



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CÓDIGOS DE BARRAS DE SANGUIJUELAS
(ANNELIDA:CLITELLATA) DE LA CUENCA DE
MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O
P R E S E N T A:**

DIEGO JOSSUÉ JIMÉNEZ ARMENTA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA
FIGUEROA**

2016

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX₁



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Jiménez

Armenta

Diego Jossué

55 30 78 51 24

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

308133464

2. Datos del tutor

Dr.

Alejandro Francisco

Oceguera

Figueroa

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Fernando

Álvarez

Padilla

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

María Berenit

Mendoza

Garfias

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Alejandro Francisco

Oceguera

Figueroa

6. Datos del sinodal 4

Biól.

Luis Ricardo

Salas

Montiel

7. Datos del sinodal 5

M. en C.

Luis

García

Prieto

8. Datos del trabajo escrito.

Códigos de barras genéticos de sanguijuelas
(Annelida: Clitellata) de la Cuenca de México.

62 p.

2016

RESUMEN.

El código de barras genético es una herramienta que permite realizar determinaciones taxonómicas de animales mediante la comparación de secuencias del gen mitocondrial de la subunidad I del Citocromo C Oxidasa. Por lo mismo, acelera el descubrimiento de biodiversidad al combinarse con un análisis de distancias genéticas; una de sus mayores virtudes es la capacidad para identificar especies no descritas. En el presente estudio se generaron los códigos de barras genéticos para las especies de sanguijuelas dulceacuícolas que habitan la Cuenca de México, en el centro del país, región que ha sido sujeta a eventos continuos de desecación artificial, de manera que actualmente está compuesta de cuerpos dulceacuícolas aislados. Se recolectaron sanguijuelas pertenecientes a 3 familias y 6 especies en 5 localidades. El método del código de barras genético por sí mismo permitió la determinación de un 69.8% de las muestras, sin embargo, en algunos casos la información de la morfología fue decisiva para la determinación. Se discute la presencia de una población de *Erpobdella ochoterenai* en el Lago de Tecocomulco con alta divergencia genética con sus conespecíficos, lo que puede indicar su pertenencia a una especie no descrita. Igualmente se discuten las ventajas, desventajas y complicaciones que tiene en la actualidad el trabajo taxonómico basado en códigos de barras genéticos.

ABSTRACT

Genetic barcodes are a tool that allows performing animal taxonomic determinations by comparing sequences from the mitochondrial gene of the subunit I of the Cytochrome C Oxidase. It accelerates biodiversity discovery when combined with a genetic distance analysis; one of its major virtues is its capability to detect non-described species. In the present study, genetic barcodes were generated for the species of freshwater leeches that inhabit the Mexico Basin, in Central Mexico, which has passed through continuous events of artificial desiccation, so that it is conformed by isolated freshwater bodies in the present. Leeches from 3 families and 6 species were collected in 5 localities. Barcoding method itself was able to identify a 69.8% of the samples, but in some cases morphological information was decisive. I discuss the presence of a population of *Erpobdella ochoterenai* in Tecocomulco Lake which bears high divergency from its conspecifics, which may indicate its pertenence to an undescribed species. I also discuss the advantages, disadvantages and complications that barcode-based taxonomic work has nowadays.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de Hirudinea.

Las sanguijuelas pertenecen a la subclase Hirudinea (Lamarck, 1818). Junto con los oligoquetos, branquiobdélidos y acantobdélidos son miembros de la clase Clitellata (Siddall *et al.*, 2001; Erséus & Källersjö, 2004), la cual incluye organismos hermafroditas que presentan una estructura llamada clitelo, una región glandular que secreta ootecas (cápsulas de quitina) para el empaquetamiento de los huevos (Brusca & Brusca, 2003).

La clase Clitellata, junto con Polychaeta, conforman el phylum Annelida (Brusca & Brusca, 2003). Este phylum está compuesto por animales tripoblásticos, celomados, con cuerpo vermiforme y segmentado, en el cual la mayoría de las partes corporales se repiten en cada segmento, lo cual ha sido llamado homología serial. Sin embargo, estudios recientes (Struck *et al.*, 2007; Dunn *et al.*, 2008) han incluido además en el phylum grupos como Echiura, Sipuncula y Siboglinidae, de manera que la segmentación del cuerpo no es en realidad un carácter diagnóstico del grupo. Poseen un aparato digestivo completo, aparato circulatorio cerrado, sistema nervioso bien desarrollado y nefridios como estructuras de excreción (Brusca & Brusca, 2003).

Son varias las apomorfías que diferencian a las sanguijuelas del resto de los anélidos. Por ejemplo, presentan un número reducido y constante de somitos en su plan corporal básico (34). Estos somitos se nombran mediante números romanos (I-XXXIV), iniciando con el somito anterior. De manera regular, cada somito se subdivide externamente en 3 anillos, los cuáles se nombran de anterior a posterior como a_1 , a_2 y a_3 . En algunas especies, estos tres anillos primarios se dividen a su vez en dos anillos secundarios (b_1 - b_6). En caso de existir anillos terciarios o cuaternarios, se nombran utilizando las letras c y d, respectivamente. En la Fig. 1 se presenta de forma esquemática la nomenclatura de los somitos y anillos en Hirudinea.

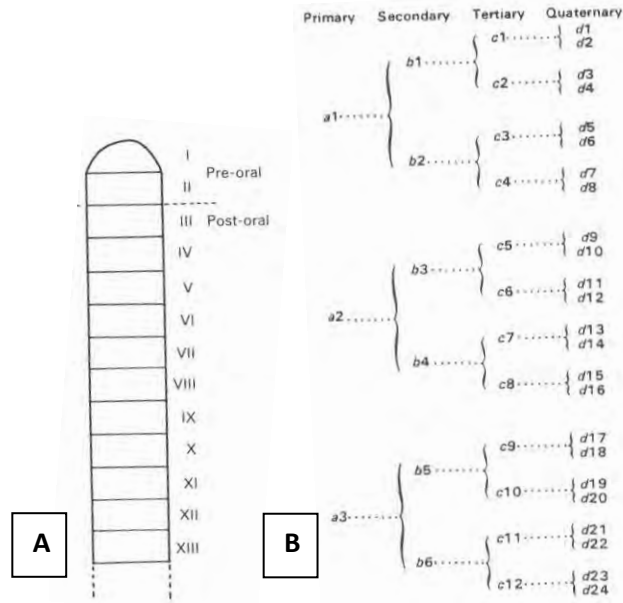


Fig. 1. Nomenclatura utilizada para los somitos y anillos externos de las sanguijuelas.
A. Esquematación de la parte anterior de una sanguijuela donde se muestra la numeración de los somitos. B. Subdivisiones posibles de los 3 anillos primarios que posee cada somito (a₁-a₃). Modificado de Sawyer (1986).

Las sanguijuelas presentan un cuerpo aplanado dorsoventralmente. No poseen las quetas que los oligoquetos usan en la locomoción y han adquirido ventosas musculares en cada extremo del cuerpo (Sawyer, 1986; Brusca & Brusca, 2003).

En oligoquetos y poliquetos, la cavidad celómica está llena de fluido y conforma un esqueleto hidrostático, pero en las sanguijuelas está ocupado por tejido mesenquimático, por lo cual se forma un sistema de canales angostos por los que circula el fluido celómico (vasos circulatorios) (Fig. 2).

Poseen un ganglio cerebroide anterodorsal que resulta de la fusión de 6 ganglios nerviosos y un par más de ganglios en cada somito corporal, formando un cordón nervioso que se extiende longitudinalmente (Mann, 2013) (Fig. 3). Tienen órganos sensoriales epidermales y entre 2 y 10 ojos de complejidad variable. Los órganos reproductores (Fig. 4) son complejos, con un aparato reproductor masculino

provisto de entre 5 y 10 pares de testisacos unidos mediante ductos espermáticos a un órgano copulador llamado atrio, ubicado en el gonoporo masculino, en el somito XII (Sawyer, 1986). El aparato reproductor femenino consta de un par de

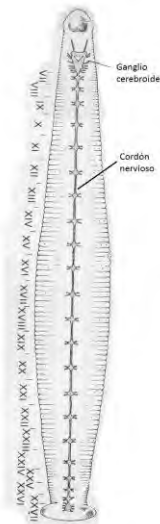


Fig. 3. Sistema nervioso de Hirudo.

(Sawyer, 1986)



Fig. 2. Vasos circulatorios de Hemiclepsis marginata.(Sawyer, 1986)

ovisacos de los cuáles se extienden oviductos que se unen en la vagina, y desembocan en el gonoporo femenino en el somito XI (Sawyer, 1986). La excreción se realiza mediante órganos derivados de metanefridios asociados a los vasos circulatorios celómicos (Brusca & Brusca, 2003).

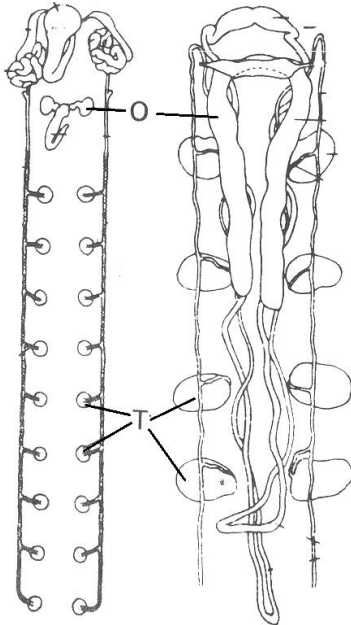


Fig. 4. Aparatos reproductores de dos especies de sanguijuelas. A la derecha, *Hirudo medicinalis*. A la izquierda, *Glossiphonia complanata*. O = ovisacos T= testisacos. Modificado de Sawyer (1986)

Alrededor del 30% de las aproximadamente 680 especies de sanguijuelas descritas a nivel mundial son hematófagas, parásitas de vertebrados, siendo la hemoglobina su principal fuente energética (Sawyer, 1986; Sket & Trontelj, 2008) El resto son liquidosomatófagas, es decir, se alimentan de fluidos internos y tejidos blandos de moluscos u otros anélidos, o bien son macrófagas, carroñeras o depredadoras de pequeños invertebrados (Sket & Trontelj, 2008; Ocegüera-Figueroa *et al.*, 2010). Las sanguijuelas hematófagas han desarrollado características únicas a nivel morfológico, bioquímico, ecológico y celular dadas las características de su dieta.

En cuanto a características morfológicas, el buche en las especies hematófagas es muy flexible y está provisto de divertículos que funcionan como almacén de alimento a largo plazo. También se presenta una pared corporal fuerte que resiste el ensanchamiento del cuerpo. En especies que no se alimentan de sangre, el buche es un tubo muscular que aparentemente tritura los alimentos ingeridos. En el caso de las sanguijuelas hematófagas, el almacenamiento del alimento se lleva a cabo mediante la concentración de las células sanguíneas por eliminación del plasma y osmolitos a través de los nefridios. Estas características son importantes dado el hecho de que las sanguijuelas pueden ingerir hasta 8 veces su peso en sangre y pueden pasar períodos de entre 6 y 12 meses sin alimentarse (Sawyer, 1986; Brusca & Brusca, 2003).

Se ha establecido que las sanguijuelas hematófagas producen vasodilatadores, anestésicos y anticoagulantes como parte de sus secreciones salivares. Así pueden evitar la constricción de las venas y asegurar el flujo de sangre (Salzet, 2001). Entre los anticoagulantes destaca la hirudina, un péptido formado por 65 residuos de aminoácidos estabilizado por 3 puentes disulfuro que actúa como inhibidor de la trombina, proteína que cataliza la transformación del fibrinógeno en fibrina, entre otras reacciones que forman parte de la cascada de coagulación (Greinacher & Warkentin, 2008). La hirudina es probablemente el anticoagulante más poderoso conocido por la humanidad. De ahí la importancia médica del grupo, ya que tanto los compuestos aislados como los individuos completos son utilizados en algunos procesos quirúrgicos y tratamientos de reimplantación de órganos (Porshinsky *et al.*, 2011).

Se ha determinado que algunas sanguijuelas estrictamente hematófagas han establecido relaciones simbióticas con bacterias. La naturaleza de dichas relaciones ha comenzado a esclarecerse y se sabe que los simbioses bacterianos han jugado un papel crucial en la evolución y éxito alimenticio del grupo, así como ocurre en muchos organismos monófagos, con dietas no balanceadas y difíciles de digerir como lo son la savia, la madera y sangre (Manzano-Marín *et al.*, 2015).

Siddall *et al.* (2001) reconocieron que las sanguijuelas forman un clado anidado dentro de Oligochaeta junto con las familias Branchiobdellidae (Ocier, 1823), Acanthobdellidae (Grube, 1851) y Lumbriculidae (Vejdovský, 1884), dejando Oligochaeta como parafilético (Fig. 5) Según Sawyer (1986), dentro de la subclase Hirudinea se distinguen 2 órdenes: Rhynchobdellida (Blanchard, 1894) o sanguijuelas con proboscis muscular y Arhynchobdellida (Blanchard, 1894), que incluye a las sanguijuelas sin proboscis que, en cambio, pueden presentar mandíbulas o estiletos, o bien, presentar una faringe muscular sin ornamentaciones. Filogenias morfológicas han sugerido que los dos grupos son naturales (Siddal & Burreson, 1998), sin embargo, estudios de filogenia molecular señalan que el orden Rhynchobdellida es parafilético (Apakupakul *et al.*, 1999; Borda & Siddall, 2004).

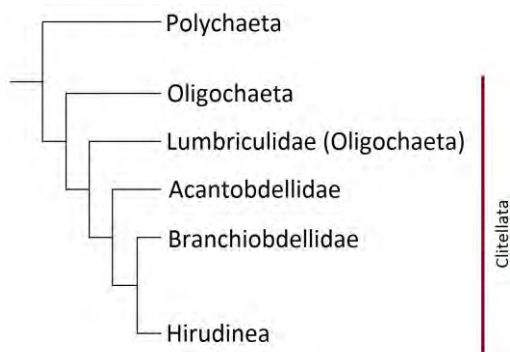


Fig. 5. Posición filogenética de Hirudinea.
Modificado de Siddall *et al.* (2001)

Hasta el momento han sido reportadas al menos 32 especies de sanguijuelas en México, las cuales pertenecen a 10 de las 14 familias propuestas (Oceguera-Figueroa & León-Règagnon, 2014; Salas-Montiel *et al.*, 2014). Han sido registradas en 28 entidades federativas del país, ya que Campeche, Baja California, Quintana Roo y Zacatecas no poseen reportes formales. De las especies conocidas, 21 están restringidas a México (Oceguera-Figueroa & León-Règagnon, 2014).

Códigos de barras genéticos.

La determinación taxonómica a nivel específico de los ejemplares biológicos es básica para el desarrollo de estudios en diferentes áreas de la Biología, tales como la Sistemática, la Ecología y los estudios evolutivos. La Taxonomía Molecular ha sido propuesta como una alternativa viable al problema del impedimento taxonómico, y uno de los ejemplos más exitosos ha sido el denominado “código de barras genético”, una herramienta auxiliar en el ejercicio taxonómico que facilita la diferenciación entre especies de organismos con base en regiones pequeñas del genoma (Hebert, 2003). La Taxonomía Molecular se trata de un complemento a la taxonomía basada en caracteres morfológicos y como una herramienta que puede arrojar luz en los siguientes casos:

- Cuando la plasticidad fenotípica de algunos caracteres puede conducir a determinaciones erróneas. Generalmente existe mayor diversidad fenotípica que genotípica al interior de un taxón (West-Eberhard, 1989).
- Ante la existencia de taxa que son muy complicados de diferenciar con base en su morfología, los cuales se encuentran homogéneamente distribuidos en todos los grupos taxonómicos y regiones biogeográficas (Bickford *et al.*, 2007; Pfenninger & Schwenk, 2007).
- Cuando existe la restricción de las claves taxonómicas a un estadio de desarrollo o sexo, que impide la determinación de algunos individuos.

La utilidad de las herramientas de la Taxonomía Molecular fue inicialmente estudiada en diferentes grupos de invertebrados donde las herramientas basadas en morfología se han considerado limitadas, como los lepidópteros (Brown *et al.*, 1999), los copépodos planctónicos (Bucklin *et al.*, 1999) y los onicóforos (Trewick, 2000). Sin embargo, la utilización de métodos moleculares en la Taxonomía se popularizó a partir de que Hebert (2003) acuñara el término “código de barras genético” con la propuesta de un marcador molecular que, en su opinión, posee la diversidad suficiente para permitir identificar a todos los taxa animales: el gen de la subunidad I de la enzima Citocromo C Oxidasa (COI o COX1). Se trata de un gen mitocondrial codificante, lo cual le confiere propiedades que facilitan el análisis de sus secuencias, como la ausencia de intrones (con la excepción del antozoo *Metridium senile*) y su elevada abundancia en las células.

Su alta conservación entre grupos taxonómicos y elevada tasa de mutación sinónima permiten su inclusión en análisis genéticos incluso entre especies cercanas (Saccone *et al.*, 1999). El 98% de los pares de especies congénicas analizados por Hebert *et al.* (2003b) poseen más del 2% de divergencia entre sus secuencias para el gen COI, un porcentaje considerado suficiente para su distinción efectiva. La divergencia al interior de una especie suele ser menor al 1% (Avice, 2000). De este modo, parece que la tasa de evolución del gen COI es suficientemente alta para permitir una diferenciación entre especies cercanas y suficientemente baja para que las secuencias no tengan una variación significativa al interior de las especies. Además, existen iniciadores o “*primers*” que permiten la amplificación rutinaria y eficaz de un fragmento específico del gen COI para gran cantidad de taxa mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Folmer *et al.*, 1994).

Los códigos de barras genéticos resultan una herramienta útil para la identificación taxonómica de ejemplares biológicos incluso cuando su estadio de desarrollo o el hecho de no poseer un ejemplar completo impiden la aplicación de claves morfológicas; por ejemplo, a partir de semillas, plántulas, huevos y larvas. Igualmente, permite el análisis de muestras complejas tales como heces, contenidos digestivos y ejemplares dañados. Además, son una herramienta para el descubrimiento de biodiversidad, ya que la observación de un porcentaje de divergencia genética entre poblaciones mayor al esperado puede ser utilizada como indicio de la presencia de especies no reconocidas previamente (Avice, 2000; Hebert *et al.*, 2003b). Potencialmente, se puede evaluar la consistencia de los límites entre especies utilizados actualmente en Sistemática utilizando criterios basados en variabilidad genética (Avice, 2000). Permiten descubrir la presencia de especies invasoras, en peligro de extinción o reguladas, así como evaluar la identidad y pureza de productos biológicos como carnes, hierbas medicinales y suplementos alimenticios (Wong & Hanner, 2008; Chen *et al.*, 2010; Garduño-Montes de Oca *et al.*, En prensa). Asimismo, resultan útiles para estudios ecológicos relacionados con la evaluación de la composición de comunidades o de la dieta de especies animales (Avice, 2000; Pompanon *et al.*, 2012). El objetivo principal del desarrollo de los códigos de barras genéticos es la creación de una base de datos que almacene información suficiente de secuencias genómicas para permitir la asignación taxonómica de cualquier muestra biológica de la cual pueda extraerse DNA (Kress & Erickson, 2012).

De manera general, el proyecto del código de barras genético incluye dos elementos coordinados. Uno es el uso de los códigos de barras para determinar ejemplares biológicos, lo cual presupone que una muestra igual o similar está previamente disponible en la base de datos, y otro es la conformación de la base de datos que será usada para realizar subsecuentes determinaciones. Es en la segunda en la que los taxónomos y expertos de los distintos grupos juegan un papel fundamental. Resultaría favorable que cada descripción de una especie, además de estar ligada a ejemplares tipo en colecciones y museos, también tuviera una “secuencia tipo”

asignada (Kress & Erickson, 2012; Kvist, 2013). La consolidación de la base de datos del código genético parte de un esfuerzo colectivo por parte de alrededor de 200 organizaciones de 50 países que conforman el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (Consortium for the Barcode of Life, CBoL), cuyos productos son depositados en el Sistema de Datos del Código de Barras de la Vida (Barcode of Life Data System, BoLD Systems) (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Una vez existente la base de datos de códigos de barras genéticos, es posible determinar taxonómicamente cualquier secuencia proveniente de una muestra biológica. Esto se consigue mediante la obtención de su secuencia del código de barras y la comparación de la misma con las publicadas en la base de datos, generalmente mediante un algoritmo de alineamiento de secuencias que evalúa la distancia entre las mismas y devuelve como resultado la secuencia de la base de datos más cercana a la de la muestra. GenBank proporciona un algoritmo de ese tipo en la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que busca correspondencia entre una secuencia problema y las disponibles en su biblioteca (Altschul *et al.*, 1990). BoLD Systems posee igualmente una interfaz en línea para ingresar datos de secuencias del código de barras y compararlos con las disponibles en la base de datos (Ratnasingham & Hebert, 2007). También es común la construcción de filogramas mediante el método de Neighbour Joining y el uso de distancias genéticas, ambos utilizando el modelo de sustitución de Kimura-2-Parámetros, el cuál considera que las tasas de ocurrencia de transversiones y transiciones son diferentes y asume que las 4 frecuencias nucleotídicas son iguales y que las tasas de sustitución no tienen variación entre sitios (Kress & Erickson, 2012; Kimura, 1980).

La discusión actual sobre este tema gira de forma importante en torno a los mejores marcadores moleculares, así como los criterios para el análisis de datos y tecnologías que deben emplearse. Por ejemplo, se ha dicho ampliamente que la información genética no puede por sí misma dar sustento a la proposición de nuevas especies y que la creencia de lo mismo es una demeritación del trabajo taxonómico clásico. También se argumenta que las diferencias en las tasas de mutación en diferentes linajes animales hacen que el método no pueda ser estandarizado para todos los taxa, ya que algunos parecen presentar una alta variación intraespecífica en el gen COI, haciendo complicada la asignación taxonómica mediante secuencias de este gen. Por otro lado, en grupos como Porifera y Anthozoa las secuencias evolucionan lentamente, haciendo que especies cercanas no presenten divergencia genética. Además, se ha considerado infundamentada la utilización del modelo de sustitución K2P para secuencias del gen COI. Asimismo, se ha expresado que el utilizar métodos basados en distancias genéticas (Neighbor Joining) en lugar de métodos basados en caracteres (Parsimonia o Máxima Verosimilitud) es inadecuado, ya que no otorga caracteres diagnósticos que permitan la descripción de especies (DeSalle *et al.*, 2005; Roe & Sperling, 2007; Huang *et al.*, 2008; Ebach & Carvalho, 2010; Srivathsan & Meier, 2012; Dupuis *et al.*, 2012).

En medio de un amplio debate que analiza los detalles e implicaciones del método propuesto por Hebert (2003), se han producido una enorme cantidad de publicaciones que lo aplican para la evaluación de la diversidad en diversos phyla animales e incluso se han elaborado propuestas con diferentes marcadores moleculares para la adaptación del método a grupos de plantas vasculares, briofitas, hongos, protistas y procariontes (Kress & Erickson, 2007; Liu *et al.*, 2010; Links *et al.*, 2012; Pawlowski *et al.*, 2012; Schoch *et al.*, 2012).

La Cuenca de México, su diversidad faunística y su historia hidrológica.

El presente estudio se enfoca en las sanguijuelas que habitan un sistema de cuerpos dulceacuícolas en el centro de México: la Cuenca de México. Los ecosistemas dulceacuícolas son escenarios interesantes desde el punto de vista evolutivo. Por un lado, los factores abióticos (físicos y químicos) presentes en sus aguas son mucho más diversos que los presentes en sistemas marinos, lo que influye en gran medida en la dinámica y composición de las comunidades que los habitan. Por ejemplo, el pH en diferentes cuerpos de agua dulce ocupa un rango entre 2 y 14. Otros factores muy variables incluyen la morfología del cuerpo de agua, las condiciones del sedimento, concentración de nutrientes, disponibilidad de luz y temperatura. Incluyen aguas tanto lólicas como lénticas, así como perennes y efímeras (Townsend *et al.*, 1983; Gray, 1988; Brönmark & Hansson, 2005). Esta diversidad de factores hace que la biota difiera mucho entre cuerpos de agua aun cuando estos puedan estar geográficamente próximos. En general, la biota dulceacuícola es derivada de la marina y terrestre. Hutchinson (1967) propone 4 rutas evolutivas para explicar su origen:

- 1) Invasión por parte de organismos marinos con tolerancia a bajas salinidades.
- 2) Aislamiento de hábitats de agua salada que perdieron salinidad con el tiempo.
- 3) Invasión por parte de organismos terrestres (por ejemplo, las plantas vasculares y los artrópodos).
- 4) Radiación adaptativa dentro del cuerpo dulceacuícola.

No existe ningún grupo taxonómico a nivel de phylum o clase que sea exclusivo de ambientes dulceacuícolas (Hutchinson, 1967). De manera general, es muy poco el flujo génico que existe entre las poblaciones de una misma especie de agua dulce, ya que la dispersión entre ellos representa un desafío importante (Bilton *et al.*, 2001)

La Cuenca de México es un sistema endorreico, con un desagüe artificial en la parte norte (el Gran Canal de Desagüe de la Ciudad de México) cuya construcción se desarrolló entre 1865 y 1900. Se encuentra embebida entre montañas, con los volcanes Popocatepetl e Iztaccíhuatl al este, la Sierra Chichinautzin y del Ajusco al sur, la Sierra de las Cruces y Sierra Monte al este y la Sierra de Tepotzotlán-Tezontlalpan, Pachuca, Chiconautla y Tepozán al Norte. Su área

aproximada es de 9,600 km² y engloba parte de la Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla (Gutiérrez de MacGregor *et al.*, 2005; Bojórquez-Tapia *et al.*, 2009). Su origen está relacionado con la actividad volcánica del Eje Neovolcánico Transversal. Un sistema fluvial que originalmente se drenaba hacia el sur, desde los ríos Cuautla y Cuernavaca hasta el río Amacuzac, se vio cerrado por la aparición de la Sierra del Chichinautzin hace unos 700 mil años (Cserna *et al.*, 1988). Sucesivos eventos volcánicos moldearon un sistema de lagos interconectados cuya cobertura llegó a ser de unos 1500 km² antes del apogeo del Imperio Azteca (100 DC) (Mazari & Mackay, 1993) (Fig. 6). Se divide, según las características de su relieve, en 4 regiones, que siguen el descenso de las aguas desde las sierras del norte: la región montañosa, el piedemonte, las planicies proluviales lacustres y la planicie lacustre (Gutiérrez de MacGregor *et al.*, 2005).



Fig. 6 La cuenca de México en el Cuaternario Superior (Moser, 1975)

La Cuenca de México ha sido ampliamente modificada por la intervención humana. En la época prehispánica existieron en ella importantes asentamientos, que ocuparon la región de las planicies y el piedemonte debido a su alta disponibilidad de agua y recursos alimentarios (Gutiérrez de MacGregor *et al.*, 2005). El poblado más antiguo fue Cuicuilco, en el suroeste, que existió entre el 650 a.C. y el 200 d.C. y desapareció con las explosiones del volcán Xitle, entre el 100 y el 400 d.C. Se ha propuesto que los habitantes sobrevivientes emigraron al Norte y habitaron la ciudad de Teotihuacán. En el año 1325 d.C., en un islote del Lago de Texcoco, fue fundada la ciudad de México-Tenochtitlán, la más importante tras la caída de Teotihuacán. Sus habitantes, los mexicas, formaron asentamientos asociados a 6 lagos interconectados: Chalco y Xochimilco al sur, Texcoco y México al centro y Zumpango y Xaltocan al norte. De estos lagos, en la actualidad subsisten únicamente el Lago de Texcoco y el de Xochimilco, pues el resto han sufrido

extracciones de agua, entubamientos y contaminación intensiva desde principios del siglo XX. El lago de Texcoco, durante la época lluviosa, recibía el drenaje de los otros 5, así como de las aguas subterráneas ricas en minerales y sales, de modo que su salinidad era incluso mayor que la del agua marina (Sosa-Rodríguez, 2010). Se trataba de un área rica en paisajes, que presentaba vegetación que incluía bosques de oyamel, pino-encino, matorrales xerófilos, pastizales y, por supuesto, vegetación halófila en la parte central. La fauna original de este ahora incipiente conjunto de lagos ha sido ampliamente descrita (Niederberger, 1979; Halffter & Reyes-Castillo, 1975; Rabiela, 1985). Era albergue para unas 67 especies de aves, en su mayoría migratorias, 9 de anfibios (entre los que destaca el ajolote endémico a la región, *Ambystoma mexicanum*, otras 4 especies de ajolotes y 4 de ranas), 7 de ofidios, 3 de quelonios y 87 de mamíferos. Se han reportado peces de 3 familias (Atherinidae, Goodeidae y Cyprinidae), así como la presencia de crustáceos como el acocil (*Cambarellus montezumae*), bivalvos (*Anodonta impura*, *Sphaerium subtransversum* y *Valvata humeralis*), gastrópodos (*Physa*, *Planorbella*, *Limnea* y *Succinea*) e insectos acuáticos (Diptera, Odonata, Hemiptera, etc.) (Alcocer-Durand & Escobar-Briones, 2010; Niederberger, 1979; Contreras, 1930).

Oceguera-Figueroa & León-Règagnon (2014) realizaron una lista de especies de sanguijuelas registradas en México en donde mencionan 11 especies con distribución en el área de la Cuenca de México, las cuales pertenecen a 5 familias, enlistadas en el Cuadro 1. Todas las especies, a excepción de *Diestecostoma mexicanum* poseen hábitos dulceacuícolas.

Cuadro 1. Especies de sanguijuelas reportadas para la Cuenca de México (Oceguera-Figueroa & León-Règagnon, 2014)

Familia	Especie
Erpobdellidae	<i>Erpobdella mexicana</i> Dugés 1872
	<i>Erpobdella ochoterenai</i> Caballero 1932
Glossiphonidae	<i>Haementheria officinalis</i> de Filippi 1849

	<i>Helobdella atli</i> Ocegüera-Figueroa & León-Régagnon 2005
	<i>Helobdella socimulcensis</i> Caballero 1931
	<i>Helobdella elongata</i> Castle 1900
	<i>Helobdella octatestisaca</i> Lai & Chang, 2009
	<i>Placobdella lamothei</i> Ocegüera-Figueroa & Siddall, 2008
Haemopidae	<i>Haemopsis caballeroi</i> Richardson 1971
Hirudinidae	<i>Limnobdella mexicana</i> Blanchard 1893
Xerobdellidae	<i>Diestecostoma mexicanum</i> Baird 1869

La alteración del sistema hidrológico de la cuenca comenzó con la construcción de diques, drenajes y acueductos a manos de los mexicanos para regular los niveles del agua y contrarrestar inundaciones. También desarrollaron chinampas: acumulaciones de fango rodeadas por plantas acuáticas que son utilizadas con fines agrícolas. Durante la Colonia (1521-1810), el mal manejo del agua potable y aguas negras generaba condiciones insalubres para la población. Ocurrieron una serie de inundaciones que devastaron severamente la ciudad en repetidas ocasiones, por lo cual fue decidida la desecación artificial de los lagos como solución. De este modo, a partir del Porfiriato (finales del siglo XVII y principios del XVIII) y hasta el siglo XX, se realizaron obras para drenar el agua de los lagos, la última y más importante siendo la construcción de la Red de Drenaje Profundo. Para atacar la escasez del líquido, comenzaron a explotarse recursos subterráneos. Esta combinación de decisiones desencadenó la desecación extrema de cuerpos dulceacuícolas de la ciudad (Fig.7), así como el paulatino hundimiento de la misma (Sosa-Rodríguez *et al.*, 2010).

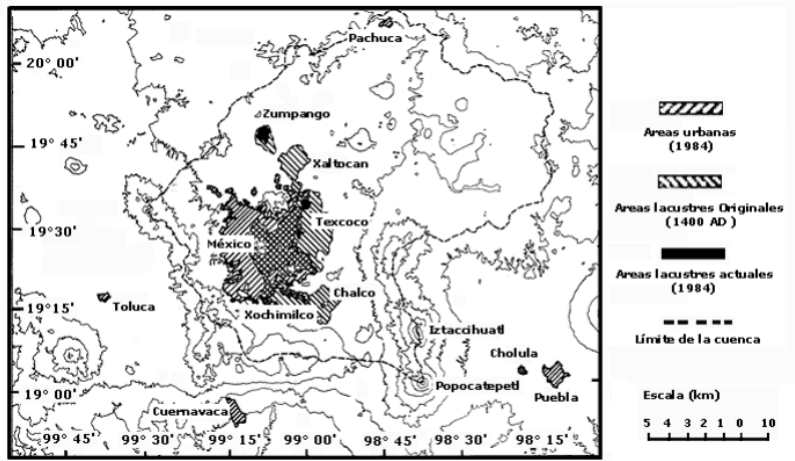


Fig. 7. Cuerpos de agua dulce de la Cuenca de México en 1984 y comparación con su extensión original (Niedrenberg, 1987)

La alta variación abiótica inherente a los cuerpos dulceacuícolas, así como la complicada historia hidrológica de la cuenca, hacen de ella un caso de estudio interesante para analizar el efecto potencial que sus transformaciones (principalmente de los últimos siglos) han tenido en la historia evolutiva de los organismos que la habitan. En el presente estudio se analizan molecularmente, empleando secuencias de la COI y los métodos del código de barras genético, las poblaciones de 6 especies de sanguijuelas que habitan la Cuenca de México, con base en el material colectado en 5 localidades. Además, se incluye una breve caracterización morfológica de cada una de las especies estudiadas.

ANTECEDENTES.

Los métodos del código de barras genético han sido aplicados a la resolución de problemas taxonómicos en el estudio de las sanguijuelas, tales como el descubrimiento de complejos de especies y el reporte de especies invasoras.

Oceguera-Figueroa *et al.* (2011) reportaron una amplia diversidad genética entre las poblaciones mexicanas de las especies del género *Helobdella*, descubriendo una población especialmente divergente en el municipio de Temixco, Morelos asignada originalmente a la especie cosmopolita *Helobdella stagnalis* y posteriormente propuesta como la especie nueva *Helobdella temiscoensis* por Salas-Montiel *et al.* (2014) con base en caracteres morfológicos y moleculares. Por otro lado, también reconocen que las especies nombradas como *Helobdella conchata*, *Helobdella socimulcensis* y *Helobdella moorei*, de morfologías similares, forman en realidad parte de un mismo linaje, quedando las tres unificadas bajo el nombre de *Helobdella socimulcensis*.

La sanguijuela sudamericana *Helobdella europaea* ha sido reportada como introducida en Alemania, Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Hawaii, gracias a análisis utilizando los métodos del código de barras genético (Siddall & Budinoff, 2005; Kutschera, 2004). Es también el caso de *Barbronia weberi*, perteneciente a la familia Salifidae, nativa de Asia y cuya introducción ha sido reportada en Nueva Zelanda, Australia, Inglaterra, Alemania, Italia, Brasil, Estados Unidos, Costa Rica, México y Sudáfrica (Genoni & Fazzone, 2008; Oceguera-Figueroa *et al.*, 2011; Garduño-Montes de Oca *et al.*, En prensa).

Siddall *et al.* (2007) descubrieron mediante análisis de secuencias del gen COI que las sanguijuelas comercializadas en varios países bajo el nombre de *Hirudo medicinalis* para su utilización en tratamientos médicos y estudios bioquímicos pertenecen en realidad a la especie *Hirudo verbana*.

OBJETIVOS.

Objetivo General

Establecer la utilidad del código de barras genético para la determinación de especies de sanguijuelas en la Cuenca de México.

Objetivos Particulares

- Determinar las especies de sanguijuelas presentes en la Cuenca de México con base en su morfología.
- Obtener y publicar secuencias de código de barras para las especies de sanguijuelas distribuidas en la Cuenca de México.
- Determinar la divergencia genética entre poblaciones y usarla como indicador de posibles especies no descritas.
- Observar el efecto que la fragmentación de los cuerpos de agua ha tenido a nivel genético en las poblaciones de las especies de sanguijuelas estudiadas.

METODOLOGÍA

Recolecta de ejemplares.

Las sanguijuelas fueron recolectadas manualmente y mediante trampas cebadas con vísceras de res en 5 cuerpos dulceacuícolas ubicados dentro del área de la Cuenca de México durante el mes de octubre del 2015 (Fig. 8); las coordenadas de los sitios se presentan en el Cuadro 2. Todos los ejemplares fueron recolectados y transportados al laboratorio en recipientes de plástico. Cabe mencionar que en la localidad Fuentes Brotantes fueron recolectadas ootecas.

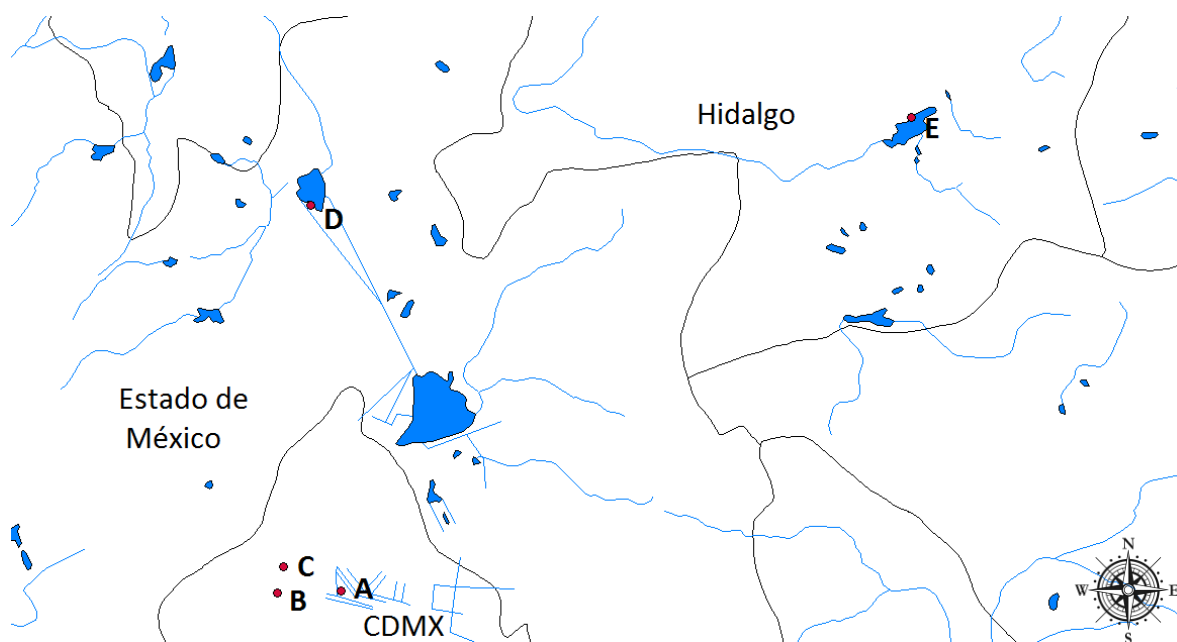


Fig. 8. Ubicación geográfica de los sitios de colecta. A. Embarcadero Cuemanco. B. Parque Nacional Fuentes Brotantes. C. Cantera Oriente. D. Lago de Zumpango. E. Lago de Tecocomulco.

Cuadro 2. Sitios de colecta de sanguijuelas para el presente estudio.

Sitio de colecta	Municipio y entidad federativa.	Coordenadas
Embarcadero Cuemanco, Xochimilco	Xochimilco, Ciudad de México	19.286980, -99.102137

Parque Nacional Fuentes Brotantes	Coyoacán, Ciudad de México	19.285244, -99.180724
Cantera Oriente	Coyoacán, Ciudad de México	19.317452, -99.172660
Lago de Zumpango	Zumpango, Estado de México	19.763901, -99.138969
Lago de Tecocomulco	Tepeapulco, Hidalgo	19.871632, -98.399010

Los ejemplares recolectados fueron transportados al laboratorio y narcotizados mediante la adición gradual de etanol al 96% con una pipeta en agua del medio, con el fin de que se conservasen totalmente extendidos y con los músculos relajados, lo que facilita la identificación morfológica. Una vez que los organismos cesaron sus movimientos, se retiró el exceso de mucus y fueron etiquetados y conservados en recipientes con alcohol al 96%.

Análisis morfológico.

Se observó la morfología externa de los organismos bajo el microscopio de disección, con el fin de identificar caracteres diagnósticos y asignarlos a una especie descrita, con la ayuda de claves taxonómicas y literatura especializada (Sawyer, 1986; Ringuelet, 1985)

Asimismo, se realizó la disección de ejemplares representativos de cada especie con el fin de observar su anatomía interna. Para esto, los ejemplares se sujetaron con alfileres entomológicos a una caja de Petri con una cama de cera y, bajo el microscopio de disección, se realizó un corte longitudinal en la parte dorsal del individuo. Posteriormente se retiró cuidadosamente el tejido conectivo que rodea a los órganos internos para su observación.

Ejemplares de referencia fueron depositados en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE) perteneciente al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Extracción de DNA, amplificación y secuenciación del gen COI.

En un ambiente estéril, se tomaron muestras de tejido de la ventosa posterior de las sanguijuelas. Se prefiere esta parte del cuerpo con el fin de minimizar la probabilidad de extraer DNA de los contenidos intestinales lo cual podría causar errores en la determinación molecular.

En el Laboratorio de Sistemática Molecular del Departamento de Zoología del Instituto de Biología de la UNAM, se llevó a cabo la digestión de cada una de las muestras de tejido, así como

la purificación de DNA, utilizando el protocolo del DNeasy Blood & Tissue Kit fabricado por QIAGEN®. Usando la muestra de DNA purificado de cada individuo, se amplificó un fragmento del gen de la subunidad I de la citocromo C oxidasa (COI) mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers universales diseñados por Folmer *et al.* (1994) LCO1490, 5' – GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG – 3' y HCO2198, 5' – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA – 3'.

Cada tubo de reacción contenía 0.12 µl de *Taq* polimerasa, 3 µl de buffer 5X, 0.2 µl de cada uno de los primers y 2 µl de DNA. Esto se llevó a un volumen total de 15 µl con agua estéril. La reacción de amplificación se realizó en una termocicladora Arktik™ Thermal Cycler (TermoFisher Scientific) siguiendo el siguiente perfil térmico: 2 minutos a 94°C seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 52°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto de PCR fue enviado al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología de la UNAM para la obtención de secuencias de DNA utilizando un secuenciador de capilares.

Edición, análisis de secuencias y alineamiento.

La edición de las secuencias se realizó de manera manual observando los electrofenogramas para cada una de las lecturas en el programa computacional Geneious 5.1.7 (Biomatters Ltd. Auckland, New Zealand). Cada una de las secuencias generadas fue inicialmente comparada mediante un análisis de BLAST (Alstchul *et al.*, 1990) con las secuencias disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, 03-feb-2016) y en BOLD Systems V3 (<http://www.boldsystems.org/>, 03-feb-2016) con el fin de obtener una determinación preliminar. Cada una de las secuencias fue asignada a una familia de sanguijuelas y con base en este resultado se ensamblaron matrices de datos, incluyendo las secuencias de la COI de los organismos recolectados y otros miembros de la misma familia cuyas secuencias estuviesen disponibles en GenBank (Cuadro 3). Esto con el fin de comparar las secuencias generadas en el presente trabajo con los registros previos. En total se ensamblaron 3 matrices, correspondientes a las familias Erpobdellidae (Blanchard, 1894), Glossiphoniidae (Vaillant, 1890) y Haemopidae (Richardson, 1969).

Cada una de las matrices fue alineada utilizando el programa MUSCLE (Edgar, 2004) mediante la interfaz disponible en línea (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), incluyendo grupos externos, los cuales fueron escogidos con base en estudios filogenéticos previos (Borda & Siddall, 2004; Ocegüera-Figueroa *et al.* 2011).

Las matrices generadas para cada familia de sanguijuelas estudiada poseen las características indicadas en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Datos de las secuencias utilizadas en los análisis

Familia Erpobdellidae

Especie	Localidad	Número de acceso de GenBank	Referencia
<i>Barbronia weberi</i>	Costa Rica	HQ336339	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2011)
<i>Erpobdella annulata</i>	Washington, EUA	HQ336345	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2011)
<i>Erpobdella montezuma</i>	Arizona, EUA	GQ368760	Phillips & Siddall (2009)
<i>Erpobdella punctata</i>	Ontario, Canadá	AF003275.1	Siddall & Burreson (1998)
<i>Erpobdella melanostoma</i>	Michigan, EUA	AF116025	Apakupakul, <i>et al.</i> (1999)
<i>Erpobdella bucera</i>	Michigan, EUA	AF116024	Apakupakul, <i>et al.</i> (1999)
<i>Erpobdella mexicana</i>	Guanajuato, México	DQ235597	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella mexicana</i>	Tlaxcala, México	DQ235601	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella mexicana</i>	Ciudad de México, México	DQ235595	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella ochoterenai</i>	Jalisco, México	DQ235599	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella ochoterenai</i>	Jalisco, México	DQ235600	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i>

			<i>al.</i> (2005)
<i>Erpobdella ochoterenai</i>	Tlaxcala, México	DQ235596	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella ochoterenai</i>	Xochimilco, México	DQ235603	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella triannulata</i>	Chiapas, México	HQ336347	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2011)
<i>Erpobdella triannulata</i>	Veracruz, México	DQ235602	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella triannulata</i>	Tabasco, México	DQ235604	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella triannulata</i>	Chiapas, México	HQ336347	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2011)
<i>Erpobdella bykowskii</i>	Eslovenia	DQ009667	Pfeiffer <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella haskonis</i>	Alemania	DQ009668	Pfeiffer <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella testacea</i>	Francia	AF116027.1	Apakupakul, <i>et al.</i> (1999)
<i>Erpobdella obscura</i>	Manitoba, Canadá	KM612244	Artículo no publicado
<i>Erpobdella octocolata</i>	Francia	AF003274	Siddall & Burreson (1998)
<i>Erpobdella octocolata</i>	Uzbekistán	HQ336344	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2011)
<i>Erpobdella monostriata</i>	Alemania	DQ009665	Pfeiffer <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella nigricollis</i>	Alemania	DQ009664	Pfeiffer <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella japonica</i>	Corea	AF116026	Apakupakul, <i>et al.</i>

			(1999)
<i>Erpobdella vilnesis</i>	Alemania	DQ009663	Pfeiffer <i>et al.</i> (2005)
<i>Erpobdella dubia</i>	Michigan, EUA	AF116023	Apakupakul, <i>et al.</i> (1999)

Familia Glossiphonidae

Especie	Localidad	Número de acceso de GenBank	Referencia
<i>Haementeria acuecuyetzin</i>	Veracruz, México	JN850899	Oceguera-Figueroa (2012)
<i>Helobdella michaelsoni</i>	Chile	AF536824	Siddall & Borda (2003)
<i>Helobdella stagnalis</i>	Reino Unido	AF329041	Siddall & Borda (2003)
<i>Helobdella temiscoensis</i>	Morelos, México	HQ179862	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella temiscoensis</i>	Morelos, México	HQ179861	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella elongata</i>	Michigan, EUA	AF329045	Siddall & Borda (2003)
<i>Helobdella elongata</i>	Jalisco, México	HQ179863	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> , 2010
<i>Helobdella fusca</i>	Michigan, EUA	AF329038	Siddall & Borda (2003)
<i>Helobdella triserialis</i>	Bolivia	AF329054	Siddall & Borda (2003)

<i>Helobdella europaea</i>	Australia	AY856047	Siddall & Budinoff (2005)
<i>Helobdella europaea</i>	Nueva Zelanda	AY856049	Siddall & Budinoff (2005)
<i>Helobdella europaea</i>	Taiwán	FJ000350	Yi-Te Lai & Chen (2009)
<i>Helobdella europaea</i>	Taiwán	FJ000351	Yi-Te Lai & Chen (2009)
<i>Helobdella europaea</i>	Sudáfrica	AY856048	Siddall & Budinoff (2005)
<i>Helobdella socimulcensis</i>	Jalisco, México	HQ179866	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella socimulcensis</i>	California, EUA	DQ995303	Bely & Weisblat (2006)
<i>Helobdella socimulcensis</i>	Xochimilco, México	DQ995311	Bely & Weisblat (2006)
<i>Helobdella socimulcensis</i>	Guanajuato, México	HQ179867	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella socimulcensis</i>	Querétaro, México	HQ179868	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella socimulcensis</i>	Morelos, México	HQ179871	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella socimulcensis</i>	Guanajuato, México	HQ179870	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella socimulcensis</i>	Morelos, México	HQ179871	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)

<i>Helobdella socimulcensis</i>	Hidalgo, México	HQ179869	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella octatestisaca</i>	Taiwán	FJ000342	Yi-Te Lai & Chen (2009)
<i>Helobdella octatestisaca</i>	Taiwán	FJ000343	Yi-Te Lai & Chen (2009)
<i>Helobdella octatestisaca</i>	Sudáfrica	HQ179860	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella octatestisaca</i>	Guanajuato, México	HQ179858	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella octatestisaca</i>	Tabasco, México	HQ179859	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella octatestisaca</i>	Querétaro, México	HQ179855	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella octatestisaca</i>	Hidalgo, México	HQ179857	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella nununununojensis</i>	Bolivia	AF329048	Siddall & Borda (2003)
<i>Helobdella sorojchi</i>	Bolivia	AF329050	Siddall & Borda (2003)
<i>Helobdella paranensis</i>	Uruguay	AF329037	Siddall & Borda (2003)
<i>Helobdella pichipanan</i>	Chile	AY962456	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella bolivianita</i>	Bolivia	AF329053	Siddall & Borda (2003)
<i>Helobdella atli</i>	Puebla, México	HQ179850	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)

<i>Helobdella atli</i>	Tlaxcala, México	HQ179851	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)
<i>Helobdella atli</i>	Xochimilco, México	HQ179852	Oceguera-Figueroa <i>et al.</i> (2010)

Familia Haemopidae

Especie	Localidad	Número de acceso de GenBank	Referencia
<i>Hirudo verbana</i>	Turquía	KT692947	Artículo no publicado
<i>Haemopsis marmorata</i>	New Jersey, EUA	FJ897515	Wirchansky & Shain (2010).
<i>Haemopsis terrestris</i>	Missouri, EUA	FJ897514	Wirchansky & Shain (2010).
<i>Haemopsis kingi</i>	Alberta, Canadá	KM612231	Artículo no publicado
<i>Haemopsis sanguisuga</i>	Serbia	KP663470	Živić, <i>et al.</i> (2015)
<i>Haemopsis caeca</i>	Sin datos	AY040702	Siddal, <i>et al.</i> (2001)

Cuadro 4. Características de las matrices de datos moleculares generadas en el presente estudio.

Familia	Número de terminales (Secuencias generadas en el presente trabajo entre paréntesis)	Longitud del alineamiento (número de nucleótidos)
Erpobdellidae	64 (36)	649
Glossiphonidae	56 (19)	614
Haemopidae	7 (1)	650

Análisis de agrupamiento

Las secuencias fueron analizadas mediante un análisis de vecinos más cercanos o Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) en el programa PAUP* 4.0 (Swofford, 2002). En el mismo programa se calcularon las distancias genéticas pareadas para cada una de las matrices con base en el modelo de sustitución de Kimura-2 parámetros (K2P).

Análisis filogenéticos

Se llevaron a cabo, para cada matriz, análisis bajo el enfoque de la parsimonia en el programa TNT (Goloboff, *et al.*, 2008), usando 20 réplicas para la adición aleatoria de taxones y el método de bisección y reconexión de árboles (Tree-bisection-regrafting, TBR) para el intercambio y re-enraizamiento de ramas. Se obtuvieron valores de bootstrap mediante 100 seudorréplicas de búsqueda tradicional.

Adicionalmente, se analizaron las matrices en busca del modelo de sustitución molecular que mejor se ajustase a los datos mediante la herramienta FindModel (Tao *et al.*, 2010) disponible en línea (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>), obteniendo como resultado el modelo GTR + Gamma para los 3 casos. Utilizando este modelo de sustitución, se realizaron análisis de Máxima Verosimilitud en el programa raxML (Stamatakis, 2006), utilizando 1000 réplicas de bootstrap. Una topología aleatoria fue usada como árbol de inicio y se calcularon valores de soporte mediante el algoritmo de Rapid Bootstrap (Stamatakis *et al.*, 2008).

RESULTADOS.

Análisis morfológico.

Los individuos colectados fueron identificados utilizando caracteres morfológicos, clasificándolos dentro de 3 familias, 3 géneros y 6 especies. El resumen de la taxonomía de las especies identificadas, así como las localidades en que fueron recolectadas, se presenta en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Taxonomía de las especies de sanguijuelas encontradas.

Familia	Género	Especie	Localidades en que fue recolectada
Erpobdellidae	<i>Erpobdella</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	Parque Nacional Fuentes Brotantes, Lago de Zumpango
		<i>Erpobdella ochoterenai</i>	Embarcadero Cuemanco, Cantera Oriente, Lago de Tecocomulco
Glossiphonidae	<i>Helobdella</i>	<i>Helobdella atli</i>	Parque Nacional Fuentes Brotantes, Cantera Oriente
		<i>Helobdella socimulcensis</i>	Embarcadero Cuemanco
		<i>Heobdella octatestisaca</i>	Embarcadero Cuemanco, Cantera Oriente, Lago de Tecocomulco
Haemopidae	<i>Haemopsis</i>	<i>Haemopsis caballeroi</i>	Embarcadero Cuemanco

A continuación se presenta una breve caracterización de las especies recolectadas, incluyendo caracteres diagnósticos.

Helobdella socimulcensis Caballero, 1931



Fig. 9. Vista dorsal de *Helobdella socimulcensis*.

Sitio de colecta: Embarcadero Cuemanco.

Localidad tipo: Xochimilco, Ciudad de México

Hábitat. Se encontró debajo de rocas en la orilla de los cuerpos de agua, así como entre las raíces de lirio y plantas acuáticas.

Morfología. El cuerpo tiene forma aplanada y lanceolada, siendo más angosto en la parte anterior. Posee un color pardo amarillento, con un patrón de bandas longitudinales en la parte dorsal, del que resaltan las 2 bandas centrales, que son más oscuras y se extienden desde las manchas oculares hasta la ventosa posterior (Fig. 9). En la mayoría de los casos existen dos, cuatro o seis líneas longitudinales laterales. Las manchas oculares son circulares y separadas entre sí. La región ventral carece de cualquier tipo de pigmentación. En cada somito se observan papilas cuadrangulares. El aparato digestivo inicia con una probóscis muscular y a los lados del esófago se observan abundantes glándulas salivales. El buche presenta 5 pares de ciegos laterales, el último par forma postciegos. El recto está formado por 4 proyecciones laterales digitiformes. Presenta 6 pares de testisacos, cada uno de los cuales se conecta a un conducto deferente de trayecto ascendente que conecta lateralmente a los cuernos atriales y posteriormente al gonoporo masculino localizado en XII a1/a2. Los ovarios son simples y tubulares y desembocan directamente en el gonoporo femenino localizado en XII a2/a3 .

Notas: Es liquidosomatófaga, se alimenta de fluidos y tejidos blandos de invertebrados, principalmente gastrópodos.

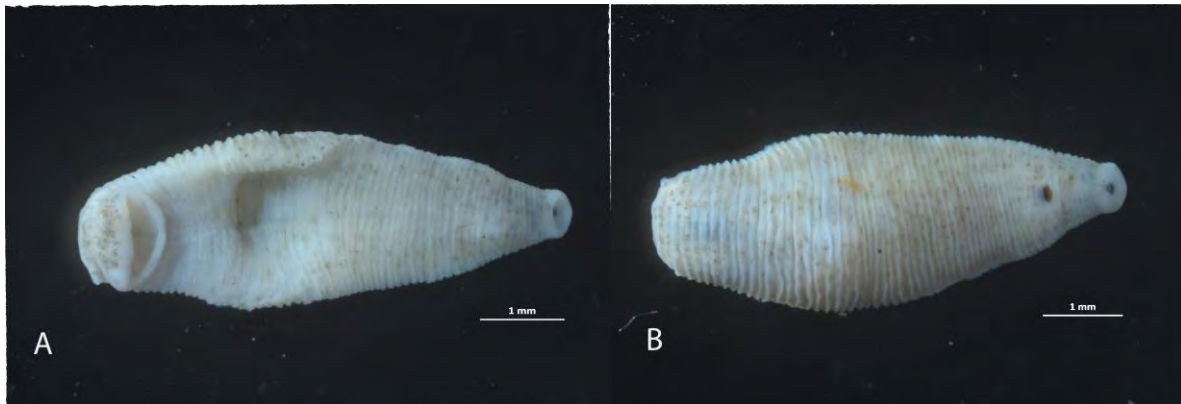


Fig. 10. Morfología externa de *Helobdella octatestisaca*. A. Vista ventral. B. Vista dorsal, donde se observa el escudo nucal y los ojos.

Sitios de recolecta: Cantera Oriente, Embarcadero Cuemanco, Tecocomulco

Localidad tipo: Taipei, Taiwán

Hábitat. Se halla debajo de rocas en la orilla de los cuerpos de agua, así como entre las raíces de plantas acuáticas.

Morfología. El cuerpo es aplanado y tiene forma lanceolada, siendo más angosto en la parte anterior. No posee patrones de pigmentación y las papilas son muy pequeñas. Presenta un escudo nucal quitinoso en VIII (Fig. 10). Un par de ojos triangulares, casi tocándose entre ellos. Presenta una probóscis muscular. Aparato digestivo con un buche que posee 6 pares de ciegos. Presenta 4 pares de testículos, cada uno de los cuales se conecta a un conducto deferente de trayecto ascendente que conecta lateralmente a los cuernos atriales y posteriormente al gonoporo masculino localizado en XII a1/a2. Presenta un par de ovarios simples y tubulares que desembocan en el gonoporo femenino localizado en XII a2/a3.

Notas: Es liquidosomatófaga, se alimenta de fluidos y tejidos blandos de invertebrados, principalmente gastrópodos.

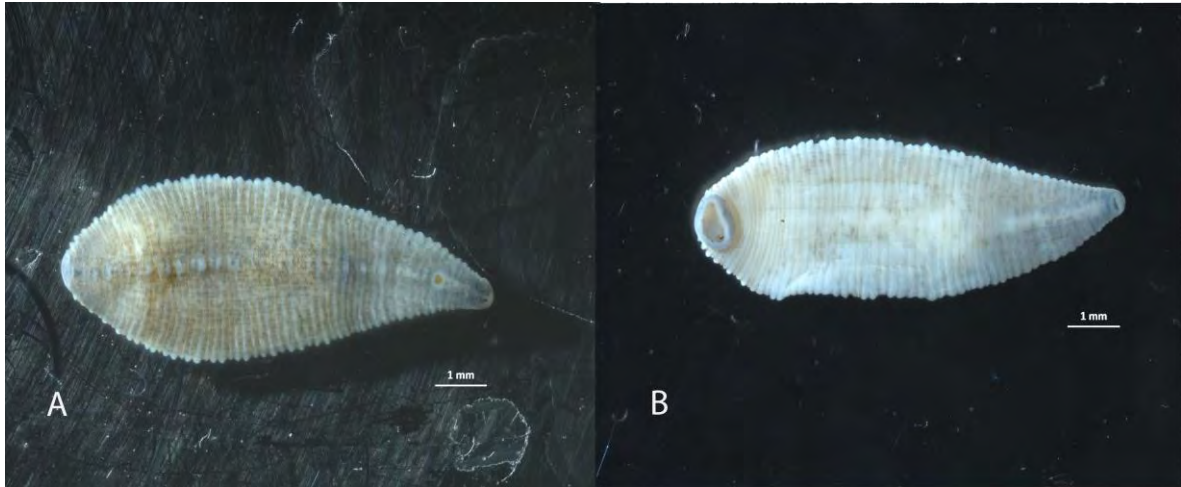


Fig. 10. Morfología externa de *Helobdella atli*. A. Vista dorsal, donde se observa el escudo nupal y los ojos. B. Vista ventral.

Sitios de colecta: Cantera Oriente, Fuentes Brotantes.

Localidad tipo: Totolcingo, Tlaxcala

Hábitat. Se halla debajo de rocas en la orilla de los cuerpos de agua, así como entre las raíces de plantas acuáticas.

Morfología. El cuerpo tiene forma lanceolada, siendo más angosto en la parte anterior. Presenta un escudo dorsal quitinoso. El segundo y tercer anillo de cada somito presenta una proyección lateral, de modo que el borde del cuerpo es aserrado. Presenta una línea central de papilas que se extiende longitudinalmente en todo el cuerpo (Fig. 10). Un par de ojos redondos y separados.. Presenta una probóscis muscular. El buche posee 6 pares de ciegos. Presenta 6 pares de testículos cada uno de los cuales se conecta a un conducto deferente de trayecto ascendente que desemboca lateralmente a los cuernos atriales y posteriormente al gonoporo masculino localizado en XII a1/a2. Con un par de ovarios simples y tubulares que desembocan en el gonoporo femenino localizado en XII a2/a3.

Notas: Es liquidosomatófaga, se alimenta de fluidos y tejidos blandos de invertebrados, principalmente gastrópodos.

Erpobdella mexicana Dugès, 1872

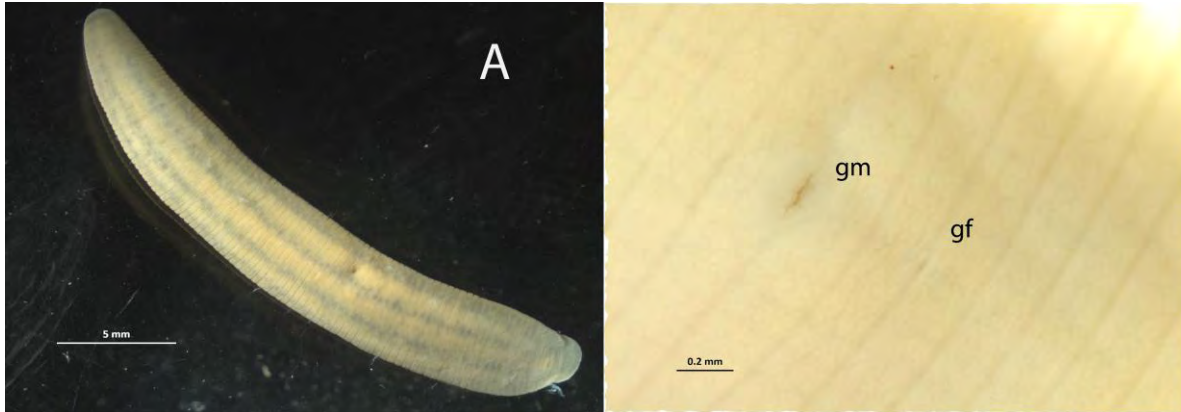


Fig. 11. Morfología externa de *Erpobdella mexicana*. A. Cuerpo completo, vista dorsal.

B. Detalle de los gonoporos (gm= gonoporo masculino, gf= gonoporo femenino).

Sitios de colecta: Fuentes Brotantes, Zumpango.

Localidad tipo: Presa de la Olla, Guanajuato, Guanajuato.

Hábitat. Puede hallarse debajo de rocas dentro de los cuerpos de agua, así como en raíces de plantas acuáticas, también se les puede capturar en movimiento.

Morfología. Cuerpo alargado y delgado, de color pardo rojizo a marrón claro, con dos pares de franjas longitudinales de color negro en la superficie dorsal (Fig. 11A). Presenta tres pares de ojos, uno labial y dos bucales. El aparato digestivo presenta una faringe larga y muscular, un buche tubular sin ningún tipo de ciegos y el recto es igualmente tubular. Los testisacros tienen forma de racimo, con ductos eyaculatorios que presentan una curva previa al cuerno atrial. Los cuernos atriales desembocan en el gonoporo masculino en XII a2/b5. Aparato reproductor femenino formado por un par de ovisacos laterales, los cuales presentan un brazo ascendente alrededor del somito XV y una porción descendente más desarrollada que termina juntando ambos ovisacos en la región media del cuerpo en el somito XVII. El gonoporo masculino es más grande que el femenino y se encuentran separados entre sí por dos anillos (Fig. 11B).

Notas. Son macrófagas, se alimentan de pequeños invertebrados e incluso presentan canibalismo.

Erpobdella ochoterenai Caballero, 1932

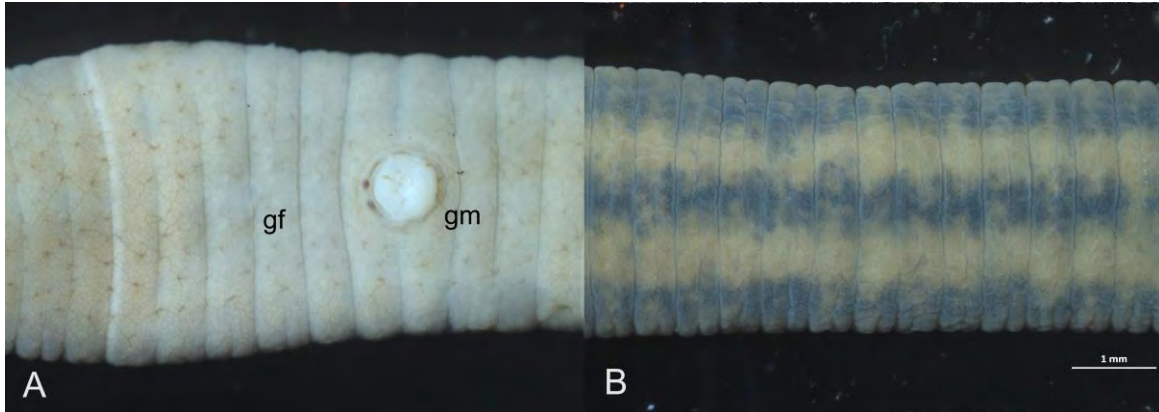


Fig. 12. Morfología externa de *Erpobdella ochoterenai* A. Detalle de los gonoporos (gf= gonoporo femenino, gm= gonoporo masculino). B. Patrón de pigmentación del dorso.

Sitio de recolecta: Tecocomulco.

Localidad tipo: Xochimilco, Ciudad de México, México.

Hábitat. Puede hallarse debajo de rocas dentro de los cuerpos de agua, así como en raíces de plantas acuáticas, también se les puede capturar en movimiento.

Morfología. Cuerpo alargado y delgado, de color pardo rojizo, ligeramente adelgazado en la región anterior, con una franja de color negro que atraviesa el dorso de forma longitudinal y en ocasiones, también dos franjas laterales (Fig. 12B). Se observan papilas amarillentas en cada anillo. Presenta tres pares de ojos, uno labial y dos bucales. El aparato digestivo presenta una faringe larga y muscular, un buche tubular sin ningún tipo de ciegos y el recto es igualmente tubular. Los testisacos tienen forma de racimo, con ductos eyaculatorios que conducen directamente al cuerno atrial, el cual desemboca en el gonoporo masculino en XII a2/b2, el cual se observa con forma marcada de disco o roseta. Los ovarios son simples y tubulares y desembocan en el gonoporo femenino, ubicado entre los somitos XII y XIII. La separación entre gonoporos es de 3 anillos o 3 anillos y medio (Fig. 12A).

Notas. Son macrófagas, se alimentan de pequeños invertebrados e incluso presentan canibalismo.

Haemopsis caballeroi Richardson (1971)

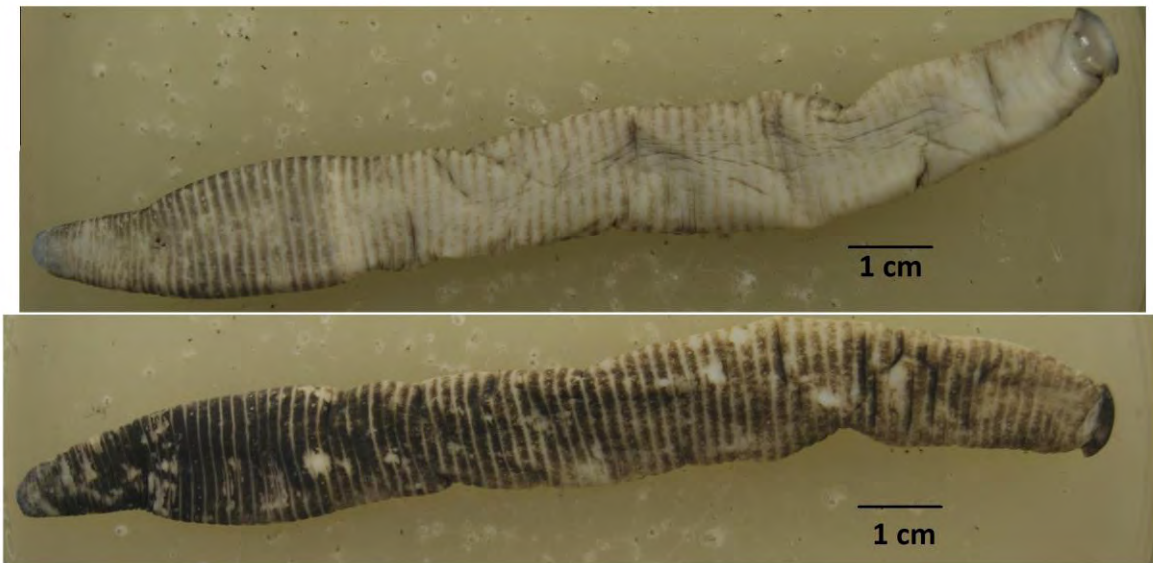


Fig. 13. Morfología externa de *Haemopsis caballeroi*. Arriba, vista ventral. Abajo, vista dorsal.

Sitio de colecta: Embarcadero Cuemanco

Localidad tipo: Xochimilco, Ciudad de México, México.

Hábitat. Puede hallarse debajo de rocas dentro de los cuerpos de agua, así como en raíces de plantas acuáticas y enterrada ligeramente en el sedimento de los bordes de los cuerpos de agua.

Morfología. Cuerpo robusto y alargado, con la parte media más ancha que el resto. Color negro, ligeramente más claro en la parte ventral (Fig. 13) y con manchas blancas en el dorso. 5 pares de ojos situados uno detrás del otro, estando el primero en el somito II y el último en el somito VI. Tres mandíbulas en la cavidad oral. Tracto digestivo con un par de postciegos. 10 pares de testisacos ovalados de los cuáles se prolongan anteriormente los conductos eferentes, que desembocan en el gonoporo masculino en XI. Posee un órgano copulador masculino. Los oviductos provenientes de los ovarios se fusionan en la vagina, que desemboca en el gonoporo femenino, en el somito XII.

Análisis molecular.

Asignación taxonómica mediante caracteres moleculares.

Al realizar búsquedas mediante las interfaces en línea de GenBank y Bold Systems, se consideró como resultado aquella secuencia que presentara una mayor identidad porcentual con cada una de las secuencias problema según el algoritmo que utiliza cada recurso. Los resultados de la asignación taxonómica de los individuos utilizando la secuencia de DNA de COI mediante la herramienta BLAST en GenBank, así como la base de datos de BOLD Systems son compatibles en un 86.8% de los casos cuando se comparan entre si. La identificación obtenida por ambos métodos es concordante con la obtenida por el análisis morfológico en un 69.8% de los casos. Para los ejemplares asignados morfológicamente y mediante BOLD Systems a la especie *Helobdella socimulcensis*, GenBank devuelve como la secuencia con mayor identidad una cuya asignación taxonómica sólo se llevó a cabo a nivel de género. Por otro lado, los individuos asignados morfológicamente a *Helobdella octatestisaca* encuentran una identidad mayor en ambas bases de datos con secuencias etiquetadas como *Helobdella stagnalis* obtenidas de ejemplares mexicanos, aun cuando hay secuencias publicadas bajo el nombre *Helobdella octatestisaca*. En el caso donde fue recolectada una ooteca en la localidad Fuentes Brotantes, la identificación morfológica a nivel de especie es imposible, dado el estadio de desarrollo de los organismos, sin embargo, los caracteres moleculares permiten asignarla a la especie *Erpobdella mexicana*, según ambas bases de datos. Los resultados completos de la asignación taxonómica mediante caracteres morfológicos y moleculares se presentan en el Cuadro 5. Todas las secuencias obtenidas en el presente estudio serán enviadas para su publicación en ambas bases de datos.

Cuadro 5. Asignación taxonómica de los ejemplares mediante morfología y dos bases de datos moleculares.

Número de individuo / Sitio de colecta	Morfología	GenBank	BOLD Systems
01 / Fuentes Brotantes	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
02 / Fuentes Brotantes	Ooteca de <i>Erpobdella</i> sp.	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>

03 / Fuentes Brotantes	<i>Helobdella atli</i>	<i>Helobdella atli</i>	<i>Helobdella atli</i>
05 / Cuemanco	<i>Haemopsis caballeroi</i>	<i>Haemopsis sp.</i>	<i>Haemopsis sp.</i>
06 / Cuemanco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
07 / Cuemanco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
08 / Cuemanco	<i>Helobdella octatetisaca</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>	Sin resultado
09 / Cuemanco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
10 / Cuemanco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
11 / Cuemanco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
12 / Cuemanco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
13 / Cuemanco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
14 / Cuemanco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
16 / Cuemanco	<i>Helobdella socimulcensis</i>	<i>Helobdella sp.</i>	<i>Helobdella socimulcensis</i>
17 / Cuemanco	<i>Helobdella socimulcensis</i>	<i>Helobdella sp.</i>	<i>Helobdella socimulcensis</i>

18 / Cuemanco	<i>Helobdella socimulcensis</i>	<i>Helobdella</i> sp.	<i>Helobdella socimulcensis</i>
19 / Cuemanco	<i>Helobdella socimulcensis</i>	<i>Helobdella</i> sp.	<i>Helobdella socimulcensis</i>
21 / Cuemanco	<i>Helobdella octatestisaca</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>
22 / Cuemanco	<i>Helobdella octatestisaca</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>
23 / Cuemanco	<i>Helobdella octatestisaca</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>
25 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
26 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
27 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
28 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
29 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
30 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
31 / Cantera	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
32 / Cantera	<i>Erpobdella</i>	<i>Erpobdella</i>	<i>Erpobdella</i>

	<i>ochoterenai</i>	<i>ochoterenai</i>	<i>ochoterenai</i>
33 / Cantera	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
34 / Cantera	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
35 / Cantera	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
36 / Cantera	<i>Helobdella atli</i>	<i>Helobdella atli</i>	<i>Helobdella atli</i>
37 / Cantera	<i>Helobdella atli</i>	<i>Helobdella atli</i>	<i>Helobdella atli</i>
38 / Cantera	<i>Helobdella atli</i>	<i>Helobdella atli</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>
39 / Cantera	<i>Helobdella octatestisaca</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>
40 / Cantera	<i>Helobdella octatestisaca</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>
42 / Tecocomulco	<i>Helobdella octatestisaca</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>
43 / Tecocomulco	<i>Helobdella octatestisaca</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>
44 / Tecocomulco	<i>Helobdella octatestisaca</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>	<i>Helobdella stagnalis</i>
45 / Tecocomulco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
47 /	<i>Erpobdella</i>	<i>Erpobdella</i>	<i>Erpobdella</i>

Tecocomulco	<i>ochoterenai</i>	<i>ochoterenai</i>	<i>ochoterenai</i>
48 / Tecocomulco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
49 / Tecocomulco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
50 / Tecocomulco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
51 / Tecocomulco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
52 /Tecocomulco	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>	<i>Erpobdella ochoterenai</i>
53 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
54 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
55 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
56 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
57 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
58 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>
59 / Zumpango	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>	<i>Erpobdella mexicana</i>

Para la familia Haemopidae, la especie colectada en el presente estudio corresponde a *Haemopsis caballeroi*, colectado en la localidad tipo (Xochimilco). Al no haber otras secuencias publicadas para esta especie, se integraron a la matriz todas las secuencias de código de barras pertenecientes al género con una asignación taxonómica a nivel de especie disponibles en GenBank. Es así que el presente estudio genera la primera secuencia de código de barras para *Haemopsis caballeroi*.

Análisis Molecular

Familia Erpobdellidae

En la Fig.14 se muestran la topología obtenida por el método de Neighbor Joining para los ejemplares de la familia Erpobdellidae, así como algunos valores de distancia genética promedio entre y dentro de los *clusters* o agrupamientos. Las secuencias de *Erpobdella mexicana* de la Cuenca de México forman un *cluster* que incluye también la secuencia de Tlaxcala, dentro del cual hay una baja distancia genética (<1%). Por otro lado, las secuencias asignadas a *Erpobdella ochoterenai*, se agrupan en varios *clusters*, uno que incluye las secuencias obtenidas de ejemplares de Tecocomulco, Hidalgo y otro que agrupa a los pertenecientes al resto de la cuenca (Cuemanco y Cantera). Las secuencias de Jalisco forman un *cluster* cercano a las de Tecocomulco, las cuáles se ubican en un cluster que también incluye una secuencia de Tlaxcala, mientras que la de Xochimilco se agrupa con las de Cuemanco y Cantera. La divergencia genética al interior del *cluster* que contiene los ejemplares de Tecocomulco es de 4.87%, mientras que en el que contiene los ejemplares del resto de la Cuenca es <1%. La distancia genética promedio entre estos dos *clusters* es de 9.78%.

En la Fig. 15 se presenta el consenso estricto con valores de soporte de ramas obtenidos mediante bootstrap (mayores a 75) de 20 árboles más parsimoniosos encontrados por el programa, cada uno con una longitud de 1240 pasos. En la Fig. 16 se muestra el árbol con el mayor puntaje en la inferencia mediante el método de Máxima Verosimilitud. En ambos casos, todas las secuencias obtenidas en este estudio forman clados con valores de soporte altos junto con sus conespecíficas.

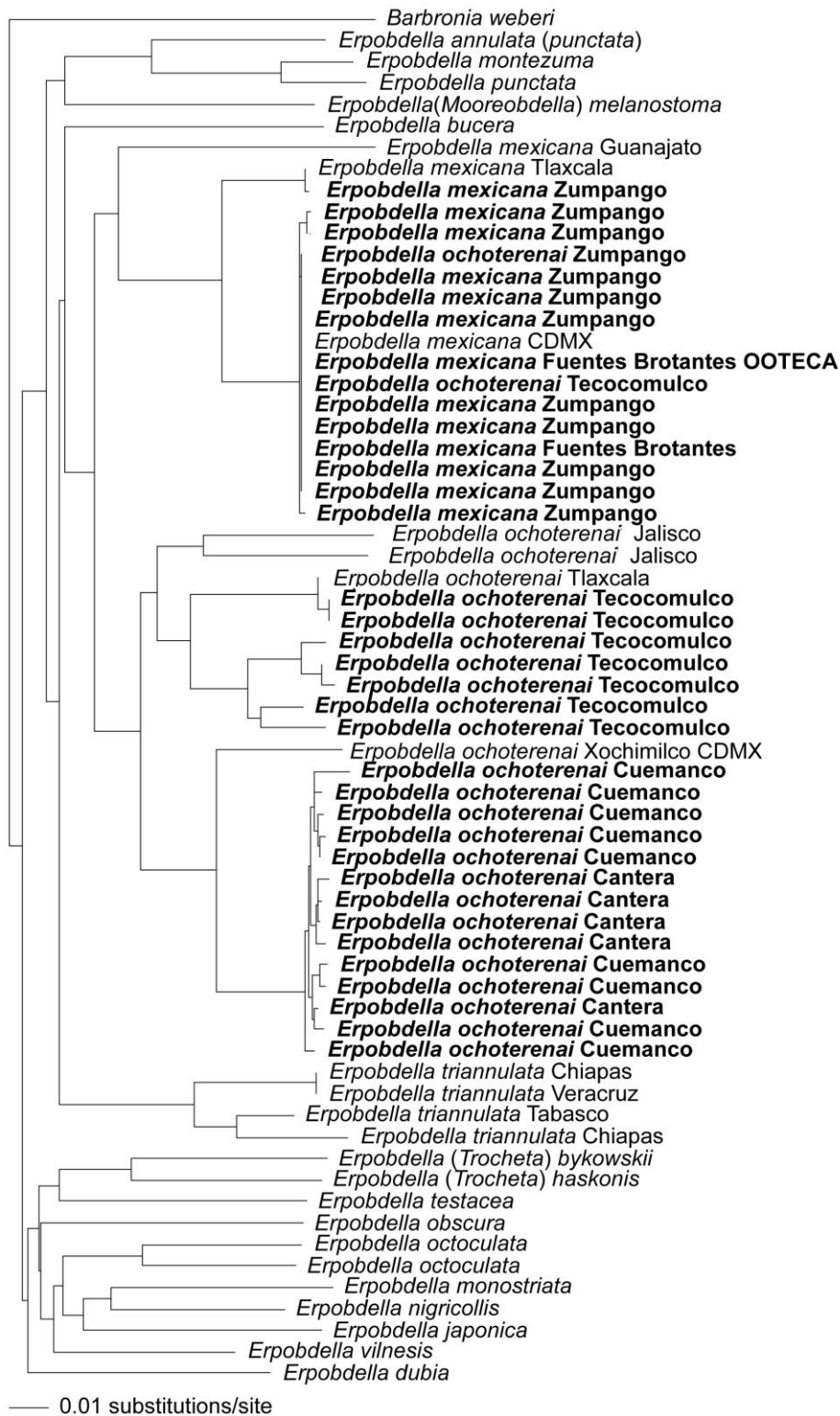


Fig. 14. Filograma obtenido mediante el método de agrupamiento de Neighbor Joining. Las terminales en negritas pertenecen a individuos recolectados en el presente estudio.



Fig. 15. Consenso estricto de 20 árboles más parsimoniosos para la familia Erpobdellidae con valores de bootstrap >75

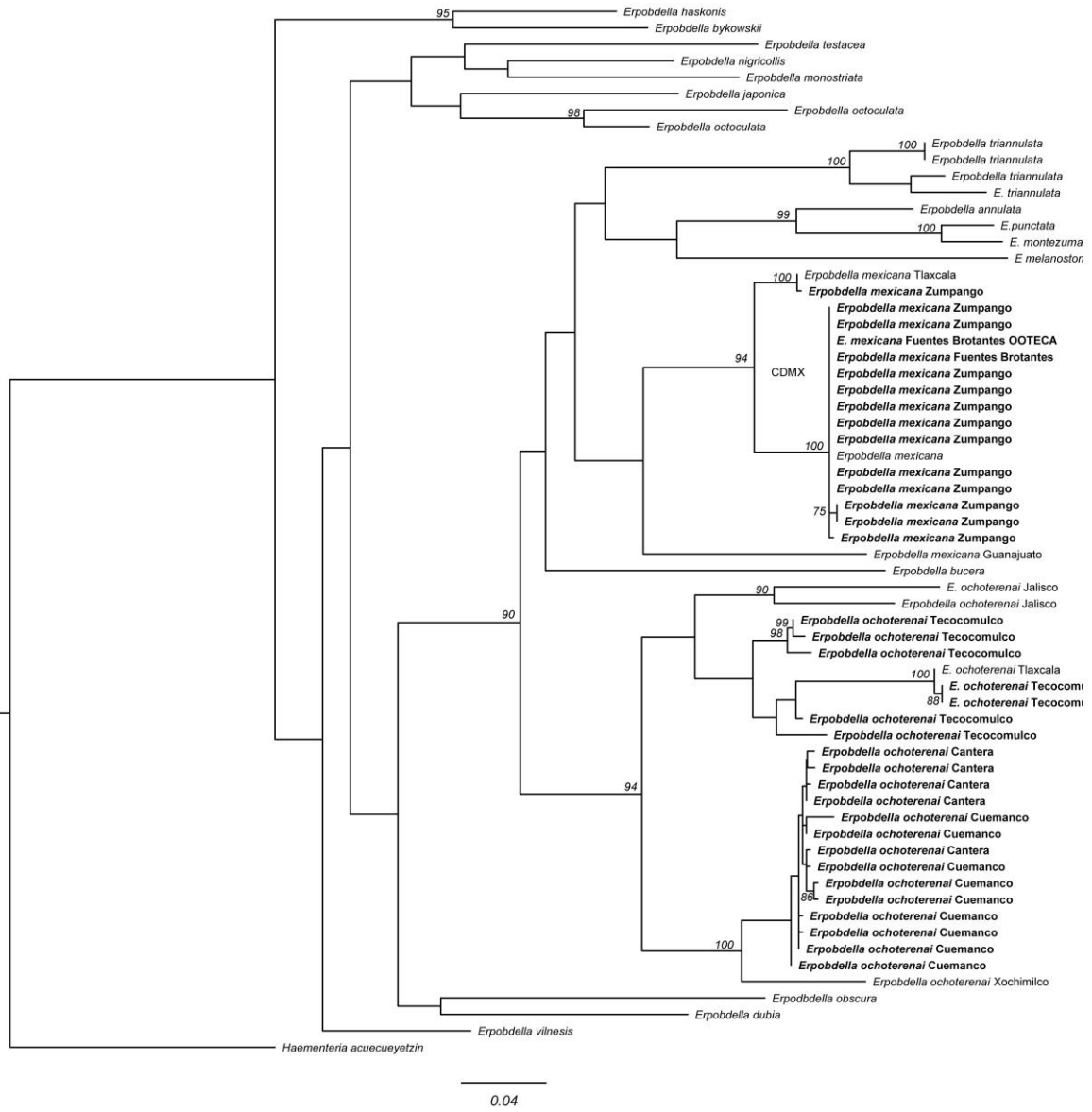


Fig. 16. Topología obtenida mediante el método de Máxima Verosimilitud para la familia Erpobdellidae con valores de bootstrap >75.

Familia Glossiphonidae

En la Fig. 17 se muestran la topología obtenida por el método de Neighbor Joining para la familia Glossiphoniidae, así como los valores de distancia genética promedio entre algunos *clusters*. Para *Helobdella socimulcensis* se observa un *cluster* que incluye ejemplares de la localidad tipo de esta especie (Xochimilco) y sin una distancia genética importante entre todos los individuos (<1%), tanto pertenecientes a la Cuenca de México como fuera de ella, con excepción de los ejemplares de Jalisco y California, que difieren en promedio respectivamente un 3% y un 2.5% del resto. Para *Helobdella octatestisaca*, todas las secuencias pertenecientes a la cuenca se encuentran en el mismo *cluster*, que incluye además un ejemplar de Querétaro, mientras que en un *cluster* aparte se hallan secuencias de Tabasco y Guanajuato, y en uno más las que fueron colectadas fuera del territorio mexicano. El *cluster* que incluye las secuencias de la Cuenca de México tiene una divergencia promedio >2% con las de la localidad tipo (Taipei, Taiwán). En cuanto a *Helobdella atli*, el *cluster* que forman los ejemplares de esta especie incluye una secuencia de la localidad tipo (Totolcingo, Tlaxcala) y no presenta una distancia genética promedio elevada entre sus integrantes (<1%).

En la Fig. 18 se presenta el consenso estricto con valores de bootstrap de 6 árboles más parsimoniosos encontrados por el programa, cada uno con un tamaño de 969 pasos, mientras que en la Fig. 19 se muestra el árbol con la puntuación más alta obtenido mediante Máxima Verosimilitud. Las topologías son congruentes entre los dos métodos y, en ambos casos, las secuencias obtenidas en este estudio forman clados con valores de soporte elevados junto con aquellas pertenecientes a la misma especie.

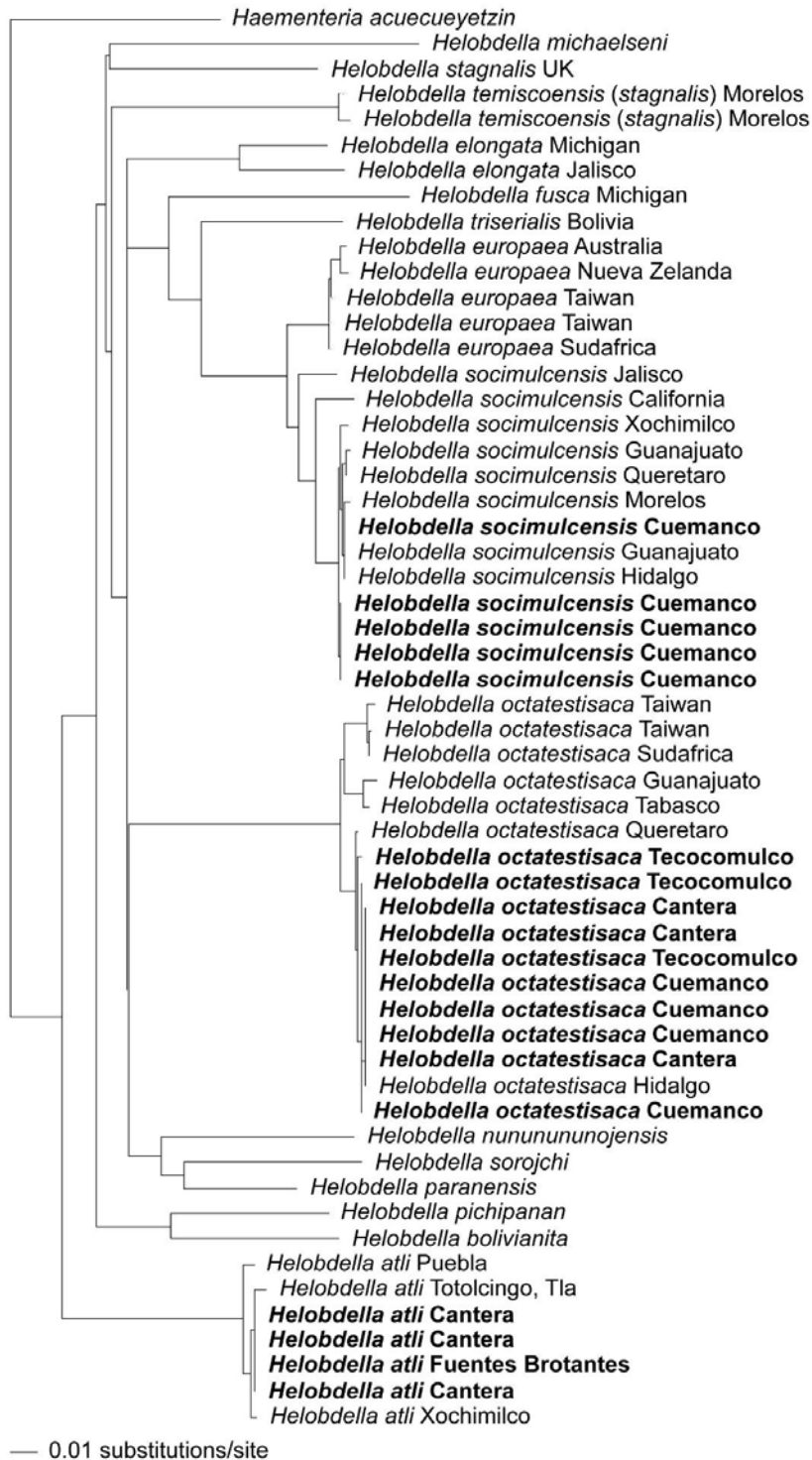


Fig. 17. Filograma obtenido mediante el método de agrupamiento de Neighbor Joining para la familia Glossiphoniidae. Las terminales en negritas pertenecen a individuos recolectados en el presente estudio.

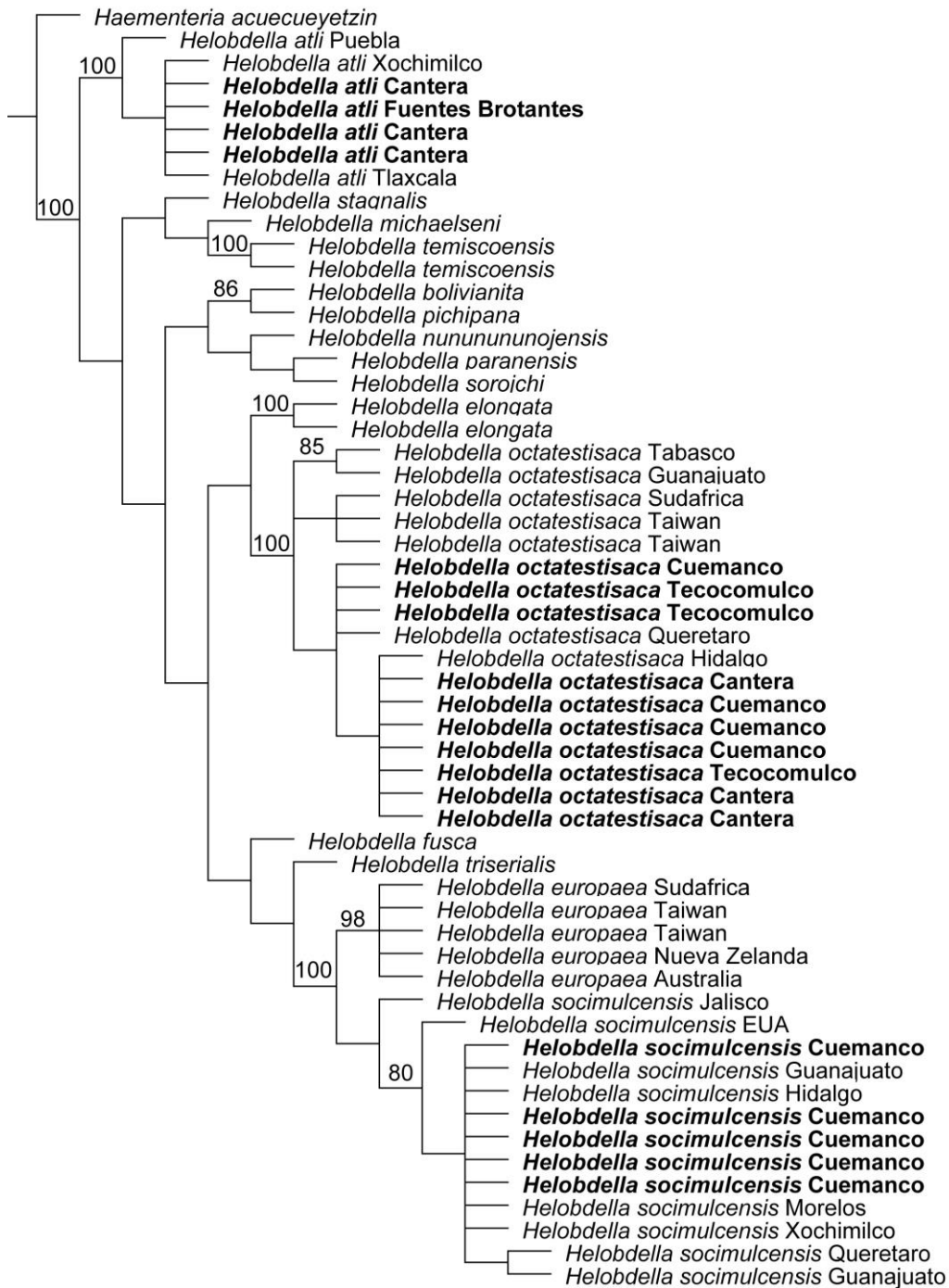


Fig. 18. Consenso estricto de 20 árboles más parsimoniosos para la familia Glossiphoniidae con valores de bootstrap >75.

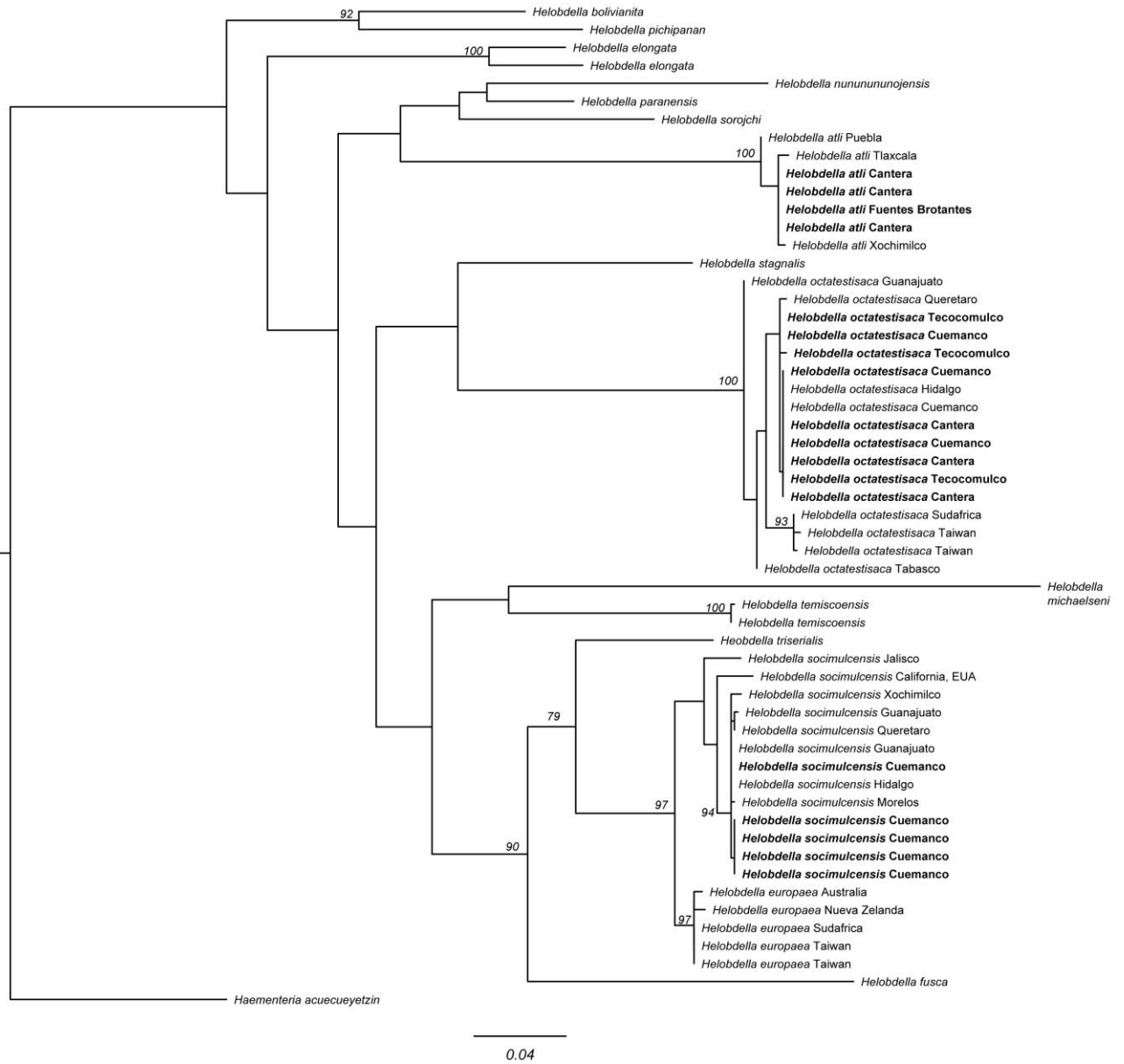


Fig. 19 Topología obtenida mediante el método de Máxima Verosimilitud para la familia Glossiphoniidae con valores de bootstrap >75.

Familia Haemopidae

No fue posible analizar la diferencia genética entre poblaciones de la especie recolectada (*Haemopsis caballeroi*), debido a que sólo se obtuvo un ejemplar en una sola localidad y no hay secuencias disponibles para esta especie en GenBank. En el análisis de Neighbor Joining, cuya topografía se muestra en la Figura 20, se observa que la secuencia de código de barras que se agrupa en el mismo *cluster* que *Haemopsis caballeroi* pertenece a *Haemopsis marmorata*, con la cual tiene una distancia genética de 10.1%.

Se presenta igualmente el árbol más parsimonioso encontrado por el programa, con un tamaño de 343 pasos (Fig. 21), así como el obtenido mediante la inferencia de Máxima Verosimilitud (Fig. 22). En ambos casos, *Haemopsis caballeroi* forma un clado con valor de soporte alto con *Haemopsis marmorata*.

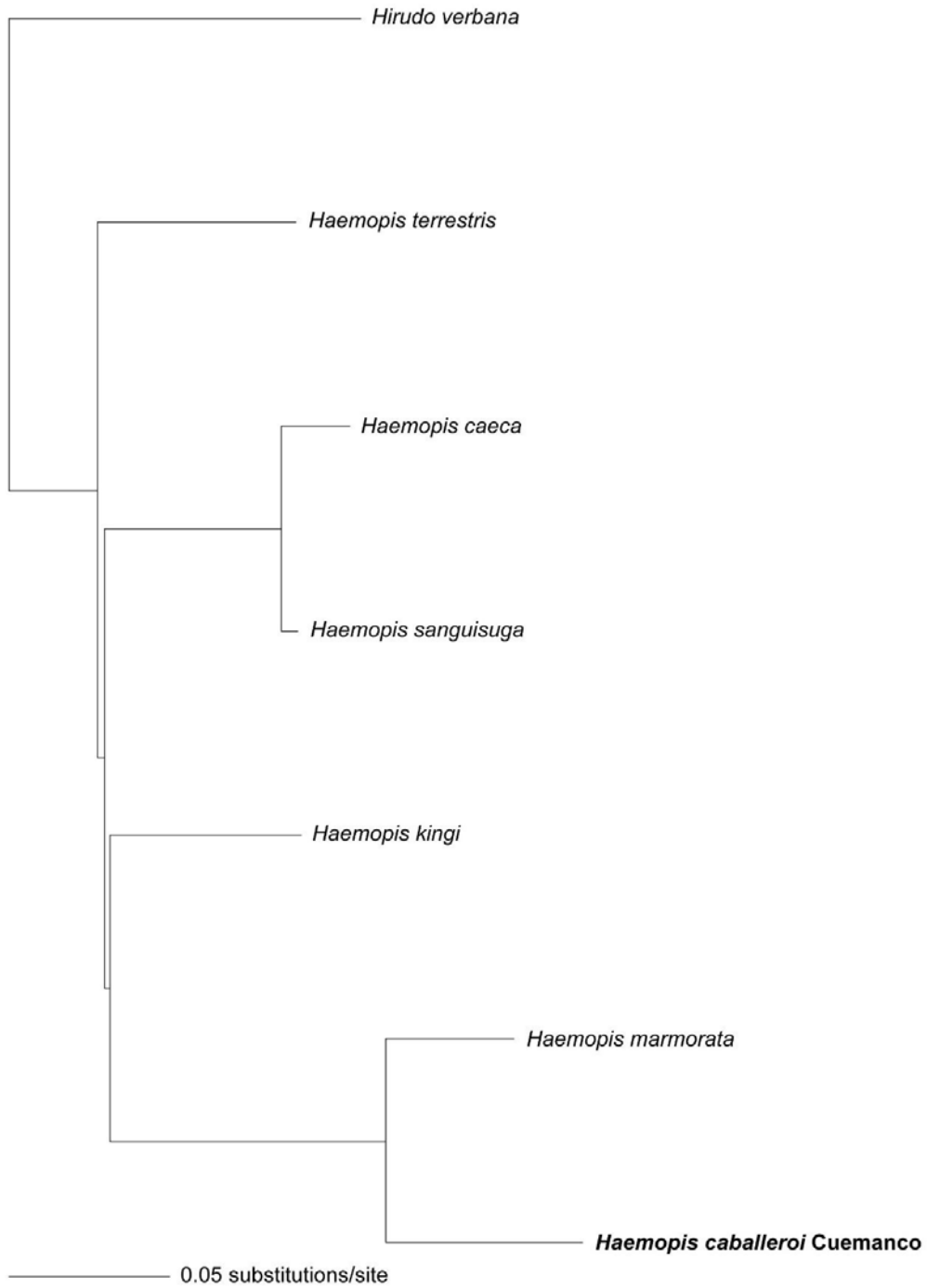


Fig. 20. Filograma obtenido mediante el método de agrupamiento de Neighbor Joining para la familia Haemopidae. Las terminales en negritas pertenecen a individuos recolectados en el presente estudio.

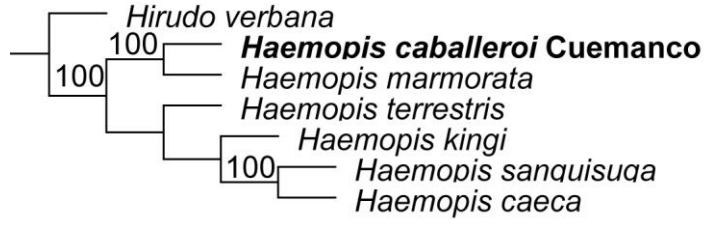


Fig. 21. Árbol más parsimonioso para la familia Haemopidae

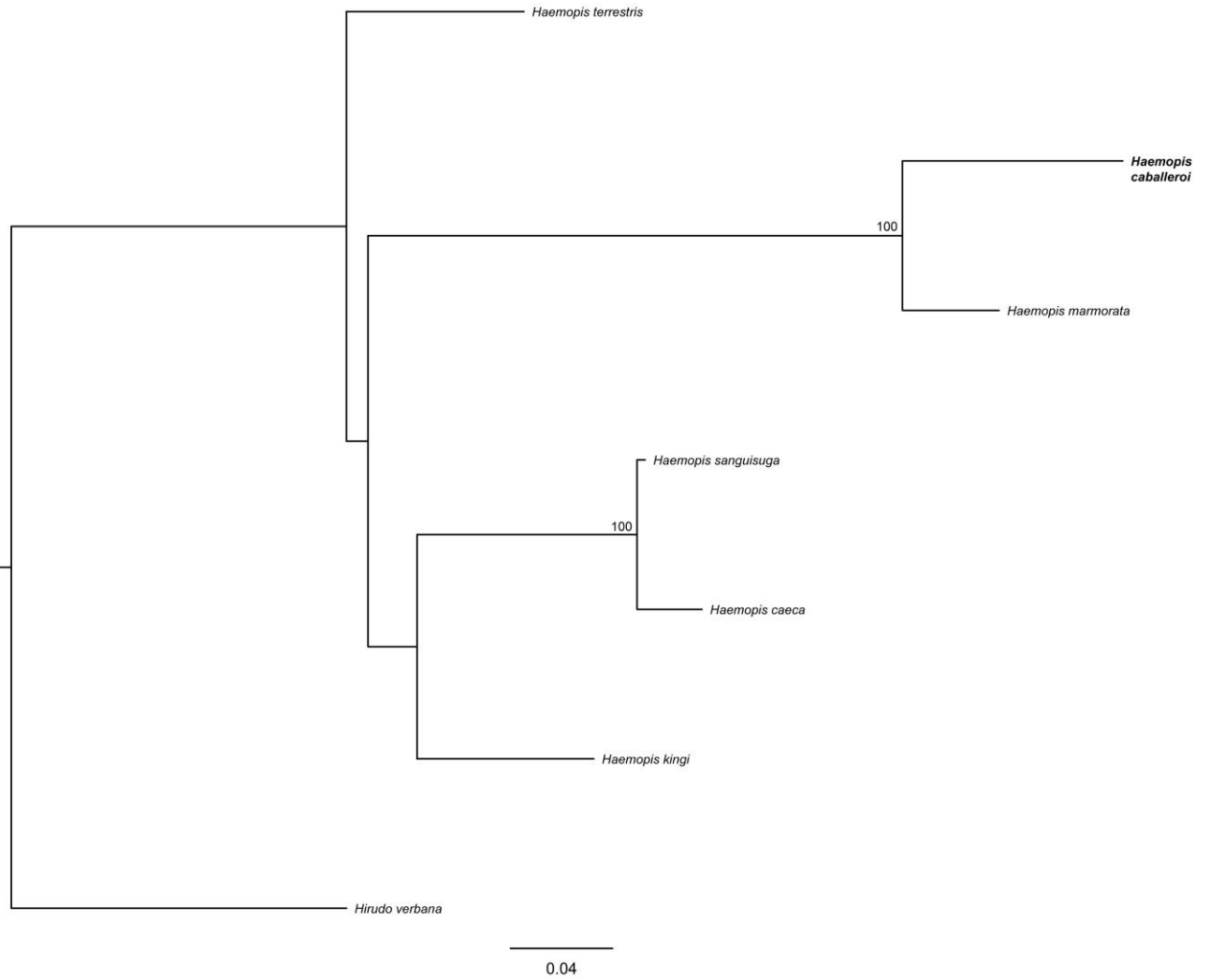


Fig. 22. Topología obtenida mediante el método de Máxima Verosimilitud para la familia Haemopidae

DISCUSIÓN.

Asignación taxonómica mediante caracteres moleculares.

En el presente estudio se utilizaron las dos bases de datos moleculares más importantes para la consulta de secuencias del código de barras genético: GenBank y BOLD Systems. Algunas de las secuencias problema (*Helobdella socimulcensis* y *Haemopsis caballeroi*) obtuvieron mayor identidad en GenBank con secuencias que únicamente se encontraban identificadas a nivel de género (*Helobdella* sp. y *Haemopsis* sp. respectivamente). En algunos casos, hay una incompatibilidad entre la determinación taxonómica obtenida utilizando caracteres moleculares y la obtenida mediante caracteres morfológicos. Kvist (2013) postula que se han publicado secuencias del código de barras para el 15.13% de la biodiversidad reconocida. Particularmente, en el phylum Annelida se tienen publicados códigos de barras que representan el 10.62% de su diversidad reconocida en GenBank y el 10.88% en BOLD Systems. Esto implica que para la mayoría de las muestras no se obtendrá una identificación precisa en las bases de datos. Además, aun cuando la secuencia publicada corresponda a la especie de la muestra problema, en múltiples ocasiones está publicada bajo un nombre inválido. Por ejemplo, existen muestras de México con secuencias publicadas bajo el nombre *Helobdella stagnalis*, ya que se consideraba la presencia de un escudo nucal de quitina como carácter diagnóstico y se suponía que tenía una distribución cosmopolita. Sin embargo, actualmente se reconoce que esa especie no está presente en territorio nacional y que las muestras pertenecen a las especies *Helobdella octatestisaca*, *Helobdella atli* o bien *Helobdella temiscoensis* (Oceguera-Figueroa & León-Règagnon 2005; Oceguera-Figueroa *et al.*, 2011; Salas-Montiel *et al.*, 2014). Es así que el hecho de que los individuos determinados en este estudio como *Helobdella octatestisaca* mediante caracteres morfológicos, encuentren la mayor identidad en las bases de datos con una secuencia nombrada como *Helobdella stagnalis* se explica al observar que dicha secuencia fue enviada a la base de datos antes de la publicación del artículo donde se revisa la diversidad del género *Helobdella* en México (Oceguera-Figueroa *et al.*, 2011). De este modo se remarca que resulta necesario un conocimiento de la taxonomía actualizada del grupo de estudio para detectar la utilización de nombres obsoletos en las bases de datos. El mismo fenómeno se observó al recolectar secuencias para el ensamblaje de las matrices de datos moleculares usadas en este estudio. Existen en GenBank 5 secuencias de código de barras publicadas bajo el género *Trocheta*, 1 bajo *Mooreobdella* y 100 bajo *Dina*, cuando estos géneros fueron sinonimizados con *Eropbdella* por Siddall (2002). Algunas de dichas secuencias fueron subidas en las bases de datos aún después de la publicación del artículo de Siddall (2002), lo que denota que aquellos que las publicaron no contaban con información actualizada respecto a la taxonomía del grupo o simplemente la ignoraron. El problema de la mala asignación taxonómica y la enorme ausencia de datos de las secuencias publicadas ha sido discutido antes (Kress & Erickson, 2012; Kvist, 2013). Si consideramos que el objetivo de la iniciativa del Código de Barras de la Vida es poseer

secuencias de la COI publicadas para toda especie animal, para cada nueva especie descrita debería generarse y publicarse una secuencia para el código de barras y debería actualizarse periódicamente la taxonomía de las secuencias ya publicadas. Del mismo modo, la publicación de las secuencias en las bases de datos debe ser realizada por taxónomos expertos para garantizar que la identificación es correcta y que la secuencia pertenece efectivamente a la especie con que ha sido etiquetada. Para este fin es relevante también la publicación de secuencias procedentes de la localidad tipo y, de ser posible, del ejemplar tipo.

El presente estudio enfatiza una de las ventajas que posee la determinación taxonómica de especies mediante códigos de barras. Se consiguió obtener una secuencia y asignarla a una especie a partir de una ooteca que contenía huevos embrionados de *Erpobdella* sp. Con caracteres morfológicos hubiese sido imposible obtener una determinación precisa, pero mediante los datos de código de barras se logró la asignación a *Erpobdella mexicana*. En la recolecta de sanguijuelas, no es raro que no se logren recolectar individuos adultos de *Erpobdella*, sino únicamente las ootecas donde están depositados sus huevos. Este fenómeno fácilmente encuentra analogías en la colecta de otros grupos de animales. Hay muchos casos en que una clave taxonómica basada en morfología resultaría poco funcional para evaluar la diversidad. En este tipo de casos, con una base de datos robusta, se contaría con un método auxiliar de importancia para los estudios de diversidad animal.

Análisis Molecular

Análisis de distancias

Familia Erpobdellidae

El método del código de barras resulta eficiente para la determinación taxonómica de la especie *Erpobdella mexicana* en la región de la Cuenca de México. Esto se concluye debido a que todas las secuencias de dicha especie se agrupan dentro de un único *cluster* que presenta baja diversidad genética en su interior (<1%).

Por otro lado, las secuencias de aquellos individuos determinados como *Erpobdella ochoterenai* aparecen en dos *clusters* separados. Ha sido discutida ampliamente la relación entre los grupos taxonómicos y la divergencia genética. Por ejemplo, Avise & Walker (1998), tras una amplia revisión bibliográfica, concluyen para el grupo de los vertebrados que la información proporcionada por secuencias de genes mitocondriales y las asignaciones taxonómicas clásicas tienden a convergir.

Cuando aplicamos esta idea al estudio de los códigos de barras genéticos, la pregunta que surge es qué tan divergentes deben ser dos secuencias del código de barras para considerar que

pertenecen a especies distintas. La delimitación de especies mediante códigos de barras se basa en la supuesta existencia de una disparidad evidente entre la variación intraespecífica e interespecífica, el llamado *barcode gap*, cuyo cálculo ha sido intentado por diversos autores. Hebert *et al.* (2004) proponen un umbral de 10 veces el porcentaje de variación intraespecífica media para la delimitación de especies animales, mientras que Smith *et al.* (2005) encuentran que una divergencia del 5% en las secuencias de la COI basta para diferenciar especies. Los datos proporcionados por las secuencias del código de barras ayudan al perfeccionamiento del sistema taxonómico, presentando grupos de individuos/poblaciones que reflejan especies putativas. Para esto debe realizarse un muestreo que cubra todo el rango geográfico del taxón de interés. Las especies sugeridas por datos moleculares pueden ser posteriormente sustentadas usando datos morfológicos, biogeográficos, ecológicos, etc. (DeSalle *et al.*, 2005). Resulta de interés observar que, mientras que las poblaciones de *Erpobdella ochoterenai* de la Cantera Oriente y el Embarcadero Cuemanco (al sur de la Cuenca de México) no presentan entre ellas una gran diversidad genética, sugiriendo su pertenencia a una sola entidad taxonómica (especie), la población del Lago de Tecocomulco (ubicado al norte de la Cuenca de México) presenta una divergencia muy alta con respecto al resto, lo que podría indicar que ha seguido un rumbo evolutivo diferente al del resto de sus conespecíficos, el cual probablemente inició desde los orígenes de la cuenca. Se hipotetiza la alta salinidad de la parte central de la misma como una barrera capaz de generar especiación alopátrica. Por otro lado, la divergencia genética al interior de la población de Tecocomulco también es mayor a la esperada a nivel intraespecífico (Avice, 2000), por lo que la alta divergencia respecto al resto de las poblaciones podría ser efecto de esta variabilidad inherente a la población. Una evaluación más profunda de esta población utilizando herramientas morfológicas o morfométricas podría ayudar a sustentar la idea de que se trata de una especie separada.

Familia Glossiphonidae

La utilización de códigos de barras genéticos resulta útil para la determinación correcta a nivel especie de las poblaciones de *Helobdella socimulcensis*, *Helobdella octatensis* y *Helobdella atli* que habitan la Cuenca de México. La baja diversidad genética al interior de las mismas (<1) sugiere que las especies no han sido afectadas por fenómenos de aislamiento genético.

Familia Haemopidae

La secuencia generada en el presente estudio servirá como referencia para la identificación de futuros especímenes de *Haemopsis caballeroi*, la única especie de la familia conocida para la Cuenca de México. Se reconoce que la especie más cercana genéticamente es *Haemopsis marmorata*. Un estudio posterior enfocado en analizar la variación genética de *H. caballeroi* a lo

largo de su distribución en México podría revelar diferencias genéticas elevadas ya que la especie se distribuye en áreas geográficas separadas entre sí en los estados de Hidalgo, Jalisco, Morelos, Tlaxcala y en la Ciudad de México (Oceguera-Figueroa & León Rêgagnon, 2014).

Análisis filogenéticos

Las inferencias filogenéticas obtenidas mediante los métodos de Parsimonia y Máxima Verosimilitud para las 3 familias sustentan que las poblaciones de sanguijuelas de las localidades estudiadas son parte de grupos naturales fácilmente reconocibles. Llama particularmente la atención la alta estructura que se observa en el clado compuesto por secuencias de *Erpobdella ochoterenai* procedentes del Lago de Tecocomulco, lo que es indicador de la alta diversidad intraespecífica que existe para el gen COI en esta especie.

CONCLUSIONES.

- Los métodos del código de barras genético resultaron efectivos para la determinación taxonómica de la mayoría de los ejemplares estudiados, sin embargo, se requiere conocimiento previo de la taxonomía del grupo y los caracteres morfológicos diagnósticos para detectar errores al utilizar las bases de datos en línea. Las bases de datos deben ser perfeccionadas, reguladas y actualizadas para ser una herramienta totalmente funcional para la identificación de hirudíneos.
- Es posible que la población de *Erpobdella ochoterenai* del Lago de Tecocomulco pertenezca en realidad a una especie no descrita, dada la alta divergencia genética que presenta respecto al resto de las poblaciones.
- Se generó la primera secuencia de código de barras para la especie *Haemopsis caballeroi*, así como los primeros reportes de diversidad de hirudíneos para la Cantera Oriente, en la Ciudad de México.
- En general, exceptuando el caso de *Erpobdella ochoterenai*, las distancias genéticas observadas en el presente estudio sugieren que las especies se comparten en los distintos cuerpos de agua y que el tiempo en que han permanecido aisladas no ha sido suficiente para observar cambios genéticos, al menos empleando el COI.

LITERATURA CITADA.

Alcocer-Durand, J., & Escobar-Briones, E. G. (2010). The aquatic biota of the now extinct lacustrine complex of the Mexico basin. *Freshwater Forum* 2(3), 171-183.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.

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

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.

Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.

Bely, A. E., & Weisblat, D. A. (2006). Lessons from leeches: a call for DNA barcoding in the lab. *Evolution & Development*, 8(6), 491-501.

Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K. & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148-155.

Bilton, D. T., Freeland, J. R., & Okamura, B. (2001). Dispersal in freshwater invertebrates. *Annual review of Ecology and Systematics*, 32, 159-181.

Bojórquez-Tapia, L. A., Cruz-Bello, G. M., Luna-González, L., Juárez, L., & Ortiz-Pérez, M. A. (2009). V-DRASTIC: using visualization to engage policymakers in groundwater vulnerability assessment. *Journal of Hydrology*, 373(1), 242-255.

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

Bronmark, C., & Hansson, L. (2005). *The Biology of Lakes and Ponds*. Oxford: OUP Oxford.

Brown, B., Emberson, R. M., & Paterson, A. M. (1999). Mitochondrial COI and II provide useful markers for *Wiseana* (Lepidoptera: Hepialidae) species identification. *Bulletin of Entomological Research*, 89(04), 287-293.

Brusca, R. C. & Brusca, G. J., (2003). *Invertebrates*. Sunderland, Massachusetts.

Bucklin, A., Guarnieri, M., Hill, R. S., Bentley, A. M., & Kaartvedt, S. (1999). Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. In *Molecular Ecology of Aquatic Communities* (pp. 239-254). Springer Netherlands.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., ... & Luo, K. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*, 5(1), e8613.

Contreras, F. (1930). Moluscos del lago de Xochimilco, D. F. *Anales Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México*, 1, 39-46.

Cserna, Z. D., De la Fuente-Duch, M., Palacios-Nieto, M., Triay, L., Mitre-Salazar, L. M., & Mota-Palomino, R. (1988). Estructura geológica, gravimetría, sismicidad y relaciones neotectónicas regionales de la cuenca de México: Universidad Nacional Autónoma de México. *Instituto de Geología, Boletín*, 104, 71.

DeSalle, R., Egan, M. G., & Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1905-1916.

Dunn, C. W., Hejnal, A., Matus, D. Q., Pang, K., Browne, W. E., Smith, S. A., ... & Sørensen, M. V. (2008). Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*, 452(7188), 745-749.

Dupuis, J. R., Roe, A. D., & Sperling, F. A. (2012). Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough. *Molecular Ecology*, 21(18), 4422-4436.

Ebach, M. C., & Carvalho, M. R. D. (2010). Anti-intellectualism in the DNA barcoding enterprise. *Zoologia (Curitiba)*, 27(2), 165-178.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.

Erséus, C., & Källersjö, M. (2004). 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida). *Zoologica Scripta*, 33(2), 187-196.

Folmer, O., Hoeh, W. R., Black, M. B., & Vrijenhoek, R. C. (1994). Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294-299.

Garduño-Montes de Oca, U., Martínez-Flores, G., Contreras-Mirón, S., Jiménez-Armenta, J. & Ocegüera-Figueroa, A. (En prensa). Registro de la sanguijuela introducida *Barbronia weberi*

(Annelida: Clitellata) en Nuevo León, México identificada mediante el uso de información morfológica y del código de barras genético. *Revista Mexicana de Biodiversidad*.

Genoni, P., & Fazzone, A. (2008). *Barbronia weberi* (R. Blanchard, 1897)(Hirudinea: Salifidae), an Asian leech species new to Italy. *Aquatic Invasions*,3(1), 77-79.

Goloboff, P. A., Farris, J. S., & Nixon, K. C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24(5), 774-786.

Gray, J. (1988). Evolution of the freshwater ecosystem: the fossil record. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 62(1), 1-214.

Greinacher, A., & Warkentin, T. E. (2008). The direct thrombin inhibitor hirudin. *Thrombosis and Haemostasis-Stuttgart*, 99(5), 819.

Gutiérrez-de MacGregor, M.T., González-Sánchez, J. & Zamorano-Orozco, J.J. (2005). La Cuenca de México y sus cambios demográfico-espaciales. Primera edición. UNAM.

Halffter, G. y P. Reyes-Castillo (1975) , *Fauna de la Cuenca del Valle de México*, Memoria de las Obras del Sistema del Drenaje Profundo del Distrito Federal, vol. 1, Talleres Gráficos de la Nación, México, 135-180

Hebert, P. D., Cywinska, A., & Ball, S. L. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*,270(Suppl 1), S96-S99.

Hebert, P. D., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol*, 2(10), e312.

Huang, D., Meier, R., Todd, P. A., & Chou, L. M. (2008). Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution*, 66(2), 167-174.

Hutchinson, G. E. (1967). *A treatise on limnology. Volume II. Introduction to lake biology and the limnoplankton*. John Wiley & Sons, New York, London, and Sydney. 1115 p.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.

Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. *PLoS one*, 2(6), e508.

Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2012). *DNA barcodes: methods and protocols*. Humana Press, pp 3-8

Kutschera, U. (2004). The freshwater leech *Helobdella europaea* (Hirudinea: Glossiphoniidae): an invasive species from South America. *Lauterbornia*, 52, 153-162.

Kvist, S. (2013). Barcoding in the dark?: a critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(1), 39-45.

Links, M. G., Dumonceaux, T. J., Hemmingsen, S. M., & Hill, J. E. (2012). The chaperonin-60 universal target is a barcode for bacteria that enables de novo assembly of metagenomic sequence data. *PLoS One*, 7(11), e49755.

Liu, Y., Yan, H. F., Cao, T., & GE, X. J. (2010). Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses). *Journal of Systematics and Evolution*, 48(1), 36-46.

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

Manzano-Marín, A., Oceguera-Figueroa, A., Latorre, A., Jiménez-García, L. F., & Moya, A. (2015). Solving a bloody mess: B-vitamin independent metabolic convergence among gammaproteobacterial obligate endosymbionts from blood-feeding arthropods and the leech *Haementeria officinalis*. *Genome Biology and Evolution*, 7(10), 2871-2884.

Mazari, M., & Mackay, D. M. (1993). Potential for groundwater contamination in Mexico City. *Environmental Science & Technology*, 27(5), 794-802.

Niederberger, C. (1979). Early sedentary economy in the Basin of Mexico. *Science*, 203(4376), 131-142.

Oceguera-Figueroa, A. (2012). Molecular phylogeny of the New World bloodfeeding leeches of the genus *Haementeria* and reconsideration of the biannulate genus *Oligobdella*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 508-514.

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

Oceguera-Figueroa, A., & León-Règagnon, V. (2014). Biodiversidad de sanguijuelas (Annelida: Euhirudinea) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 183-189.

Oceguera-Figueroa, A., León-Règagnon, V., & Siddall, M. E. (2010). DNA barcoding reveals Mexican diversity within the freshwater leech genus *Helobdella* (Annelida: Glossiphoniidae). *Mitochondrial DNA*, 21(sup1), 24-29.

Oceguera-Figueroa, A., León-Règagnon, V., & Siddall, M. E. (2005). Filogenia y revisión de los Erpobdelliformes (Annelida, Arhynchobdellida) de México, con base en secuencias de ADN nuclear y mitocondrial. *Revista mexicana de biodiversidad*, 76(2), 191-198.

Oceguera-Figueroa, A., Phillips, A. J., Pacheco-Chaves, B., Reeves, W. K., & Siddall, M. E. (2011). Phylogeny of macrophagous leeches (Hirudinea, Clitellata) based on molecular data and evaluation of the barcoding locus. *Zoologica Scripta*, 40(2), 194-203.

Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., ... & Fiore-Donno, A. M. (2012). CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS Biol*, 10(11), e1001419.

Pfeiffer, I., Brenig, B., & Kutschera, U. (2005). Molecular phylogeny of selected predaceous leeches with reference to the evolution of body size and terrestriality. *Theory in Biosciences*, 124(1), 55-64.

Pfenninger, M., & Schwenk, K. (2007). Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 121.

Phillips, A. J., & Siddall, M. E. (2009). Poly-paraphyly of Hirudinidae: many lineages of medicinal leeches. *BMC evolutionary biology*, 9(1), 1.

Pompanon, F., Deagle, B. E., Symondson, W. O., Brown, D. S., Jarman, S. N., & Taberlet, P. (2012). Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 1931-1950.

Porshinsky, B. S., Saha, S., Grossman, M. D., Beery li, P. R., & Stawicki, S. P. A. (2011). Clinical uses of the medicinal leech: a practical review. *Journal of Postgraduate Medicine*, 57(1), 65.

Rabiela, T. R. (1985). *La cosecha del agua: pesca, caza de aves y recolección de otros productos biológicos acuáticos de la cuenca de México* (Vol. 7). SEP Cultura, Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364.

Roe, A. D., & Sperling, F. A. (2007). Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(1), 325-345.

Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., & Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1), 195-209.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.

Salas-Montiel, R., Phillips, A. J., De Leon, G. P. P., & Ocegüera-Figueroa, A. (2014). Description of a new leech species of *Helobdella* (Clitellata: Glossiphoniidae) from Mexico with a review of Mexican congeners and a taxonomic key. *Zootaxa*, 3900(1), 077-094.

Salzet, M. (2001). Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches. *FEBS letters*, 492(3), 187-192.

Sawyer, R.T. (1986). *Leech Biology and Behaviour: Feeding biology, ecology, and systematics*. Clarendon Press.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & Miller, A. N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.

Sket, B., & Trontelj, P. (2008). Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 129-137.

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

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(1), 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(3), 467-472.

Siddall, M. E., & Bureson, E. M. (1998). Phylogeny of Leeches (Hirudinea) based on mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9(1), 156-162.

Siddall, M. E., Apakupakul, K., Burreson, E. M., Coates, K. A., Erséus, C., Gelder, S. R., ... & Trapido-Rosenthal, H. (2001). Validating Livanow: molecular data agree that leeches, branchiobdellidans, and Acanthobdella peledina form a monophyletic group of oligochaetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(3), 346-351.

Smith, M. A., Fisher, B. L., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1825-1834.

Siddall, M. E., Trontelj, P., Utevsky, S. Y., Nkamany, M., & Macdonald, K. S. (2007). Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1617), 1481-1487.

Sosa-Rodriguez, F. S. (2010). Impacts of water-management decisions on the survival of a City: from ancient tenochtitlan to modern Mexico City. *Water Resources Development*, 26(4), 675-687.

Srivathsan, A., & Meier, R. (2012). On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, 28(2), 190-194.

Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688-2690.

Stamatakis, A., Hoover, P., & Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic biology*, 57(5), 758-771.

Struck, T. H., Schult, N., Kusen, T., Hickman, E., Bleidorn, C., McHugh, D., & Halanych, K. M. (2007). Annelid phylogeny and the status of Sipuncula and Echiura. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 57.

Swofford, D. L., & Begle, D. P. (1993). *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1, March 1993*. Center for Biodiversity, Illinois Natural History Survey.

Tao, N., Richardson, R., Bruno, W., & Kuiken, C. (2010). FindModel. Los Alamos, NM: Los Alamos National Security. Ver <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>.

TOWNSEND, C. R., HILDREW, A. G., & Francis, J. (1983). Community structure in some southern English streams: the influence of physicochemical factors. *Freshwater Biology*, 13(6), 521-544.

Trewick, S. A. (2000). Mitochondrial DNA sequences support allozyme evidence for cryptic radiation of New Zealand Peripatoides (Onychophora). *Molecular Ecology*, 9(3), 269-281.

Trewick, S. A. (2000). Mitochondrial DNA sequences support allozyme evidence for cryptic radiation of New Zealand Peripatoides (Onychophora). *Molecular Ecology*, 9(3), 269-281.

West-Eberhard, M. J. (1989). Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual review of Ecology and Systematics*, 249-278.

Wirchansky, B. A., & Shain, D. H. (2010). A new species of Haemopsis (Annelida: Hirudinea): Evolution of North American terrestrial leeches. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1), 226-234.

Wong, E. H. K., & Hanner, R. H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41(8), 828-837.

Yi-Te Lai, C. H. C., & 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.

Živić, I., Radosavljević, T., Stojanović, K., & Petrović, A. (2015). The first molecular characterization of the genus Hirudo on the territory of Serbia: estimation of endangerment. *Aquatic Ecology*, 49(1), 81-90.