°C por 5 min., 15 ciclos de 94°C, 46°C, 72°C por 45 segundos cada temperatura y 25 ciclos de 94°C, 46°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 6 minutos.

Finalmente, la región nuclear espaciador interno transcrito (ITS) se amplificó con el siguiente perfil térmico: 95°C por 5min, 35 ciclos de 95°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 1:30 min, finalmente una extensión de 8 min a 72°C.

En todas las reacciones se agregó 0.1 µl de Mg por cada muestra. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, con 1 µl de reactivo fluorescente (REDGEL) por cada 2 µl de templado.

Secuenciación del DNA

La purificación y secuenciación se realizó en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad del Instituto de Biología (LANABIO), UNAM.

Organización de la presente tesis

Este trabajo está organizado de la siguiente forma: en el Capítulo I se presentan los análisis filogenéticos del género *Helobdella* empleando la evidencia total, en este capítulo se distinguen las relaciones filogenéticas que guardan las especies nominales y se identifican los grupos principales así como los complejos de especies y las especies potencialmente nuevas. El Capítulo II contiene la caracterización morfológica de las especies recolectadas en México, finalmente en el Capítulo III se presenta el análisis de un caso de una especie de *Helobdella* ampliamente distribuida a nivel mundial de la cual se sugiere realizar cambios taxonómicos.

CAPÍTULO I
RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO
***HELOBDELLA* BLANCHARD, 1896 CON BASE EN CARACTERES**
MOLECULARES

Introducción

Helobdella incluye especies dulceacuícolas provistas con una proboscis evertible y por presentar el cuerpo aplanado dorsoventralmente; presentan un par de manchas oculares; carecen de bacteriomas o estructuras portadoras de bacterias; se alimentan exclusivamente de hemolinfa y tejidos blandos de invertebrados acuáticos (Sawyer, 1986; Siddall & Borda, 2003). Este grupo es el más diverso de Hirudinea en cuanto a número de especies y su mayor diversidad ocurre en América del Sur; sin embargo, algunos de sus miembros se distribuyen en todos los continentes de forma natural y se han detectado especies introducidas transcontinentalmente (Siddall & Borda, 2003; Christoffersen, 2011; Reyes-Prieto et al., 2013).

El primer estudio sobre las relaciones filogenéticas de *Helobdella* fue realizado por Siddall y Borda (2003), el cual incluyó 21 terminales representando 15 especies y en el que se analizaron nueve caracteres morfológicos y dos marcadores moleculares (DNA mitocondrial). En dicho trabajo los autores sustentaron la monofilia del grupo y los géneros *Gloiobdella* y *Desmobdella* fueron sinonimizados con *Helobdella* al encontrarse anidadas dentro de este último y en caso de ser reconocidos, *Helobdella* quedaría como parafilético. A la fecha, se han realizado diversos estudios sobre la variación molecular intra e inter específica en las especies del género *Helobdella*, para lo cual se ha estudiado particularmente el gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI). Esto ha resultado en la detección de especies “potencialmente” nuevas, las cuales en algunos casos han sido descritas con base en la combinación de datos morfológicos y moleculares (Bely & Weisblat; 2006; Ocegüera-Figueroa et al., 2010; Kutschera et al., 2013; Saglam et al., 2018; Salas-Montiel et al., 2014).

El intento de identificar los límites entre especies con base en datos moleculares ha seguido tres aproximaciones: 1) Identificar un umbral de similitud entre secuencias de una misma especie y utilizar este mismo umbral para distinguir entre otros pares de especies. Este enfoque surgió a partir del concepto del código de barras de DNA propuesto por

Herbert y colaboradores (2003a). Teóricamente, este método nos permite asignar individuos a especies, ya que se asume que la variación intraespecífica es más baja que la variación interespecífica. En este sentido, seríamos capaces de usar un umbral de similitud al comparar con una o varias secuencias de referencia ya existentes en una base de datos (Hebert et al., 2003b). El empleo de marcadores moleculares bajo esta perspectiva ha permitido, acelerar el descubrimiento de especies en general (Tautz et al., 2003). Bajo este criterio, distancias pareadas corregidas bajo el modelo de Kimura 2 parámetros (K2P) entre 2% y 3%, son valores suficientes para considerar que dos secuencias de COI pertenecen a especies distintas; sin embargo, es claro que estos valores pueden cambiar de acuerdo al taxón (Erséus & Gustafsson, 2009); 2) A partir de métodos de coalescencia. Este método estima genealogías intraespecíficas comparando árboles de genes mitocondriales y nucleares (Achura & Erséus, 2013). Para aplicar este último método es necesario contar con información de más de un marcador molecular. Finalmente, la tercera aproximación se basa en utilizar las secuencias de código de barras de DNA como una serie de caracteres, dentro de la cual teóricamente podemos encontrar aquellos que sean diagnósticos para unidades taxonómicas previamente descritas. Bajo esta aproximación lo más importante son dichos caracteres diagnósticos y el experto es quien considera el número de posiciones que son relevantes para sustentar una clasificación particular (Sarkar et al., 2008).

El uso exclusivo del gen COI (un solo marcador mitocondrial) para resolver problemas taxonómicos y/o para investigar las relaciones filogenéticas de un grupo determinado de especies puede resultar en conclusiones erróneas una vez evaluadas otras fuentes de información. En principio esto se debe a que 1) los marcadores mitocondriales pueden sobreestimar el número de especies, 2) puede haber copias nucleares de genes mitocondriales generalmente en forma de pseudogenes que llevarían a sobre estimar la diversidad, 3) existe flujo génico que puede estar sesgado por el sexo y 4) pueden reflejar fenómenos de introgresión (Hebert, 2004; Rubinoff et al., 2006; Achurra & Erseus, 2013; Martinsson et al., 2013). En la actualidad, se sugiere que el uso de diversas fuentes de información para realizar estudios filogenéticos, es preferible sobre aquellas opciones que únicamente evalúan una sola fuente (Kvist et al., 2010; Chang & James, 2011), por lo cual, en el presente trabajo buscamos investigar las relaciones filogenéticas dentro del género y poner a prueba tanto la monofilia del grupo como la pertinencia de erigir nuevas categorías y evaluar clasificaciones previas (géneros, subespecies y series) con base en los tres

marcadores moleculares: COI, NADH-I e ITS. Adicionalmente, se buscó identificar especies nuevas potenciales mediante el uso de los análisis moleculares.

Materiales y Métodos

Recolecta del material biológico

Entre 2015 y 2018 se realizaron recolectas de sanguijuelas en los estados de Chiapas Ciudad de México, Michoacán, Nuevo León, Jalisco, Tabasco y Veracruz (Fig. 3). En abril del 2018 se efectuaron recolectas en dos localidades en los alrededores de la ciudad de La Plata, Argentina: Blagiardi y Punta Lara. Los organismos fueron procesados de acuerdo con lo descrito en la Metodología general. Aunado a esto, se incluyen en el presente trabajo secuencias de DNA de ejemplares recolectados en Uruguay en Octubre del 2008 por Alejandro Ocegüera Figueroa y ejemplares donados recolectados en Perú y Cuba.

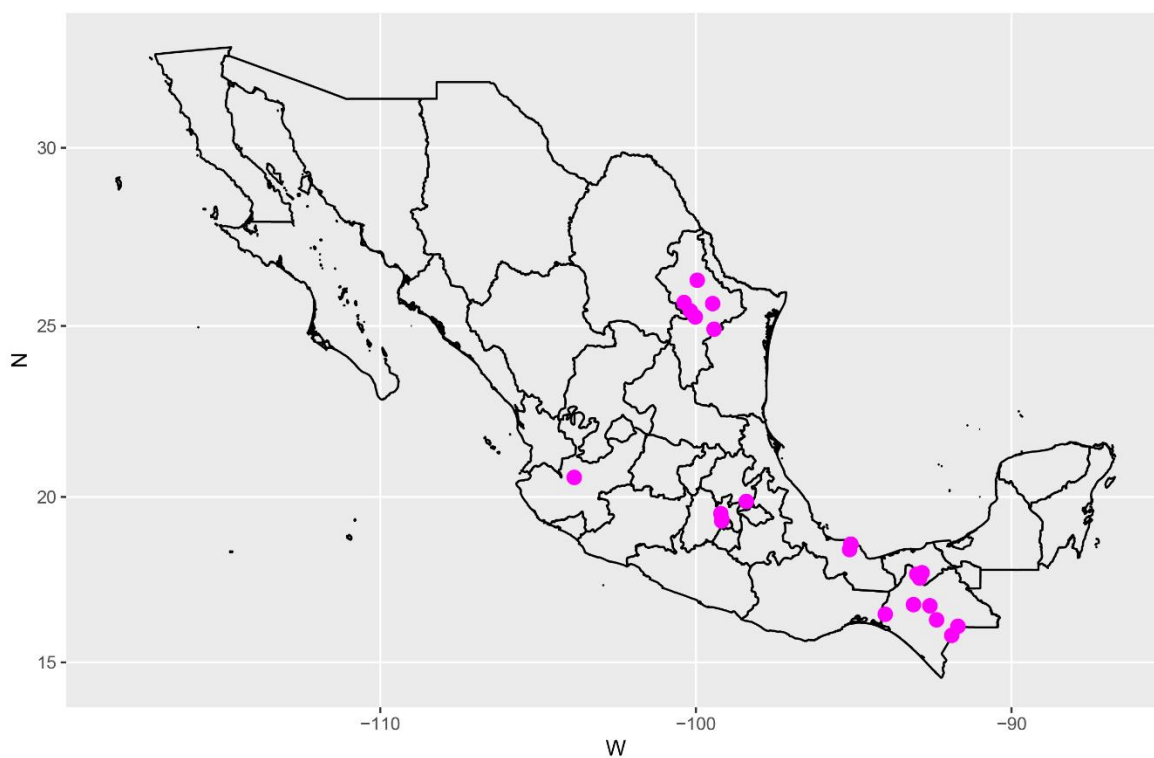


Figura 3. Ubicación geográfica de los sitios de recolecta de ejemplares dentro de la República Mexicana.

Alineamiento de secuencias genéticas

El alineamiento de secuencias de DNA se realizó con ayuda del software Mafft (Kato & Toh, 2008) para cada una de las particiones; como grupo externo se utilizaron especies del género *Haementeria* las cuales fueron escogidas con base en estudios filogenéticos previos (Siddall & Borda, 2003; Ocegüera-Figueroa, 2012). Se analizó una matriz de 206 terminales con 604 caracteres alineados para el gen COI, una matriz de 74 terminales con 616 caracteres para NDHI y de 47 terminales con 980 caracteres para ITS. La matriz concatenada tuvo un total de 214 terminales con un total de 2200 caracteres alineados representando 35 especies nominales del género *Helobdella*.

En el Cuadro 3 se muestran los códigos de acceso de GenBank de las secuencias usadas en este análisis. En el Cuadro 4 se muestran los ejemplares recolectados en México, que fueron asignados preliminarmente a cuatro especies con ayuda de registros previos para nuestro país (Salas-Montiel et al., 2014). Finalmente, en el Cuadro 5 se muestran los organismos provenientes de recolectas en Uruguay, Argentina, Perú y Cuba que fueron incluidos en el análisis filogenético.

Análisis filogenético

Las inferencias filogenéticas se realizaron bajo dos criterios de optimización: Inferencia Bayesiana (BI) a través del software MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et. al, 2011) con la versión en línea de comandos y Parsimonia (P) con ayuda del software TNT v. 1.5 (Goloboff et. al, 2008).

Previo al análisis por BI, se buscó el modelo de sustitución que mejor se ajustara a los datos de las matrices alineadas con ayuda de ModelTest (Burnham & Anderson, 2002), análisis integrado en el paquete Phangorn para R (Schliep et al., 2017; R-Core-team, 2018) (Script en el Anexo 3) y se eligió de acuerdo al criterio de información de Akaike o AIC (Posada, 2008).

Los parámetros para la búsqueda por BI en MrBayes fueron 10 millones de generaciones con árboles muestreados cada 1000 generaciones y de acuerdo a ModelTest con el modelo HKY+G+I para la partición de los genes COI y NADH-I y GTR+G para ITS. La opción Burn-in fue establecida a 25%.

La búsqueda en TNT se realizó con la opción *New Technology Search*, al tratarse de una matriz con más de 200 terminales (Goloboff et al. 2003). Los parámetros establecidos fueron: una búsqueda con 100 réplicas, 5 rondas de “ratcheting” y 5 rondas de “tree fusing”. Los valores de soporte fueron estimados mediante 1000 rondas de re-muestreo por bootstrap. Los árboles filogenéticos por cada gen se muestran en el Anexo 4.

Adicionalmente, se calcularon las distancias genéticas para las matrices de cada gen con el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P) (ver Hebert et al., 2004) con ayuda del paquete Phangorn para R (Schliep, et al., 2017; R-Core-Team, 2018).

Cuadro 3. Especies del género *Helobdella* incluidas en el presente trabajo con los respectivos códigos de GenBank de tres marcadores moleculares.

Espece	ID-COX	ID-NDHI	ID-ITS	Localidad
Grupo interno				
<i>Helobdella atli</i>	HQ179851			Tlaxcala México
	HQ179850			Puebla México
	HQ179852			D. F. México
<i>Helobdella austinensis</i>	DQ995306			Austin EUA
	DQ995307			Austin EUA
	DQ995308			Austin EUA
	DQ995309			Austin EUA
	DQ995310			Austin EUA
	KC812736			Austin EUA
	<i>Helobdella bolivianita</i>	AF329053	AF329076	
<i>Helobella echoensis</i>	JN692266			Oregon EUA
	JN692267			Pennsylvania EUA
	JN692268			Pennsylvania EUA
	KM612173			Canada
<i>Helobella elongata</i>	AF329045	AF329068		Michigan EUA
	MG821608			Chiapas México
	MG821609			Chiapas México
	MG821610			Chiapas México
	HQ179863			México
<i>Helobdella eriensis</i>	KM196604			Lago Erie EUA
<i>Helobdella europaea</i>	DQ995304			Berkeley, CA EUA
	DQ995298			California EUA
	DQ995297			California EUA
	FJ000349			Taipei Taiwan
	FJ000350			Taipei Taiwan
	FJ000351			Taipei Taiwan
	FJ000352			Taipei Taiwan
	AY856049			Taipei Nueva Zelanda
	AY856047			Aura Vale Lake Australia
	AY576008			Alemania
<i>Helobella fusca</i>	AF329038	AF329061		Michigan EUA
<i>Helobdella lineata</i>	AF329039	AF329062		Michigan EUA
	-	AF329078		Virginia EUA
<i>Helobdella melananus</i>	FJ000353			Taipei Taiwan
	FJ000354			Taipei Taiwan
	FJ000355			Taipei Taiwan
<i>Helobdella michaelsoni</i>	AF536824	AF536825		Lago Calafquen Chile
<i>Helobdella modesta</i>	JN692263			Collingswood, NJ EUA
	AF329040	AF329063		Columbus, OH EUA
	HQ179853			Washington EUA
	HQ179854			Washington EUA

<i>Helobdella nunununojensis</i>	AF329047	AF329070	Ulla Ulla	Bolivia
	AF329048	AF329071	Madidi	Bolivia
<i>Helobdella octatestisaca</i>	FJ000343		Taiwan	China
	FJ000344		Taiwan	China
	FJ000345		Taiwan	China
	FJ000346		Taiwan	China
	FJ000342		Taiwan	China
	FJ000347		Taiwan	China
	FJ000348		Taiwan	China
	MG821611		Chiapas	México
	MG821612		Chiapas	México
	MG821613		Chiapas	México
	MG821614		Chiapas	México
	KY498613		Texas	EUA
	HQ179858		Guanajuato	MEX
	HQ179857		Hidalgo	México
	HQ179855		Queretaro	México
	HQ179859		Tabasco	México
	HQ179856		Jalisco	México
<i>Helobdella papillata</i>	AF329046	AF329069	Virginia	EUA
	DQ995303		California	EUA
<i>Helobdella papillornata</i>		AY856050		
<i>Helobdella paranensis</i>	AF329037		Arroyo Espinas	Uruguay
<i>Helobdella pichipanan</i>	AY962456		Lago Chico	Chile
<i>Helobdella ringueleti</i>	AF329051	AF329074	Madidi	Bolivia
<i>Helobdella robusta</i>	DQ995299		Sacramento, CA	EUA
	AF178680	AF178680	California	EUA
	DQ995300		Sacramento, CA	EUA
	DQ995301		Sacramento, CA	EUA
<i>Helobdella serendepitous</i>	JN692265		NJ	EUA
<i>Helobdella socimulcensis</i>	DQ995311		Xochimilco	México
	HQ179868		CDMX	México
	HQ179867		Querétaro	México
	HQ179869		Guanajuato	México
	HQ179866		Hidalgo	México
	HQ179871		Jalisco	México
	HQ179872		Morelos	México
	HQ179870		Morelos	México
	MG821615		Guanajuato	México
	MG821616		Chiapas	México
	AF329050	AF329073	Chiapas	México
<i>Helobdella sorojchi</i>	AF329049	AF329072	Madidi	Bolivia
	AF329041	AF329064	Madidi	Bolivia
<i>Helobdella stagnalis</i>	AF116018			Francia
	AF329041	AF329064	Cotswolds	Inglaterra
	MF150165		Diyabakir Cinar	Turquía

<i>Helobdella temiscoensis</i>	HQ179861			Temixco, Morelos	México
	HQ179862			Temixco, Morelos	México
<i>Helobdella transversa</i>	AF329044	AF329067		Michigan	EUA
<i>Helobdella triserialis</i>	AF329054	AF329077		Laguna Volcán	Bolivia
<i>Helobdella virginiae</i>	HQ179864			Catemaco, Veracruz	México
Grupo externo					
<i>Haementaria ghiliani</i>	AF329035	AF329058	JN850932	BioPharm	Guyana Francesa
<i>Haementaria gracilis</i>	AF329034	AF329057		Arroyo Espinas	Uruguay
<i>Haementaria lutzii</i>	AF329033	AF329056		Rio Pastaza	Ecuador
<i>Haementaria officinalis</i>	JN850906	JN850952	JN850928		
<i>Haementaria tuberculifera</i>	JN850910	JN850937	JN850933	Iquitos	Perú

Cuadro 4. Organismos recolectados en la República Mexicana y los genes que fueron amplificados para cada taxón. Se incluyen los números de catálogo de la Colección Nacional de Helminthos (CNHE) de los ejemplares de referencia.

Clave	Taxón	Localidad	CNHE	Genes		
				COX-1	NDI	ITS
AO25-26	<i>H. octatestisaca</i>	Presa Cierro Prieto, Nuevo León		x		
AO29-31		Sombreretillo, Nuevo León		x		
AO39-41		Rio San Juan, Nuevo León		x	x	x
AO45		Presa el Cuchillo, Nuevo León		x		
AO95		Emiliano Zapata, Chiapas		x		
AO132-136		Cocaná, Tabasco		x		
AO139-140, AO157		Laguna Llano Grande, Tabasco		x		
AO151-152		Catemaco, Veracruz		x		
AO164-167		Montebello, Chiapas		x		
GT03 y GT05		Ejido Rosendo Salazar, Chiapas		x	x	x
GT06		Laguna Escondida, Veracruz	11046	x	x	x
GT07-09		La Vega, Jalisco	11047	x	x	x
AO08		Michoacán		x		
AO09		Michoacán		x	x	
AO21-22	Presa Rodrigo Gómez, Nuevo León		x			
AO23	Presa Rodrigo Gómez, Nuevo León		x			
AO27-28	<i>H. elongata</i>	Presa Cierro Prieto, Nuevo León	11087	x	x	x
AO42-44		Rio raíces, Nuevo León		x	x	
AO93-94		Emiliano Zapata, Chiapas		x		
GT02		Laguna Escondida, Veracruz	11089	x	x	x
GT10-12		La Vega, Jalisco		x	x	x
GT43-44		Tabasco	11089	x	x	x
GT92		Presa Cerro Prieto, Nuevo León		x		
AO07		Camecuaro, Michoacán		x		
AO32-34		Sombreretillo, Nuevo León		x	x	x
AO37-38		Rio San Juan, Nuevo León	11086	x		
AO102	<i>H. socimulsensis</i>	San José, Tabasco		x		
AO139, 155, 156 y 158		Llano Grande, Tabasco		x	x	x
AO159		Arcotete Chiapas		x		x
GT04		Laguna Escondida Veracruz	11133	x	x	x
GT84-87		Ejido Rosendo Salazar, Chiapas	11132			
GT37	<i>H. atli</i>	Parque Tezozomoc, CDMX		x	x	x

Cuadro 5. Organismos recolectados en Latinoamérica y los genes que fueron amplificados para cada taxón. Se incluyen los números de catálogo de la Colección Nacional de Helminfos (CNHE) de los ejemplares depositados.

Clave	Taxón	Localidad	CNHE	Genes		
				COX-1	NDI	ITS
GT19-21, GT45-46	<i>Helobdella ampullariae</i>	Parque Saavedra, Argentina	11049	x	x	x
GT22 y GT25		Parque Saavedra, Argentina		x	x	x
UR31, UR14, UR10, UR17 y UR22	<i>Helobdella brasiliensis</i>	Uruguay		x		
BG01		El Negro, La Plata, Argentina		x	x	x
BG02		Arroyo el Divisorio, Argentina		x		
GT26 y GT68		General la Valle, Argentina		X	x	x
GT28, GT30 y GT69	<i>Helobdella triserialis</i>	Matanzas, Cuba		x	x	x
GT31 y GT39	<i>Helobdella elongata</i>	Matanzas, Cuba		x	x	x
GT55-57	<i>Helobdella simplex</i>	Blagiardi, La Plata, Argentina		x	x	x
BG04		El Negro, La Plata, Argentina	10948	x	x	
UR34, UR39 y UR37		Uruguay				
GT58, GT62-64, GT82 y 83	<i>Helobdella adiaastola</i>	La Plata, Argentina	11046	x	x	x
GT59-61	<i>Helobdella triserialis</i> var. <i>lineata</i>	Cantera 2, La Plata, Argentina	10947	x	x	x
GT67	<i>Helobdella michaelsoni</i>	General la Valle Argentina		x	x	x
BG03	<i>Helobdella cordobensis</i>	El Negro, La Plata, Argentina		x		
BG06		Argentina		x	x	x
UR11, UR36 y UR40		Uruguay		x		
BG10	<i>Helobdella triserialis</i>	El Negro, Argentina		x	x	x

Resultados

El análisis de parsimonia resultó en 272 árboles más parsimoniosos con 6022 pasos cada uno. A partir de los 272 árboles se construyó un árbol de consenso estricto (Fig. 4). La mayoría de las relaciones se encontraron pobremente sustentadas, con valores de Bootstrap menores a 50% en algunos casos. El árbol de consenso obtenido del análisis de BI (Fig. 4) es en general congruente con el de P y en general muestra menos politomias.

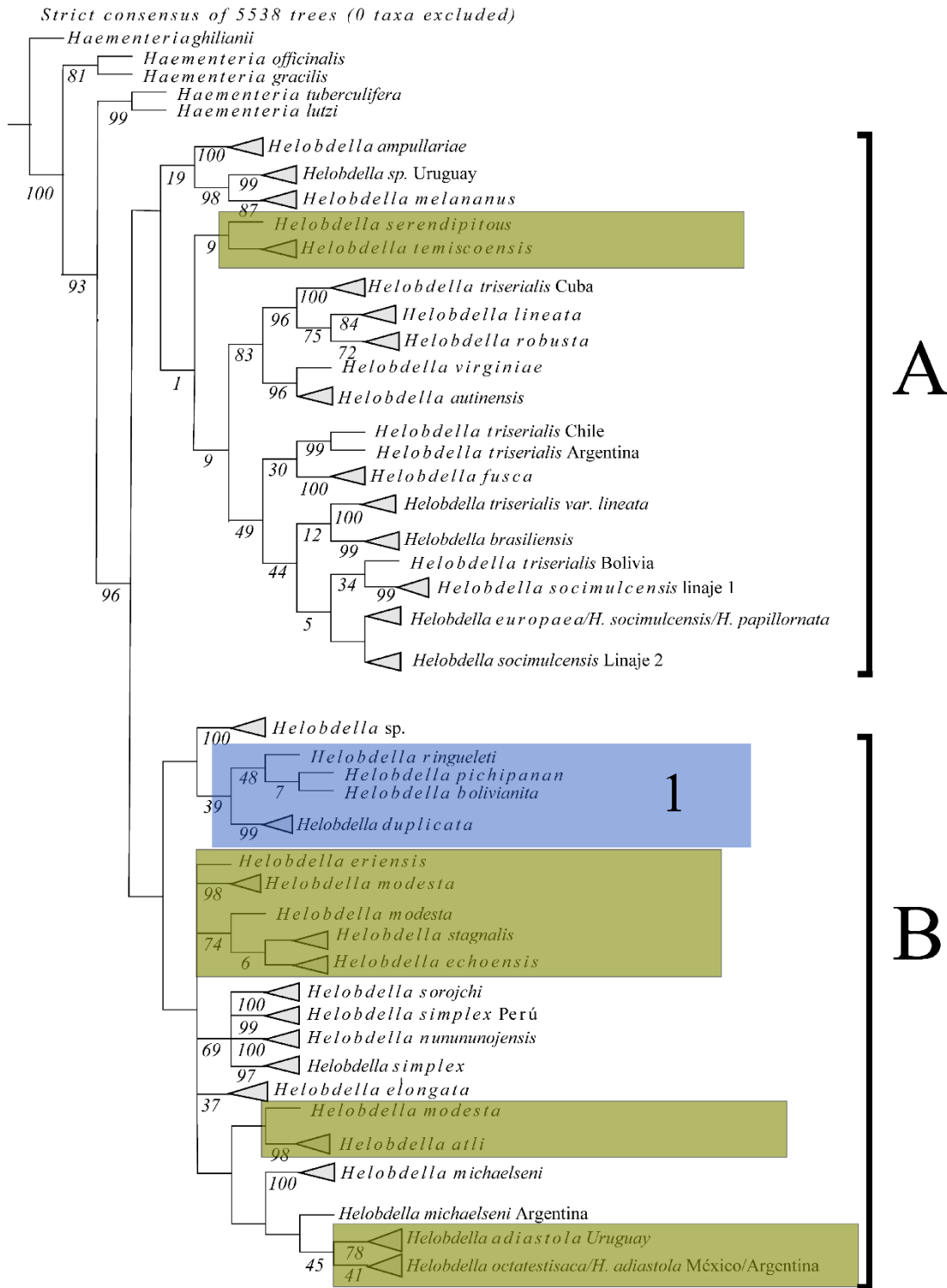


Figura 4. Reconstrucción filogenética con base en el criterio de Parsimonia (P). Se presenta el árbol de consenso estricto. El género *Helobdella* se divide en dos grupos de especies A y B. En el grupo B se encontró el clado 1 con especies con placa quitinoide dorsal monofilético (Azul) mientras que el clado 2 se recuperó como polifilético (verde).

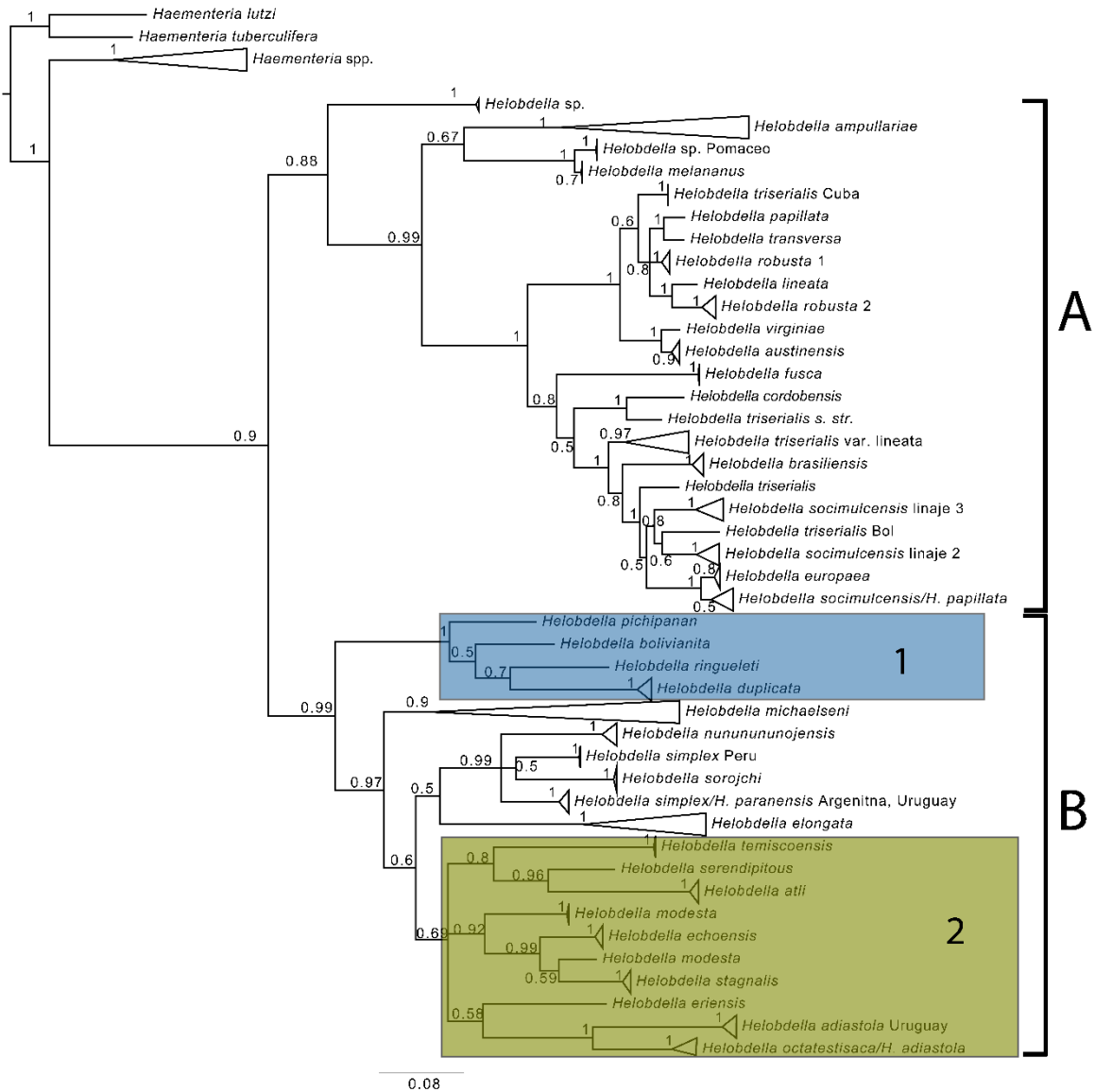


Figura 5. Reconstrucción filogenética de *Helobdella* bajo el criterio de inferencia Bayesiana (BI). Dentro del género se forman dos grupos de especies A y B. Algunas especies del grupo B presentan placa quitinoide dorsal y se agrupan en los clados 1 y 2 (azul y verde).

Independientemente del método filogenético empleado, se recupera al género *Helobdella* como monofilético con buen apoyo tanto en P como en BI con 93% y 0.9, respectivamente. El análisis de BI recupera dos grupos principales, denominados A y B (Fig. 5), con buenos soportes de nodo. El grupo A incluye a las especies de la serie *triserialis* más otras especies con un patrón metamérico de papilas dorsales y/o células pigmentadas dorsales. El grupo B incluye a las especies de la serie *stagnalis* más otras especies sin placa quitinoide dorsal. En ninguno de los casos, las series (*triserialis* y

stagnalis) forman grupos monofiléticos. El árbol de consenso estricto resultado del análisis de P, también recupera dos grandes grupos (A y B); sin embargo, no son idénticos. Además de algunos cambios menores en los grupos terminales, en P dos especies con placa quitinoide dorsal aparecen anidadas dentro del clado A (*H. serendepitous* Saglam, Kutschera, Saunders, Saidel, Katherine, Balombini & Shain 2018 y *H. temiscoensis* Salas-Montiel, Phillips, Pérez-Ponce De León, Ocegüera-Figueroa, 2014); no obstante esta relación está pobremente soportada (9%).

En el árbol de BI, las especies provistas con placa quitinoide dorsal aparecen formando dos grupos: El grupo 1 formado por *Helobdella bolivianita* Siddall, 2001, *H. ringueleti* Siddall, 2001 y *H. duplicata* (Moore, 1911), y el grupo 2 formado por *H. temiscoensis*, *H. serendepitous*, *H. atli* Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon, 2005, *H. modesta* (Verrill, 1872), *H. echoensis* Saglam et al. 2018, *H. stagnalis*, *H. eriensis* Saglam et al. 2018, *H. octatestisaca* Lai & Chen, 2009 y *H. adiaastola* Ringuelet, 1972. En los dos casos, muestras asignadas a *H. modesta* y *H. adiaastola* aparecen en dos grupos independientes. Adicionalmente, *Helobdella simplex* Moore, 1911, una especie del grupo B carente de placa quitinoide dorsal, también se divide en dos grupos, uno formado por las muestras de Perú y otro por las de Argentina/Uruguay.

Helobdella robusta del grupo A forma dos grupos, mientras que las muestras identificadas como *H. socimulcensis* y *H. triserialis* aparecen formando tres grupos. *H. triserialis* var. *lineata* constituye un clado independiente con alto valor de apoyo, cuyo grupo hermano es el clado que comprende a *H. brasiliensis* (Weber, 1915), *H. triserialis* de Argentina, *H. triserialis* de Bolivia, *H. socimulcensis* (*sensu stricto*, linaje 1 y linaje 2) y *H. europaea* Kutchera, 1985.

En cuanto a grupos monofiléticos con elevada diversidad genética que probablemente incluyan a más de una especie, se encuentran *H. elongata* así como el grupo formado por *H. adiaastola* (Uruguay) hermano del grupo *H. adiaastola/H. octatestisaca* (México y Argentina).

Discusión

Hasta la fecha, se han registrado 6 especies del género *Helobdella* en México, tres provistas de placa quitinoide dorsal: *H. atli* Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon, 2005, *H.*

temiscoensis y *H. octatestisaca* Lai et al., 2009 y tres sin dicha placa: *H. elongata* (Castle, 1900), *H. socimulcensis* (Caballero, 1931) y *Helobdella virginiae* Ocegüera-Figueroa, 2007. Todas estas especies fueron incluidas en la filogenia por primera vez. Es importante señalar que; los terminales identificados como *Helobdella socimulcensis* y *H. elongata* mostraron una alta diversidad genética (ANEXO 4) y probablemente representen más de una especie, lo que necesariamente requiere una revisión morfológica mas profunda en la que se evalúe la variación morfológica y su posible relación con la variación molecular.

Individuos identificados como *H. adiaistola* de Argentina y *H. octatestisaca* de Taiwan y México (Figs. 4 y 5), conforman un clado con alto valor de apoyo. Dada la baja diversidad genética entre los ejemplares provenientes de Taiwan y Argentina, con seguridad el origen de la población de Taiwan se localiza en dicho país sudamericano. Las poblaciones distribuidas en México se agrupan independientemente de las muestras de Argentina + Taiwan; sin embargo, presentan bajas distancias genéticas entre estas, además que un individuo recolectado muy al norte del continente americano, en Texas, EUA (Richardson et al., 2017), se anidó con las muestras de Argentina (Anexo 4). Considerando la amplia distribución geográfica, así como la baja diversidad genética entre las muestras, se sugiere que se trata de una sola especie ampliamente distribuida (América y Asia). Por prioridad nomenclatural, todos los taxones de este grupo deben llevar el nombre de *Helobdella adiaistola* Ringuelet, 1972 y se propone que el nombre *H. octatestisaca* como sinónimo. Claramente, la amplia distribución geográfica de esta especie se debe a eventos de dispersión antropogénica, y muy probablemente las sanguijuelas han sido dispersadas junto a los caracoles del género *Pomacea* en el continente Asiático, al cual se encuentran asociadas especies de *Helobdella* (p. ej. *H. europaea* en Lai et al., 2009). Este aspecto se aborda con mayor profundidad en el Capítulo III.

Respecto a los caracteres morfológicos que reportaron Lai et al. (2009) que diferencian a *H. octatestisaca* de sus congeneres, se encuentra la presencia de 4 pares de testisacos; sin embargo, en los ejemplares de Argentina claramente se distinguen 6 pares. Por esta razón, en el Capítulo II se presenta una caracterización morfológica que incluye los ejemplares recolectados en México y Argentina, para establecer con mayor precisión los rasgos morfológicos que distinguen a esta especie.

Durante el siglo pasado, los nombres *H. fusca*, *H. lineata* y *H. triserialis* se utilizaron indistintamente para referirse a las formas de una especie con múltiples líneas longitudinales dorsales de pigmentación marrón o negras, además de papilas dorsales arregladas metaméricamente y con una distribución aparentemente, en todo el continente Americano. Siddall y Borda (2003) establecieron con evidencia genética y morfológica que *H. lineata* y *H. fusca* son especies válidas distribuidas exclusivamente en Norteamérica, mientras que *H. triserialis* solo se encuentra en América del sur. Entre las variedades de *H. triserialis* que reconoció Ringuelet (1945) se encuentra *Helobdella triserialis lineata*, una subespecie distribuida a lo largo del continente Americano. Siddall y Buddnoff (2005) consideraron que, en general, los caracteres morfológicos de *Helobdella europea* coinciden con los de la subespecie de Ringuelet, sin embargo, en la inferencia filogenética presentada en este trabajo puede distinguirse que los ejemplares identificados como *H. triserialis var lineata* de Argentina y Uruguay están más cercanamente relacionados con *H. brasiliensis* que con *H. europea*, cuyo grupo hermano es *H. socimulcensis*. Esto sugiere que las formas sudamericanas representan una especie independiente sin nombre formal.

A partir de la filogenia que se presenta en este trabajo, logramos incrementar sustancialmente nuestro conocimiento sobre las relaciones que guardan las especies del género *Helobdella* y proponemos un cambio nomenclatural, con la sinonimia entre *H. adiastrata* y *H. octatestisaca* y la evidencia de al menos 10 linajes que potencialmente representan especies nuevas derivadas de especies previamente descritas: 1) *H. socimulcensis* linaje 1, 2) *H. socmulcensis*. linaje 2, 3) *H. elongata* linaje 1, 4) *H. elongata* linaje 2, 5) *H. adiastrata* de Uruguay, 6) *H. triserialis* de Bolivia, 7) *H. triserialis* de Cuba, 8) *H. triserialis* de El Negro, Argentina, 9) *H. triserialis var. lineata* y *H. simplex* de Perú; por lo que concluimos que la riqueza de especies puede ser incluso mayor a la contemplada.

Con este trabajo el número de especies incluidas en la filogenia de *Helobdella* es de 35 con lo que se robustecen sustancialmente las hipótesis filogenéticas del grupo en relación a la filogenia previa (Siddall & Borda, 2003) al aumentar a poco más del doble las especies representadas. Adicionalmente, se contempla por primera vez información genética de origen nuclear para estudiar las relaciones filogenéticas dentro de este género, con la inclusión de la región ITS para algunas de las terminales provenientes de México, Cuba y Argentina.

CAPÍTULO II

DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO HELOBDELLA DE MÉXICO

Introducción

Desde el año 2004 a la fecha se han descrito 14 especies del género *Helobdella*, la mayoría del continente americano. Esta cantidad de nuevas especies claramente excede a las descritas para otros géneros de sanguijuelas, lo cual sugiere que la riqueza de especies podría ser mayor a la catalogada hasta ahora (Oceguera-Figueroa & León-Regagnon., 2005; Gullo, 2006; Oceguera-Figueroa, 2007; Lai et al., 2009, Gullo, 2009, Moser, 2013, Beresic-Perrins, 2013, Kutschera, et al., 2013, Salas-Montiel, 2014, Iwama et al. 2016; Iwama, et al., 2017).

En el Capítulo I se analizaron secuencias de DNA de ejemplares de *H. adiaistola* recolectadas en Argentina y provistas con placa quitinoide dorsal, lo cual nos permitió determinar que esta especie ha sido introducida a Taiwan, Mexico y EUA en donde ha sido reconocida con un nombre distinto (*H. octatestisaca*). Además, se identificó que *H. elongata* forma un linaje independiente de *H. elongata* de EUA lo cual sugiere constituyen dos especies. Finalmente, individuos asignados a *Helobdella socimulcensis* (anteriormente considerada *H. triserialis* var. *lineata*) se separaron en 3 linajes.

En el presente capítulo se presenta la caracterización morfológica de *H. adiaistola*, *H. elongata* y dos linajes de *H. socimulcensis* de México. Con esta información se busca establecer el número de especies que se distribuyen en México.

Objetivo

Caracterizar la morfología interna y externa de especímenes mexicanos del género *Helobdella*, asignados preliminarmente a *H. adiaistola*, *H. elongata* y *H. triserialis*.

Materiales y Métodos

Los ejemplares estudiados en este capítulo fueron procesados para su estudio morfológico de acuerdo a lo señalado en la sección Metodología General. Adicionalmente, un ejemplar de *H. socimulcensis* de un linaje independiente (linaje 2) fue procesado para su observación a través de microscopía electrónica de barrido. Para el caso de *H. socimulcensis* s.s. (linaje 3) se revisaron ejemplares de estudios previos depositados en la CNHE recolectados en la localidad tipo (Xochimilco, CdMx) y del Estado de Hidalgo. De manera

similar, para el caso de *H. elongata* y *H. adiastrata*, se revisaron los ejemplares disponibles en la misma colección. Los números de catálogo así como los sitios de recolecta se presentan en el Cuadro 6. De *H. socimulcensis* linaje 1 distribuido en Chiapas y Tabasco (Capítulo I, Figs. 4 y 5) y para el linaje 2 de *H. elongata* distribuido en Nuevo León (Anexo 3, Fig. I), no se cuenta con material biológico en buen estado para su análisis morfológico, por lo que no se pueden realizar las descripciones actualmente.

Cuadro 6. Ejemplares de *H. elongata*, *H. octatestisaca* y *H. socimulcensis* depositados en la CNHE que fueron analizados morfológicamente.

CNHE	Ejemplares	Taxón	Localidad	Hábitat
1682	6	<i>Helobdella elongata</i>	Rio de Oaxtepec, Morelos	Bajo piedras
1682	1	<i>Helobdella octatestisaca</i>	Rio de Oaxtepec, Morelos	Bajo piedras
4704	2	<i>Helobdella socimulcensis</i>	Lago de Tecocomulco, Hidalgo	Raíces de lirio acuático
4705	1	<i>Helobdella socimulcensis</i>	Embarcadero de Cuemanco, Xochimilco, CDMX	Raíces de lirio acuático
5566	2	<i>Helobdella socimulcensis</i>	Pista de canotaje, Xochimilco, CDMX	-

Resultados

Se presenta la descripción morfológica de ejemplares de *H. adiastrata*, de *H. elongata* linaje 1 y de *H. socimulcensis* linaje 2 y 3.

Helobdella adiastrata Ringuelet, 1972 (= *Helobdella octatestisaca* Lai & Chang, 2009) (Figs. 6 – 8).

Descripción con base en 10 ejemplares recolectados en el Ejido Rosendo Salazar, Chiapas; Rio de Oaxtepec, Morelos; La Vega, Jalisco y Laguna Escondida, Veracruz. Los ejemplares de Chiapas se encontraron sobre la concha de bivalvos de la especie *Curbicula flumine* y el resto adheridos a rocas sumergidas.

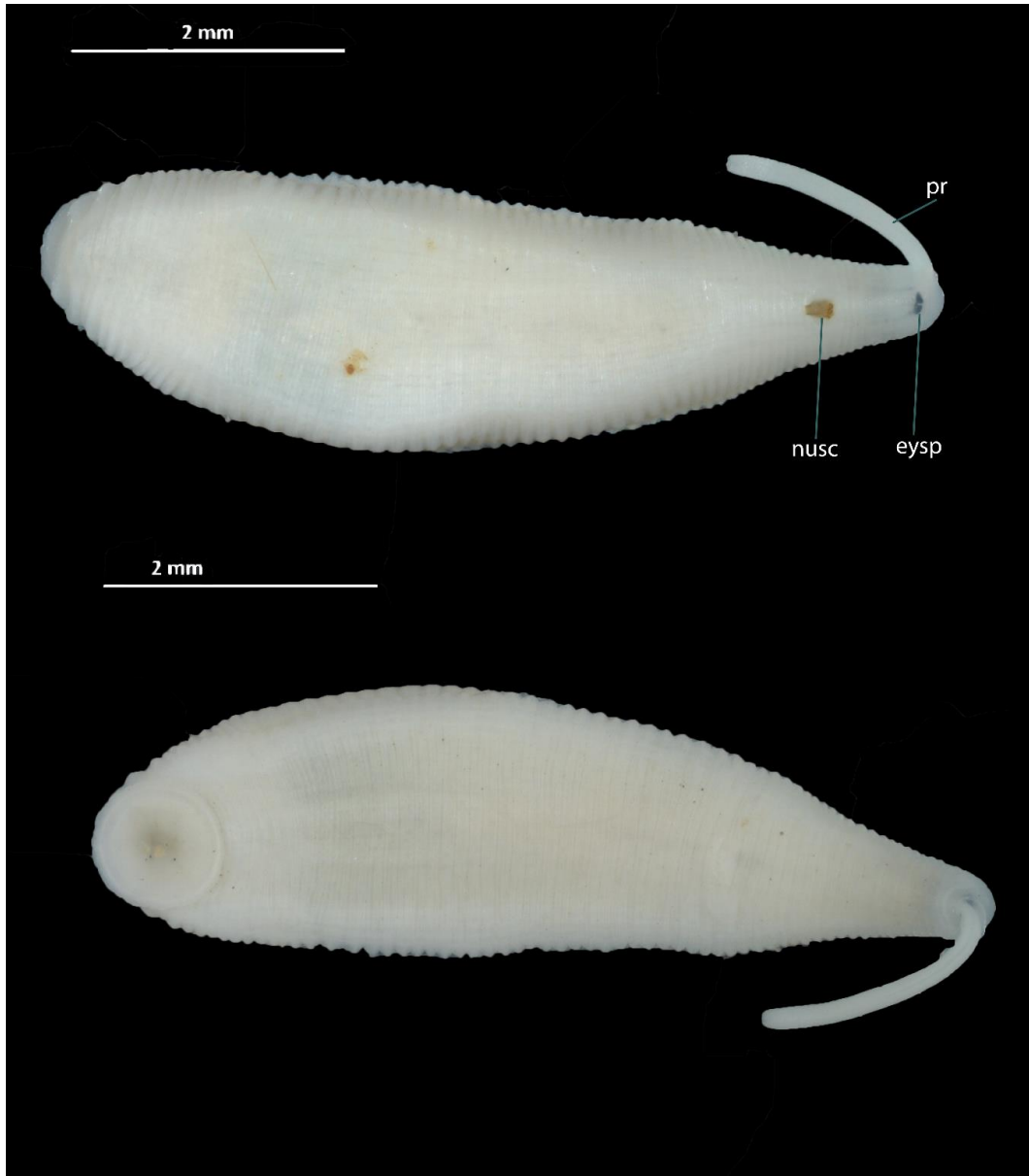


Figura 4. Vista dorsal y ventral de *Helobdella adiaistola* recolectada en Laguna escondida, Veracruz. pr= proboscis; eysp= manchas oculares; nusc= placa quitinoide dorsal.

Morfología externa. Esta especie presenta el cuerpo lanceolado, la superficie dorsal y ventral sin papilas, y carece de un patrón metamérico de pigmentación (Fig. 6). El tamaño del cuerpo en las preparaciones permanentes varía de 5.7 a 10 mm; el escudo nuchal abarca dos anillos (13 y 14), correspondientes al somito VIII a1 y a2, tiene forma de valva y varía de redondeada a ligeramente angular (Fig. 7A, B y C). Un par de manchas oculares situadas entre III y IV a1 ó sólo en IV a1; cada mancha ocular con forma más o menos ovalada o triangular, casi tocándose una con otra (0.0091 mm entre estas) (Fig. 7D). Los somitos I y II están fusionados; el poro bucal es de forma más o menos triangular y se ubica entre I+II y

III a1; la ventosa posterior es subterminal; de la región anterior a la posterior se pueden observar un total de 68 anillos.

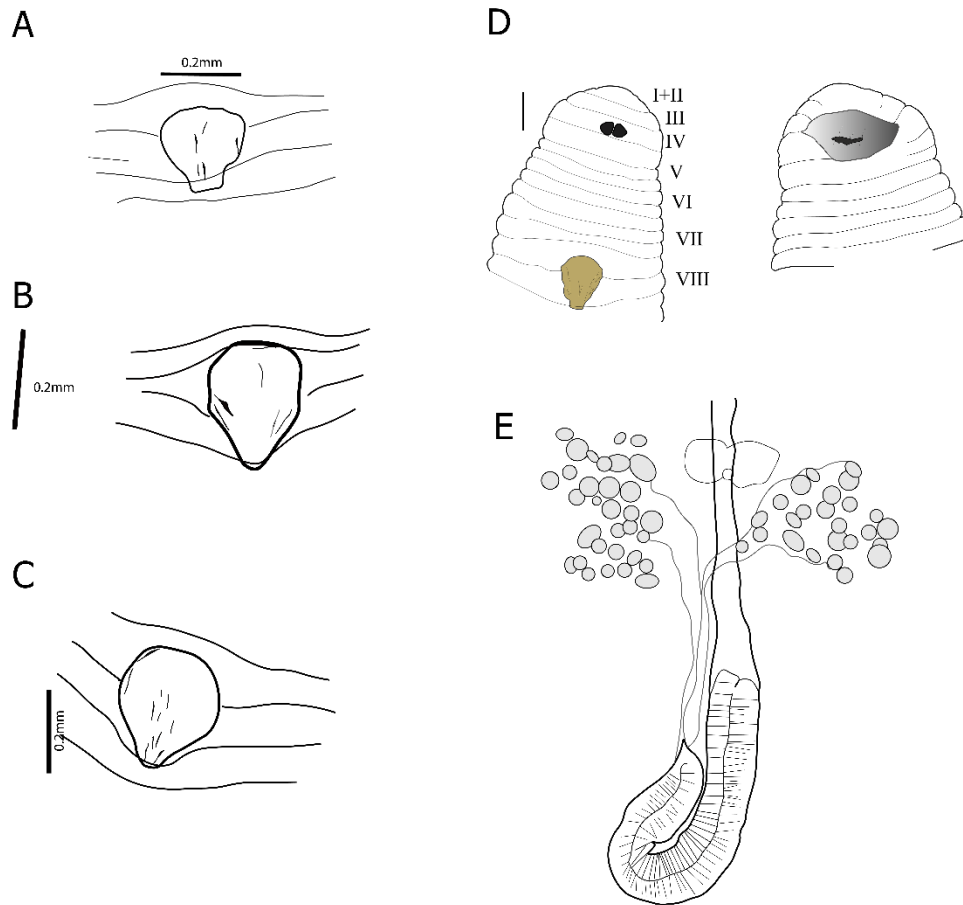


Figura 5. *Helobdella adiaastola*. A), B) y C) Detalle de la placa quitinoide dorsal. D) Detalle de la region anterior del cuerpo C) morfología de la proboscis observada en algunos ejemplares. mo= boca; eysp= manchas oculares; sg= glandulas salivales y pr= proboscis

Morfología interna. La proboscis es recta, abarca de 11 a 15 anillos y mide en promedio 1.5 mm. En un par de ejemplares la proboscis presentó una terminación en forma de cayado (Fig. 7 E). El buche presenta seis ciegos digitiformes, los primeros dos pares no muy bien desarrollados; los testisacos pueden aparecer en cinco o seis pares, a diferencia de lo señalado por Lai et al., (2009), quienes establecieron el número en 4. El último par de ciegos del buche forman postciegos, que descenden hasta el cuarto par de ciegos intestinales (Fig. 8).

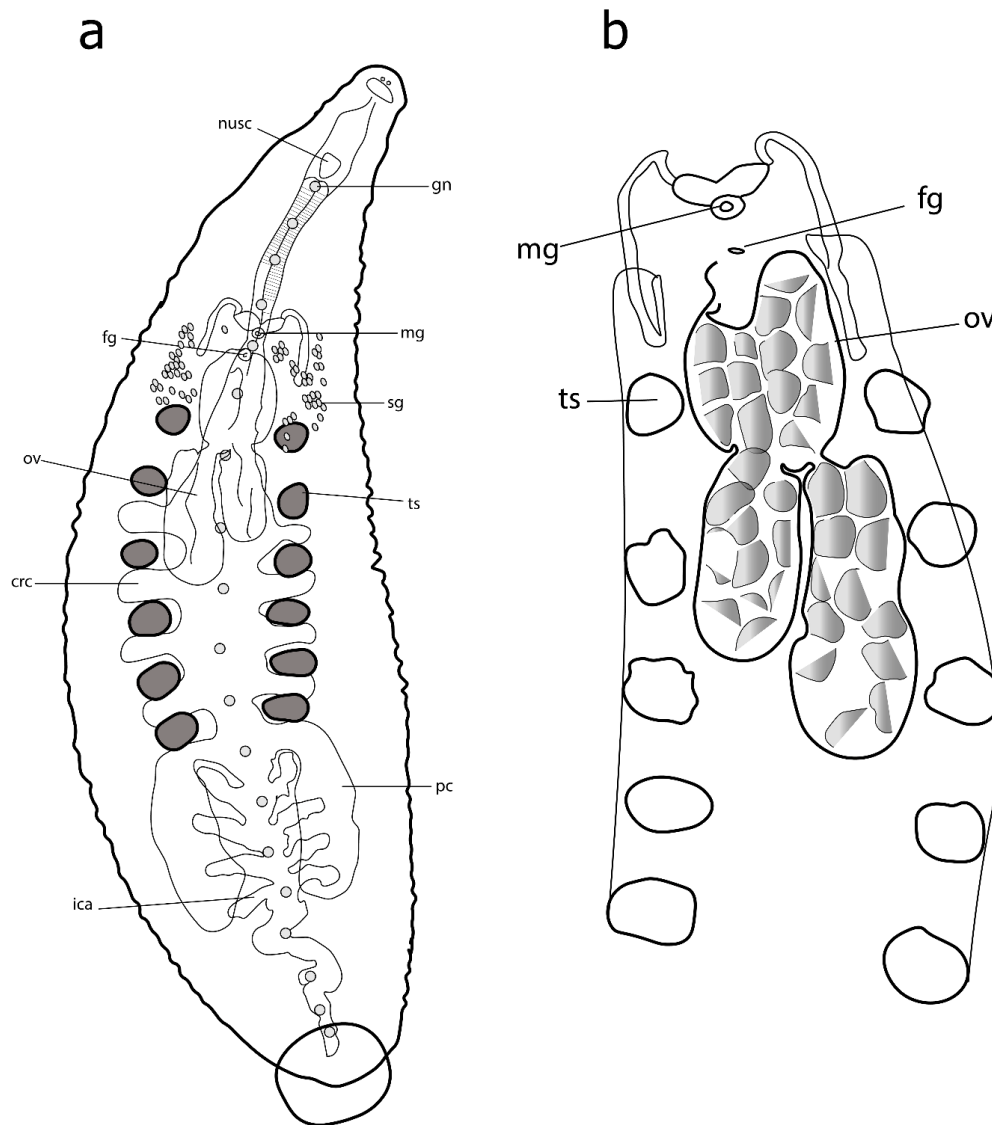


Figura 6. *Helobdella adiastrata*. a) Morfología interna a partir de un ejemplar colectado en Veracruz. b) detalle del sistema reproductivo. nusc= Escudo nuchal; gn= ganglio nervioso; mg= gonoporo masculino; fg= gonoporo femenino; sg= glándulas salivales; ov= ovisacos; ts= testisacos; crc= ciegos del buche; pc= postciegos; ica= ciegos intestinales.

Diagnosis diferencial. *Helobdella adiastrata* es similar a *H. stagnalis* de Europa, *H. temiscoensis*, *H. modesta*, *H. eriensis*, *H. echoensis* y *H. serendepitous* de Norteamérica por poseer una placa quitinoide dorsal, carecer tanto de órganos metaméricos así como de pigmentos en el dorso. Los caracteres que la diferencian a *H. adiastrata* de éstas son los siguientes: 68 anillos en total en *H. adiastrata* mientras que son 67 en *H. stagnalis*, *H. eriensis* y *H. modesta* y 66 en *H. serendepitous* y *H. echoensis* (Saglam et al., 2018); escudo nuchal en el anillo 13 en *H. adiastrata* y en el anillo 12 en *H. modesta*, *H. eriensis*, *H. echoensis* y *H. serendepitous* (Saglam et al., 2018). Manchas oculares ovaladas o

triangulares muy cercanas entre si en *H. adiastrala* y, por el contrario manchas oculares punctiformes y bien separadas en *H. temiscoensis* (Salas-Montiel et al., 2014). Además, los postciegos con trayecto posterior sobrepasan el cuarto par de ciegos intestinales en *H. adiastrala* mientras que en *H. temiscoensis* no llegan al tercer par en (Salas-Montiel et al., 2014).

Helobdella elongata Castle, 1900

Linaje 1 (Figs. 9 y 10)

La siguiente diagnosis se realizó con base en 13 ejemplares recolectados en Rio de Oaxtepec, Morelos, La Vega, Jalisco, Teapa, Tabasco y Laguna Escondida, Veracruz. Los ejemplares se encontraron adheridos a rocas sumergidas.

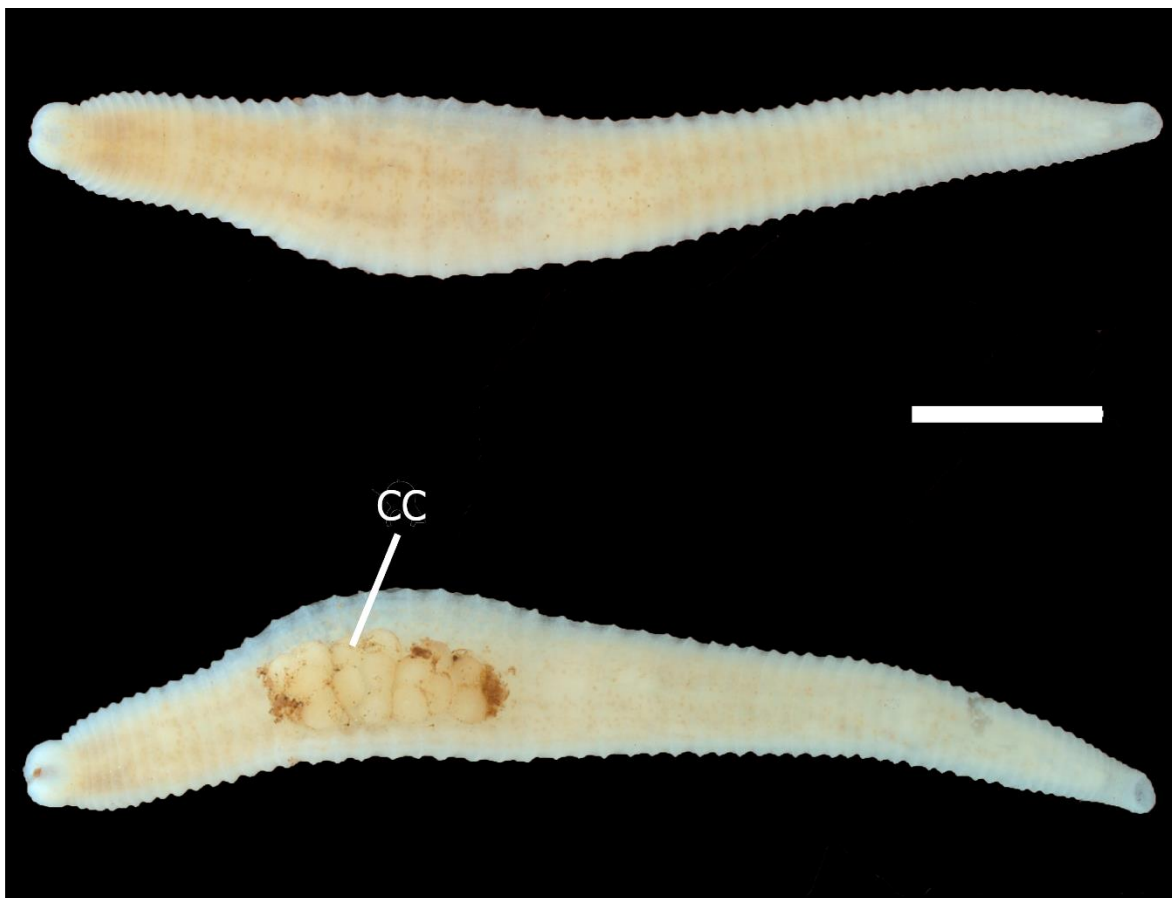


Figura 7. *Helobdella elongata* linaje 1 de México. Vista dorsal y vista ventral. CC=ootecas. Escala: 2 mm.

Morfología externa. Cuerpo alargado y semi-cilíndrico en corte transversal, miden de 11 a 15 mm de largo en las preparaciones. Carece de órganos metaméricos en la superficie dorsal y ventral, el color del cuerpo es amarillo o blanquecino (Fig. 9). Las manchas oculares en un ejemplar de Morelos se ubican en el somito IV; sin embargo, éstas no fueron observadas en ninguno de los ejemplares colectados en Veracruz y Jalisco. La boca se localiza en el centro de la ventosa anterior. La ventosa posterior es terminal y caliciforme. Los anillos de los somitos centrales presentan una subdivisión secundaria o un surco transversal. Desde la region anterior a la posterior se pueden observar un total de 66 anillos.

Morfología interna. Glándulas salivales difusas en el parénquima, distribuidas del somito XII al XIII, en algunos casos hasta el XIV. La proboscis es recta y abarca de 5 a 11 anillos. Cuenta con un buche en forma de tubo desprovisto de ciegos laterales; sin embargo, en algunos ejemplares se aprecian ensanchamientos con forma globosa en el buche, que corresponden en posición a cada ganglio nervioso. Presenta un par de postciegos que descienden hasta antes del segundo par de ciegos intestinales o del somito XIX a XXI y en algunos casos rebasan el tercer par. Presenta seis pares de testisacos.

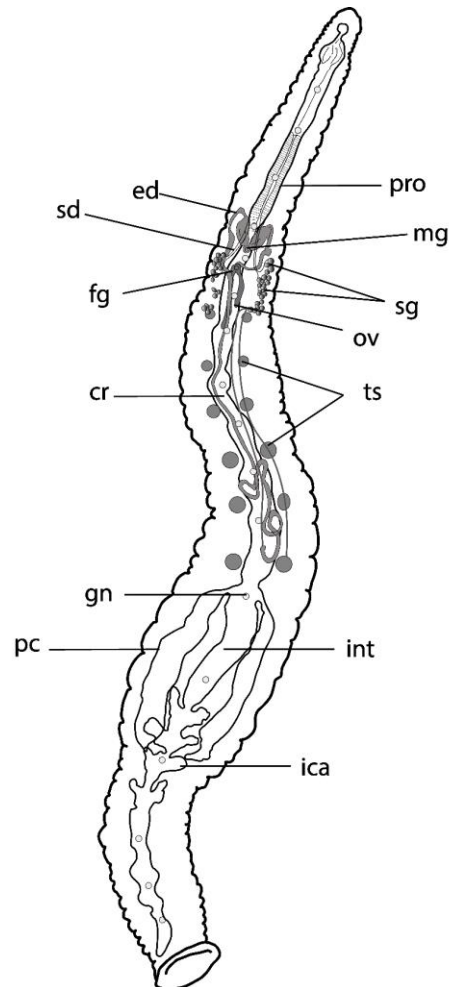


Figura 8. *Helobdella elongata* de México del linaje 1. Morfología interna de un individuo recolectado en Laguna Escondida, Veracruz. pro= proboscis; sd= ducto salival; mg= gonoporo masculino; fg= gonoporo femenino; sg= glándulas salivales; ov= ovisacos; ts= testisacos; cr= buche; gn= ganglio nervioso; int= intestino; pc= postciegos; ica= ciegos intestinales.

Diagnosis diferencial. *Helobdella elongata* linaje 1 de México puede distinguirse de las otras 8 especies con forma corporal alargada y que carecen de ciegos en el buche, debido a que *Helobdella elongata* linaje 1 cuenta con un par de postciegos que están ausentes en *Helobdella michaleseni*, *Helobdella obscura* y en *Helobdella fantasmae* (Ringuelet, 1985 y

Gullo, 2009); asimismo, los postciegos de *H. elongata* linaje 1 alcanzan el segundo par de ciegos intestinales hasta el somito XXI mientras que en *Helobdella similis* sólo alcanzan el primer par de ciegos intestinales en el somito XIX (Ringuelet, 1985). El color corporal de *Helobdella elongata* linaje 1 es blanco o amarillo, *H. fantasmae* presenta líneas marrón; *Helobdella wodzickiorum* está manchado irregularmente de color marrón oscuro; *H. nununununojensis* tiene arreglos longitudinales de cromatóforos marrón o grises (Siddall & Borda, 2004; Siddall, 2001). Las glándulas salivales de *H. elongata* linaje 1 están dispuestas de forma dispersa en el parénquima mientras que aparecen de forma compacta en *Helobdella longicolis* y *H. nununununojensis* (Ringuelet, 1985; Siddall, 2001). Finalmente, los anillos de *H. elongata* linaje 1 presentan una subdivisión o un surco medio transversal que está ausente en *H. obscura*, *H. similis*, *H. wodzickiorum* y *H. fantasmae* (Ringuelet, 1985; Siddall & Borda, 2004).

Morfológicamente los organismos colectados en México pertenecientes a *H. elongata* linaje 1 no son completamente congruentes con los descritos para *H. elongata s. s.* de EUA, ya que en la descripción de Castle (1900) los postciegos se originan en el somito XIX y llegan hasta XX, dando lugar a un recorrido más corto que en las formas analizadas de México los cuales alcanzan el somito XXI. Adicionalmente, la mayoría de los ejemplares colectados en nuestro país no presentan manchas oculares, las cuales si se describieron para *H. elongata s. s.* Aunado a la diferenciación morfológica, se ha detectado una alta divergencia genética entre las formas de México respecto a la forma de EUA, por lo que el linaje 1 de *H. elongata* caracterizado en este trabajo posiblemente representa una especie nueva que requiere una descripción formal.

Helobdella socimulcensis sensu stricto (Caballero, 1931)

(Figs. 11 – 13)

La siguiente diagnosis se realizó a partir de 5 ejemplares colectados en la localidad tipo de esta especie (Xochimilco, CdMx) así como con base en material recolectado en el Lago de Tecocomulco ubicado en el Estado de Hidalgo. Las sanguijuelas fueron recolectadas debajo de piedras y entre las raíces de plantas acuáticas.



Figura 9. Vista dorsal y ventral de *Helobdella socimulcensis* colectada en Xochimilco. Escala: 2 mm.

Morfología externa. Los ejemplares miden 6 – 10 mm de largo en las preparaciones. Las manchas oculares se localizan en el anillo 4 correspondiente al somito IV; los primeros 3 somitos son uni-anillados. En a superficie dorsal se encuentran líneas longitudinales color marrón claro o verdusco y manchas metaméricas de color crema dispuestas de manera

regular en hileras longituinales. Exhibe 14 líneas de células de pigmento marrón en cada flanco del dorso, 28 en total (Fig. 12c). Las series de líneas se originan en la región de las manchas oculares y corren hasta el ano, algunas de ellas se llegan a fusionar dando la apariencia de una sola línea gruesa (Fig. 11). El par de líneas medias se originan cada una, en una mancha ocular; conforme van recorriendo el dorso se aproximan la una a la otra, en cada anillo nervioso o a2; el color de estas se va atenuando conforme llegan al extremo posterior. Los siguientes 6 anillos posteriores al anillo ocular, llevan ininterrumpidamente manchas color crema de forma más o menos cuadrada o circular, paralelas a las líneas paramediales; en lo subsecuente dichas manchas aparecen en cada anillo a2 (Fig. 11). Cuerpo entero formado por 64 anillos; en algunos anillos se distingue una subdivisión secundaria ó un surco medio transversal. Presentan tres hileras de papilas, una media y dos laterales. Las hileras longitudinales adicionales, de encontrarse, son incompletas (Fig. 12d); la hilera central de papilas se origina en la región clitelar; en los ejemplares observados las papilas estaban ligeramente pigmentadas de negro. La boca se ubica en el margen anterior de la ventosa (Fig. 12b).

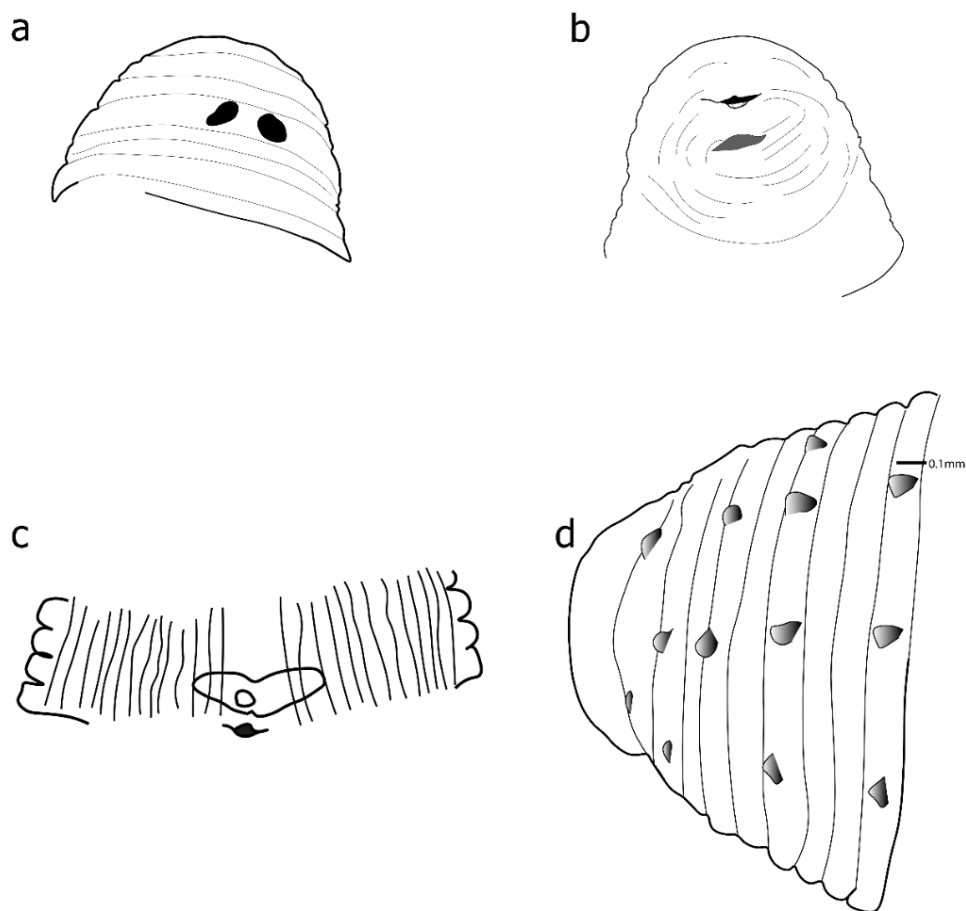


Figura 10. *Helobdella socimulcensis* sensu stricto. Detalle de la región anterior a) dorsal y b) ventral. c) Líneas de células de pigmento observadas en las tinciones, a la altura del somito XI y XII. d) hileras de papilas observadas en la región posterior

Morfología interna. La proboscis es recta, abarca 14 anillos (somitos VIII al XII) y mide en promedio 3.65 mm. El esófago abarca los tres anillos del somito XIV. Buche con 5 pares de ciegos; los primeros cuatro digitiformes, cada uno aumentando ligeramente de tamaño en sentido antero-posterior; el último par se proyecta hacia el extremo posterior del cuerpo (postciegos) de manera sinuosa, rebasando el último par de ciegos intestinales. Cuenta con 5 pares de testisacos que se presentan intersomitos.

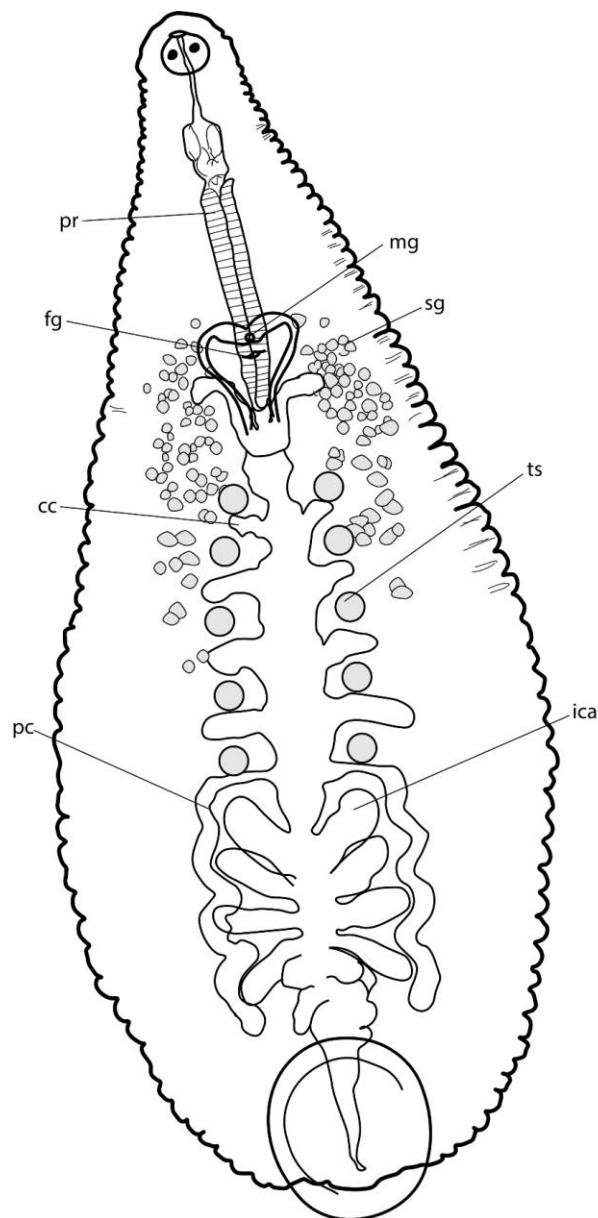


Figura 11. *Helobdella socimulcensis sensu stricto*. Morfología interna de un individuo colectado en Hidalgo. pr= proboscis; mg= gonoporo masculino; fg= gonoporo femenino; sg= glándulas salivales; ts= testisacos; cc= ciegos del buche; pc= postciegos; ica= ciegos intestinales.

Diagnósis diferencial. *Helobdella socimulcensis s. s.* forma parte del complejo *triserialis*, dicho complejo incluye a las especies: *H. fusca*, *H. lineata*, *H. papillata* *H. robusta*, *H. austinensis* Kutschera, Langguth, Kuo, Weisblat & Shankland 2013 de Norteamérica; *H. brasiliensis*, *H. cordobensis*, *H. striata* y *H. triserialis* con 4 variedades (*bituberculata*, *hemilineata*, *lineata*, *nigricans* y *unilineata*) de Sudamérica y *H. europaea* de Europa; este conjunto constituyen también el clado “A” en la filogenia presentada en el Capítulo 1, Figs. 4 y 5.

Los caracteres morfológicos que definen a *H. socimulcensis* de acuerdo con la descripción de Caballero (1931) son: una faja media dorsal verde oscuro que se va atenuando hacia la región posterior, papilas en tres hileras, una media y dos laterales; manchas circulares constituidas por cromatóforos blancos, dispuestas en el espacio que dejan las papilas; cinco pares de ciegos en el buche, el último con recorrido descendente y finalmente cinco pares de testisacos. Sin embargo, estos caracteres no son suficientes para diferenciarla de las formas previamente mencionadas.

Las siguientes características observadas en el presente trabajo permiten distinguirla de los otros miembros del complejo “*triserialis*”: *H. socimulcensis* presenta los anillos con una subdivisión secundaria en mientras que estos son completos en *H. triserialis* y sus variedades *H. brasiliensis* y *H. striata* (Ringuelet, 1985); hay 28 líneas longitudinales en el dorso de *H. socimulcensis* y solo 12 -14 líneas en *H. lineata* (Siddall & Borda, 2003). Existen 5 pares de testisacos en *H. socimulcensis* mientras que 6 pares en *H. austinensis*, *H. brasiliensis*, *H. cordobensis*, *H. striata* y en *H. triserialis* y sus variedades (Kutschera, et al., 2013; Ringuelet, 1985); manchas blancas en cada anillo a2 en los somitos completos en *H. socimulcensis* y manchas en todos los anillos en *H. robusta* (Kutschera, et al., 2013); al menos tres hileras de papilas dorsales en *H. socimulcensis* mientras que estas están ausentes en *H. fusca* y en *H. cordobensis* (Siddall & Borda, 2003; Ringuelet, 1985); en *H. socimulcensis* el ducto espermático carece de vesícula la cual está presente en *H. striata* (Ringuelet, 1985) y finalmente, *H. socimulcensis* presenta pigmento marrón en el dorso mientras que en *H. papillata* los pigmentos están completamente ausentes (Siddall & Borda, 2003).

Helobdella socimulcensis Linaje 2

(Figs. 14 – 16)

La siguiente diagnosis se realizó con base en 10 ejemplares recolectados en Ejido Rosendo Salazar, Chiapas, Laguna Escondida, Veracruz y Teapa, Tabasco. Los individuos de Chiapas se encontraron asociados a moluscos de la familia Planorbidae, los restantes se encontraron adheridos a rocas sumergidas.

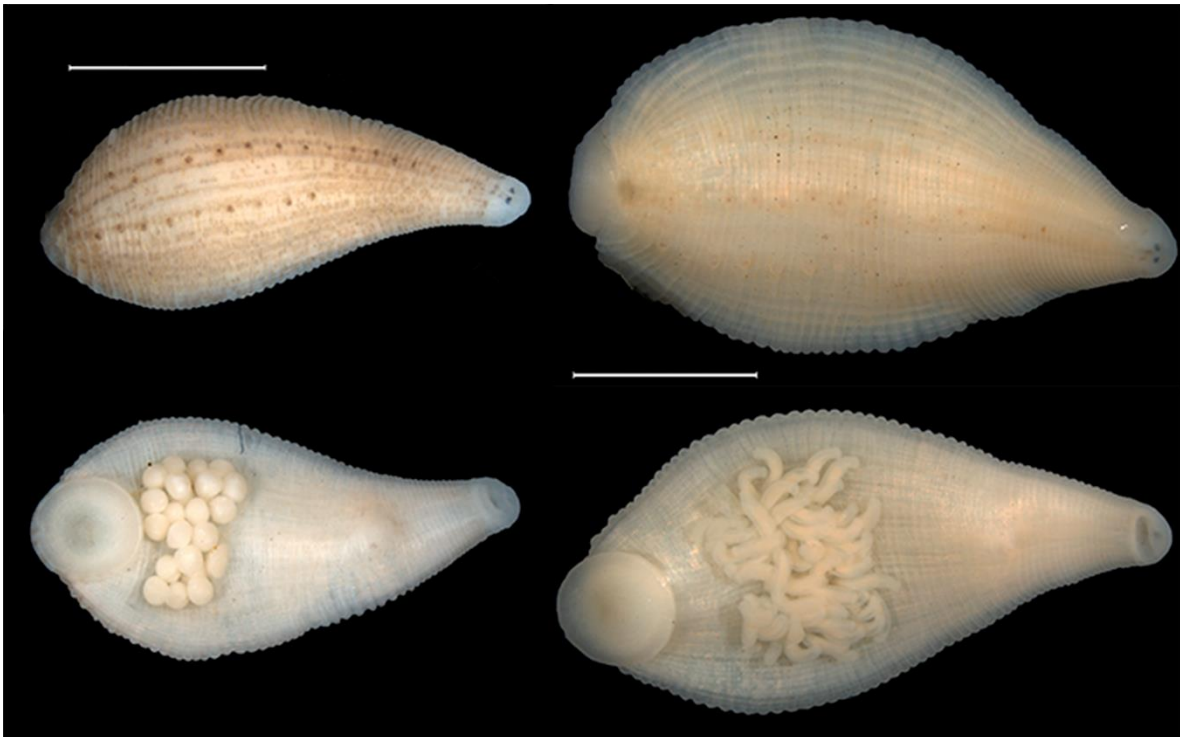


Figura 12. *Helobdella socimulcensis* linaje 2 vista dorsal y ventral de dos individuos representando dos morfotipos, colectados en el Ejido Rosendo Salazar, Chiapas. Escala: 2 mm.

Morfología externa. El tamaño del cuerpo en las preparaciones varía de 5 a 9 mm. Las manchas oculares se encuentran en el anillo 4 correspondiente al somito IV; tienen forma de coma o semiovalada. El color del dorso del cuerpo es café con el fondo crema, dado por la presencia de líneas longitudinales y un patrón metamérico de cromatoforos, arreglados de manera mas o menos regular. Algunos individuos, principalmente los de mayor tamaño, la coloración marrón del dorso se pierde (Fig. 14), además presentan papilas metaméricas mucho más desarrolladas (Fig. 16a). Las líneas longitudinales de pigmento marrón que presenta los individuos de este linaje, son de 18 a 20 en cada flanco, es decir, alrededor de 40 líneas dorsales; dos de éstas son paralelas a la hilera central de papilas

(medianas), las cuales no llegan a juntarse en la región posterior y tienen una tonalidad constante en el dorso. Las líneas dorsales se originan en los siguientes dos anillos posteriores al anillo ocular (excepto las líneas mediales) y descienden hasta el ano. Los anillos pre-oculares son de color blanco intenso. Únicamente a través de la tinción, fue posible constatar la presencia y el mismo número de líneas de pigmento dorsales en los ejemplares carentes de coloración dorsal. Las 3 hileras de papilas se encuentran teñidas de marrón oscuro o negro en la punta, a veces aparecen hileras adicionales pero incompletas. En el penúltimo anillo, existen dos papilas en cada extremo del ano muy pronunciadas (Fig. 16a). Ventralmente, la apertura bucal se localiza entre el anillo 2 y el 3 y existe un anillo entre ésta y las manchas oculares. La región genital exhibe un ensanchamiento muy marcado, particularmente en el anillo donde se ubica el gonoporo masculino (Fig. 14). Se observan un total de 68 anillos en todo el cuerpo. Los anillos presentan abundantes papilas diminutas, siendo más evidentes en los márgenes del cuerpo (Fig. 16c).

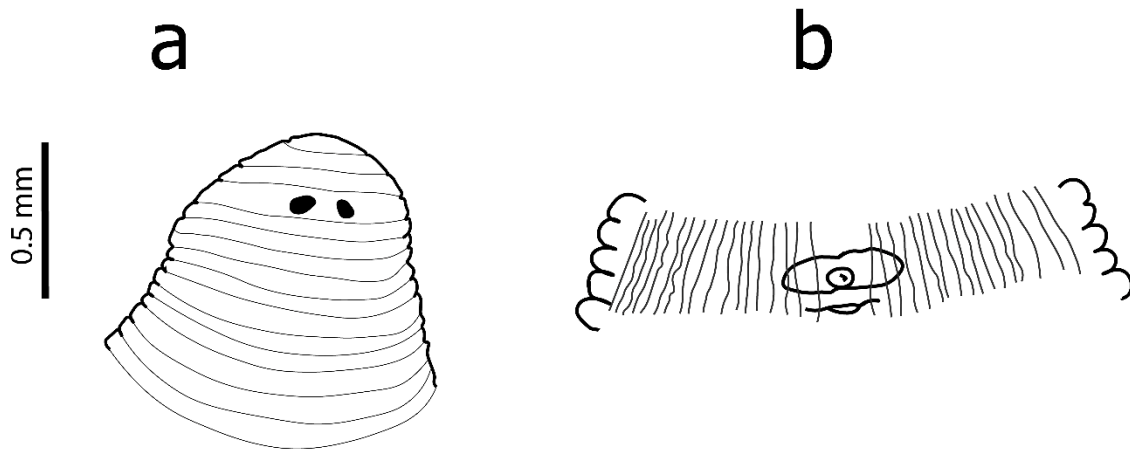


Figura 13. *Helobdella socimulcensis* linaje 2. a) Detalle de la región anterior dorsal y b) Líneas de células de pigmento observadas en las tinciones, a la altura del somito XI y XII.

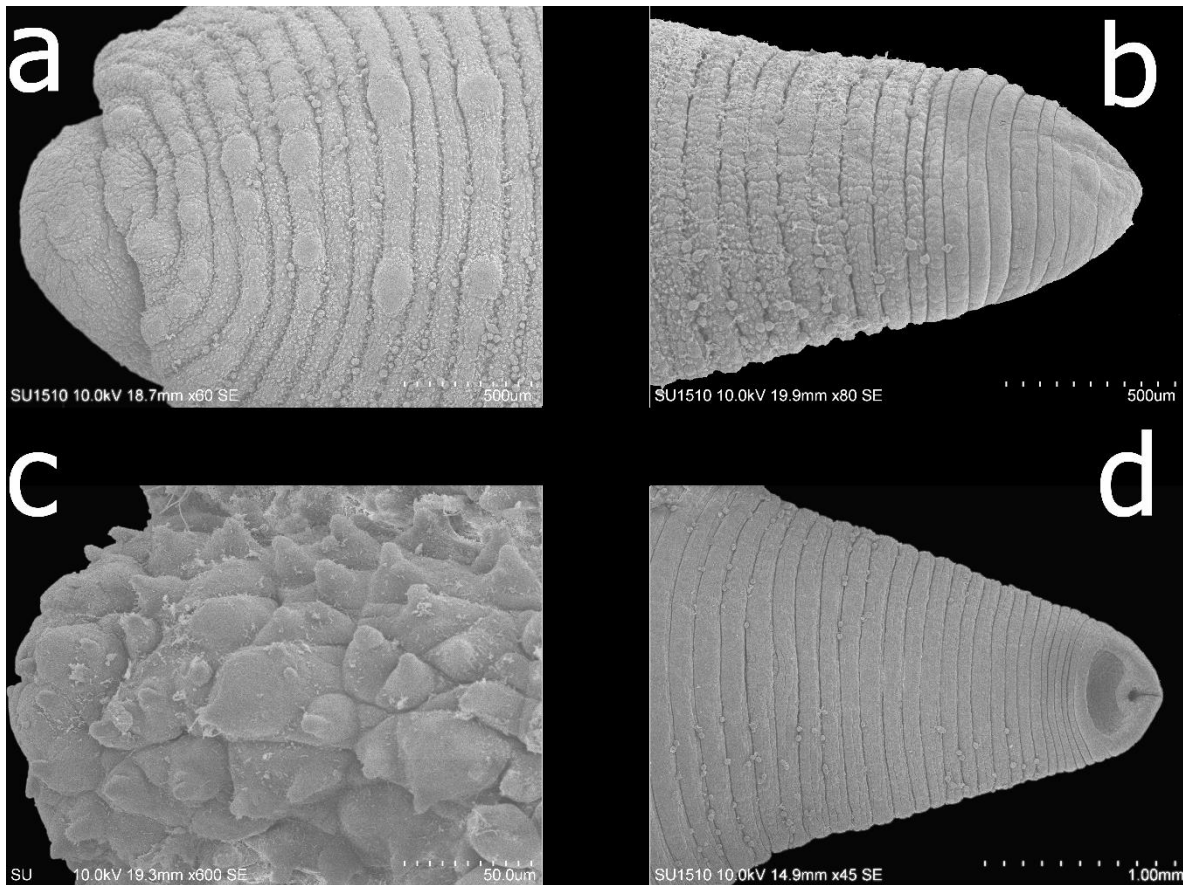


Figura 14. *Helobdella socimulcensis* linaje 2. Ejemplar recolectado en Ejido Rosendo Salazar, Chiapas. a) Hileras de papilas observadas en la región posterior; b) Detalle de la región anterior dorsal. C) papilas diminutas observados en un anillo de la region posterior y d) detalle de la ventosa anterior y poro bucal

Morfología interna. La proboscis es recta y mide 1.95 mm de largo en promedio; abarca de 18 a 20 anillos. Esófago muy corto. Tiene 5 pares de ciegos en el buche, el último par con recorrido descendente, sinuoso desde XIX hasta XXIII. Cuenta con cinco pares de testisacos. Los ovisacos pueden llegar hasta el último par de testisacos; son más anchos desde la mitad hasta la región terminal (Fig. 17).

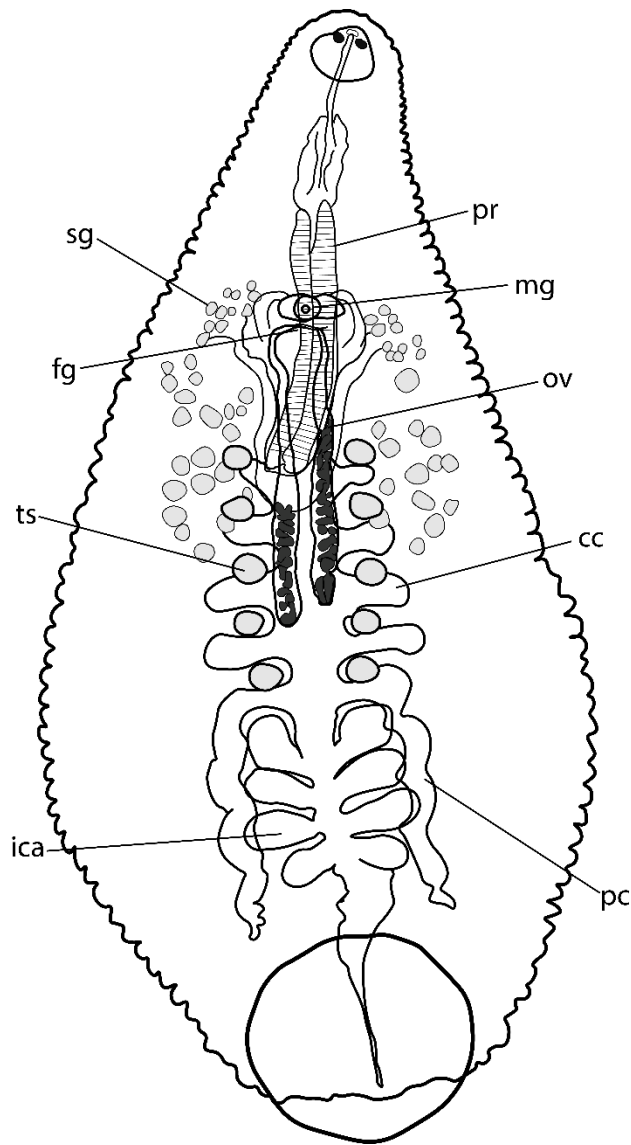


Figura 17. *Helobdella socimulcensis* linaje 2. Morfología interna de un individuo colectado en Hidalgo. pr= proboscis; mg= gonoporo masculino; fg= gonoporo femenino; sg= glandulas salivales; ts= testisacos; cc= ciegos del buche; pc= postciegos; ica= ciegos intestinales.

Diagnósis diferencial. *Helobdella socimulcensis* linaje 2 presenta el arreglo de órganos internos descrito para *H. socimulcensis s. s.* sin embargo, se diferencia de esta y las demás especies del complejo “*triserialis*” por los siguientes rasgos: *Helobdella socimulcensis* linaje 2 presenta 40 líneas en el dorso, siendo 28 en *H. socimulcensis s. s.*, 12 a 14 líneas en *H. lineata*, 16 a 20 líneas en *H. austinensis*; En *Helobdella socimulcensis* linaje 2, el par de líneas medianas no se juntan, sin embargo, en las otras especies éstas se unen en cada anillo a2, las líneas paramedianas se originan dos anillos después del anillo que lleva las manchas oculares mientras que en *H. socimulcensis s. s.* se originan en el anillo

que lleva las manchas oculares. Adicionalmente, *Helobdella socimulcensis* linaje 2 presenta 68 anillos en el cuerpo entero y *H. socimulcensis* s. s. solo 64 anillos. *Helobdella socimulcensis* linaje 2 presenta 5 pares de testisacos *H. austinensis*, *H. brasiliensis*, *H. cordobensis*, *H. striata* y en *H. triserialis* y sus variedades presentan 6 pares (Kutschera, et al., 2013; Ringuélet, 1985); manchas blancas en cada anillo a2 mientras que las manchas pueden estar presentes en todos los anillos en *H. robusta* (Kutschera, et al., 2013); el poro bucal abre en la region posterior de la ventosa, en *H. robusta* dicho poro abre en el centro de la ventosa (Shankland et al. 1991); al menos tres hileras longitudinales de papilas en la region dorsal, mientras que estas están ausentes en *H. fusca* y en *H. cordobensis* (Siddall & Borda, 2003; Ringuélet, 1985); ducto espermático sin vesícula contrario a *H. striata* que presenta ducto con vesícula (Ringuélet, 1985). Finalmente el pigmento marrón en el dorso podría diferenciarla de *H. papillata* cuyo dorso se reportó sin pigmento (Siddall & Borda, 2003).

DISCUSIÓN GENERAL

Filogenia de las especies del género *Helobdella*

En el presente estudio, el uso de la información genética de tres marcadores moleculares (COI, NADH-I e ITS) nos permitió inferir las relaciones filogenéticas entre 35 especies, 15 de las cuales se incorporan a este tipo de estudios por primera vez: *Helobdella adiaistola*, *H. ampullariae*, *H. atli*, *H. austinensis*, *H. brasiliensis*, *H. cordobensis*, *H. duplicata*, *H. echoensis*, *H. eriensis*, *H. hyalina*, *H. serendepitous*, *H. simplex*, *H. socimulcensis*, *H. temiscoensis*, *H. virginiae*; 7 de estas especies son originarias de sudamerica (Cuadro 5, Capítulo I). En el análisis de evidencia total igualmente se recupera la monofilia del grupo valores altos de soporte, por lo que podemos asumir que los caracteres que definen al género *Helobdella*, como la presencia de un anillo separando los gonoporos, un par de manchas oculares, ausencia de órganos esofágicos (bacteriomas) y somitos formados por tres anillos (Ringuelet, 1985; Siddall & Borda, 2003), son congruentes con la información molecular. Al igual que en la hipótesis filogenética previa (Siddall & Borda, 2003) se recuperó al género *Haementeria* como grupo hermano de *Helobdella*, siendo la sinapomorfía para ambos géneros la presencia de un par de manchas oculares (Light & Siddall, 1999; Siddall & Borda, 2003; Siddall et al. 2005).

El uso de información molecular nos permitió diferenciar entre las especies del género *Helobdella* y, en casos particulares como en el complejo “*Helobdella triserialis*”, nos permitió reconocer y poner a prueba grupos como variedades y formas. El género *Helobdella* es un grupo morfológicamente complejo y sus especies son difíciles de delimitar debido a la elevada variación intraespecífica de algunos caracteres morfológicos (patrones de pigmentación y distribución de las papilas dorsales) así como por la falta de variación en otros caracteres (forma de cuerpo, anatomía interna en general). Debido a esto, establecer con certeza el número de especies existentes así como su distribución geográfica ha confundido a los taxónomos por mucho tiempo.

Entre el material que se incluyó en este estudio se encuentra un ejemplar de *Helobdella triserialis* colectado en Chile, el cual consideramos como *H. triserialis* s. s. ya que la localidad tipo de esta especie se ubica en dicho país (Blanchard, 1900) y por lo tanto es la forma que mantiene el nombre. En la filogenia resultante (Fig. 4 y 5, Capítulo I) *H. triserialis* de Bolivia, considerada *sensu stricto* por Siddall y Borda (2003), no se agrupa con

nuestra muestra de Chile, por el contrario, está más cercanamente relacionada con *Helobdella socimulcensis* Linaje 2 de México y muy probablemente representa una especie nueva. De forma interesante, *H. triserialis s. s.* (de Chile) aparece como especie hermana de *H. cordobensis* de Argentina. *Helobdella cordobensis* originalmente fue descrita como una variedad de *H. triserialis* por Ringuélet (1943), sin embargo, Ringuélet (1968) la consideró como una especie independiente, ya que ésta especie Argentina carece de papilas en la superficie dorsal, las cuales son características de las variedades que han sido asociadas con *H. triserialis*.

Se incorporaron a la filogenia secuencias de ejemplares preliminarmente identificadas como *H. triserialis triserialis* de El negro, La Plata, Argentina y de Matanzas, Cuba. Estos ejemplares presentan tres hileras de papilas dorsales, líneas marron que recorren el dorso desde la región ocular hasta el ano y cuentan con hileras longitudinales de manchas blancas dispuestas en cada anillo a2. Estos caracteres son consistentes con los descritos para *H. triserialis sensu lato* sin embargo, la muestra de Argentina aparece como grupo hermano de *H. socimulcensis* de México y mientras que las de Cuba se ubican anidadas en el clado de especies norteamericanas, entre ellas *H. robusta*, *H. lineata*, *H. papillata* y *H. transversa*, por lo que una revisión morfológica podría ayudarnos a establecerlas como especies nuevas.

La sanguijuela norteamericana *Clepsine papillifera variedad d lineata* fue descrita por Verill en 1874. Moore (1898) la transfirió al género *Glossiphonia* elevandola a especie y posteriormente la sinonimizó con *Glossiphonia fusca*, otra especie norteamericana que contaba con papilas dorsales y líneas marron en el dorso (Moore, 1906). Moore (1901), mencionó que las formas de esta especie norteamericanas eran muy parecidas a *Helobdella triserialis* (Blanchard, 1900) de Chile y que probablemente se trataba de la misma especie, lo cual conllevó a varias sinomias subsecuentes (Ringuélet, 1985). En México Caballero (1935) identificó sanguijuelas recolectadas en Patzcuaro, Michoacán como *Glossiphonia fusca* y como una especie independiente de *H. socimulcensis* (otra especie de este complejo) que este autor describió en 1931. Ringuélet (1943), con la información previa y sus observaciones de ejemplares provenientes de Argentina, Brasil, Chile y Uruguay estableció que algunos de los ejemplares sudamericanos correspondían de igual manera a *G. fusca*. Ringuélet también observó que el conjunto de formas conocido como *G. fusca* eran difíciles de diferenciar de *H. triserialis* por lo que podían considerarse como una variedad de esta especie específicamente como *Helobdella triserialis var. lineata*, un taxón que al fin estaba

muy ampliamente distribuido, con representación en EUA, Mexico, Centro y Sur América (Ringuelet, 1985). Siddall & Borda (2003) señalaron que las formas asignadas a "*lineata*" de EUA, eran independientes de *H. triserialis s. s.* (sensu Siddall y Borda, 2003), sin embargo, en su análisis no fueron incluidos ejemplares de *H. triserialis var lineata* de más al Sur de EUA. Siddall & Buddinof (2005) reportaron cierta correspondencia morfológica entre *H. triserialis var lineata* de Ringuelet (1943) y *Helobdella europaea*, esta última, descrita en Europa con base en ejemplares introducidos provenientes de una localidad inespecífica del continente americano (Kutschera, 1985, Siddall & Budinoff, 2005; Reyes-Prieto et al., 2013). Más tarde Ocegüera-Figueroa et al. (2010) establecieron que las formas del complejo "*triserialis*" en México también eran independientes tanto del ejemplar de Bolivia como de las especies de EUA y de *H. europaea*, por lo que para las formas distribuidas en nuestro país se retomó el nombre *Helobdella socimulcensis* usado por Caballero (1931). En el presente análisis filogenético (Fig. 4 y 5, Capítulo I), incluimos por primera vez muestras de *Helobdella triserialis var. lineata* de Sudamérica, recolectadas en La Plata, Argentina y los resultados son sorprendentes ya que éste es un taxón independiente de *H. triserialis s. s.* de Chile y no está cercanamente relacionada con *H. europaea* como apuntaban las observaciones morfológicas de Siddall y Budinoff (2005). Con base en nuestros resultados, proponemos a *Helobdella triserialis var. lineata* de Argentina, como una especie independiente y que para su elevación a nivel especie necesita un epíteto específico distinto a "*lineata*" ya que la especie norteamericana con el mismo nombre es distinta morfológicamente y válida en la actualidad (Siddall & Borda, 2003).

Contrario a lo que se creía el siglo pasado (Castle, 1900; Moore, 1901, Ringuelet, 1943; Caballero, 1945; Sawyer, 1967; Kutschera, 1985; Sawyer, 1986), *H. triserialis* no es una especie tan ampliamente distribuida (Siddall & Borda, 2003), ya que, con base en la filogenia presentada en el Capítulo I y la información molecular disponible concluimos que se trata de varias especies, cada una de ellas con distribución restringida. Es interesante que especies muy afines morfológicamente, coexistan en áreas cercanas o incluso en la misma; sin embargo, no es la primera vez que se reporta esta situación, por ejemplo en Norteamérica, Bely & Weisblat (2006) señalaron la presencia de *H. robusta* y una especie no identificada muy similares morfológicamente con *H. triserialis*, en la misma localidad en Sacramento, CA, EUA.

Las sinapomorfías que llevan los miembros del complejo *triserialis* son: 1) tres o cinco hileras de papilas dorsales, cuyas puntas pueden estar pigmentadas de negro, con un número que puede variar también intraespecíficamente (Caballero, 1935; Ringuelet, 1943, Sawyer, 1985; Kutschera, 1986); 2) manchas metaméricas dorsales de color blanco y 3) coloración marrón dorsal dada por la presencia de líneas que corren antero-posteriormente (Ringuelet, 1985; Sawyer, 1985). En el Capítulo II, documentamos que dentro de los caracteres morfológicos que nos ayudan a distinguir a dos de las especies de este complejo en México, se encuentran el número de anillos del cuerpo y el número de líneas dorsales. Se detectó que la coloración marrón puede estar presente o no en individuos idénticos molecularmente, y que a pesar de la ausencia de coloración, en los organismos teñidos el número de líneas en el dorso es constante, por lo que es un carácter de importancia taxonómica.

Se ha reportado que el número de tetisacos es un carácter útil para diferenciar entre especies, sin embargo, pudiera estar variando de acuerdo al grado de madurez o entre individuos de distintas poblaciones, pudiendo existir en menor número, por ejemplo con los ejemplares tipo de *H. octatetisaca* (Lai et al. 2009), la que se describió con un par menos. Por lo mismo, su establecimiento debe ser considerado a partir de suficientes ejemplares recolectados en distintas localidades y de ser posible de recolectas de distintas temporadas (Romdhane et al. 2017). La trayectoria de la proboscis, recta o con una curvatura en la parte posterior, ha sido considerada un carácter útil en la diferenciación entre especies (Ringuelet, 1985); sin embargo, ejemplares de *H. adiastrata* de México pueden presentar ambos arreglos; sólo un par de individuos del total observado presentaba la curvatura (Capítulo 2, Fig. 7E) por lo que consideramos que este carácter pudo haber cambiado en función de las contracciones del organismo durante la fijación del mismo.

La dieta de estas sanguijuelas se ha usado como evidencia adicional para diferenciar entre especies, particularmente su preferencia a determinadas presas; por ejemplo, Kutschera et al. (1987) observaron que *H. europaea* consume una amplia gama de presas pero tiene una fuerte preferencia por oligoquetos del género *Tubifex*, mientras que *H. robusta* de CA, USA se alimenta exclusivamente de moluscos. Sin embargo, hasta ahora no existe un estudio dirigido a probar esta hipótesis, además de que no en todas las descripciones es posible incorporar información ecológica por la dificultad de obtener ésta en campo; por lo

tanto, la información acerca de la dieta es muy limitada y no sabemos si esta evidencia puede ser de utilidad para delimitar especies.

Una fuente poco explorada pero posiblemente útil taxonomicamente, se relaciona con el ciclo de vida y con el desarrollo de las especies; por ejemplo en el ciclo reproductivo, las diferencias en el número de huevos, así como el de ootecas. A partir del trabajo de Romdhane et al. (2017) se sabe con detalle que *Helobdella stagnalis* tiene dos fases reproductivas al año, puede llevar 34 ± 13 huevos fertilizados dentro de 4 a 8 capullos y que los juveniles pueden estar adheridos al vientre de su progenitora de 24 a 28 días, tiempo en el cual alcanzan su morfología final. Un fenómeno también interesante, es que en la mayoría de las especies de Glossiphoniidae, el inicio de la reproducción depende de una temperatura del medio (BenAhmed et al., 2015). Otro aspecto importante es que la forma de los espermatóforos puede variar enormemente de una especie a otra sin embargo, este carácter es conocido solo para un número limitado de especies (Mann, 1962).

Riqueza de especies en México

En el presente estudio se incluyeron ejemplares procedentes de México recolectados en los estados de Chiapas, Ciudad de México, Jalisco, Nuevo León, Tabasco y Veracruz; localidades que abarcan tanto la región Neotropical como la Neártica. Inicialmente los ejemplares colectados fueron asignados a 4 de las 6 especies reportadas (Oceguera-Figueroa & León-Reganòn, 2005; Oceguera-Figueroa, 2007; Oceguera-Figueroa, 2010; Salas-Montiel et al., 2014). A este número agregamos a *H. austinensis* de Nuevo León, más dos especies potencialmente nuevas del complejo “*triserialis*” y dos especies afines morfológicamente a *H. elongata*, una de cada grupo caracterizada morfológicamente en este trabajo. Con esto, llegamos a 10 especies del género en México, un número que es potencialmente una subestimación del número real de especies de este género distribuidas en el país.

Riqueza de especies en Sudamérica

Hasta la fecha, las especies del género *Helobdella* de Sudamérica no habían sido modificadas desde el punto de vista nomenclatural, a pesar de los numerosos cambios que han tenido las especies del mismo género en otras partes del continente (Kutschera, 1986; Shankland, et. al., 1992; Siddall & Borda 2003; Siddall & Budinoff, 2005; Oceguera-Figueroa et al., 2010; Kutschera et al., 2013). Con este trabajo logramos resolver parte del

problema dentro del complejo “*H. triserialis*”; sin embargo, es claro que hace falta realizar un muestreo más amplio e incluir las poco más de 40 especies restantes de Sudamérica. Un buen punto de partida puede ser incluir las 16 especies que Raúl Adolfo Ringuelet describió durante su trayectoria académica; de este modo, podremos incrementar nuestro conocimiento sobre las relaciones filogenéticas que existen entre las especies del género más diverso de sanguijuelas.

CONCLUSIONES

- *Helobdella* es confirmado como un género monofilético cuyo género hermano es el género *Haementeria*
- *Helobdella octatestisaca* Lai & Chen, 2009 es sinónima de *Helobdella adiaastola* Ringuelet 1972
- En México se distribuyen 6 especies descritas del género *Helobdella*: *H. adiaastola* Ringuelet 1972, *H. atli* Ocegüera & León-Règagnon 2005, *H. austinensis* Kutschera, Langguth, Kuo, Weisblat & Shankland 2013 *H. socimulcensis* (Caballero, 1931), *H. temiscoensis* Salas-Montiel, Phillips, Pérez-Ponce De León, Ocegüera-Figueroa, 2014 y *H. virginiae* Ocegüera-Figueroa, 2007 y 4 especies potencialmente nuevas *H. socimulcensis* linaje 1 y linaje 2 y *Helobdella elongata* linaje 1 y linaje 2.
- Los ejemplares originalmente asignados a *Helobdella triserialis* de El Negro, Argentina, Matanzas, Cuba y Bolivia posiblemente se tratan de especies independientes que necesitan una revisión morfológica más profunda.
- *Helobdella triserialis* var *lineata* necesita ser elevada a nivel de especie y renombrada ya que es una forma independiente de *H. lineata* de EUA y de *H. europaea*
- El número de líneas en el dorso resultó ser un carácter útil para diferenciar entre los miembros del complejo “*triserialis*” en México; sin embargo, se necesita evaluar su utilidad en el resto de las formas que comprenden este complejo de especies de origen Americano.

CAPITULO III

Traveling with leeches. I pity snails, and all that carry their homes on their backs
J. R. R. Tolkien, The fellowship of the ring.

TORRES-CARRERA, G., S. KVIST, M. E. SIDDALL, C. DAMBORENEA & A.
OCEGUERA-FIGUEROA

*Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida
Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, México, C.P.
04510. gerardojwl@ciencias.unam.mx*

1 Division of Invertebrate Zoology, American Museum of Natural History.

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

3 Richard Gilder Graduate School, American Museum of Natural History.

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

*División Zoología Invertebrados, Museo de La Plata, CONICET, Paseo del Bosque s/n
1900. La Plata, Argentina*

*Laboratorio de Helmintología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de
México. Ciudad Universitaria, Copilco, Coyoacán. A.P. 70-153. Ciudad de México. C.P.
14510, Mexico. aoceguera@ib.unam.mx*

Keywords:

Abstract

In the last decades introductions of Apple snails (Ampullariidae) into Asiatic continent and their role as intermediate host or vector of zoonotic diseases have been documented.

Symbiotic association between apple snails and other organisms has been studied widely and currently a considerable number of epibionts on the shell, operculum and branchial cavity of these snail are known, including algae, ciliates, rotifers, nematodes, flatworms (temnocephalans), oligochaetes, dipterans, bryozoans, copepods, mites and leeches. In particular, members of the genus *Helobdella* as *Helobdella octatestisaca* and *Helobdella*

melananus were described in Taiwan from samples recorded in *P. canaliculata*. In this study based on Citochrome oxidase subunit I from *Helobdella octatestisaca* from Mexico, USA and Taiwan and *Helobdella adiaastola* collected in Argentina, we found that both correspond to same species. *Helobdella ampullariae* is other bearing proboscis leech associated to Pomaceans and in our phylogenetic reconstruction, it forms two monophyletic lineages, from Argentina and Taiwan respectively, which may represent independent species.

Introduction

The infamous apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) is one of the best documented invasive species that represents a major threat to agriculture, environment and human health given their role as intermediate hosts or vectors of zoonotic diseases (Lv et al. 2009; Qian-Qian et al. 2018). Apple snails are members of the mollusc family Ampulariidae, which includes around 120 species and ten genera with species naturally distributed in the Neotropics, Africa and Asia (Hayes et al. 2015). The genus *Pomacea* is restricted to the New World, including South, Central and North America and at least two species: *P. canaliculata* and *Pomacea maculata* have been introduced in Asia (Qian-Qian et al. 2018).

In South America, the symbiotic association between apple snails and other organisms has been studied widely and currently a considerable number of epibionts on the shell, operculum and branchial cavity of these snails have been documented, including algae, ciliates, rotifers, nematodes, flatworms (temnocephalans), oligochaetes, dipterans, bryozoans, copepods, mites and leeches, in particular members of the genus *Helobdella* (Damborenea et al. 2017).

Lai et al. (2009) recorded three species of leeches of the genus *Helobdella* associated with the introduced apple snail *P. canaliculata* in Taiwan. Based on morphological and molecular data (COI sequences), two new species were described: *Helobdella octatestisaca* Lai & Chang, 2009 and *Helobdella melananus* Lai & Chang, 2009. *Helobdella europaea* Kutschera, 1987, a well-known introduced leech was also recorded. In the same paper, the authors clearly stated that the three leech species were not native from Taiwan, rather they were introduced accidentally with their host from an unspecified location (Lai et al. 2009).

In a current project to characterize the morphological and molecular variation of species of *Helobdella*, as well as to better understand the geographic distribution of both native and introduced species, leeches assigned to *Helobdella* were collected in Argentina,

Mexico and Uruguay. In particular, special attention was given to the surrounding areas of the Museo de la Plata, Argentina, an area where Raúl Ringuelet (1914-1982), one of the most prolific leech taxonomist, was active and where the type localities of many of the species described by him are distributed. With the newly collected material, we generated sequences of the mitochondrial COI following previous works (Oceguera-Figueroa et al. 2010), the animal barcode region, and compare them with the information available in public repositories.

Materials and methods

Specimen collection. In general, the specimens were found attached to submerged rocks and plant roots in ponds and lakes. Some specimens were found attached to shells of bivalves (*Curbicula fluminea*) and gastropodes of the genus *Pomacea*. Specimens from Uruguay were collected in October 2008 by Rodrigo Ponce de León, Odile Volonterio and AO-F. Specimens from Mexico were collected from 2016 to 2018 by GT-C and AO-F and specimens from Argentina were collected by GT-C and CD in 2018. Leeches were relaxed by gradual addition of 70% ethanol and then fixed in 95% ethanol. Specimens used for DNA extraction were stored in 96% ethanol. For morphological studies, specimens were stored in 70% ethanol.

Molecular analysis. Tissue from the caudal sucker was removed and used for total DNA extraction using the DNeasy Blood and Tissue kit from Quiagen (Valencia, CA, USA) following the protocol provided by the manufacturer. Amplification of a partial sequence the Cytochrome C oxidase subunit 1 (COI) was performed with the primers LCO1490 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' and HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer 1994) under the thermic profile described by Siddall & Borda (2003). PCR products were visualized in an electrophoresis agarose gel and subsequently amplified in a sequencer ABI-PRISM 3100 Applied Biosystems® at the Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LANABIO), Instituto de Biología UNAM.

Sequences were reconciled and edited in Geneious 5.1.7 (Biomatters Ltd. Auckland, New Zealand). A matrix, including 32 newly generated sequences (Table 1), as well as 49 sequences obtained from GenBank was aligned using MAFFT (Katoh & Toh 2008).

Haementeria ghilianii and *Haementeria gracilis* were used as outgroup based on previous

phylogenetic analyses (Oceguera-Figueroa, 2012). Final matrix included 81 terminals and 655 characters. The substitution model was selected according the AKAIKE criterion with JModelTest (Posada 2008). Pairwise genetic distances were calculated in PAUP* (Swofford 2002) with the Kimura 2-parameters substitution model as suggested by DNA barcoding supporters (see Hebert et al. 2004).

Phylogenetic analysis. Phylogenetic analyses were performed following two approaches: Parsimony and Maximum Likelihood. Parsimony analysis was conducted in the software TNT (Goloboff et al. 2008) with a heuristic search using 1000 replicates of random sequences and tree bisection reconnection (TBR) branch swapping; considering gaps as missing data. Clade support was determined using non parametric bootstrapping with 1000 replicates. Maximum likelihood analyses was performed in RaxML v. 8.2 (Stamatakis 2014) command line version, with MRE auto-bootstrap replicates option by using the general time reversible model (GTR) with gamma distributed rate parameter and invariable regions model.

Morphological analysis. For the characterization of external morphology, both ventral and dorsal surfaces were observed under a stereomicroscope. For internal morphology, specimens were stained with a mixture of Meyer's paracarmin and haematoxylin and mounted in permanent glass slides with Canada balsam and observed using a light microscopy. Voucher specimens were deposited in the Colección Nacional de Helmintos (CNHE), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CDMX, México.

Results

Phylogenetic analyses

Parsimony (P) analysis resulted in 1160 equally parsimonious trees with 984 steps each and a strict consensus tree was constructed (CI=0.43, RI=0.85). Maximum likelihood (ML) tree Log was -5152.114709. P and ML trees recovered bearing identical topologies, except in isolates of the same species/population and uniquely ML tree is included (Figure 1). Both trees recovering all the species provided with a chitinous nuchal scute forming a monophyletic clade. However, the support value is low (Bootstrap-value <50% in P and 64% in ML). All the samples of *H. octatetisaca*, including those from the type locality (Taiwan) and a wide representation from American continent (Mexico and USA) and the samples of *H. adiastrala* from Argentina form a single well supported group (100% support

in both trees), in general without phylogenetic or geographical structure. Both trees recover to North American *Helobdella eriensis* as its sister species of *H. octatestisaca*/*H. adiastrata*. *Helobdella melananus* from Taiwan, was found sister to *Helobdella* sp. from Uruguay and close to *Helobdella ampullariae*,

Discussion

With an extended dataset of COI sequences of a multitude of *Helobdella* species, especially from the New World, we provide additional information that strongly suggest that *H. octatestisaca* and *H. melananus*, described from Taiwan, are introduced species in the Asiatic island, and more importantly, we found that *Helobdella octatestisaca* corresponds to a species previously described and widely known in South America: *Helobdella adiastrata* Ringuelet, 1972 whereas *H. melananus* is genetically close to *Helobdella ampullariae*. These findings strongly suggest that the apple snail *P. canaliculata*, when introduced in Taiwan, was in fact, harbouring leeches also native from South America.

As it has been suggested recently, the use of both morphological and molecular data should be used, when possible, in the description of new species. In cases when species were described before the development of the technology to readily generate DNA sequences, it has been demonstrated that the generation of such data from specimens collected in their type localities can provide a rational proxy to solve nomenclatural and taxonomic problems (See Kvist et al. 2010; Iwama et al. in review).

Taxonomic description of new species based on specimens collected in non-native areas of distribution is becoming more frequent and in some instances, hinder the taxonomic work and hamper the recognition of biogeographic patterns. For example, *H. europaea* was first described from Germany and was thought to be, together with *Helobdella stagnalis*, the second species of *Helobdella* that reached Europe; later on, it was suggested that it was introduced probably by the aquarium trade (Nesemann & Neubert 1999) and subsequently its presence was recorded in Australia (where it was described as a new species: *Helobdella papillornata* Govedich and Davies, 1998), South Africa and Spain (Siddall & Budinoff 2005; Reyes-Prieto et al. 2013).

Helobdella is the most speciose genera of leeches; it has been suggested that the group originated in South America where most of the diversity of the group is distributed and then, multiple events of colonization of North America after the closure of the Panama Isthmus and then, a single colonization of Europe (Siddall et al. 2005).

The freshwater proboscis-bearing leech *Helobdella ampullariae* Ringuelet, 1945 was described based on specimens collected from the branchial cavity of *Pomacea canaliculata* from Uruguay and has been recorded in Argentina in the same host (Ringuelet, 1985); apparently, the leech spends its entire life cycle associated with the apple snail. More recently, *Helobdella triserialis* has also been recorded associated with *P. canaliculata* and *Pomacea diffusa* in Brazil (De-Carli et al. 2014).

Morphological analysis

***Helobdella adiaastola* Ringuelet, 1972**

(Figure 2a, 2c)

External morphology. Dorsoventrally flattened, body foliaceous (length 5.7-10 mm); dorsal surface whitish or yellowish, some specimens with minute dark spots (Figure X). Somites I and II merged. One pair of eyespots between III and IV or only in IV, closely together to each other. Nuchal scute at VIII a1/a2 annuli 13 or 14, triangular or subpiriform. Male gonopore on XII a1 and female gonopore on XII a3, separated by a single annulus. Mouth pore on the center of the anterior sucker. 68 annuli visible on the whole body.

Internal morphology. Proboscis straight, sometimes recurved, embrace 11 to 15 annuli (mean length 1.5 mm.); salivary cells diffusely located in parenchyma; six pairs of lateral digitiform crop caeca, last pair forming postcaeca or diverticula that reach fourth pair of intestinal caeca; intestine with 4 pairs of lateral caeca; six (sometimes five) pairs of intersomital testisacs (Figure X).

Remarks. *Helobdella adiaastola* is small leech (less than 1 cm) provided with a conspicuous nuchal chitinous scute on the dorsal surface of VIII a1/a2 and the dorsal surface without papillae, stripes or metameric spots. The type locality of *Helobdella adiaastola* is an unspecified locality in Argentina or Uruguay, since then, it has been recorded widespread in Brazil and Paraguay and Peru (Ringuelet 1972, 1985; Iwama & Pintor Arruda 2016). Ringuelet (1981) recorded *H. adiaastola* from Mexico based on specimens from Central Mexico but latter, this record was transferred to a new species: *Helobdella atli* Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon, 2005, then, laying the distribution of *H. adiaastola* restricted to South America (Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon 2005).

Oceguera-Figueroa et al. (2010), analyzed COI sequences of a variety of species of *Helobdella* from Mexico and found specimens attributable to *H. octatestisaca* from Taiwan, based only on low genetic distance. Since then, *H. octatestisaca* has been recorded in 16 states of Mexico (Salas-Montiel et al. 2014) and more recently in Texas, USA (Richardson et al. 2017). Based on the data presented here, *H. adiaastola* and *H. octatestisaca* actually correspond to the same species, being the later a junior synonym. However, this opens a question regarding the characteristics of the male reproductive system of this species, in particular of the number of testisacs. In the original description of *H. octatestisaca*, only four pairs of testisacs were described (hence the name of the species), this is quite unusual not only for the species of *Helobdella* but for the whole family Glossiphoniidae, being 6 pairs the most common condition (Sawyer, 1986). In the original description of *H. adiaastola* in Ringuélet (1972) the number of testisacs is not reported, however in the redescription of Ringuélet (1985), Iwama & Pintor Arruda (2016), and in the specimens studied here, it is clear that six pairs of testisacs are present. Probably, the authors of the original description of *H. octatestisaca* failed to recognize the first two pairs of testisacs or probably they based their observations in immature specimens but most likely, *H. adiaastola* as well as its junior synonym *H. octatestisaca* have 6 pairs of testisacs.

***Helobdella ampulariae* Ringuélet, 1945**

(Figure 2b, 2d)

External morphology. Body sub-cylindrical (length 7.5 – 8.6 mm) without nuchal shield nor papillae. Mouth located on the former border of the sucker. Dorsum white with black chromatophores profusely scattered throughout the dorsal surface and in smaller proportion in ventral surface. One pair of eyespots, widely separated at IV, hardly distinguishable due to lack of pigments. Caudal sucker unusually large, cup-shape, semi-pedunculated. 60 annuli visible on the whole body.

Internal morphology. Proboscis straight, not recurved (mean length 0.97 mm.); embrace 8 annuli. Salivary cells diffusely located in parenchyma located in clitellar area. Crop with five digitiform caeca, without postcaeca. Intestine with 4 pairs of lateral caeca, first three pairs anteriorly oriented and the last pair laterally oriented. Five pair (sometimes four) intersomital testisacs.

Remarks. *Helobdella ampullariae* was described in 1945 by R. Ringuelet based on organisms from El Salto, Río Uruguay; Interestingly in the description is mentioned that type specimens lack ocular pigment as well as pigment in the body, being totally white. These attributes are directly related to the habitat of this species, the gill cavity of ampularid molluscs, so it seems that it is a unique case of permanent parasitism within the genus *Helobdella*. Later Ringuelet assigned specimens associated with snails of the genus *Pomacea* collected in the surroundings of La Plata, Argentina to *H. ampullariae*; however, unlike those from Uruguay, Argentinian samples had a greenish-black body pigmentation due to the presence of melanophores but similar internal morphology Ringuelet (1981). In our phylogenetic reconstruction it is possible to identify three lineages of leeches partner to ampularid snails; one of these lineages with specimens lacking body colour from Uruguay that is grouped with *H. melananus* lineage and two represented by organisms with black spots and blue to green body color, *H. ampullariae* from La Plata, Argentina and one independent lineage from Uruguay. The above indicate that the name *H. ampullariae* actually could be representing two species closely related. To the best of our knowledge no American described species resembles morphologically *H. melananus* thus this species remains valid.

Acknowledgments

Andrea Jiménez Marín, Ofelia Delgado Hernández, Laura Márquez Valdelamar and Nelly López Ortíz assisted in the generation of DNA sequences. We also thank Luis García Prieto for incorporating the specimens into the Colección de Nacional de Helmintos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México City. This project was funded by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica IN210318 (PAPIIT-UNAM) and CONACYT Ciencia Básica 220408 to AO-F. CONACYT scholarship and PAEP support by Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, both provided to GT-C.

References

Damborenea C., Brusa F. & Negrete L. (2017) Symbionts and diseases associated with

- invasive apple snails. *In*: Joshi R.C., Cowie R.H. & Sebastian L.S. (Eds), Biology and management of invasive apple snails. Philippine Rice Research Institute, Maligaya, Science City of Muñoz, Nueva Ecija 3119, 406 pp.
- De-Carli, B.P., Rotundo, M.M. Paschoal, L.R.P., Andrade, D.P., Cavallari, D.C., Ocegüera-Figueroa, A. & Alonso D.D., (2014) First record of the association of the leech *Helobdella triserialis* (Hirudinea, Glossiphoniidae) and two species of *Pomacea* (Gastropoda, Ampullariidae) in Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 9, 136–140.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S. & Nixon, K.C. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24, 774–786.
<https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x>
- Hayes, K.A., Burks, R.L., Castro-Vazquez A., Darby P.C., Heras H., Martín P.R., Qiu J-W., Thiengo S.C., Vega, I.A., Wada, T., Yusa, Y., Burela, S., Cadierno, M.P., Cueto, J.A., Dellagnola, F.A., Dreon, M.S., Frassa M.V., Giraud-Billoud, M., Godoy, M.S., Ituarte, S., Koch, E., Matsukura, K., Pasquevich M.Y., Rodriguez C., Saveanu L., Seuffert M.E., Strong E.E., Sun J., Tamburi N.E., Tiecher M.J., Turner R.L., Valentine-Darby P.L. & Cowie R.H. (2015) Insights from an Integrated View of the Biology of Apple Snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia*, 58, 1–2.
<https://doi.org/10.4002/040.058.0209>
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H. & Hallwachs W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 14812–14817.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Iwama, R.E., Ocegüera-Figueroa, A., de Carlie, D., Manglicmot, C., Erséus, C., Morning-Song M.N., Siddall, M.E. & Kvist, S. Broad geographic sampling and DNA barcoding do not support the presence of *Helobdella stagnalis* (Linnaeus, 1758) in North America. *Zootaxa* (in review)
- Iwama R.E. & Pintor-Arruda E. (2016) Leeches of the genus *Helobdella* (Clitellata: Hirudinida) from São Paulo, Brazil with descriptions of two new species using micro-computed tomography and a new record of *Barbronia weberi* (Blanchard 1897). *Zootaxa*, 4144, 411–429.

- <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4144.3.8>
- Katoh K. & Toh H. (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9 (4), 286-298.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbn013>
- Kvist, S., Ocegüera-Figueroa, A., Erseus, C. & Siddall, M. (2010) Barcoding, types and the Hirudo files: using information content to critically evaluate the identity of DNA barcodes. *Mitochondrial DNA*, 21, 198–205.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2010.529905>
- Lai Y-T., Chang C-H. & Chen J-H. (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.
- Lv, S., Zhang Y., Liu H-X., Hu, L., Yang K., Steinmann P., Chen Z., Wang L-Y., Utzinger J. & Zhou X-N. (2009) Invasive snail and an Emerging infectious Disease: from the first national survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3, c368
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000368>
- Nesemann, H. & Neubert, E. (1999) Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea. *Süßwasserfauna von Mitteleuropa* 6/2, Heidelberg.
- Ocegüera-Figueroa A. & León-Règagnon, V. (2005) A new freshwater leech species of *Helobdella* (Annelida: Glossiphoniidae) from central Mexico. *Zootaxa*, 976, 1–8.
- Ocegüera-Figueroa A., V. León-Règagnon & Siddall, M. (2010) DNA barcoding reveals Mexican diversity within the freshwater leech genus *Helobdella* (Annelida: Glossiphoniidae). *Mitochondrial DNA*, 21, 24–29.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2010.527965>
- Ocegüera-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.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.10.020>
- Quian-Quian Y., SuWen L., Chao H. & Xiao-Ping Y. (2018) Distribution and the origin of invasive apple snails, *Pomacea canaliculata* and *P. maculata* (Gastropoda: Ampullariidae) in China. *Scientific reports*, 8, 1185.
- Posada D. (2008) JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and*

- Evolution*. 25 (7), 1253-1256.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Reyes-Prieto, M., Ocegüera-Figueroa A., Snell S., Negrodo A., Barba E., Fernández A.M. & Latorre A. (2013) DNA barcode reveal the presence of the introduced freshwater leech *Helobdella europaea* in Spain. *Mitochondrial DNA*, 25 (5), 387-393.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2013.809426>
- Ringuelet, R.A. (1972) Algunos Hirudíneos del Museum d'Histoire Naturelle de Paris. *Physis*, 31, 99–103.
- Ringuelet, R.A. (1981) Clave para el reconocimiento de los hirudíneos de México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología*, 521, 89–97.
- Ringuelet, R.A. (1985) Fauna de agua dulce de la República de Argentina, Hirudinea, FECIC, Buenos Aires, 321 pp.
- Richardson, D.J., Moser, W.E., Hammond, C.I., Lazo-Wasem, E.A. & Barger, M.A. (2017) Host associations of *Helobdella octatestisaca* (Hirudinida: Glossiphoniidae) and the first report of this leech in the United States. *Comparative Parasitology*, 84, 18–20.
<https://doi.org/10.1654/1525-2647-84.1.18>
- Salas-Montiel, R., Phillips, A.J., Pérez-Ponce de León G. & Ocegüera-Figueroa, A., (2014) Description of a new leech species of *Helobdella* (Clitellata: Glossiphoniidae) from Mexico with a review of Mexican congeners and a taxonomic key. *Zootaxa*, 3900, 77–94.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3900.1.4>
- Sawyer, R.T. (1986) *Leech Biology and Behaviour*. Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.
- Siddall M.E. & Borda E. (2003) Phylogeny and revision 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.
<https://doi.org/10.1046/j.1463-6409.2003.00098.x>
- Siddall, M.E. & Budinoff, R.B. (2005) DNA–barcoding evidence for widespread introductions of a leech from the South American *Helobdella triserialis* complex. *Conservation Genetics*, 6, 467–472.
<https://doi.org/10.1007/s10592-005-4986-y>

- Siddall, M.E, Budinoff, R.B. & Borda, E. (2005) Phylogenetic evaluation of systematics and biogeography of the leech family Glossphoniidae. *Invertebrate Systematics*, 19, 105–112.
<https://doi.org/10.1071/IS04034>
- Stamatakis A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30 (9), 1312-1313.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Swofford, D. L. 2002. PAUP* phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Figure 1.

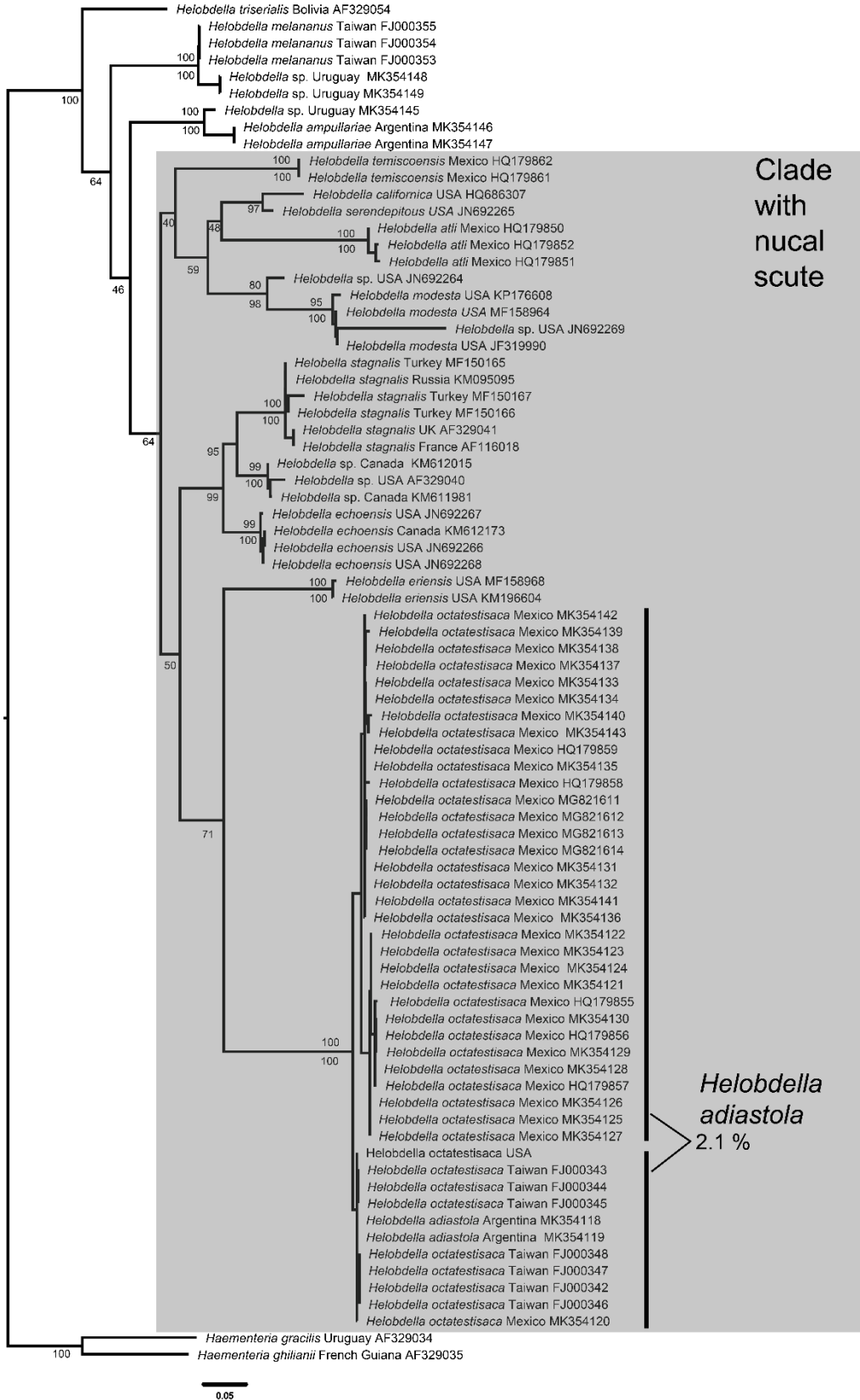


Figure 2.

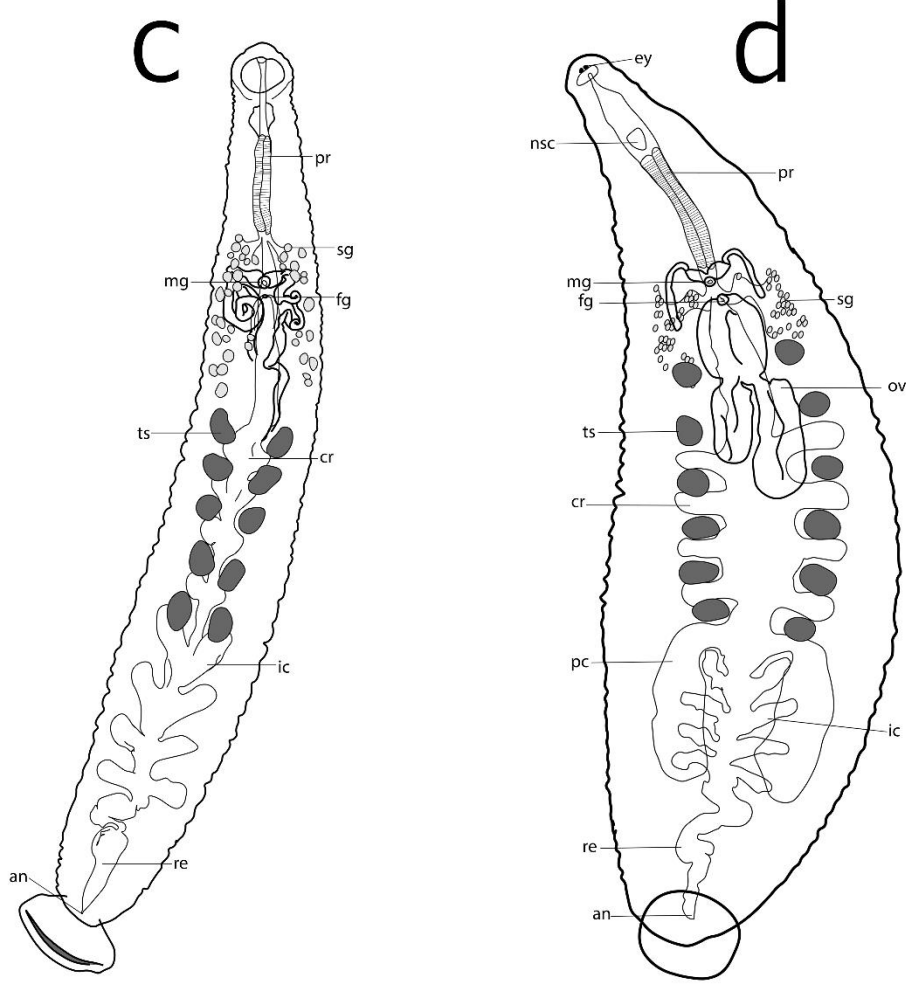


Table 1.

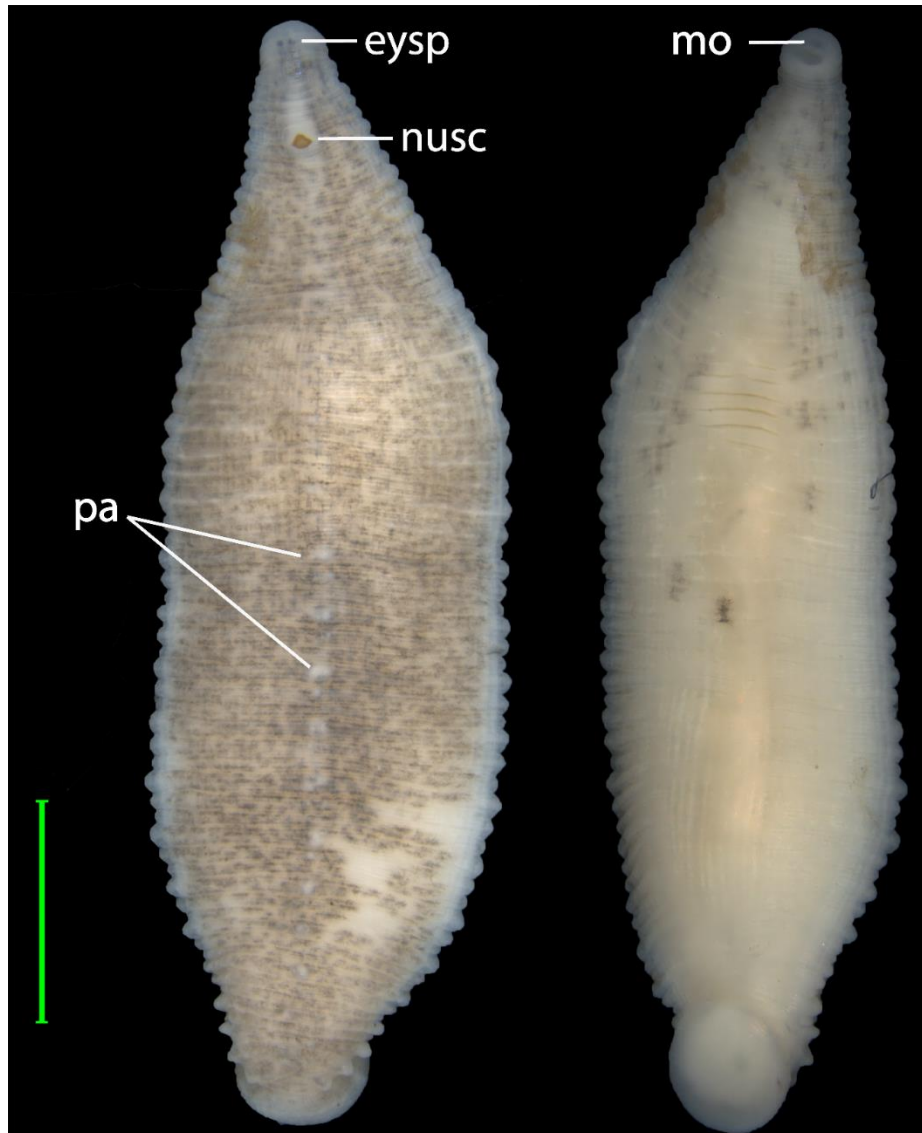
Taxon	Locality	Coordinates	GenBank accession num.	CNHE
<i>Helobdella</i>	Blagiardi, La	-34.8765083 -	MK354118, MK354119	
<i>adiastola</i>	Plata, Argentina	57.8118138888888		11046
	Sombreretillo, Rio San Juan and Presa Cerro Prieto, Nuevo León, México	26.2958318 - 99.9828303 25.4269351 - 100.1749035 25.669538 - 100.3743216	MK354120, MK354121, MK354122, MK354123, MK354123, MK354123, MK354123, MK354124, MK354125, MK354126, MK354127	
	La Vega, Jalisco, México	20.578708 - 103.854916	MK354128, MK354129, MK354130	11047
	Ejido Rosendo Salazar and Emiliano Zapata, Chiapas, México	16.470749 - 93.999563 16.10545 - 91.6978698333333	MK354131, MK354140, MK354143	
	Cocaná and Laguna Llano Grande, Tabasco, México	17.564657 - 92.910965 17.6823694 - 93.0022	MK354132, MK354133, MK354134, MK354135, MK354136, MK354141, MK354142	
	Catemaco, Veracruz, México	18.4259382 - 95.1302887	MK354137, MK354138, MK354139	11048
<i>Helobdella</i>	Bagliardi, La	-34.8765083 -	MK354146, MK354147	
<i>ampullariae</i>	Plata, Argentina	57.8118138888888		11049

General la Valle, -34.8765083 - MK354144
Buenos 57.81181388888888
Aires, Argentina

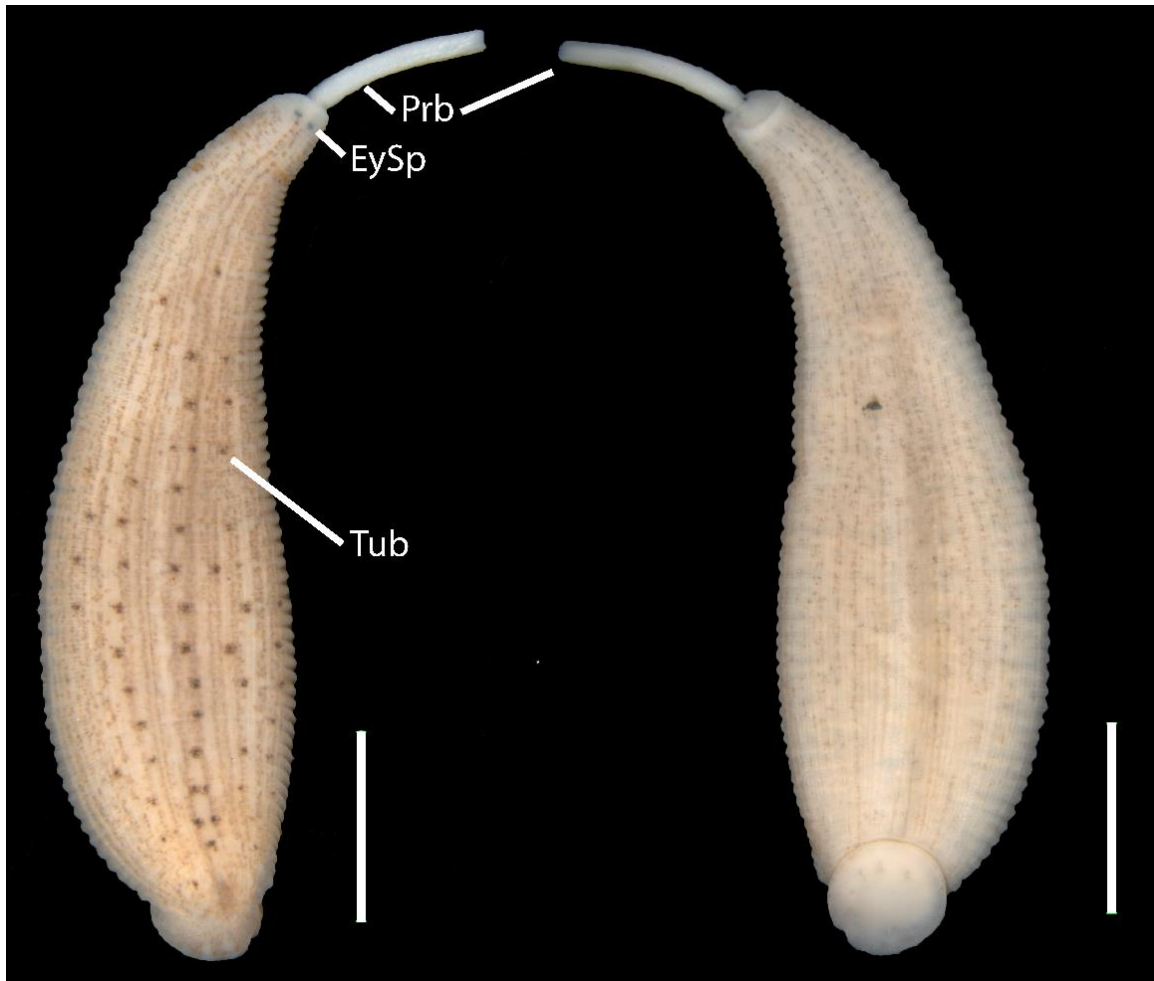
Helobdella Uruguay MK354145, MK354148,
sp. MK354149

ANEXOS

ANEXO 1. Laminas con los ejemplares (vista dorsal y ventral) de *Helobdella* recolectados en este trabajo e incluidos en la filogénia



Helobdella atli de CDMX, México (Clave: GT37). Vista dorsal y ventral. eysp= manchas oculares; nusc= escudo nuca; pa=papilas y mo= poro bucal. Escala: 2mm.



Helobdella austinensis de Nuevo León, México (Clave: A0032). Vista dorsal y ventral. Pbr= proboscis; EySp= manchas oculares y Tub= tubérculos o papilas. Escala: 2mm.



Helobdella brasiliensis de Parque Saavedra, Argentina (Clave: GT22). Vista dorsal y ventral. Escala: 2mm.



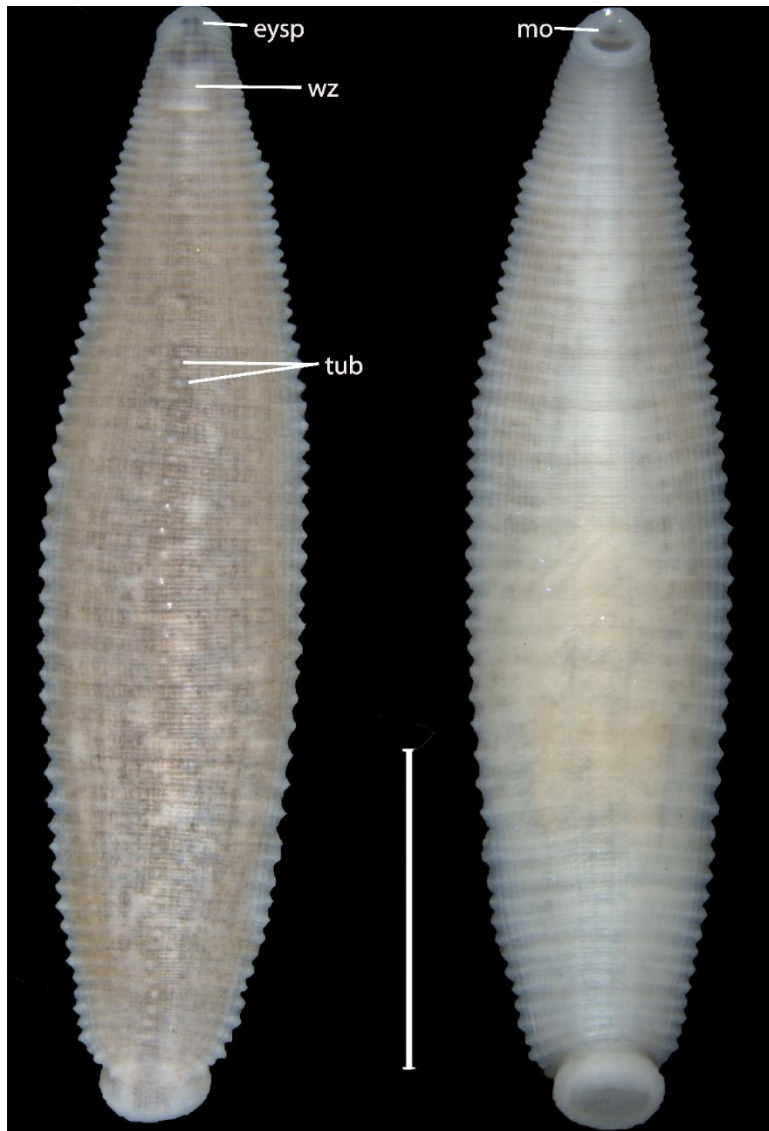
Helobdella cordobensis de Argentina (Clave: BG03). Vista dorsal y ventral. Escala: 2mm.



Helobdella hyalina de Parque Saavedra, Argentina (Clave: GT26). Vista dorsal y ventral. Escala: 2mm.



Helobdella michaelsoni de General La Valle, Argentina (Clave: GT67). Vista dorsal y ventral.



Helobdella simplex de La Plata, Argentina (Clave: GT55). Vista dorsal y ventral. eysp=Manchas coluares; wz= zona blanquecina; tub= tuberculos y mo= poro bucal. Escala: 2mm.



Helobdella triserialis de Cuba (Clave: GT28). Vista dorsal y ventral.



Helobdella triserialis var. *lineata* de Parque Saavedra, Argentina (Clave: GT23). Vista dorsal y ventral.



Helobdella trierialis de El Negro, Argentina (Clave: BG10). Vista dorsal y ventral. Escala: 2mm.

ANEXO 2. Método de tinción Paracarmin-Hematoxilina de Delafield

Método combinado Paracarmin-Hematoxilina de Delafield para la tinción de los ejemplares.

- Pasar a alcohol 96% (10 minutos)
- Teñir con paracarmín de Mayer de 1 a 3 minutos
- Lavar en alcohol 96% (10 minutos)
- Hidratar en alcoholes graduales de 70%, 50%, 25 y agua destilada (10 minutos cada uno)
- Teñir con hematoxilina de Delafield durante 3 a 5 minutos
- Lavar en agua destilada
- Diferenciar en agua acidulada a 2% con ácido clorhídrico hasta que adquieran un color rosa pálido
- Lavar en agua destilada
- Virar en agua de la llave agregando unas gotas de carbonato de litio, hasta que tomen un color azul morado
- Lavar en agua destilada (10 minutos)
- Deshidratar en alcoholes graduales hasta alcohol absoluto (10 minutos en cada uno y 20 en absoluto)
- Aclarar agregando salicilato de metilo poco a poco, a los ejemplares en alcohol absoluto
- Montar en portaobjetos usando bálsamo de Canadá
- Etiquetar y poner a secar

ANEXO 3. Script: ModelTest en R.

Script para encontrar el mejor modelo de sustitución en R y para calcular las distancias genéticas. En siguiente script solo se ejemplifica con la matriz alineada de secuencias del gen COI.

Previamente al análisis se debe de tener instalado el paquete PHANGORN en la consola de R y cuyo manual de uso e instalación se encuentra disponible en el repositorio de CRAN y del distribuidor.

Modelo de sustitución

```
library(phangorn)
```

```
## Cargar alineamiento “.fasta”
```

```
sec_cox<-read.FASTA("cox.fas")
```

```
### crear un archivo phydat a partir del alineamiento
```

```
secuencias_cox<-as.phyDat(sec_cox)
```

```
### Búsqueda modelo de mejor ajuste para la matriz secuencias_cox
```

```
modelo_cox<-modelTest(secuencias_cox, tree = NULL, model = c("JC", "F81", "K80",  
"HKY", "SYM", "GTR"), G = TRUE, I = TRUE, FREQ = FALSE, k = 4, control =  
pml.control(epsilon = 1e-08, maxit = 10, trace = 1), multicore = FALSE, mc.cores = NULL)
```

```
###
```

```
### Calcular distancias con ape
```

```
dist<-dist.dna(secuencias_cox, model = "K80", as.matrix = TRUE)
```

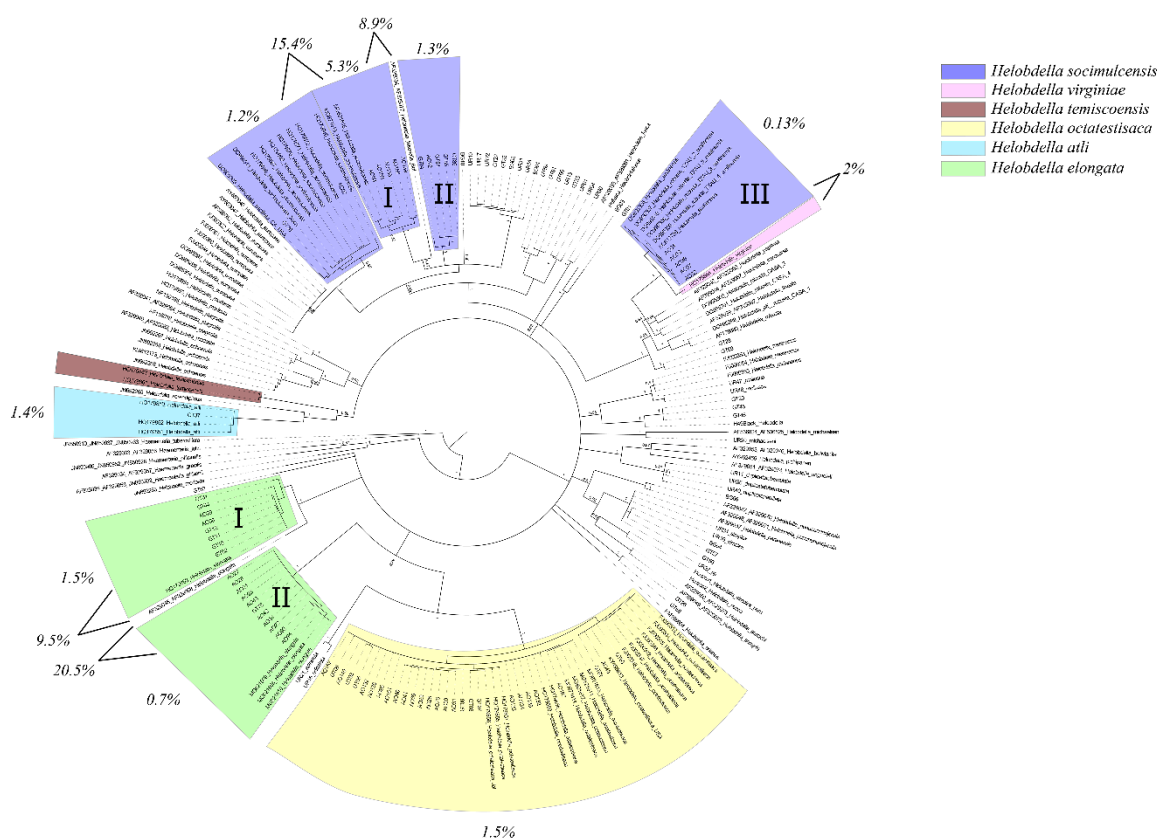
```
## guardar la matriz como un archivo excel
```

```
write.csv(dist, "COX_distancias")
```

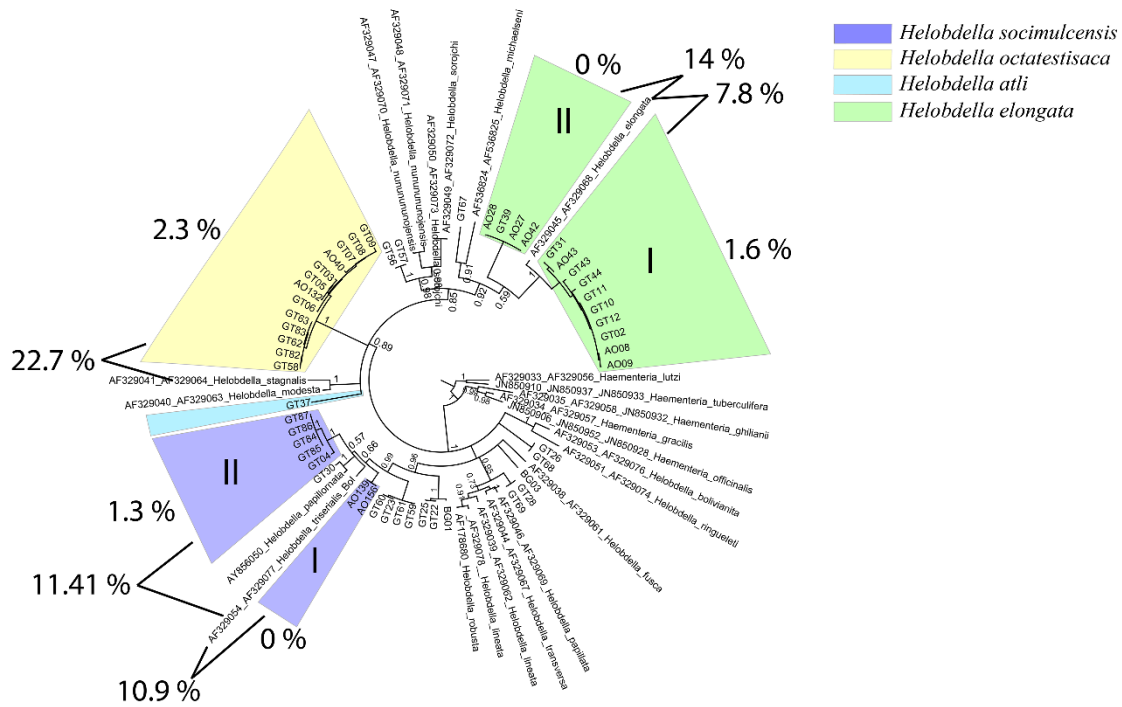
```
###En el directorio de trabajo aparece el archivo .csv con la matriz de distancias que puede  
abrirse/editarse con Excel.
```

ANEXO 4. Hipótesis filogenéticas con cada gen (COI, NADH-I e ITS) y de evidencia total (en extenso) bajo el criterio de IB

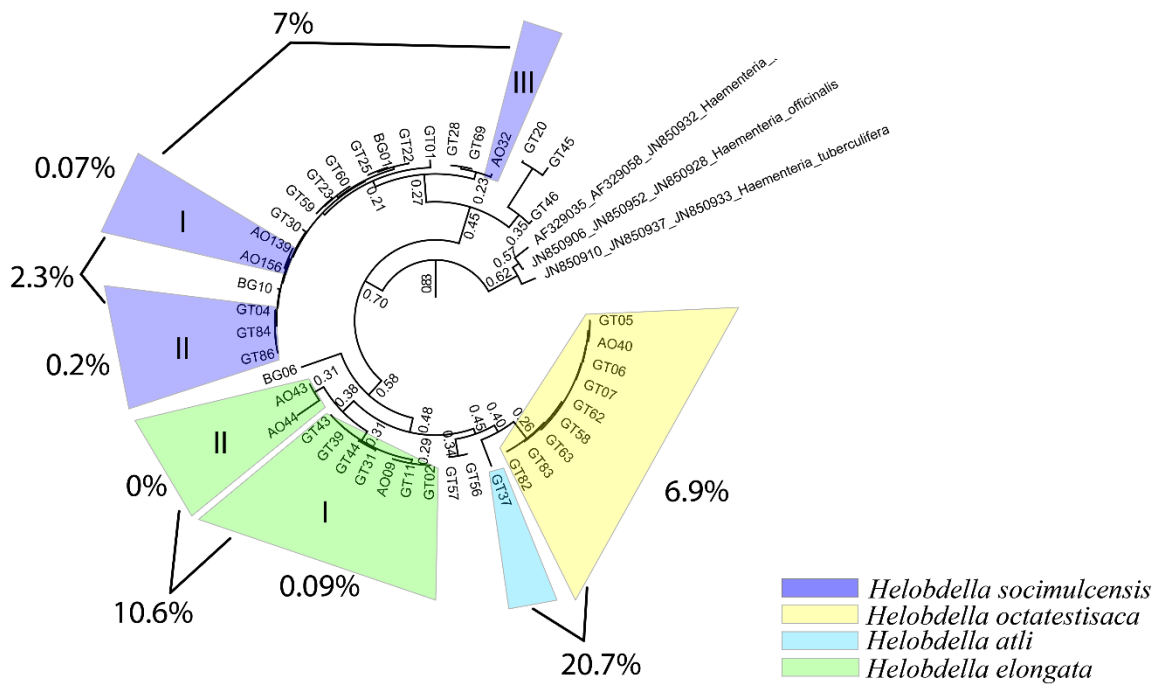
Divergencia genética bajo el modelo de K2P intra e interespecíficas de las especies colectadas en México. Las distancias se muestran en los árboles filogenéticos de cada gen obtenidos por el criterio de IB. Finalmente se muestra la filogenia obtenida bajo el criterio de BI con los todos los genes concatenados.



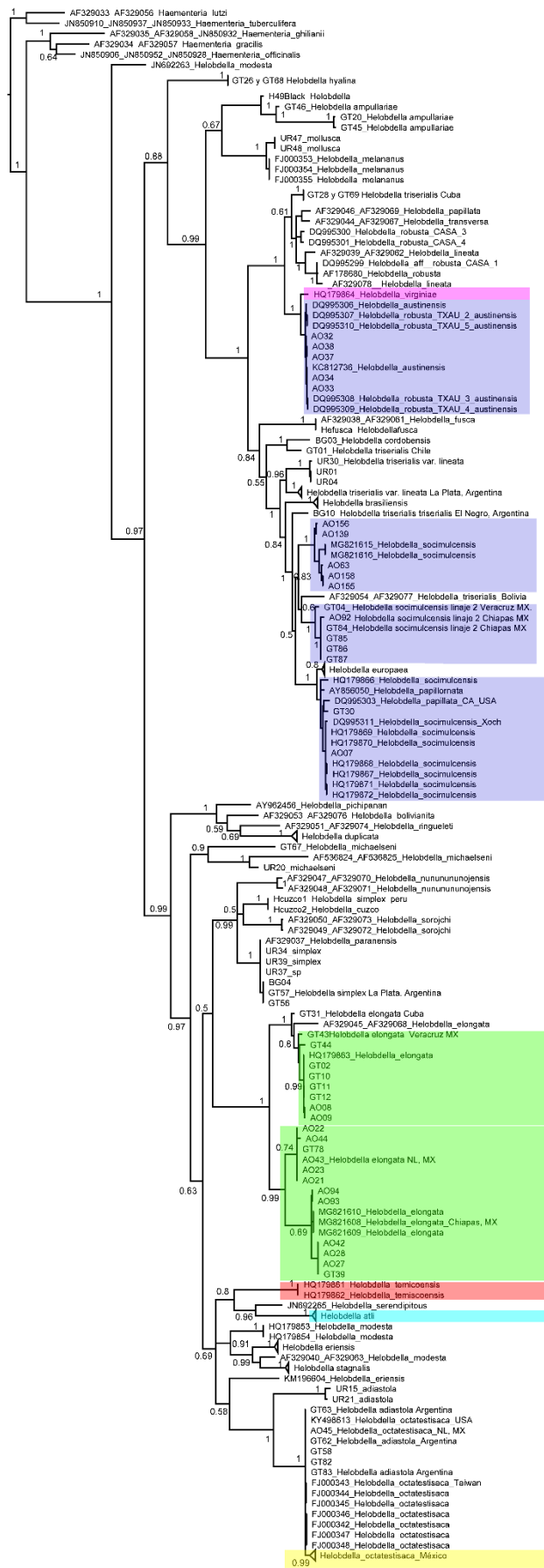
Árbol filogenético obtenido con el gen COI por el criterio de IB. Se muestran por color las especies distribuidas en México. Los números romanos señalan el linaje asignado a cada clado de cada especie nominal.



Árbol filogenético obtenido con el gen mitocondrial NDH1 por el criterio de IB. Se muestran por color las especies distribuidas en México. Los números romanos señalan el linaje asignado a cada clado de cada especie nominal.



Árbol filogenético obtenido con el gen nuclear ITS por el criterio de IB. Se muestran por color las especies distribuidas en México. Los números romanos señalan el linaje asignado a cada clado de cada especie nominal.



LITERATURA CITADA

- Achurra A. & Erséus C. (2013) DNA barcoding and species delimitation: the *Stlodrilus heringianus* case (Annelida: Clitellata: Lumbriculidae). *Invertebrate Systematics* **27**: 118–128.
- Apakupakul, K., Siddall, M. E., Bureson, E. M., (1999) Higher level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences. *Mol. Phylogenetic Evolution* **12**: 350–35.
- Bely A. E. & Weisblat D. A. (2006) Lessons from leech: A call for DNA barcoding in the lab. *Evolution & Development* **8**: 491–501.
- Baird D. J., Pascoe T.J., Zhou X., Hajibabaei M. (2011) Building freshwater macroinvertebrate DNA-barcode libraries from reference collection material: formalin preservation vs specimen age. *Journal of the North American Benthological Society* **30**: 125–130.
- Beresic-Perrins R. K., Govedich F. R., Banister K., Bain B. A., Rose D. & Shuster S. M. (2017) *Helobdella blinni* sp. n. (Hirudinida, Glossiphoniidae) a new species inhabiting Montezuma Well, Arizona, USA. *ZooKeys* **661**: 137–155.
- Blanchard, R. (1900). Hirudineen. In *Hamburger Magalhaensische Sammelreise*, Hamburg, 1–20.
- Bock D.G., Zhan A., Lejeune C., MacIsaac H. J., Cristescu M. E. (2011) Looking at both sides of the invasion: patterns of colonization in the violet tunicate *Botrylloides violaceus*. *Molecular Ecology* **20**: 503–516.
- Brusca R. C. & Brusca G. J. (2003) *Invertebrates*. 2 ed. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. 936 pp.
- Burnham, K. P. and Anderson, D. R (2002) *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. 2nd ed. Springer, New York.
- Caballero, C. E. (1931). *Glossiphonia socumulcensis* nv. Sp. *Anales del Instituto de Biología*. 2: 85–90.
- Caballero, C. E. (1935). Hirudíneos de México. XI. *Glossiphonia fusca* Castle, 1900. *Anales del Instituto de Biología* **6**: 49–52.

- Caballero, C. E. (1941). Sanguijuelas del lago de Pátzcuaro y descripción de una nueva especie, *Illinobdella patzcuarensis*. *Anales del Instituto de Biología* 11: 449-464.
- Castle W. E. (1900) Some North American fresh Water Rhynchobdellidae, and their Parasites. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*. **36**: 1–64.
- Castro J. A., Picornell A., Ramon M. (1998) Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *International Microbiology* **1**: 327–332.
- Chang C.-H. & James S. (2010) A critique of earthworm molecular phylogenetics. *Pedobiologia-International Journal of Soil Biology*. 54S: S3-S9.
- Chritoffersen M. L. (2011) A catalogue of *Helobdella* (Annelida, Clitellata, Hirudinea, Glossiphoniidae), with a summary of leech diversity, from South America. *Neotropical Biology and Conservation* **4**: 89–98.
- Cywinska A., Hunter F. F., Hebert P. D. (2006) Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology* **20**: 413–424.
- Davies R. W. (1991) Annelida: Leeches, Polychaetes, and Acanthobdellids. In: *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press 437–479.
- De Salle, Egan, M. G. and Siddall, M. (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**: 1905–1916.
- De Wit P. & Erens C. (2010) Genetic variation and phylogeny of Scandinavian species of *Grania* (Annelida: Clitellata: Enchytraeidae), with the discovery of a cryptic species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **48**: 285–293.
- Engdahl C., Larsson P., Näslund J., Bravo M., Evander M., Lundström J. O., Ahlm C. & Bucht G. (2014) Identification of Swedish mosquitoes based on molecular barcoding of the COI gene and SNP analysis. *Molecular Ecology Resources* **14**: 478–488.
- Erséus C. & Gustafsson D. (2009) Chapter 3. Cryptic Speciation in Clitellate Model Organisms. En *Annelids in Modern Biology* Edit. Shain D. H. Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology* **3**: 294–299.

- Frati F., Simon C., Sullivan J., Swofford D. L. (1997) Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. *Journal of Molecular Evolution* **44**:145–158.
- Garduño-Montes de Oca Uriel, Martínez-Flores Gisela, Contreras-Mirón Samantha, Jiménez-Armenta Jossué, Ocegüera-Figueroa Alejandro (2016) First record of the introduced leech *Barbronia weberi* (Annelida: Clitellata) in Nuevo Leon, Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad* **87**: 1124–1126.
- Goloboff P., Farris J., Nixon K.. (2003) T.N.T.: Tree Analysis Using New Technology. Program and documentation, available at <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/tnt>.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S. & Nixon, K.C. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, **24**: 774–786.
- GULLO, B. S. 2006. *Helobdella nahuelhuapensis* sp. nov. (Hirudinea, Glossiphoniidae), from Bariloche, Argentina. *Zootaxa*, **1276**: 33-38.
- Gullo, B. S. (2009) A new leech species of *Helobdella* (Hirudinea, Glossiphoniidae) from San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **80**: 47–50.
- Hebert P. D., Cywinska A., Ball S. L., deWaard J. R. (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences* **270**: 313–321.
- Hebert P. D., Ratnasingham S, deWaard J. R. (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **270**: S96–S99.
- Heber P. D. N., Penton E. H., Burns, J. M., Jazen D. H. & Hallwachs W. (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* **101**: 14812-14817.
- Iwama R. E. & Pintor-Arrunda E. (2016) Leeches of the genus *Helobdella* (Clitellata: Hirudinida) from São Paulo, Brazil with descriptions of two new species using micro-computed tomography and a new record of *Barbronia weberi* (Blanchard 1897). *Zootaxa* **4144**: 411–429.
- Iwama R. E., De Matos-Nogueira J. M. & Zangirolame-Goncalves A. (2017) *Helobdella buzz* n. sp. (Clitellata: Hirudinida), a bromeliad leech from the Brazilian Atlantic Forest. *Zootaxa* **4272**: 591–595.
- Iwama, R.E., Ocegüera-Figueroa, A., de Carlie, D., Manglicmot, C., Erséus, C., Morning-Song M.N., Siddall, M.E. & Kvist, S. Broad geographic sampling and DNA

barcoding do not support the presence of *Helobdella stagnalis* (Linnaeus, 1758) in North America. *Zootaxa* (in review)

- Katoh K. & Toh H. (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* **9**: 286-298.
- Källersjö M., Von Proschwitz T., Lundberg S., Eldenäs P. & Erséus C. (2005) Evaluation of ITS rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies in freshwater mussels: an example using Unionidae from north-western Europe. *Zoologica Scripta* **34**: 415–424.
- Klemm, D. J. (1972) Biota of Freshwater Ecosystems. Identification Manual No. 8. Freshwater Leeches (Annelida: Hirudinea) of North America. US Government Printing Office, Washington, D.C., 58 pp.
- Kvist S., Oceguera-Figeroa A., Siddall M. E. & Erseus C. (2010) Barcoding, types and the *Hirudo* files: Using information content to critically evaluate the identity of DNA barcodes. *Mitochondrial DNA* **21**: 198–205.
- Kutschera U. (1985) Beschreibung einer neuen egelart, *Helobdella striata* nov. sp. (Hirudiinidae). *Zoologische Jahrbücher Abteilung Systematik* **112**: 469-476.
- Kutschera U., Wirtz P. 1986. A leech that feeds its young. *Animal Behaviour* **34**: 941–942.
- Kutschera U. (1987) Notes on the Taxonomy and Biology of Leeches of the Genus *Helobdella* Blanchard 1896 (Hirudinea: Glossiphoniidae). *Zoologischer Anzeiger* **5/6**: 321-323.
- Kutschera U., Langguth H., Kuo D.-H., Weisblat & Shankland (2013) Description of a new leech species from North America, *Helobdella austinensis* n. sp. (Hirudinea: Glossiphoniidae), with observations on its feeding behaviour. *Zoosystematics and Evolution* **89**: 239–246.
- Lai Y-T., Chang C-H. & Chen J-H. (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.
- Li, Y., Zhou, X., Feng, G., Hu, H., Niu, L., Hebert, P. D. N. & Huang, D (2010) COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae). *Molecular Ecology Resources* **10**: 31–40.

- Light J. E. & Siddall, M. E. (1999). Phylogeny of the leech family Glossiphoniidae based on mitochondrial gene sequences and morphological data. *Journal of Parasitology*, **85**: 813–823.
- Liu H & Beckenbach A. T. (1992) Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **1**:41–52.
- López-Jimenez S. (1985) Estudio taxonómico de algunos Hirudíneos de México. Tesis Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 182 pp.
- Mann K. H. (1962) Leeches (Hirudinea). Their structure, physiology, ecology and embryology. With an appendix on the systematic of marine leeches. Pergamon press. New York. 201 pp.
- Martinsson S., Achurra A., Svensson M. & Erséus C. (2013) Integrative taxonomy of the freshwater worm *Rhyacodrilus falciformis* s.l. (Clitellata: Naididae), with the description of a new species. *Zoologica Scripta* **46**: 612-622.
- Moore J. P. (1898) The leeches of the United States National Museum. *Proceedings of the United States National Museum*. **21**: 543–563.
- Moore J. P. (1901) The hirudinea of Illinois. *Bulletin of the Illinois state Laboratory of Natural History*, Vol. 5, 12: 479–548.
- Mosser W. E., Fend S. V., Richardson D. J., Hammond C. I., Lazo-Wasem E. A., Govedich f. R. & Gullo B. S. (2013) A new species of *Helobdella* (Hirudinida: Glossiphoniidae) from Oregon, USA. *Zootaxa* **3718**: 287–294.
- Ocegüera-Figueroa A. & León-Règagnon, V. (2005) A new freshwater leech species of *Helobdella* (Annelida: Glossiphoniidae) from central Mexico. *Zootaxa*, **976**: 1–8.
- Ocegüera-Figueroa, A. (2007) Especie nueva de sanguijuela del género *Helobdella* (Rhynchobdellida: Glossiphoniidae) del lago de catemaco, Veracruz, México. *Acta Zoologica Mexicana* **23**: 15–22.
- Ocegüera-Figueroa, A., León-Règagnon V. & Siddall M. E. (2010) DNA barcoding reveals Mexican diversity within the freshwater genus *Helobdella* (Annelida: Glossiphoniidae). *Mitochondrial DNA* **21**: 24–29.
- Ocegüera-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

- Ocegüera-Figueroa, A. & Kvist (2019) Subclass Hirudinea (Annelida:Clitellata): Leeches. En Concepts in Animal Parasitology, University of Nebraska, Lincoln, *in Review*.
- Posada D. (2008) JModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*. **25**: 1253-1256.
- Prendini, L. (2005) Comment on "Identifying spiders through DNA barcodes". *Canadian Journal of Zoology* **83**: 498–504.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S. & Achaz G. (2011) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation, *Molecular Ecology* **21**:1864–1877.
- Reyes-Prieto, M., Ocegüera-Figueroa A., Snell S., Negrodo A., Barba E., Fernández A.M. & Latorre A. (2013) DNA barcode reveal the presence of the introduced freshwater leech *Helobdella europaea* in Spain. *Mitochondrial DNA*, **25**: 387–393.
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Richardson D. J., Moser W. L., Hammond C. I., Lazo-Wasem E. A. & Bager M. A. (2017). Host associations of *Helobdella octatestisaca* (Hirudinida: Glossiphoniidae) and the first report of this leech in the United States. *Comparative Parasitology* **84**: 18–20.
- Ringuelet, R. A. (1943) Sobre la morfología y variabilidad de *Helobdella triserialis* (Em. Bl.) (Hirudinea, Glossiphoniidae). *Notas Museo de la Plata* **8**: 215–240.
- Ringuelet, R. A. (1968). Lave o clave para el reconocimiento de las sanguijuelas conocidas de la República Argentina (Hirudinea) y apuntamientos sobre la hirudofauna neotrópica y transicional mexicana. *Physis* **27**: 367–390.
- Ringuelet, R. A. (1978a) Nuevos generos y especies de Glossiphoniidae: Sudamericanos basados en caracteres ecto y endosomaticos (Hirudinea, Glossiphoniiformes). *Limnobiós* **1**: 269–276.
- Ringuelet, R. A. (1978b) Hirudineos nuevos o ya descriptos de la Argentina y del Uruguay. *Limnobiós* **1**: 258–268.
- Ringuelet, R. A. (1982) Clave para el reconocimiento de los Hirudineos de México. *Anales del Instituto e Biología*. **52**: 89–97.
- Ringuelet, R. A. (1985) Fauna de Agua Dulce de la República de Argentina, Hirudinea. Buenos Aires; FECIC, p. 3217.

- Rolleston J. D. (1959) François-Joseph-Victor Broussais 1772 to 1832: his life and doctrines. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **22**: 405.
- Romdhane Y., Ahmed R. B. & Tekaya S. (2017) Sexual behavior, insemination and development of the freshwater leech *Helobdella stagnalis* (Annelida, Hirudinea, Glossiphoniidae), *Invertebrate Reproduction & Development* **61**: 253–264.
- Ronquist F. Teslenko M. van der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Larget B. Liu L. Suchard M. A. & Huelsenbeck J. P. (2011). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* **61**: 539–542.
- Rubinoff D., Cameron S. & Will K. (2006) A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *Journal of heredity* **97**: 581–594.
- Saglam N., Kutschera U. Saunders R., Saidel W. M., Balombini K. L. W. & Shain . H. (2018) Phylogenetic and morphological resolution of the *Helobdella stagnalis* species-complex (Annelida: Clitellata: Hirudinea). *Zootaxa* **4403**: 061–086.
- Salas-Montiel R., Phillips A. J., Perez-Ponce de Leon G., & Ocegüera-Figueroa A. (2014) Description of a new leech species of *Helobdella* (Clitellata: Glossiphoniidae) from Mexico with a review of mexican congeners and a taxonomic key. *Zootaxa*. **3900**: 077–094.
- Sarkar, I. N., Planet P. J. & Desalle R. (2008) CAOS software for use in character-based DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* **8**: 1256–1259.
- Sawyer, R. T. (1967). The leeches of Louisiana, with notes on some North American species (Hirudinea, Annelida). *Proceedings of the Louisiana Academy of Science* **30**: 32–38.
- Sawyer, R. T. (1986) *Leech biology and behaviour*. Oxford University Press, Oxford.
- Shankland M., Bissen S. T. & Weisblat D. A. (1992) Description of the Californian leech *Helobdella robusta* sp.nov., and comparison with *Helobdella triserialis* on the basis of morphology, embryology, and experimental breeding. *Canadian Journal of Zoology* **70**: 1258–1263.
- Sharma P. & Kobayashi T. (2014) Are "universal" DNA primers really universal?. *Journal of Applied Genetics* **55**:485–96.
- Schliep, K., Potts, A. J., Morrison, D. A., Grimm, G. W. (2017) Intertwining phylogenetic trees and networks. *Methods in Ecology and Evolution* **8**: 1212–1220.

- Siddall M. E. (2001) Leeches of Laguna Volcán, Bolivia, Including a New Species of *Helobdella* (Clitellata: Hirudinea). *American Museum Novitates* **3313**: 1-11.
- Siddall, M. E. & Borda E. (2003) Phylogeny and revision 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. & Budinoff R. B. (2005) DNA-barcoding evidence for widespread introductions of a leech from the South American *Helobdella triserialis* complex. *Conservation Genetics* **6**: 467–472.
- Siddall, M.E, Budinoff, R.B. & Borda, E. (2005) Phylogenetic evaluation of systematics and biogeography of the leech family Glossiphoniidae. *Invertebrate Systematics*, **19**: 105–112.
- Sket, B. & P. Trontelj. 2008. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia* **595**:129–137.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., and Vogler, A. P. (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology Evolution* **18**: 70–74.
- Tessler M., de Carle D., Voiklis M. L., Greshm O. A., Neumann J. S., Cios S. & Siddall M. E. (2018) Worms that suck: Phylogenetic analysis of Hirudinea solidifies the position of Acanthobdellida and necessitates the dissolution of Rhynchobdellida. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **127**: 129–134.
- Van Houdt J. K. J., Breman F. C., Virgilio M., DeMeyer M. (2010) Recovering full DNA barcodes from natural history collections of Tephritid fruitflies (Tephritidae, Diptera) using mini barcodes. *Molecular Ecology Resources* **10**: 459–465.
- Vega I. A., Damborenea M. C., Gamarra-Luques C., Koch E., Cueto J. A. & Castro-Vazquez A. (2006). Facultative and obligate symbiotic associations of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *BIOCELL* **30**: 367–375.
- Walton RL, Beahm EK, Brown RE, Upton J, Reinke; K, Fudem G, et al. 1998, Microsurgical replantation of the lip: a multi-institutional experience. *Plastic and Reconstructive Surgery* **102**: 358–68.
- Wang G, Li C, Guo X., Xing D., Dong Y., Wang Z., Zhang Y., Liu M., Zheng Z., Zhang H., Zhu X., Wu Z. & Zhao T. (2012) Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. *PLoS ONE*, **7**: e47051.

- Weisblat, D. A. & Kuo D-H. (2014) Developmental biology of the leech *Helobdella*. *The International Journal of Developmental Biology* **58**: 429–443
- Wells M. D., Manktelow R. T., Boyd J. B., Bowen V. (1993) The medical leech: an old treatment revisited. *Microsurgery* **14**: 183–6.
- Whitaker I. S., Raob J., Izadi D. & Butlerd P. E. (2004) Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **42**: 133–137.
- Yao K. M., Song J., Liu, C., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P. and Chen, S. (2010) Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PloS ONE* **5**: e13102.