



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

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LA  
SANGUIJUELA MEDICINAL NORTEAMERICANA *MACROBDELLA*  
*DECORA* (SAY, 1824)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LUIS RICARDO SALAS MONTIEL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO OCEGUERA FIGUEROA**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DR. FERNANDO ÁLVAREZ PADILLA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**CIUDAD DE MÉXICO, JULIO, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





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

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LA  
SANGUIJUELA MEDICINAL NORTEAMERICANA *MACROBDELLA*  
*DECORA* (SAY, 1824)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LUIS RICARDO SALAS MONTIEL**

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

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. FERNANDO ÁLVAREZ PADILLA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F.

JULIO, 2017



## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACyT y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo financiero recibido durante la realización de este proyecto.

Al proyecto PAPIIT IA204114.

A los miembros del Comité Tutor por sus valiosas contribuciones durante la realización de este proyecto:

Dr. Alejandro Ocegüera Figueroa

Dr. Alejandro Zaldívar Riverón

Dr. Fernando Álvarez Padilla

A los miembros del jurado por sus acertadas observaciones en el presente manuscrito:

Dra. Claudia Patricia Ornelas García

Dr. Alejandro Zaldívar Riverón

Dr. Fernando Álvarez Padilla

Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

M. en C. Luis García Prieto

## ÍNDICE

Listas de Figuras y Tablas.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	3
Diversidad genética y estructura poblacional de la sanguijuela medicinal norteamericana <i>Macrobdeella decora</i> (Say, 1824).....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Filogeografía.....	4
1.2. Métodos de inferencia filogenética.....	7
1.3. Generalidades de la subclase Hirudinida Lamarck, 1818.....	9
1.4. Sanguijuelas medicinales.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo general.....	16
2.2. Objetivos particulares.....	16
3. ANTECEDENTES.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1. Obtención del material biológico.....	18
4.2. Extracción de DNA y amplificación.....	19
4.3. Alineamiento de secuencias.....	20
4.4. Análisis filogenéticos.....	21
4.5. Datación de tiempos de divergencia.....	21
4.6. Diversidad genética.....	22
4.7. Estructura poblacional.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1. Análisis filogenéticos.....	24
5.2. Datación de tiempos de divergencia.....	32
5.3. Diversidad genética.....	32
5.4. Estructura poblacional.....	34
6. DISCUSIÓN.....	38
6.1 Análisis filogenéticos.....	38
6.2 Datación de tiempos de divergencia.....	39
6.3 Diversidad genética.....	40

6.4 Estructura poblacional.....	42
7. CONCLUSIONES.....	42
8. LITERATURA CITADA.....	44
9. ANEXOS.....	51
9.1. Anexo 1: New species of medicinal leech from North America, with description and phylogenetic.....	51
9.2. Anexo 2: Distribution of the New England Medicinal Leech, <i>Macrobdella sestertia</i> Whitman, 1886 and redeterminations of specimens of <i>Macrobdella</i> (Annelida: Clitellata: Macrobdellidae) at the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution.....	69



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de DNA mitocondrial.....	6
Figura 2. Monofilia de la clase Clitellata.....	10
Figura 3. Poli-parafilia de la familia Hirudinidae.....	13
Figura 4. Área de distribución geográfica de <i>M. decora</i> .....	14
Figura 5. Árbol más parsimonioso utilizando el marcador mitocondrial COI.....	24
Figura 6. Árbol de máxima credibilidad de clados utilizando el marcador mitocondrial COI.....	25
Figura 7. Árbol más parsimonioso utilizando el marcador mitocondrial NADH.....	26
Figura 8. Árbol de máxima credibilidad de clados utilizando el marcador mitocondrial NADH.....	27
Figura 9. Árbol más parsimonioso utilizando el marcador mitocondrial 18S.....	28
Figura 10. Árbol de máxima credibilidad de clados utilizando el marcador mitocondrial 18S.....	29
Figura 11. Árbol más parsimonioso utilizando la matriz concatenada del COI, NADH y 18S.....	30
Figura 12. Árbol de máxima credibilidad de clados utilizando la matriz concatenada del COI, NADH y 18S.....	31
Figura 13. Tiempos de divergencia.....	33
Figura 14. Red de haplotipos del COI.....	35
Figura 15. Red de haplotipos del NADH.....	36
Figura 16. Gráfico de asignación genética en STRUCTURE.....	36
Figura 17. Filogenia y área de distribución <i>Wyeomyia smithii</i> .....	38

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidades de colecta.....	18
Tabla 2. Marcadores y primers utilizados.....	20
Tabla 4. Distancias genéticas K2P utilizando el COI.....	34
Tabla 5. Distancias genéticas K2P utilizando el NADH.....	34
Tabla 6. Valores de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) del COI.....	35
Tabla 7. Valores de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) del NADH.....	37
Tabla 8. Parámetros de diversidad genética del COI.....	37
Tabla 9. Parámetros de diversidad genética del NADH.....	37

## RESUMEN

La filogeografía estudia los procesos que determinan la distribución geográfica de los linajes genéticos. Existen diversos métodos útiles para este propósito, entre los que destacan los métodos de inferencia filogenética, diversidad genética, diferenciación poblacional, redes de haplotipos y de asignación genética. Las sanguijuelas son un buen modelo para estudios filogeográficos debido a su poca capacidad de dispersión, lo que promueve la estructura geográfica al interior de sus poblaciones. *Macrobdeella decora* (Say, 1824), mejor conocida como la sanguijuela medicinal norteamericana, es la especie más ampliamente distribuida en el norte de América. Su distribución abarca desde las provincias del noreste de Canadá hasta Georgia, EUA, existiendo un área grande sin su presencia y reapareciendo en Nuevo León, México, lo cual confiere a su distribución un carácter disyunto. En estudios anteriores se ha propuesto que la distribución geográfica atípica de *M. decora* fue directamente influenciada por la última máxima glaciación durante el Pleistoceno entre hace 26500 y 19000 años. Sin embargo, está hipótesis no se ha puesto a prueba. En el presente trabajo se estudiaron tanto morfológica como genéticamente ejemplares de *M. decora* de seis localidades; dos de Canadá (Parque Algonquin y Caledon) y cuatro de Estados Unidos (Connecticut, Maryland, Massachusetts y Minnesota). Se realizaron análisis de inferencia filogenética, estimación de tiempos de divergencia, cálculo de distancias genéticas, redes de haplotipos, diversidad genética y estructura poblacional usando los marcadores mitocondriales COI y NADH, así como el marcador nuclear 18S. Los resultados sugieren la existencia de 2 poblaciones, una constituida por las secuencias del norte (Parque Algonquin, Canadá; Caledon, Canadá; y Minnesota, EUA) y la otra por las secuencias del sur (Massachusetts, EUA y Connecticut, EUA). Las poblaciones presentan un patrón de disminución de diversidad genética sur-norte. Los análisis también sugieren que la divergencia de las poblaciones ocurrió hacia finales del Pleistoceno. Finalmente, como consecuencia del análisis de las secuencias se descubrió una nueva especie de sanguijuela medicinal, la cual se describe detalladamente y se ubica en el contexto filogenético utilizando los marcadores nucleares 18S, 28S y el marcador mitocondrial COI. Adicionalmente, se realizaron redeterminaciones taxonómicas para ejemplares de *Macrobdeella*, siendo la más notable *Macrobdeella sestertia*, una especie identificada erróneamente como *M. decora*, pero que corresponde a la sanguijuela medicinal de Nueva Inglaterra, considerada en peligro de extinción, registrada sólo en el este de Maine, EUA y Massachusetts, EUA y cuyo nuevo registro perteneciente a Nuevo Hampshire, EUA, aumenta la probabilidad de re-encontrar esta especie.

## ABSTRACT

Phylogeography is in charge of the studies of the processes that determine the geographical distribution of genetic lineages. There are several useful methods for this purpose, among which phylogenetic inference, genetic diversity, population differentiation, haplotype networks and genetic assignment stand out. Leeches are a good model for phylogeographic studies because of their low dispersion capacity, which facilitates the discovery of geographic structure within their populations. *Macrobdella decora* (Say, 1824), better known as the North American medicinal leech, is the most widely distributed species in North America, it is distributed from the provinces of northeastern Canada to Georgia, USA, there is a large area without its presence and reappears in Nuevo Leon, Mexico, which renders a disjoint character to its geographical distribution. In previous studies it has been proposed that the atypical geographical distribution of *M. decora* was directly influenced by the last maximum glaciation during the Pleistocene between 24,500 and 12,500 years ago, however this hypothesis has not been tested. In the present work, specimens of *M. decora* belonging to six localities were studied both morphologically and genetically; two from Canada (Algonquin Park and Caledon) and four from the United States (Connecticut, Maryland, Massachusetts and Minnesota). Phylogenetic inference, estimation of divergence times, calculation of K2P genetic distances, haplotype network construction, genetic diversity and population structure analyses were performed using the mitochondrial markers COI and NADH as well as the nuclear marker 18S. The results suggest the existence of two populations, one consisting of the northern sequences (Algonquin Park, Canada; Caledon, Canada; and Minnesota, USA) and the other one by southern sequences (Massachusetts, USA and Connecticut, USA). Populations present a south-north genetic diversity decline pattern. Analyzes also suggest that populations diverged towards the end of the Pleistocene. Finally, as a consequence of the sequences analysis, a new species of medicinal leech was discovered, which is described in detail and placed in the phylogenetic context using the nuclear markers 18S, 28S and the mitochondrial marker COI. In addition, taxonomic re-determinations were made for *Macrobdella*, the most notorious being *Macrobdella sestertia*, a species erroneously identified as *M. decora*, corresponding to the endangered New England medicinal leech, registered only in eastern Maine, USA and Massachusetts, and whose new registry in New Hampshire, USA increases the likelihood of re-finding this species of medicinal leech .

# DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LA SANGUIJUELA MEDICINAL NORTEAMERICANA *Macrobdella decora* (SAY, 1824)

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Filogeografía

La filogeografía es una disciplina que se encarga del estudio de los principios y procesos que determinan la distribución geográfica de linajes de genes, particularmente aquellos entre y dentro de especies cercanamente relacionadas (Avice, 2000). En los casos en que linajes independientes evolucionan bajo procesos geológicos y climáticos comunes, es probable que exhiban patrones de distribución geográfica semejantes. Este es el campo de estudio de la filogeografía comparada (Avice et al., 1987). El análisis e interpretación de la distribución espacial de linajes genéticos requiere de conocimientos en genética de poblaciones, sistemática, demografía, etología y geografía histórica, por lo tanto, la filogeografía se considera como una disciplina integrativa (Avice, 1998).

Los análisis filogeográficos utilizan regiones del genoma como materia prima para el estudio de procesos involucrados en la configuración espacial de linajes genéticos. En términos generales, dichas regiones se conocen como marcadores moleculares y se definen como regiones del genoma en las que la composición nucleotídica varía entre diferentes individuos de una sola población o entre individuos de distintas especies (Patwardhan et al., 2014). En filogeografía y sistemática estos fragmentos de DNA son empleados para asignar taxonómicamente organismos a taxones previamente identificados con base en su información genética así como para establecer relaciones filogenéticas entre grupos de organismos incluso a partir de tejido carente de rasgos morfológicos útiles para la identificación a nivel de especie (Kurtzman, 1987; Hoss et al., 1992; Pérez-Flores et al., 2016).

Los avances en biología molecular, particularmente en genética de poblaciones, han permitido cuantificar la variación genética dentro y entre linajes. A la par, se han diseñado diversos métodos capaces de analizar dicha información desde una perspectiva histórica, lo cual ha permitido formular hipótesis en torno a la historia evolutiva de los taxones, incluyendo factores que pudieron haber influido en su distribución geográfica. De acuerdo con Galtier y Gouy (1995) la selección de un marcador molecular apropiado no es una decisión trivial y se consideran como marcadores ideales aquellos genes que poseen una sola copia, condición que satisfacen tanto los genes mitocondriales como algunos genes nucleares; una tasa de sustitución nucleotídica que proporcione suficientes sitios informativos para el análisis en cuestión; primers específicos para evitar amplificar genes no deseados del organismo e incluso de organismos simbioses (Yli-Mattila et al., 2000).

Históricamente, los marcadores mitocondriales han prevalecido en estudios filogeográficos (Avise et al., 1987; Avise, 1998; Bray et al., 2013), de genética de poblaciones (Ballard, 2000) e inferencia filogenética (Oceguera-Figueroa, 2011). El DNA mitocondrial en última instancia es de origen bacteriano y evoluciona rápidamente en animales. Otra característica importante y comúnmente aceptada es que el DNA mitocondrial animal solamente se hereda vía materna y carece de recombinación (Gillham, 1994). Sin embargo, durante los últimos años, varios estudios han cuestionado que la ausencia de recombinación y la herencia exclusivamente materna sean una característica constante a lo largo de todo el reino animal (Lunt et al., 1997; Awadalla et al., 1999; Hoarau et al., 2001; Ladoukakis y Zouros, 2001). Actualmente se sabe que en algunos grupos de organismos los mecanismos de reconocimiento y eliminación de DNA mitocondrial parental pueden fallar haciendo posible que ocurran filtraciones de DNA mitocondrial parental hacia los ovocitos (Kondo et al., 1990; Gyllensten et al., 1991; Magoulas y Zouros, 1993; Meusel y Mortiz, 1993; Kvist et al., 2004). También se sabe que las fallas en el mecanismo de reconocimiento de DNA mitocondrial parental son más comunes en poblaciones híbridas, en las cuales la especificidad en el proceso de reconocimiento puede ser menos preciso (Kaneda et al., 1995; Shitara et al., 1998; Sutovsky et al., 2000). A pesar de lo anterior, el “consenso” sobre el DNA mitocondrial es que se trata de una molécula heredada de forma matrilineal que carece de recombinación genética (Gillham, 1994). Como consecuencia, los alelos mitocondriales son haploides y constituyen haplotipos (Gutiérrez-García y Vázquez-Domínguez, 2011). La palabra “haplotipo” se deriva del término “haploide” que describe componentes celulares con información de un solo progenitor, y del término “genotipo” que se refiere a la constitución genética de un organismo, en su sentido más amplio un haplotipo se refiere a los genes en un locus que se heredan juntos a partir de un solo progenitor (Birren, 1997). Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), que son variaciones en una sola posición en la secuencia de DNA entre individuos, pueden considerarse haplotipos diferentes cuando se trata de secuencias de DNA mitocondrial (Avise, 2000). Las relaciones genealógicas de los haplotipos pueden analizarse a través de diversos métodos, entre los más comunes se encuentran los de reconstrucción filogenética y construcción de redes de haplotipos (Avise, 2009).

La molécula de DNA mitocondrial consiste de 37 genes arreglados consecutivamente a lo largo de una molécula circular compuesta de aproximadamente 17000 nucleótidos (Fig. 1). Dos genes de esta molécula de DNA codifican para RNA ribosomal, 22 para RNAs de transferencia (tRNA) y 13 para subunidades de proteínas que participan en la cadena de transporte de electrones y durante la fosforilación oxidativa (Lunt et al., 1998). La molécula de DNA mitocondrial también incluye una región no codificante llamada región control o sitio de iniciación de la replicación. Esta región es extremadamente variable y se caracteriza por la presencia de elementos repetitivos y una alta frecuencia de inserciones y deleciones nucleotídicas (Pesole et al., 1999). Entre los factores involucrados en la rápida evolución del DNA

mitocondrial destacan la carencia de mecanismos de reparación de DNA y el medio corrosivo rico en oxígeno al que se encuentran expuestas las moléculas dentro de la mitocondria (Awise, 2009).

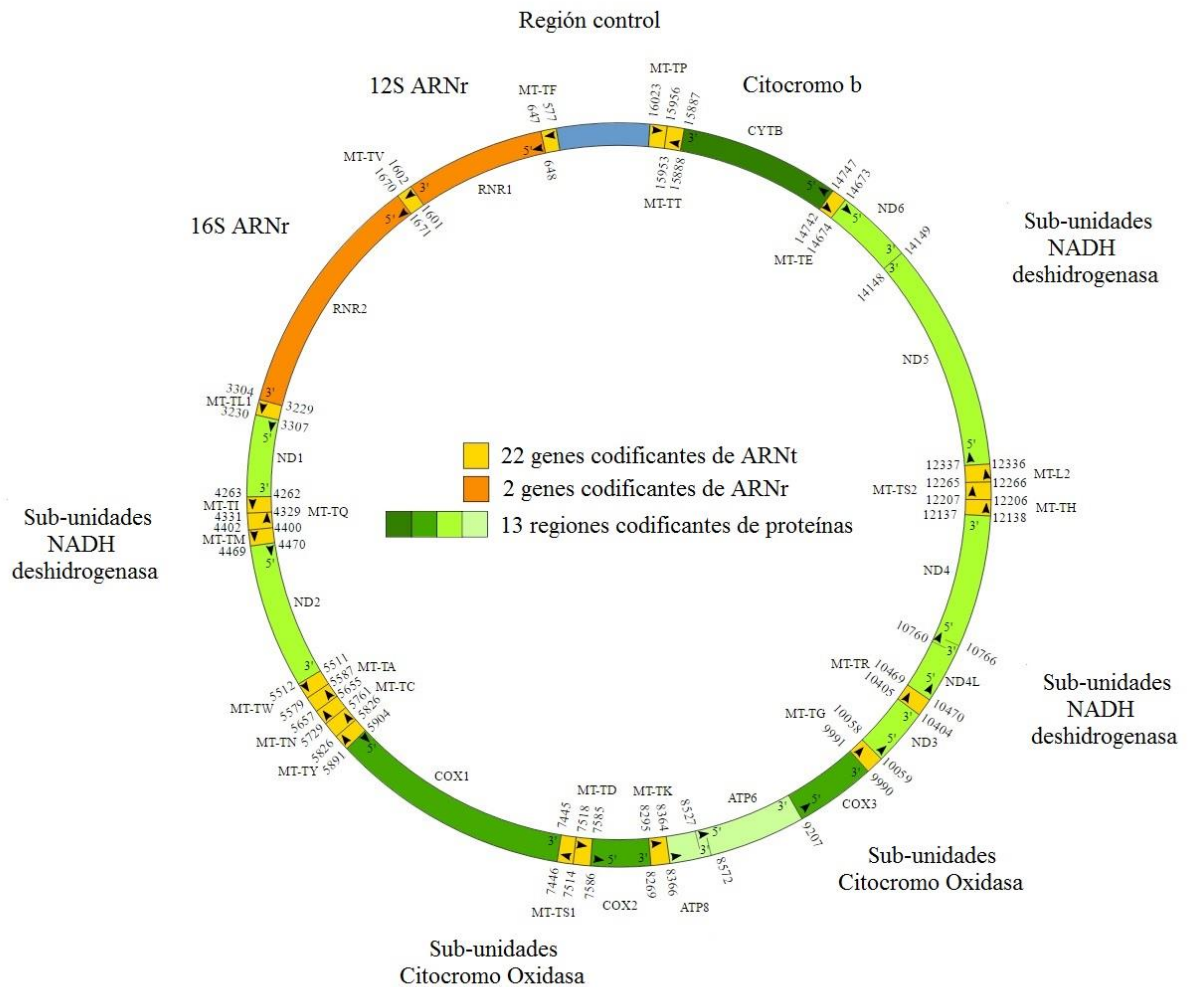


Fig. 1 Molécula de DNA mitocondrial mostrando los genes codificantes y la región control

A pesar de que la mayoría de los estudios filogeográficos se basan en el análisis del DNA mitocondrial, es importante incluir loci nucleares diploides que brinden un panorama completo (no sólo matrilineal) en torno a la evolución de los patrones genealógicos de las poblaciones en respuesta a cambios climáticos y geológicos a través del tiempo (Karl y Awise, 1993; Hare, 2001). Los genes nucleares ribosomales se consideran como los mejores marcadores para establecer relaciones filogenéticas (Woese et al., 1990). Se trata de regiones universales del genoma que contienen tanto regiones altamente conservadas como regiones sumamente variables (Goerge et al., 1977). El ribosoma consiste de 2 subunidades, la subunidad ribosomal menor (SSU por sus siglas en inglés) y la subunidad ribosomal mayor (LSU por sus

siglas en inglés). La SSU se compone por un solo RNA, el 18S rRNA; mientras que la LSU se conforma por tres RNAs: el 5S rRNA, el 5.8S rRNA y el 25S/28S rRNA. La tasa de evolución de los genes ribosomales es lenta en comparación con los marcadores mitocondriales, por lo que los primeros son de gran utilidad para resolver relaciones filogenéticas entre grupos lejanamente relacionados (Moritz et al., 1987). De manera general, se ha sugerido que la estructura poblacional de las especies se encuentra estrechamente relacionada con impedimentos a la dispersión ya sea inherentes a los propios organismos (por ejemplo, vagilidad reducida o adaptación a ambientes muy restringidos y localizados) o ajenas a los organismos (por ejemplo, barreras geográficas) (Avice, 2009).

## 1.2 Métodos de Inferencia Filogenética

Los métodos de inferencia filogenética son ampliamente utilizados en estudios filogeográficos para evidenciar la posible estructura poblacional al interior de las especies (Avice, 2009). La inferencia bayesiana es el método filogenético más empleado actualmente, aunque los métodos de parsimonia y máxima verosimilitud e incluso algunos análisis de distancias genéticas se utilizan con frecuencia (Bray et al., 2013; Barrow et al., 2015; Ellis et al., 2015). De forma general, el método de parsimonia se rige por una premisa bastante simple, la cual consiste en buscar el árbol o conjunto de árboles que minimicen la cantidad de cambios evolutivos o pasos requeridos para explicar los datos. En otras palabras, la explicación más simple es la más factible (Kluge y Farris, 1969; Farris, 1970). Una crítica común a este método es que al analizar matrices con secuencias altamente divergentes puede ocurrir una “atracción de ramas largas” o, por el contrario, el fenómeno conocido como zona de Felsestein, lo cual puede conducir a hipótesis filogenéticas erróneas con valores de soporte de los nodos altos (Felsestein, 1978; Swofford et al., 1996). Sin embargo, en estudios filogeográficos, en donde existe poca divergencia entre las secuencias, esta aproximación ofrece resultados confiables (Holder y Lewis, 2003).

El método de máxima verosimilitud puede simplificarse de la siguiente forma: la verosimilitud de un conjunto de datos  $D$  es la probabilidad de dichos datos dada una hipótesis  $\theta$  y un modelo de evolución molecular (Dhar y Minin, 2015). Este método no es exclusivo de inferencia filogenética y su incorporación en este campo se enfocó en primer lugar en el análisis de secuencias nucleotídicas (Felsestein, 1981) y posteriormente de secuencias de aminoácidos (Kishirno et al., 1990). Por lo tanto, la verosimilitud en inferencia filogenética es la probabilidad de los datos (secuencias) dado un modelo de evolución (hipótesis) y de un árbol filogenético (topología y longitudes de ramas) (Lemey, 2009). El proceso para encontrar el árbol filogenético más verosímil involucra encontrar la topología y la longitud de ramas del árbol que en conjunto proporcionen la probabilidad más alta de observar las secuencias de DNA que conforman la matriz de datos (Holder y Lewis, 2003). Los algoritmos de máxima verosimilitud en inferencia filogenética realizan

iteraciones entre dos etapas principales: 1) para una topología dada, encuentran las longitudes de las ramas que hacen los datos observados más probables y 2) dadas las longitudes de las ramas y los parámetros del modelo de sustitución, encuentran la topología que maximiza la verosimilitud de los datos (Swofford et al., 1996). Al final del análisis se selecciona el árbol más verosímil al calcular la proporción de probabilidad de todas las hipótesis comparadas (Lemey, 2009). A pesar de ser un método que ofrece buenos resultados es computacionalmente demandante, lo que hace imposible obtener el árbol óptimo con certeza incluso para matrices de datos moderadas (Swofford et al., 1996). Por lo tanto, todos los métodos prácticos utilizan búsquedas heurísticas para obtener árboles casi óptimos en tiempos computacionales relativamente cortos, sin embargo siempre existe la posibilidad de encontrar óptimos locales como el árbol más verosímil (Chor et al., 2000).

Finalmente, la inferencia bayesiana utiliza el teorema de Bayes para combinar la probabilidad posterior de una filogenia con la verosimilitud para producir una distribución de probabilidad sobre los árboles:

$$P[\text{Árbol} | \text{Datos}] = \frac{P[\text{Datos} | \text{Árbol}] \times P[\text{Árbol}]}{P[\text{Datos}]}$$

Los análisis bayesianos deben especificar un modelo evolutivo y ciertos parámetros “*a priori*” para determinar la probabilidad posterior de cada árbol (Rannala y Yang, 1996). Este es un método muy complejo que utiliza un algoritmo para aproximar las distribuciones de probabilidad posterior, tal algoritmo se conoce comúnmente como Cadenas de Markov Monte Carlo (Hastings, 1970). El algoritmo MCMC incluye una serie de etapas que forman una cadena. En cada etapa se propone una nueva ubicación en el espacio de parámetros como el siguiente enlace en la cadena. La ubicación propuesta se genera mediante la perturbación aleatoria de algunos parámetros en el estado presente de la cadena y por lo tanto tiende a ser similar al estado actual. Se calcula la probabilidad posterior en la ubicación propuesta y si resulta mayor que la de la ubicación actual se acepta el movimiento y la ubicación propuesta se convierte en el siguiente enlace en la cadena. El ciclo se repite generalmente durante millones de veces con la intención de observar una tendencia de las cadenas a permanecer o convergir en regiones de probabilidad posterior alta (Hastings, 1970). El número de repeticiones que debe ejecutarse para encontrar las regiones de árboles óptimos es variable e incierto y depende en gran medida del tamaño de la matriz en estudio y de la complejidad de los datos (Holder y Lewis, 2003). La inferencia bayesiana es un método robusto que permite analizar matrices muy grandes y modelos evolutivos bastante complejos en un tiempo aceptable (Huelsenbeck et al., 2001) con resultados confiables.



### 1.3 Generalidades de la subclase Hirudinida Lamarck, 1818

Hirudinida es una subclase del Phylum Annelida Lamarck, 1809 que incluye aproximadamente 680 especies de gusanos hermafroditas caracterizados por la presencia de 34 somitos constantes a lo largo del cuerpo, una ventosa oral y una ventosa caudal (Sket y Trontelj, 2008). Junto con los órdenes Acanthobdellida, Branchiobdellida y Oligochaeta, los hirudíneos constituyen la Clase Clitellata la cual forma un grupo monofilético sustentado tanto por evidencia morfológica como molecular (Fig. 2) (Siddall et al., 2001). Los clitelados o miembros de la clase Clitellata son un grupo de gusanos segmentados que poseen una zona glandular especializada en la secreción de ootecas en el tercio anterior de cuerpo (Rouse y Fauchald, 1995).

Las sanguijuelas son ampliamente reconocidas debido a que se alimentan de sangre, sin embargo sólo alrededor del 30% de las especies son hematófagas (Sawyer, 1986; Sket y Trontelj, 2008). El resto de las especies han desarrollado estrategias alimenticias diferentes, tales como liquidosomatofagia y macrofagia, es decir, la ingesta de fluidos internos u órganos blandos de pequeños invertebrados (por ejemplo, moluscos, oligoquetos, hirudíneos, etc.) o el engullimiento de presas completas que se descomponen por enzimas del aparato digestivo, respectivamente (Sawyer, 1986). Aproximadamente el 70% de las especies de hirudíneos habitan cuerpos de agua dulce, sin embargo, también existen especies terrestres y marinas (Sket y Trontelj, 2008). Los hirudíneos o sanguijuelas son cosmopolitas, encontrándose en todos los continentes excepto en la Antártida (Apakupakul et al., 1999).

A pesar de que existen muy pocos estudios en torno a la ecología de la reproducción en hirudíneos, se han caracterizado dos tipos de reproducción (Sawyer, 1986). La primera de ellas, se denomina inseminación hipodérmica y consiste en la implantación de espermatóforos en la epidermis de la sanguijuela receptora (Mann, 1962). En algunas especies de la familia Piscicolidae se describió un tejido “conductor” especializado que facilita el movimiento de los espermatozoides desde el sitio de implantación del espermatóforo hasta los ovisacos (Świątek et al., 2009). Sin embargo, recientemente Salas-Montiel et al. (2017) analizaron el sitio de implantación de los espermatóforos en *Haementeria officinalis* de Fillipi, 1849 un miembro de la familia Glossiphoniidae, y concluyen que la implantación de los espermatóforos en dicha especie no sigue patrones reconocibles por lo cual se infiere que los espermatozoides deben moverse a través del celoma desde el sitio de implantación del espermatóforo hasta los ovisacos ante la aparente ausencia de tejido conductor. La segunda estrategia de reproducción involucra especies de sanguijuelas con pene y vagina bien desarrollados que participan durante la transferencia de espermatozoides (Moser et al., 2016). Las especies de la familia Glossiphoniidae presentan estrategias de cuidado parental en las cuales los individuos adultos mantienen los huevos y las crías adheridas a la superficie ventral en donde se mantienen aún hasta después de su primer alimento (Kruger y Du-preez, 2015.)

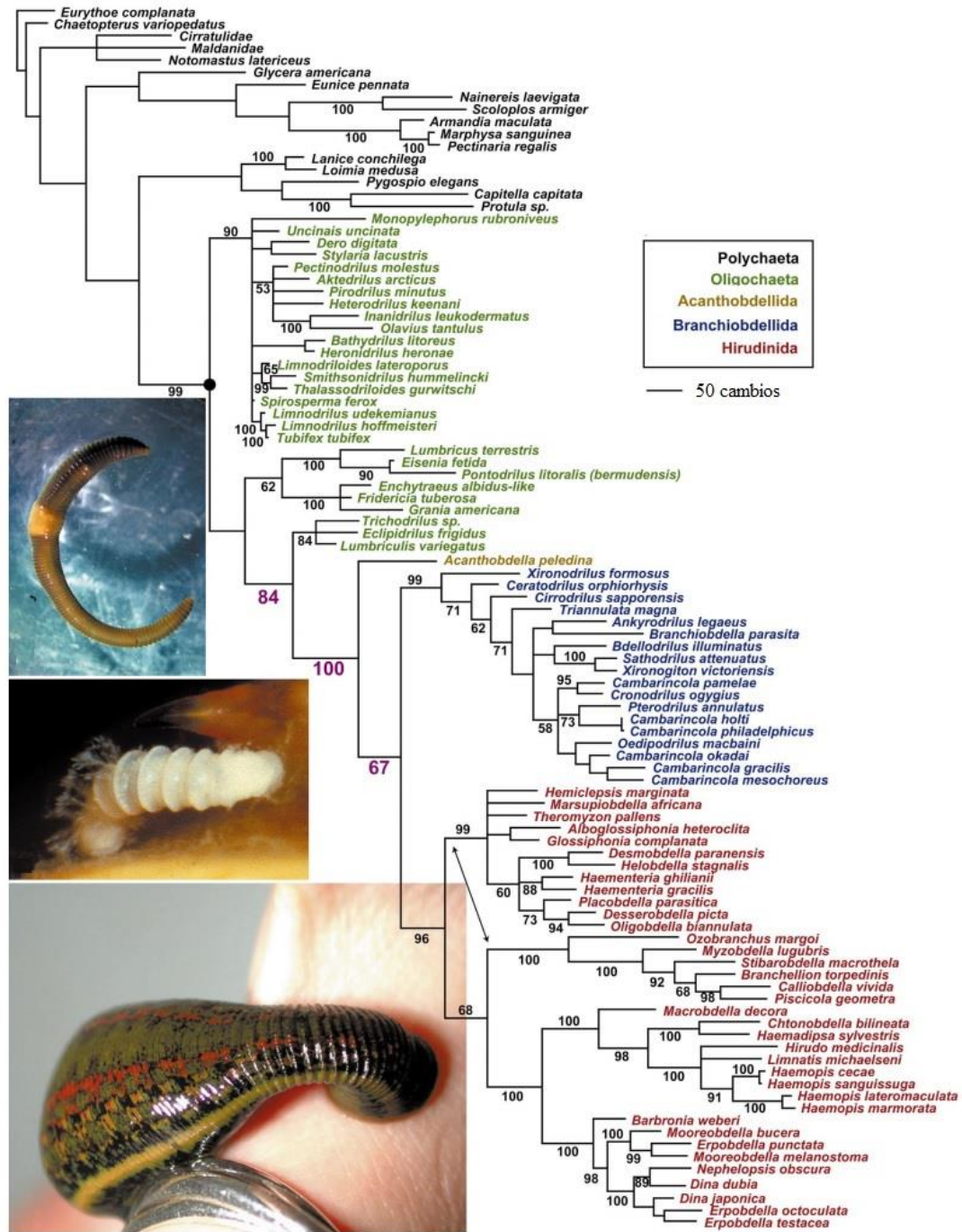


Fig. 2 Árbol de consenso estricto de la matriz concatenada del COI y 18S mostrando la monofilia de Clitellata, anidada dentro de Polychaeta. Tomado de Siddall et al. (2001)

## 1.4 Sanguijuelas medicinales

Las sanguijuelas medicinales han sido empleadas durante más de 2000 años para tratar una gran variedad de enfermedades, incluyendo demencia, tos ferina, epilepsia, diabetes, gota, tumores y obesidad (Weinfeld et al., 2000; Porshinsky et al., 2011). En Europa, las sanguijuelas medicinales se utilizaron para extraer sangre de pacientes con la finalidad de equilibrar los “humores biológicos” dentro del cuerpo. En varias culturas de Europa se creía que el desequilibrio de dichos humores era responsable de las enfermedades (Graham, 1995). El registro más antiguo del uso de sanguijuelas con fines médicos aparece en un pictograma hallado en una tumba en Egipto con una antigüedad de 1500 AC (Whitaker et al., 2004). Las sanguijuelas fueron tan populares durante los siglos XVIII y XIX que las poblaciones de la sanguijuela medicinal europea *Hirudo medicinalis* fueron explotadas casi al punto de su extinción en varios países (Wells y Combes, 1987).

La aplicación de sanguijuelas en la medicina disminuyó dramáticamente a finales del siglo XIX debido a la falta de evidencia científica que respaldara sus supuestas propiedades curativas. Sin embargo, el uso de estas en la medicina actual resucitó en el campo de la cirugía reconstructiva, particularmente en procesos que involucran la reimplantación de tejidos en los que la congestión venosa es un problema común. La congestión venosa ocurre cuando las arterias, completamente restauradas, son capaces de transportar sangre hacia el tejido reimplantado, mientras que las venas, aún en proceso de sanación, no son capaces de transportarla de regreso. Este fenómeno ocasiona estancamiento de sangre en el tejido reimplantado, lo cual puede llevar a la formación de trombos y posteriormente necrosis (Weinfeld et al., 2000). La hirudoterapia es útil para remover el exceso de sangre y permitir que las venas dañadas se recuperen (Singh, 2010; Porshinsky et al., 2011). Esta técnica ha sido utilizada para reestablecer el flujo sanguíneo de diversos tipos de tejido reimplantado, entre los que se encuentran falanges (Brody et al., 1989), pezones (Güneren et al., 2000), pabellones auriculares (Cho y Ahn, 1999), labios (Walton et al., 1998) y pene (Pantuck et al., 1996).

Las sanguijuelas medicinales provistas de mandíbulas, son especies dulceacuícolas que durante la temporada de reproducción depositan ootecas con huevos fertilizados en el medio terrestre (Sawyer, 1986). Debido a dichas características fueron incluidas dentro de la familia Hirudinidae (Richardson, 1969). Sin embargo, tras la incorporación de herramientas moleculares y de métodos filogenéticos explícitos, se puso de manifiesto que la familia no constituye un grupo monofilético (Fig. 3) (Phillips y Siddall, 2005, 2009). Actualmente se reconocen 2 clados de sanguijuelas medicinales, Hirudinidae que agrupa a las especies de Europa, África y Asia, y Macrobdellidae que agrupa a las especies del continente americano (Phillips y Siddall, 2009).

La familia Macrobdellidae está compuesta por tres géneros: *Macrobdella* Verril, 1872, *Oxyptychus* Grube, 1850 y *Philobdella* Verril, 1874 (Phillips y Siddall, 2009; Ocegüera-Figueroa et al., 2012). El género

*Macrobdeella* incluye cuatro especies (Sawyer, 1986; Klemm, 1982; Phillips et al., 2016): *M. decora*, *M. sestertia* Whitman, 1886, *M. ditetra* Moore, 1953 y *M. diplotertia* Meyer, 1975. Las especies de este género se caracterizan por un patrón de coloración dorsal verde olivo con manchas naranjas arregladas metaméricamente en la línea media, así como por la presencia de glándulas copulatorias externas en la superficie ventral, posteriores al gonoporo femenino (Klemm, 1982; Sawyer, 1972, 1986). Los miembros de este género se encuentran restringidos geográficamente a Norteamérica incluyendo Canadá, EUA y el norte de México (Sawyer, 1986; Phillips y Siddall, 2009; Caballero, 1952), *Macrobdeella decora* es la especie más ampliamente distribuida de la familia, ocupa la mayoría de los estados del noreste de Estados Unidos, del sureste de Canadá y ha sido registrada en Monterrey, México (Caballero, 1952; Palomo, 1989). Por el contrario, *M. sestertia* sólo se conoce de Nuevo Hampshire, Massachusetts y Maine (Smith y Hanlon, 1997; Phillips et al., 2016). *Macrobdeella diplotertia* se distribuye a lo largo de Arkansas, Kansas, y Missouri (Connior y Trauth, 2010), mientras que *M. ditetra* habita la planicie costera sureste, desde Texas hasta Florida al este, y hasta Carolina del Norte al norte (Meyer, 1975).

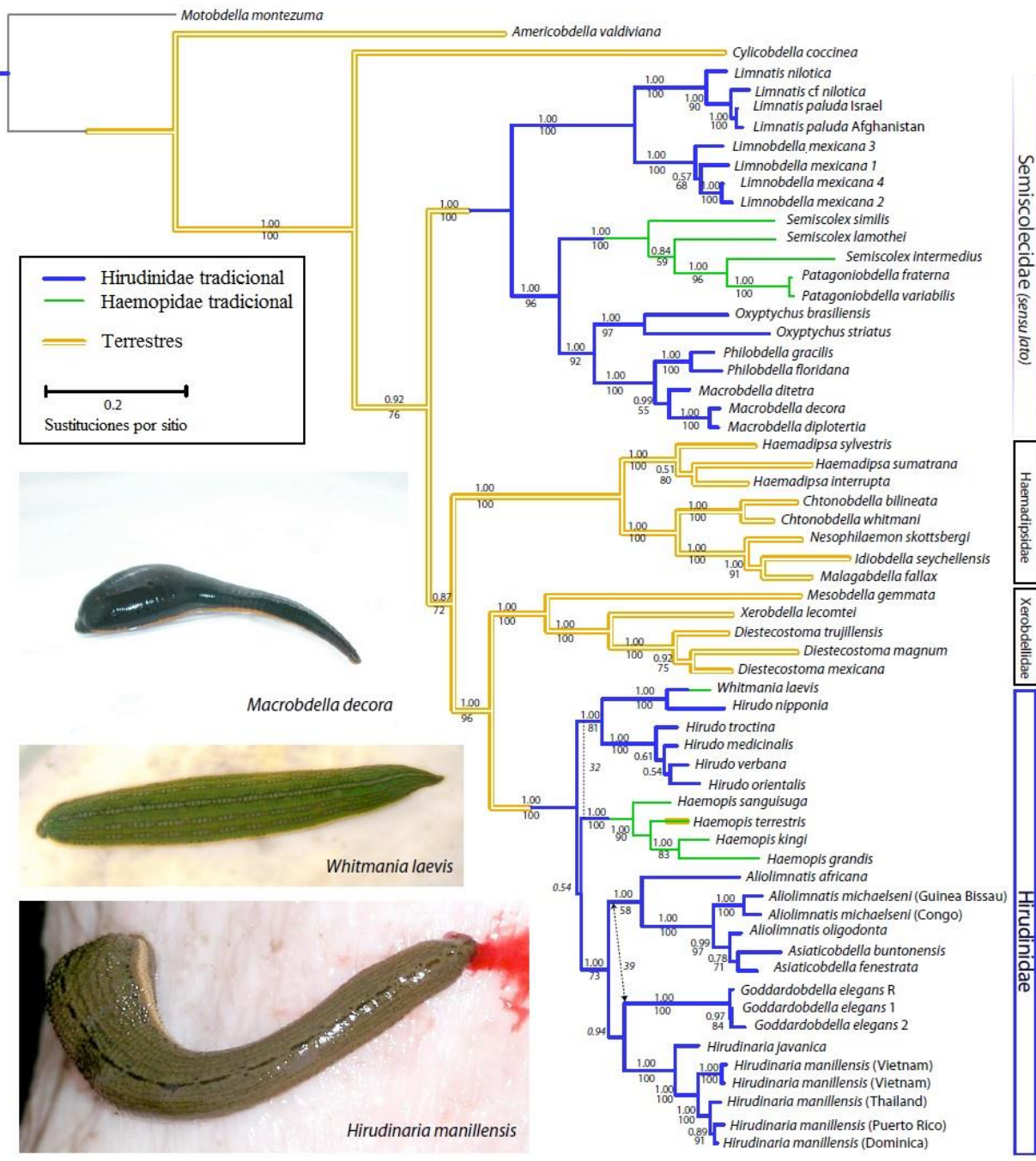


Fig. 3 Árbol de Parsimonia e Inferencia Bayesiana de la matriz concatenada incluyendo los marcadores 18S rDNA, 28S rDNA, 12S rDNA y COI. Los valores de probabilidad posterior y los valores de jackknife se encuentran por encima y debajo de los nodos, respectivamente. Las ramas en color azul corresponden a los miembros tradicionales de la familia Hirudinidae.

La mayoría de los registros de *M. decora* datan de hace más de 70 años y su estatus taxonómico no ha sido verificado a la luz de las nuevas fuentes de información. Las poblaciones de *M. decora* se distribuyen continuamente desde la provincia de Ontario al sur de Canadá hasta Georgia al sureste de Estados Unidos de donde desaparecen hasta reaparecer en Texas y Nuevo León. El registro correspondiente al norte de México confiere a la distribución geográfica de *M. decora* un carácter disyunto pues existe una zona geográfica amplia sin la presencia de esta especie (Fig. 4).



Fig. 4 Distribución geográfica de *M. decora*

La población registrada en México se considera como un relictos de las poblaciones de Estados Unidos y Canadá que durante el último máximo glacial, entre hace 26500 y 19000 años (Clark et al., 2009) se desplazaron hacia el sur del continente. Sawyer (1986) y Palomo (1989) sugieren que la población ancestral original de *M. decora* debió fragmentarse durante el último máximo glacial en refugios y tras la finalización de dicho evento paleoclimático las poblaciones aisladas iniciaron un proceso de expansión geográfica. Esta hipótesis aún no se ha puesto a prueba.

La distribución geográfica de *M. decora* es atípica, no sólo por su carácter disyunto sino por su gran extensión. Las sanguijuelas son aparentemente animales de muy baja capacidad de dispersión, tienen una

gran dependencia por el medio acuático, razón por la cual enfrentan severos problemas para desplazarse de un cuerpo de agua a otro cuando estos no están interconectados a través de aguas lóaticas como ríos y arroyos (Madill & Hovingh, 2007). Se sabe que algunas especies de sanguijuelas han establecido relaciones foréticas tanto con vertebrados como con invertebrados y que esto podría facilitar su dispersión (Khan y Frick, 1997; Maia-Carneiro et al., 2012; Badets y Du Preez, 2014); además, es muy probable que especies hematófagas como *M. decora* sean capaces de utilizar a sus hospederos como un medio eficiente de dispersión.

Considerando estos factores inherentes a la biología de las sanguijuelas, es posible que las poblaciones de *M. decora* hayan permanecido aisladas y que como consecuencia exista un alto grado de estructura poblacional y divergencia genética a lo largo de su área de distribución geográfica. Adicionalmente, debido a la falta de revisión del estatus taxonómico de los ejemplares asignados al género *Macrobdeella* depositados en la Colección Nacional de Helminfos (CNHE) del Instituto de Biología de la UNAM y de la Colección de Invertebrados del Museo Nacional de Historia Natural (NMNH) del Instituto Smithsoniano es probable que se realicen cambios taxonómicos después de una revisión detallada de los ejemplares del género.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar la diversidad morfológica y genética de *Macrobdeella decora* así como su estructura poblacional con la intención de proveer una explicación histórica de su distribución actual.

### 2.2 Objetivos particulares

- Evaluar la estructura genética entre las poblaciones de *M. decora*
- Investigar las relaciones genealógicas entre las poblaciones de *M. decora*.
- Revisar la identificación taxonómica de ejemplares asignados a *M. decora* con base en información de morfología externa.



### 3. ANTECEDENTES

*Macrobdella decora* fue descrita por el naturalista estadounidense Thomas Say en 1824 como *Hirudo decora* con base en organismos procedentes del Lago Vermilion, Minnesota, EUA. Verril (1874) erigió el género *Macrobdella* con el fin de clasificar esta especie dadas las claras diferencias con respecto a las formas europeas. La descripción original de *M. decora* consta de un sólo párrafo en el que se describen los patrones de pigmentación de la superficie dorsal y la disposición de las manchas oculares (Say, 1824). Verril (1982) propuso la separación de esta especie del género *Hirudo* principalmente debido a las glándulas copulatorias situadas en la región ventral (ausentes en el género *Hirudo*). En estudios posteriores (Klemm, 1982; Sawyer, 1986), se describe con detalle tanto la morfología externa como la interna y se da particular énfasis en el número y arreglo de las glándulas copulatorias como el carácter diagnóstico de las especies del género. La mayoría de los registros de *M. decora* se restringen a la costa este de Estados Unidos y Canadá (Klemm, 1985; Sawyer, 1986), sin embargo, existen al menos dos trabajos que reportan esta especie en Nuevo León, México (Caballero y Caballero, 1952; Palomo, 1989).

Aunque a la fecha no existen estudios filogeográficos con la sanguijuela medicinal norteamericana, se han realizado tres estudios filogenéticos que incluyen representantes de *M. decora*. Phillips y Siddall (2005) realizaron un análisis filogenético de las sanguijuelas medicinales del nuevo mundo bajo el enfoque de parsimonia, incluyeron dos representantes del género *Oxyptychus*, dos del género *Philobdella* y tres del género *Macrobdella*. Dicho análisis confirmó la monofilia de las formas norteamericanas (*Macrobdella* y *Philobdella*), las cuales resultaron ser hermanas de las sanguijuelas sudamericanas hematófagas y no hematófagas (*Oxyptychus* y *Semiscolex*). Por otra parte, Phillips y Siddall (2009) pusieron a prueba la monofilia de la familia Hirudinidae en un contexto filogenético más amplio y a pesar de ser un taxón que históricamente agrupaba sanguijuelas hematófagas, con tres mandíbulas (una dorsal y dos ventrolaterales), varios pares de ciegos del buche, pene y vagina bien desarrollados, además de ser dulceacuícolas y que depositan ootecas fuera del agua, los resultados de sus análisis no recuperaron a la familia Hirudinidae como monofilética, por lo cual se reestableció la familia Macrobdellidae para incluir sólo a las sanguijuelas medicinales del nuevo mundo. Finalmente, Ocegüera-Figueroa et al., (2012) además de describir una nueva especie de la familia Macrobdellidae y posicionarla en el contexto filogenético, analizaron la evolución de la morfología de las mandíbulas y denticulos de diversas especies de las familias Macrobdellidae, Semiscolécidae y Praobdellidae a partir de datos morfológicos y moleculares.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Obtención del material biológico

Las sanguijuelas se obtuvieron a través de diferentes métodos: 1) mediante la exposición de nuestras propias extremidades inferiores en ríos y lagos, 2) mediante trampas cebadas con vísceras de res y 3) mediante la revisión de “gusanos” comercializados como carnada por pescadores locales. Los organismos recolectados fueron transportados al laboratorio en recipientes de plástico con agua del medio. Posteriormente se anestesiaron mediante la adición gradual de etanol al 70% y se fijaron en etanol al 96% tanto para análisis morfológicos como para análisis moleculares. Los ejemplares se identificaron a nivel de especie mediante el uso de literatura especializada (Klemm, 1985; Sawyer, 1986; Phillips et al., 2016). En total se visitaron 19 localidades distribuidas en Canadá, Estados Unidos y México (Tabla 1).

Tabla 1. Localidades visitadas para la obtención de ejemplares de *M. decora*.

País	Estado	Localidad	Coordenadas	n
Estados Unidos	Illinois	Wildlife Annex	37° 42' 47.5'' N 89° 14' 17.8'' O	NA
Estados Unidos	Illinois	Oakwood Bottoms	37° 40' 24.8'' N 89° 25' 53.8'' O	NA
Estados Unidos	Illinois	Cypress Creek National Wildlife Refuge, Pooh Bear Tree	37° 18' 48.89'' N 88° 59' 3.45'' O	NA
Estados Unidos	Illinois	Douglas Lake	37° 42' 40.25'' N 89° 13' 56.65'' O	NA
Estados Unidos	Illinois	Carbondale Reservoir, Evergreen Park	37° 41' 55.1'' N 89° 13' 49.1'' O	NA
Estados Unidos	Illinois	Crab Orchard National Wildlife Refuge	37° 43' 25'' N 89° 02' 30'' O	NA
Estado Unidos	Maryland	Worcester, Eastern Shore	38° 20' 26'' N 75° 27' 22'' O	NA
Estados Unidos	Maryland	St. Mary's, Mechanicsville	38° 24' 45'' N 76° 43' 59'' O	NA

México	Nuevo León	Cola de Caballo, Santiago	25° 21' 45'' N 100° 09' 48'' O	NA
México	Nuevo León	Parque Río La Silla, Guadalupe	25° 40' 34.99'' N 100° 14' 06'' O	NA
México	Nuevo León	Río Pílon, Rayones	25° 01' 30.25'' N 99° 59' 36.74'' O	NA
México	Nuevo León	Río Ramos, Allende, Las Raíces	25° 11' 19.45'' N 100° 01' 19.25'' O	NA
México	Nuevo León	Río Pílon, Montemorelos	25° 11' 25.69'' N 99° 45' 48.22'' O	NA
Canadá*	Ontario	Parque Algonquin	45° 50' 04'' N 78° 25' 40'' O	14
Canadá*	Ontario	Caledon	43° 51' 08'' N 79° 58' 16'' O	12
Estados Unidos*	Minnesota	Lago Vermilion, St. Louis	47° 50' 04'' N 92° 19' 01'' O	5
Estados Unidos*	Massachusetts	Boston	42° 27' 26'' N 71° 05' 46'' O	13
Estados Unidos*	Connecticut	Mansfield	41° 47' 05'' N 72° 05' 04'' O	3
Estados Unidos*	Maryland	Nanjemoy, Charles	38° 22' 28.6'' N 77° 14' 23'' O	6

\*Localidades positivas; NA = No Aplica

#### 4.2 Extracción de DNA y amplificación

Con la finalidad de evitar contaminación debida a DNA del hospedero, o por los contenidos del aparato digestivo de la sanguijuela, se utilizó un trozo de la ventosa posterior para la extracción de DNA total. La extracción se realizó empleando el DNeasy Tissue Extraction Kit (Qiagen Inc., Valencia, California, EUA). La amplificación de dos marcadores mitocondriales, así como del nuclear se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genes mitocondriales COI y NADH así como el gen nuclear 18S rDNA se obtuvieron mediante los primers listados en la Tabla 2. La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo en un volumen total de 15 µl con 0.12 µl de Taq polimerasa, 1.5 µl de buffer, 0.75 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.3 µl de dNTPs 10mM, 0.24 µl de cada primer, 9.85 µl de agua estéril y 2 µl de

DNA. Las reacciones de PCR se realizaron en una termocicladora Applied Biosystems 2720. Se utilizó el siguiente protocolo de amplificación para ambos fragmentos mitocondriales: 94°C (seis min), seguido de 35 ciclos de 94°C (30 seg), 48°C (45 seg), 72°C (45 seg) y una extensión final de 72°C (seis min). El marcador nuclear se amplificó de acuerdo con el siguiente perfil térmico: 95°C (cinco min), seguido de 35 ciclos de 95° (30 seg), 52°C (30 seg), 72°C (30 seg) y una extensión final de 72°C (siete min). Los productos amplificados se enviaron al Centro de Genómica de la Universidad de Washington y al Laboratorio de Secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM para secuenciación. Las secuencias de DNA se reconciliaron y editaron en GENEIOUS v. 5.1.7 (Biomatters, disponible en <http://www.geneious.com/>).

Tabla 2. Marcadores y primers utilizados en este estudio

Marcador	Nombre del primer	Secuencia del primer	Referencia
Nuclear			
18S DNAr	A	5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'	Apakupakul et. al., 1999
	L	5'-CCAACTACGAGCTTTTAACTG-3'	Apakupakul et. al., 1999
	C	5'-CGGTAATTCAGCTCCAATAG-3'	Apakupakul et. al., 1999
	Y	5'-CAGACAAATCGCTCCACCAAC-3'	Apakupakul et. al., 1999
	O	5'-AAGGGCACCACCAGGAGTGGAG-3'	Apakupakul et. al., 1999
	B	5'-TGATCCTTCCGCAGGTTACCT-3'	Apakupakul et. al., 1999
Mitocondrial			
COI	LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer et al., 1994
	HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'	Folmer et al., 1994
NADH	LND300	5'-TGGCAGAGTAGTGCATTAGG-3'	Light y Siddall, 1999
	HND1932	5'-CCTCAGCAAAATCAAATGG-3'	Light y Siddall, 1999

#### 4.3 Alineamiento de secuencias

Los alineamientos se realizaron en MUSCLE webserver (Edgar, 2004) con los parámetros predeterminados. La matriz del COI se compone de 71 terminales y 683 caracteres, la matriz del NADH está constituida por 55 taxa y 647 caracteres alineados, mientras que la matriz del 18S se compone por 67 terminales y 1868 caracteres alineados. La matriz combinada está conformada por 66 terminales y 3197 posiciones. Se seleccionó a especies de los géneros *Oxyptychus*, *Patagoniobdella*, *Philobdella* y *Semicolex* como grupos externos con base en análisis filogenéticos previos (Phillips y Siddall, 2005, 2009; Ocegüera-Figueroa et al., 2012).

#### 4.4 Análisis filogenéticos

Los análisis de parsimonia se realizaron en TNT v. 1.1 (Goloboff et al., 2008) tanto para los genes individuales como para la matriz concatenada. Se llevaron a cabo 100 réplicas a través del método de búsqueda “New Technology Search” empleando cinco rondas del algoritmo “ratchet” y tres rondas del algoritmo “three fusing”. Todos los caracteres fueron igualmente pesados y no aditivos, los gaps fueron tratados como datos faltantes. Los valores de bootstrap se obtuvieron en TNT a partir de 1000 pseudoréplicas utilizando los algoritmos “random taxón addition” y “TBR branch swapping”, así como el método de búsqueda mencionado anteriormente. Los índices de consistencia y retención se calcularon en PAUP (Swofford, 2002).

Se escogió el modelo de sustitución nucleotídica GTR + G para el COI, HKY + G para el NADH y JC para el 18S. Los modelos de sustitución nucleotídica se obtuvieron con el programa FINDMODEL (Tao et al., 2008) a través del criterio de información de Akaike (Akaike, 1974). Los datos se analizaron bajo el método de inferencia bayesiana en el programa de cómputo MRBAYES v. 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Se realizó el análisis para cada gen por separado y también con los genes concatenados. Se ejecutaron las Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) con los parámetros de distribución predeterminados para dos corridas, cada una con una cadena fría y tres cadenas calientes por cinco millones de generaciones. Se muestrearon los árboles cada 1000 generaciones. Se utilizó la versión web de AWTY (Wilgenbusch et al., 2004) para verificar que las generaciones post burn-in alcanzaran estacionalidad en todas las particiones.

#### 4.5 Datación de tiempos de divergencia

Los análisis de tiempos de divergencia se realizaron con el programa BEAST v.1.8.4 (Drummond y Rambaut, 2007). Se ejecutó el análisis para el gen COI de forma individual y también para la matriz concatenada. Se seleccionó un reloj molecular estricto en BEAST v.1.8.4. Se utilizó el mismo modelo de sustitución nucleotídica empleado para cada partición durante los análisis filogenéticos. Se eligió el modelo de coalescencia “Constant Size” como el prior del árbol y una distribución log normal de  $0.0168 \pm 0.0018$  millones de años para calibrar el mismo (Papadopoulou et al., 2010). Los relojes moleculares del NADH y 18S se ligaron al del COI. El análisis se ejecutó por 15 millones de generaciones y se muestrearon árboles cada 1000 generaciones. Se seleccionó un burn-in de 25%. Los árboles restantes se utilizaron para construir un árbol de máxima credibilidad de clados con TREEANNOTATOR v.1.5.3 (Rambaut y Drummond, 2008).

#### 4.6 Diversidad genética

Se estimaron las distancias genéticas en PAUP\* (Swofford, 2003) empleando el modelo de evolución de Kimura dos parámetros (K2P; Kimura, 1980) y se obtuvieron las distancias genéticas promedio entre las poblaciones. El número de sitios segregantes, número de haplotipos, diversidad nucleotídica, diversidad haplotípica y el índice de diferenciación poblacional ( $F_{st}$ ) se calcularon con el programa DNAsp v.5.1. (Librado y Rozas, 2009).

#### 4.7 Estructura poblacional

Las redes de haplotipos se reconstruyeron con el programa NETWORK v.4.6 mediante el algoritmo median-joining utilizando los valores predeterminados. El tamaño de los círculos es proporcional al número de haplotipos. La estructura poblacional de *M. decora* se puso a prueba en el programa STRUCTURE v.2.3 (Pritchard et al., 2000) utilizando el modelo “admixture”. Se evaluó un número de poblaciones (K) igual a cinco de acuerdo con el número de poblaciones muestreadas Hubisz et al. (2009). La población de Maryland, EUA, se excluyó del análisis debido a que durante la realización del presente trabajo se encontró que se trata de otra especie. Se seleccionó un burn-in de 30000 y 100000 cadenas de Markov. Se realizaron diez corridas para cada valor de K. Se utilizó el método de Evanno et al. (2005) para determinar el número de poblaciones genéticas en Structure Harvester v0.6.93 (Earl & vonHoldt 2012).

## 5. RESULTADOS

Se recolectaron 53 ejemplares de *M. decora* provenientes de cinco localidades pertenecientes a seis estados/provincias de dos países (Tabla 1). La totalidad de los ejemplares presentan caracteres morfológicos típicos de la especie: dorso verde olivo con 22 manchas metaméricas de color amarillo a naranja a lo largo del cuerpo; región ventral con cuatro glándulas copulatorias arregladas en dos filas de dos glándulas cada una, posteriores al gonoporo femenino; tres mandíbulas, dos dorsolaterales y una ventral.

### 5.1 Análisis filogenéticos

El análisis filogenético del COI bajo el criterio de parsimonia (Fig. 5) y el resultado del análisis bayesiano (Fig. 6) muestran topologías congruentes. Ambas topologías recuperan a la familia Macrobdellidae como monofilética y a los miembros de la familia Semiscolecidae como su grupo hermano. Macrobdellidae incluye tres géneros: *Oxytychus*, *Philobdella* y *Macrobdella*. Este último se encuentra representado por tres especies en el análisis, dos previamente descritas (*M. decora* y *M. ditetra*) y una nueva especie de sanguijuela medicinal encontrada en el presente trabajo y que se denomina en los sucesivos como *Macrobdella* n. sp. la cual es la especie hermana de *M. decora* con valores de bootstrap y probabilidad posterior de 100 y uno, en los análisis de parsimonia y bayesiano respectivamente. En el análisis bayesiano, al interior de *M. decora*, las poblaciones de Parque Algonquin, Canadá; Caledon, Canadá y Minnesota, EUA forman un grupo monofilético con probabilidad posterior >0.95. Las poblaciones de Massachusetts, EUA y Connecticut, EUA también forman un grupo monofilético con probabilidad posterior >0.95. Dichos clados son grupos hermanos en ambos análisis. En parsimonia los valores de soporte de los mismos nodos son <80.

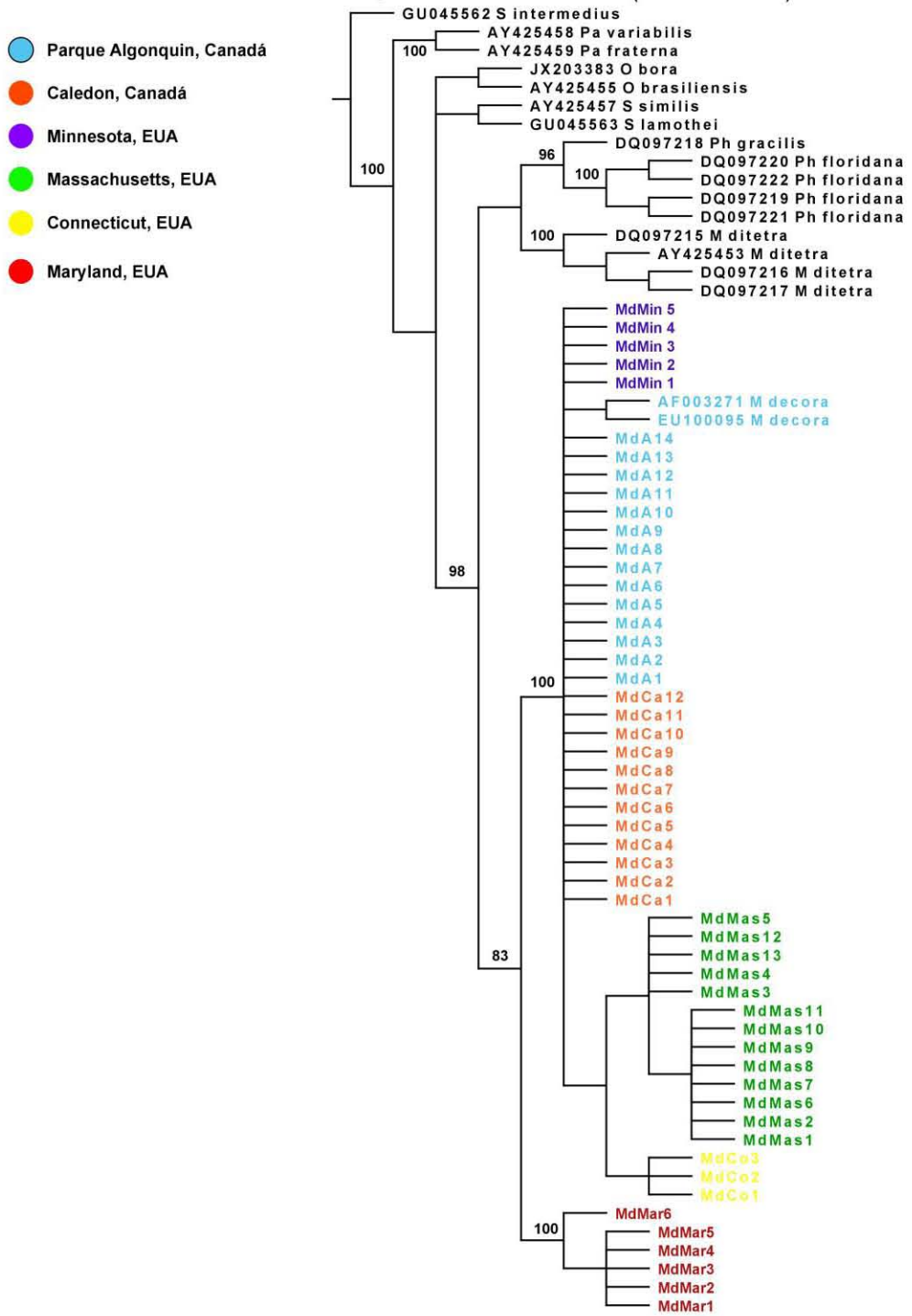


Fig. 5 Consenso estricto de los tres árboles más parsimoniosos del COI (709 pasos, IC = 0.57, IR = 0.78). Los números en los nodos representan los valores de bootstrap. Los colores en las ramas indican su pertenencia a una región geográfica particular.



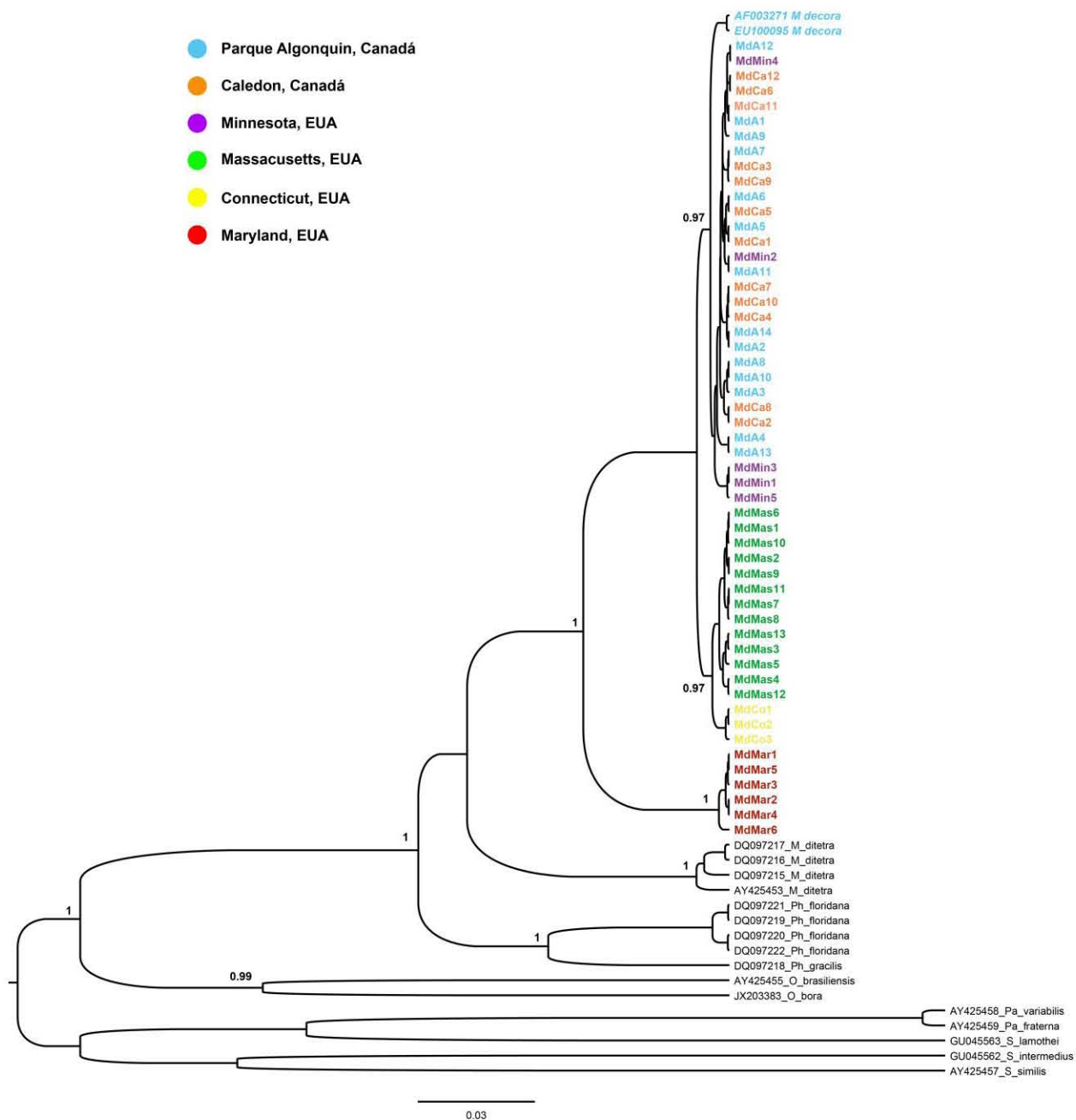


Fig. 6 Árbol bayesiano de máxima credibilidad de clados del COI. Los números en los nodos representan los valores de probabilidad posterior. Los colores en las ramas indican su pertenencia a una región geográfica particular.

El análisis filogenético del NADH bajo el criterio de parsimonia (Fig. 7) y el resultado del análisis bayesiano (Fig. 8) muestran topologías congruentes.

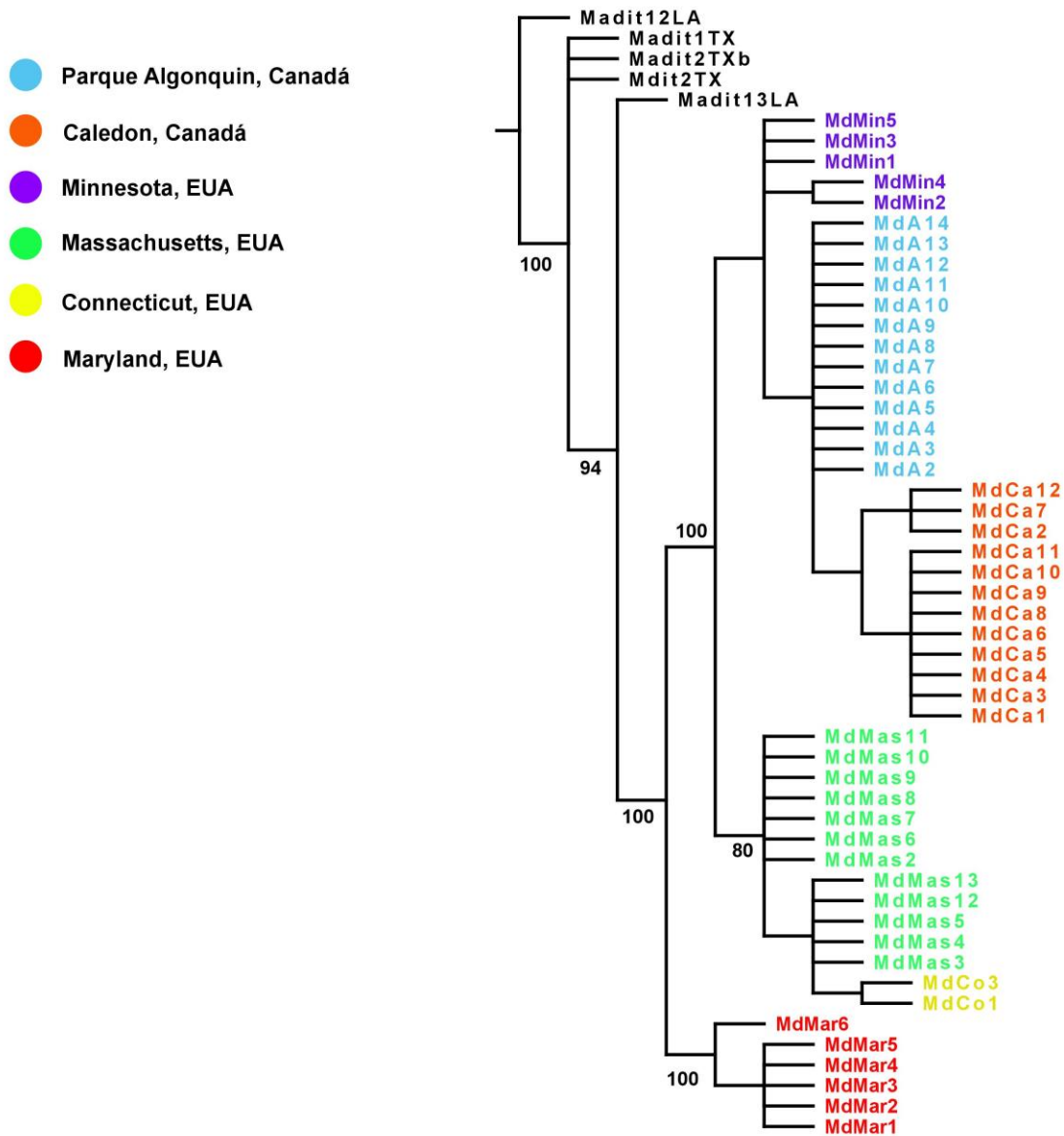


Fig. 7 Árbol más parsimonioso del NADH (110 pasos, IC = 0.91, IR = 0.98). Los números en los nodos representan los valores de bootstrap. Los colores en las ramas indican su pertenencia a una región geográfica particular.

Ambos análisis recuperan la monofilia de la familia Macrobdellidae y a los miembros de la familia Semiscolecidae como su grupo hermano. Macrobdellidae se compone de tres géneros: *Oxyptychus*, *Philobdella* y *Macrobdella*, este último incluye miembros de *M. ditetra*, así como ejemplares de *M. decora* de diversas localidades de Estados Unidos y Canadá, así como una nueva especie de sanguijuela medicinal. *Macrobdella* n.sp. se recupera en ambos análisis con valores de bootstrap y probabilidad posterior de 100 y

uno, respectivamente. En el análisis bayesiano, al interior de *M. decora* ambas poblaciones de Canadá forman un grupo monofilético >0.95 cuyo grupo hermano lo constituye la población de Minnesota, EUA >0.95. Por otra parte, las poblaciones de Massachusetts, EUA y Connecticut, EUA forman un grupo monofilético en las topologías de ambos métodos de inferencia filogenética (>80; 0.95, respectivamente). Estos dos clados son grupos hermanos.

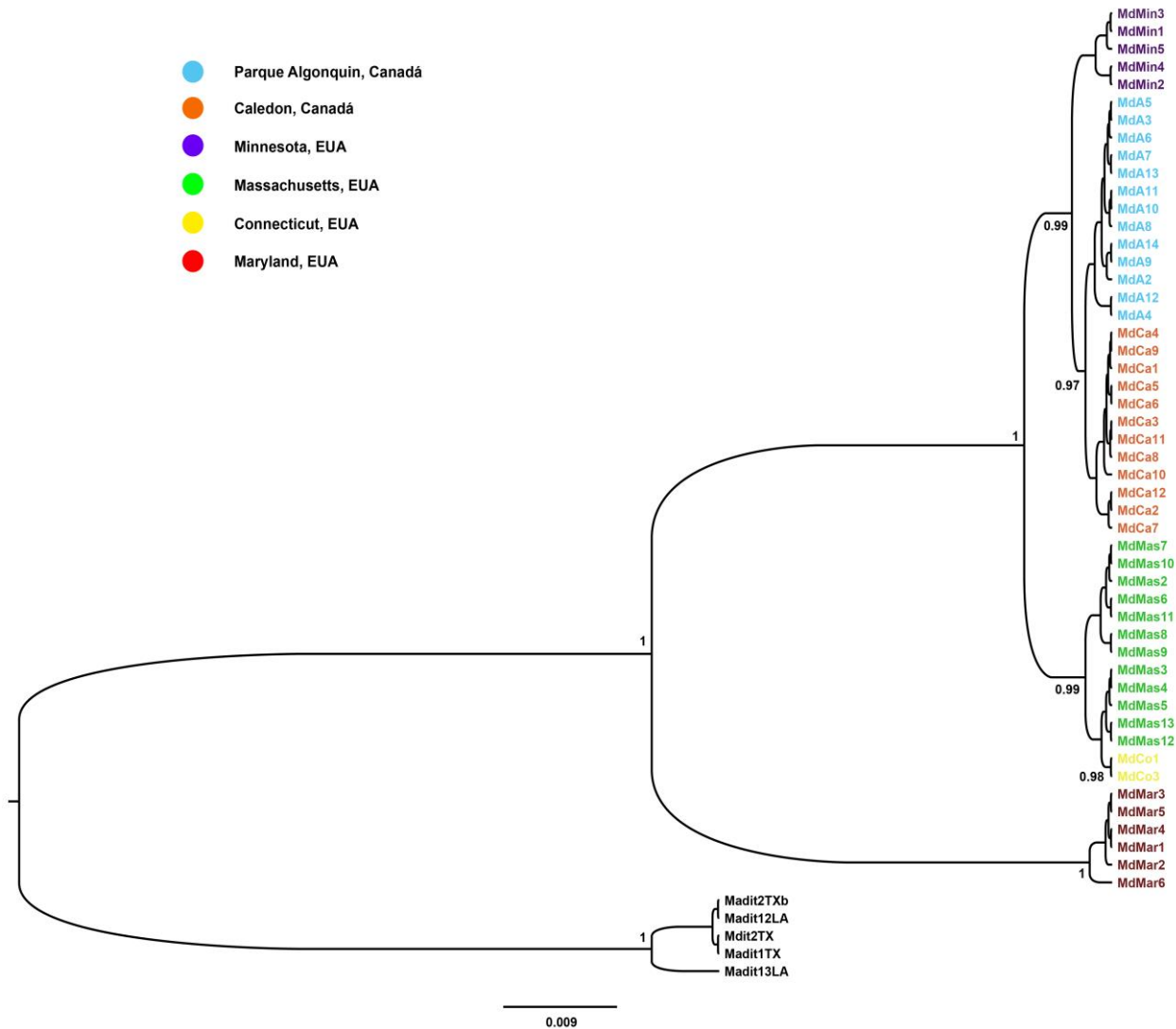


Fig. 8 Árbol bayesiano de máxima credibilidad de clados del NADH. Los números en los nodos representan los valores de probabilidad posterior. Los colores en las ramas indican su pertenencia a una región geográfica particular.

El análisis filogenético del 18S bajo el criterio de parsimonia (Fig. 9) y el resultado del análisis bayesiano (Fig. 10) muestran topologías congruentes.

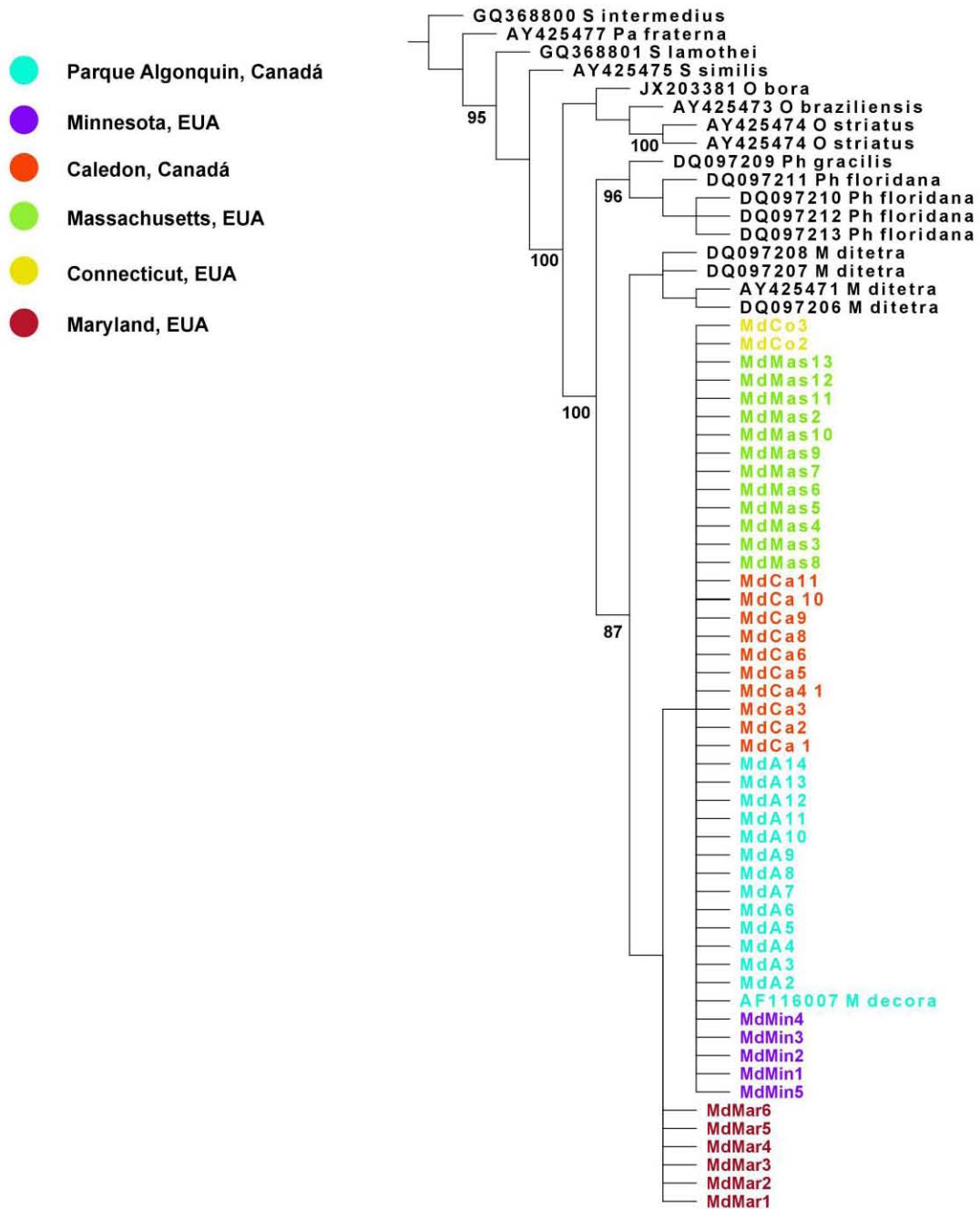


Fig. 9 Árbol más parsimonioso del 18S (352 pasos, IC = 0.8, IR = 086). Los números en los nodos representan los valores de bootstrap. Los colores en las ramas indican su pertenencia a una región geográfica particular.

Ambos métodos filogenéticos recuperan la monofilia de la familia Macrobdellidae con valores de bootstrap y probabilidad posterior >80 y 0.95, respectivamente. El grupo hermano de Macrobdellidae lo constituye el clado con los miembros de la familia Semiscolecidae. Al interior de Macrobdellidae no existen grupos bien soportados bajo ninguno de los métodos de inferencia filogenética utilizados.

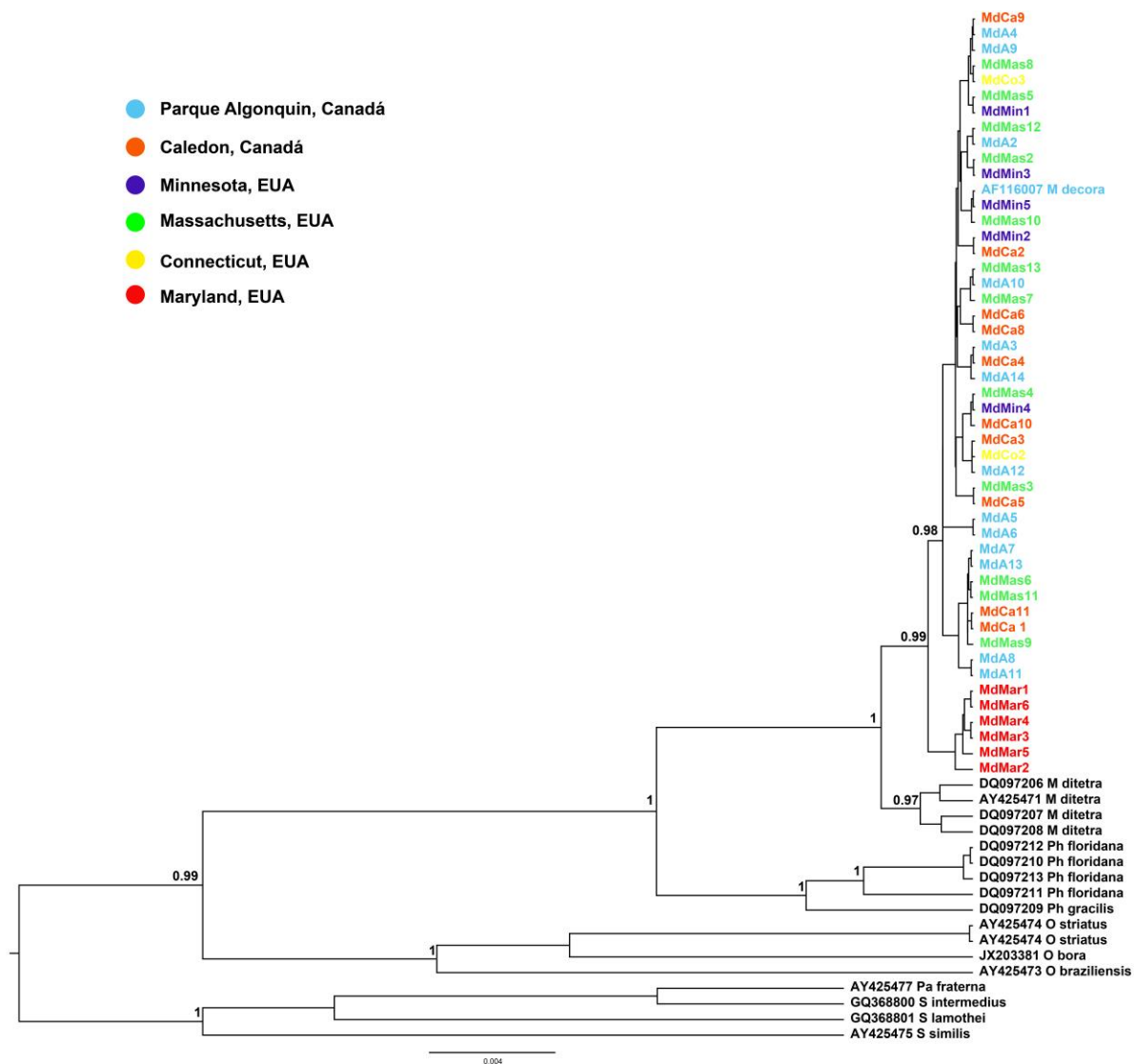


Fig. 10 Árbol bayesiano de máxima credibilidad de clados del 18S. Los números en los nodos representan los valores de probabilidad posterior. Los colores en las ramas indican su pertenencia a una región geográfica particular.

El análisis filogenético de la matriz concatenada bajo el criterio de parsimonia (Fig. 11) y el resultado del análisis bayesiano (Fig. 12) muestran topologías congruentes en general.

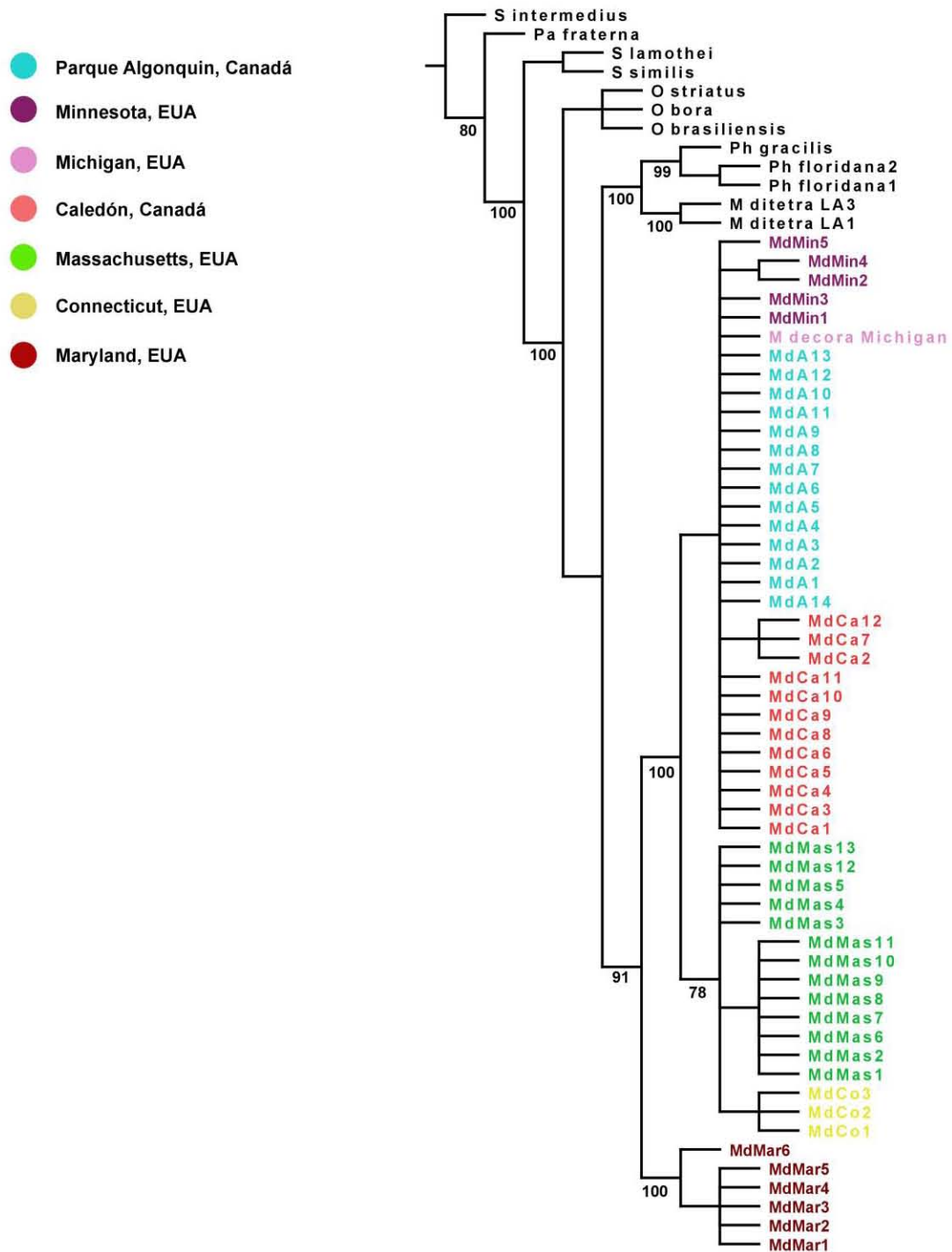


Fig. 11 Consenso estricto de los siete árboles más parsimoniosos de la matriz concatenada del COI, NADH y 18S (1177 pasos, IC = 0.66, IR = 0.84). Los números en los nodos representan los valores de bootstrap. Los colores en las ramas indican su pertenencia a una región geográfica particular.

Ambos reconocen a la familia Macrobdellidae como un grupo monofilético cuyo grupo hermano lo constituyen miembros de la familia Semiscolecidae. Macrobdellidae se compone de tres géneros: *Oxytychus*, *Philobdella* y *Macrobdella*, este último incluye miembros de *M. ditetra*, así como ejemplares de *M. decora* de diversas localidades de Estados Unidos y Canadá, así como la nueva especie de sanguijuela medicinal. *Macrobdella* n.sp. se recupera en ambos análisis con valores de bootstrap y probabilidad posterior de 100 y uno, respectivamente. En el análisis bayesiano, al interior de *M. decora* las poblaciones de Parque Algonquin, Canadá; Caledon, Canadá y Minnesota, EUA forman un grupo monofilético >0.95, cuyo grupo hermano lo constituye el clado monofilético que incluye las poblaciones de Minnesota, EUA y Connecticut, EUA con valores de bootstrap y probabilidad posterior de 78 y uno, respectivamente.

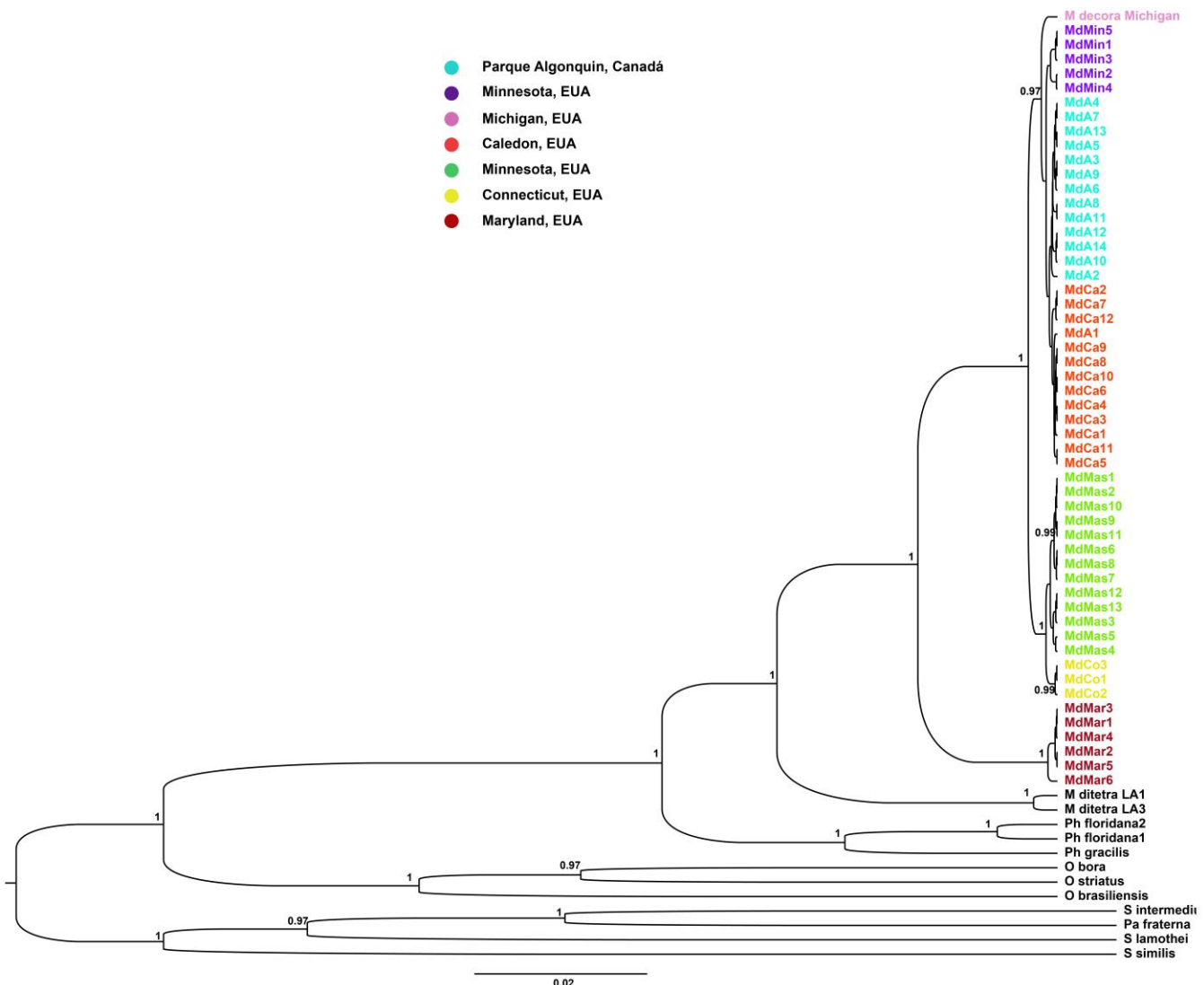


Fig. 12 Árbol bayesiano de máxima credibilidad de clados de la matriz concatenada del COI, NADH y 18S. Los números en los nodos representan los valores de probabilidad posterior. Los colores en las ramas indican su pertenencia a una región geográfica particular.

En general ambos métodos de inferencia filogenética recuperan los mismos grupos y relaciones entre ellos ya sea con los genes particionados o concatenados, solamente difieren en los valores de soporte de los nodos. El gen NADH de forma individual es capaz de reconocer a las poblaciones de Algonquin, Canadá; Caledon, Canadá y Minnesota, EUA como clados independientes, mientras que el resto de las matrices combinan dichas poblaciones en un solo clado.

## 5.2 Datación de tiempos de divergencia

El análisis de tiempos de divergencia estima que la familia Macrobdellidae y su grupo hermano, la familia Semiscolecidae, divergieron entre hace 1.7 y 1.1 millones de años. Al interior de la familia Macrobdellidae, *Oxytychus* fue el primer género en divergir hace 1.22 y 0.82 millones de años. *Philobdella* divergió entre 555 y 375 mil años, mientras que *M. ditetra* se separó entre hace 375 y 260 mil años. Los linajes de *Macrobdella* n.sp. y *M. decora* divergieron entre 200 y 140 mil años. Finalmente, al interior de *M. decora*, la separación entre las poblaciones del sur (Algonquin, Canadá; Caledon, Canadá y Minnesota, EUA) y las poblaciones del norte (Connecticut, EUA y Massachusetts, EUA) se estima que ocurrió entre hace 45 y 20 mil años atrás (Fig. 13).

## 5.3 Diversidad genética

Las distancias genéticas promedio Kimura dos parámetros (K2P) del COI y NADH entre los organismos estudiados se muestran en las Tablas 4 y 5. En general las distancias genéticas entre las distintas muestras de *M. decora* son menores a uno por ciento, aunque las distancias genéticas entre la población de Maryland y el resto de las poblaciones de *M. decora* son mayores al seis por ciento con ambos genes confirmando el hallazgo realizado en este trabajo que las muestras de Maryland son miembros de una especie distinta.

De forma general, los parámetros de diversidad genética calculados con el COI y NADH son bajos entre las distintas poblaciones asignadas a *M. decora*. A excepción de las poblaciones de Canadá analizando el COI, donde el valor de  $F_{st}$  es cero, en el resto de las comparaciones pareadas con ambos genes los valores de diferenciación poblacional tienden a uno (Tablas 6 y 7). Los valores de diversidad nucleotídica, diversidad haplotípica y sitios variables presentan tendencias cercanas a cero (Tablas 8 y 9).



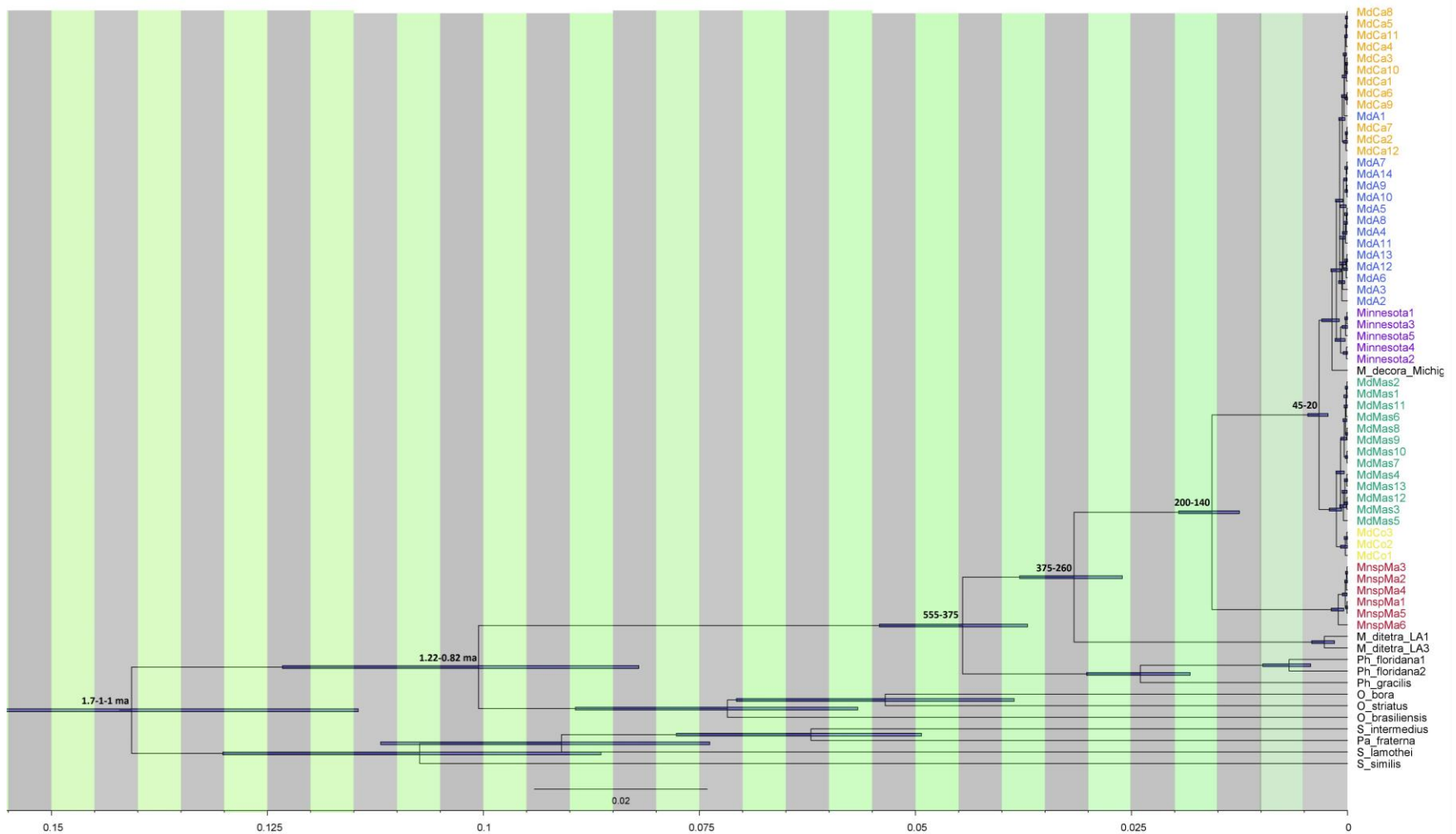


Fig. 13 Tiempos de divergencia incluyendo intervalos de confianza del 95% para cada estimado. Los intervalos de tiempos de divergencia se muestran en los nodos más importantes para este trabajo. Filograma obtenido mediante el análisis de la matriz concatenada del COI, NADH y 18S. Los colores en las ramas indican su pertenencia a una región geográfica particular.

Tabla 4. Distancias genéticas K2P promedio pareadas empleando el COI

	Minnesota, EUA	Parque Algonquin, Canadá	Caledon, Canadá	Massachusetts, EUA	Connecticut, EUA
Minnesota, EUA	-	-	-	-	-
Parque Algonquin, Canadá	0.1%	-	-	-	-
Caledon, Canadá	0.09%	0%	-	-	-
Massachusetts, EUA	0.93%	0.76%	0.85%	-	-
Connecticut, EUA	0.75%	0.7%	0.66%	0.43%	-
Maryland, EUA	6.56%	6.46%	6.61%	7.22%	6.82%

Tabla 5. Distancias genéticas K2P promedio pareadas empleando el NADH

	Minnesota, EUA	Parque Algonquin, Canadá	Caledon, Canadá	Massachusetts, EUA	Connecticut, EUA
Minnesota, EUA	-	-	-	-	-
Parque Algonquin, Canadá	0.24%	-	-	-	-
Caledon, Canadá	0.56%	0.34%	-	-	-
Massachusetts, EUA	0.98%	1.08%	1.4%	-	-
Connecticut, EUA	1.38%	1.47%	1.57%	0.28%	-
Maryland, EUA	6.66%	6.76%	6.42%	6.46%	6.84%

#### 5.4 Estructura poblacional

En total se detectaron nueve haplotipos empleando el COI distribuidos en las poblaciones de *Macrobdeella* estudiadas (Fig. 14). El haplotipo más común lo comparten individuos de las poblaciones de Canadá y Minnesota, EUA. Los haplotipos de Massachusetts y Connecticut se separan entre sí por menos posiciones mutadas que entre los haplotipos de Canadá y Minnesota. Los haplotipos de Maryland se separan del resto de los haplotipos por más de 30 posiciones.

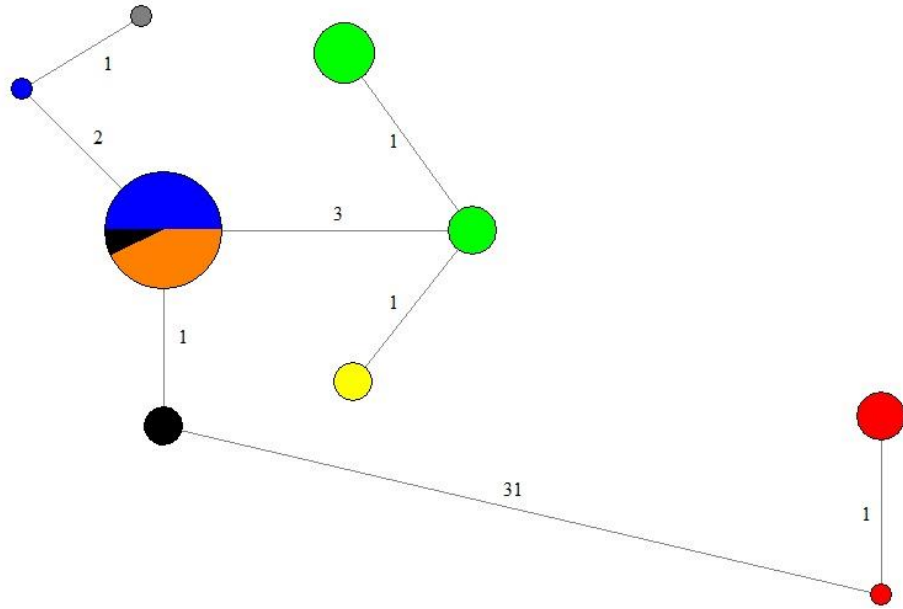


Fig. 14 Red de haplotipos del COI. El tamaño de los círculos es proporcional al tamaño de la muestra. Los números indican la cantidad de posiciones mutadas entre haplotipos. Azul = Parque Algonquin, Canadá; Amarillo = Connecticut, EUA; Anaranjado = Caledon, Canadá; Gris = Michigan, EUA; Negro = Minnesota, EUA; Rojo = Maryland, EUA; Verde = Massachusetts, EUA.

Empleando el NADH se detectaron diez haplotipos (Fig. 15). No existen haplotipos compartidos entre las poblaciones. Las poblaciones de Canadá y Minnesota se separan por menos posiciones entre sí que con el resto de los haplotipos. El mismo fenómeno ocurre entre los haplotipos de Massachusetts y Connecticut. Los haplotipos de Maryland se separan del resto de los haplotipos por más de 30 posiciones. La red de haplotipos de la matriz concatenada es sustancialmente la misma que la del COI solo.

Tabla 6. Valores pareados de  $F_{st}$  del COI

	Minnesota, EUA	Parque Algonquin, Canadá	Caledon, Canadá	Massachusetts, EUA	Connecticut, EUA
Minnesota, EUA	-	-	-	-	-
Parque Algonquin, Canadá	0.4	-	-	-	-
Caledon, Canadá	0.5	0	-	-	-
Massachusetts, EUA	0.86	0.89	0.93	-	-
Connecticut, EUA	0.93	0.96	1	0.84	-
Maryland, EUA	0.98	0.99	0.99	0.98	-

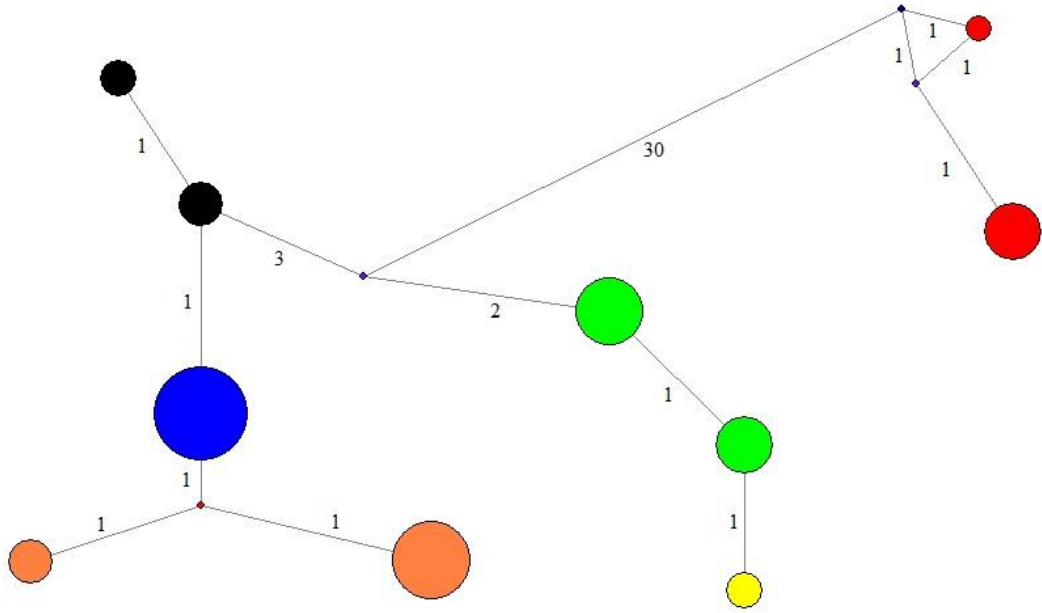


Fig. 15 Red de haplotipos del NADH. El tamaño de los círculos es proporcional al tamaño de la muestra. Los números indican la cantidad de posiciones mutadas entre haplotipos. Azul = Parque Algonquin, Canadá; Amarillo = Connecticut, EUA; Anaranjado = Caledon, Canadá; Negro = Minnesota, EUA; Rojo = Maryland, EUA; Verde = Massachusetts, EUA.

Los análisis de asignación genética en STRUCTURE sugieren que el número óptimo de poblaciones (K) calculadas por el estadístico delta K (Evanno) es igual a dos para ambos genes mitocondriales, tanto en los análisis separados como concatenados (Fig 16).

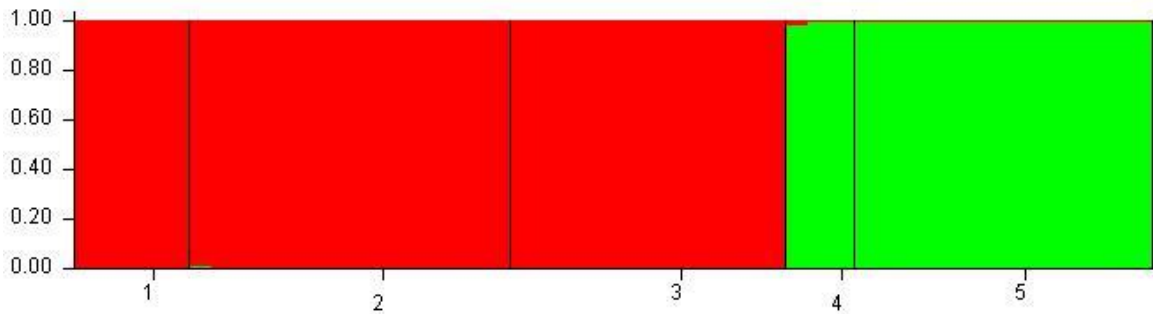


Fig. 16 Gráfico del análisis de asignación genética. 1 = Minnesota, EUA; 2= Parque Algonquin, Canadá; 3 = Caledon, Canadá; 4 = Connecticut, EUA; 5 = Massachusetts, EUA.

Tabla 7. Valores pareados de Fst del NADH

	Minnesota, EUA	Parque Algonquin, Canadá	Caledon, Canadá	Massachusetts, EUA	Connecticut, EUA
Minnesota, EUA	-	-	-	-	-
Parque Algonquin, Canadá	0.78	-	-	-	-
Caledon, Canadá	0.79	0.79	-	-	-
Massachusetts, EUA	0.9	0.96	0.92	-	-
Connecticut, EUA	0.96	1	0.95	0.83	-
Maryland, EUA	0.98	0.99	0.98	0.98	0.99

Tabla 8. Parámetros de diversidad genética del COI

Localidad	No. de Secuencias	No. de Sitios Segregantes	No. de Haplotipos	Diversidad Haplotípica	Diversidad Nucleotídica
Minnesota, EUA	5	1	2	0.6	0.0011
Parque Algonquin, Canadá	15	2	2	0.1333	0.0005
Caledon, Canadá	12	0	1	0	0
Massachusetts, EUA	13	1	2	0.5128	0.0009
Maryland, EUA	6	1	2	0.3333	0.0006

Tabla 9. Parámetros de diversidad genética del NADH

Localidad	No. de Secuencias	No. de Sitios Segregantes	No. de Haplotipos	Diversidad Haplotípica	Diversidad Nucleotídica
Minnesota, EUA	5	1	2	0.6	0.0011
Parque Algonquin, Canadá	13	0	1	0	0
Caledon, Canadá	12	2	2	0.409	0.0015
Massachusetts, EUA	12	1	2	0.5303	0.001
Maryland, EUA	6	2	2	0.3333	0.0012

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos, independientemente del método empleado mostraron una fuerte estructura geográfica de las poblaciones. Bajo el supuesto de que la distribución geográfica de las poblaciones de *M. decora* pudo ser moldeada durante el último máximo glacial (Sawyer, 1986; Palomo 1989) entre hace 26500 y 19000 años (Clark et al., 2009) se espera que las poblaciones más cercanas al límite sur de la distribución de *M. decora*, en el sureste de Estados Unidos, comenzaran un proceso de recolonización posterior al último máximo glacial en dirección norte debido simplemente a la ausencia de barreras geográficas importantes que impidan la dispersión uniforme en esta dirección. Bajo este escenario, se esperaría encontrar una filogenia “paralela” al área de distribución geográfica del organismo en cuestión cuando se trazan sobre un mapa (Figura 17). Este patrón filogeográfico ha sido reportado para diversas especies de norte América (Emerson et al., 2010; Beatty y Provan, 2010; Zinck et al., 2016). En estos estudios la diversidad genética de las poblaciones obedece a un patrón de disminución sur-norte debido a múltiples eventos fundadores (Cwynar y MacDonald, 1987; Armbruster et al., 1998; Emerson et al., 2010).

Los árboles filogenéticos obtenidos son consistentes con los patrones filogeográficos mencionados previamente. Las poblaciones del norte, en este caso Caledon y Parque Algonquin tienen menos variación genética que las poblaciones del sur, a pesar de estar separadas por una distancia geográfica mayor (200 km) en comparación con las de Massachusetts y Connecticut (70 km). Esto se puede apreciar de forma indirecta en las filogenias, por ejemplo, el marcador mitocondrial COI no tuvo resolución al interior del clado de Canadá, pero sí tuvo resolución al interior del clado que agrupa a las poblaciones de Massachusetts y Connecticut (Figs. 5-8). A pesar de que el NADH tuvo mayor resolución al interior de dicho clado, no tuvo un valor de probabilidad posterior alto ( $\geq 90$ ) en la población del Parque Algonquin que constituye el límite de la distribución de *M. decora* al norte en nuestro estudio, pero sí lo tuvo en la población de Caledon situada 200 km más al sur (Figs. 5-8). Dicho de otra forma, las poblaciones más sureñas o “fundadoras” a partir de las cuales comenzó la dispersión hacia el sur han permanecido muchas más generaciones en su hábitat, lo cual ha permitido una reproducción constante y durante más generaciones que las poblaciones del norte (de “reciente” aparición) y por lo tanto la diversidad genética en las poblaciones del sur se espera que sea más elevada, simplemente debido al mayor tiempo que se ha recombinado el DNA en las mismas.

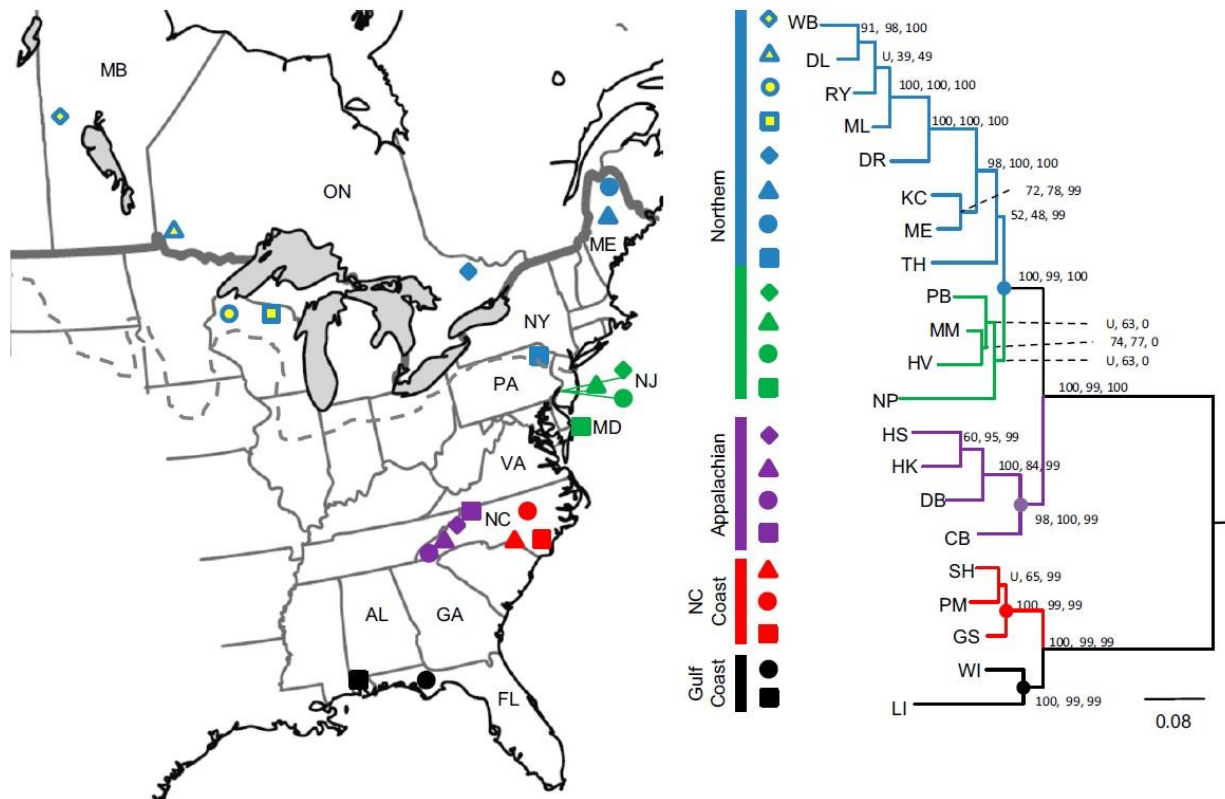


Figura 17. A la izquierda se muestra el área de distribución geográfica de *Wyeomyia smithii* al noreste de Estados Unidos. A la derecha se muestra el árbol filogenético de máxima verosimilitud de *W. smithii*. Las barras de colores identifican cuatro clados principales dentro de *W. smithii*. MB, Manitoba; ON, Ontario; ME, Maine; NY, Nueva York; PA, Pensilvania; NJ, Nueva Jersey; MD, Maryland; VA, Virginia; NC, Carolina del Norte; GA, Georgia; AL, Alabama; FL, Florida. Tomado de Emerson et al., 2010.

## 6.2 Datación de tiempos de divergencia

El estimado con base en datos moleculares de los tiempos de divergencia indica que la primera separación de linajes dentro del género *Macrobdeella* ocurrió entre hace 200 y 140 mil años entre la población de *Macrobdeella* n.sp. de Maryland y el resto de las poblaciones de *M. decora* (Fig. 13). Este resultado es una evidencia más para considerar a *Macrobdeella* n.sp. como una entidad taxonómica independiente de *M. decora* que a pesar de ser grupos hermanos se separaron mucho antes del último máximo glacial datado entre hace 26500 y 19000 años (Clark et al., 2009). Con respecto al grupo en estudio, el análisis sugiere que la separación entre las poblaciones del sur (Massachusetts, EUA y Connecticut, EUA) y del norte (Canadá y Minnesota, EUA) ocurrió entre hace sólo 45 a 20 mil años. Este intervalo incluye totalmente el periodo durante el cual se estima que ocurrió el último máximo glacial (Clark et al., 2009) y entonces puede considerarse como la primera fuente de evidencia científica que sugiere que un evento paleoclimático es el

responsable de la distribución geográfica actual de las poblaciones de *M. decora*. (Fig. 13). Los eventos de dispersión subsiguientes debieron haber ocurrido tras esta separación.

Otros estudios como el de Emerson et al. (2010) son consistentes con el presente estudio. Por ejemplo, Kotlik et al. (2006) descubrieron que las poblaciones de *Clethrionomys glareolus*, un pequeño roedor susceptible a cambios drásticos de temperatura, tuvo que migrar al sur en busca de zonas más templadas, sus análisis de divergencia sugieren que las poblaciones de *C. glareolus* se separaron hace al menos 22 mil años, una fecha que es consistente con el último máximo glacial datado entre hace 26500 y 19000 años (Clark et al., 2009) y con el presente estudio. Por otra parte, Aubry et al. (2009) descubrieron que el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) del Norte de América sobrevivió al último máximo glacial en dos refugios pleistocénicos y que a partir de estos divergió en las poblaciones que actualmente conforman el rango de distribución geográfica de esta especie de mamífero, los tiempos de divergencia sugirieron que las poblaciones de zorro rojo de estos refugios cada una divergió hace aproximadamente 20 mil años, lo cual es consistente tanto con la fecha estimada del último máximo glacial entre hace 26500 y 19000 años (Clark et al., 2009) como con los resultados del presente estudio. Por mencionar un ejemplo adicional, en el estudio realizado por Latch et al. (2009) se reconoce al último máximo glacial datado entre hace 26500 y 19000 años (Clark et al., 2009) como la fuerza dominante que moldeó la distribución geográfica actual de *Odocoileus hemionus* un mamífero que sobrevivió a dicho evento paleoclimático y cuyas poblaciones se separaron hace aproximadamente 19000 años de acuerdo con el análisis de datación realizado en el estudio. Los resultados obtenidos por Latch et al. (2009) son consistentes con los estudios mencionados anteriormente y con los resultados del presente manuscrito.

Si bien en el presente manuscrito solamente se utilizó la tasa de sustitución nucleotídica del gen mitocondrial COI para estimar los tiempos de divergencia y se pensaría que esto puede incluir un grado importante de incertidumbre al análisis (Wilke et al., 2009). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios empleando métodos similares lo cual vuelve más confiables las conclusiones a las que se pueda llegar haciendo uso de los mismos. Sin embargo este análisis por sí solo no es evidencia suficiente de que el último máximo glacial es responsable de la distribución geográfica actual de las poblaciones de *M. decora* sino solo una primera aproximación.

### 6.3 Diversidad genética

Las poblaciones de Canadá (Caledon y Parque Algonquin) tienen 0% de divergencia genética (K2P) usando el gen mitocondrial COI a pesar de que las muestras fueron recolectadas en localidades separadas por más de 200 km (Tabla 4). Este hecho es consistente con lo mencionado por Cwynar y MacDonald (1987) sobre el decline sur-norte de la diversidad genética producto de un evento de colonización uniforme ya que



las poblaciones de Canadá representan el extremo de la distribución al norte y, por lo tanto, corresponden con las poblaciones de más reciente divergencia. Por otra parte, las poblaciones de Massachusetts y Connecticut separadas por tan solo 70 km presentan distancias genéticas de 0.58% lo cual es congruente con el patrón de decline de diversidad genética sur-norte. Siguiendo esta tendencia, las poblaciones de Massachusetts y Canadá separadas por aproximadamente 664 km presentan un incremento de 0.27% respecto a la comparación anterior. Finalmente, la población de Maryland, situada geográficamente en el límite sur de las poblaciones de este estudio exhibe poco más del seis por ciento de distancias genéticas respecto a la población del extremo norte de la distribución geográfica (Tablas 4 y 5). Los resultados obtenidos con la matriz del NADH y la matriz concatenada de ambos genes mitocondriales siguen la misma tendencia que el COI. El comportamiento de la diversidad genética sugiere un evento de colonización en dirección norte (Cwynar y MacDonald, 1987). Los resultados de diversidad genética también son consistentes con los resultados obtenidos por Kotlik et al. (2006), Aubry et al. (2009), Latch et al. (2009) y Emerson et al. (2010) quienes encontraron que las distancias genéticas, diversidad haplotípica, nucleotídica y valores de  $F_{st}$  son mayores en las poblaciones del sur y muy poco diversos en las poblaciones del norte. Como ya se mencionó anteriormente en los análisis filogenéticos, este fenómeno se explica fácilmente debido a la reciente divergencia de las poblaciones del norte que han tenido relativamente poco tiempo para la acumulación de mutaciones. Los parámetros de diversidad genética de las poblaciones de este estudio pueden observarse en las Tablas 8 y 9. Nótese que a pesar del bajo número de ejemplares por localidad es evidente que en las poblaciones del sur representadas por menos organismos, existe mayor diversidad que en las del norte representadas por casi el doble de organismos. Probablemente, la variación genética podría incrementarse con un tamaño de muestra más grande, además, las características inherentes a la biología de los hirudíneos, es decir, su baja capacidad de dispersión (Madill & Hovingh, 2007) también podría explicar parte de la baja diversidad genética al interior de las poblaciones ya que al permanecer aisladas se generan altos grados de endogamia. Este fenómeno es confirmado por los valores calculados de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) en los que las poblaciones presentan valores de uno o cercanos a uno, lo cual puede interpretarse como un alto grado de diferenciación genética debido a flujo genético nulo entre las poblaciones (Knowles, 2009) (Tablas 6 y 7).

Finalmente, es importante hacer notar que el COI, considerado como el código de barras en Hirudinida (Oceguera-Figueroa et al., 2010; Kvist, 2016; Garduño-Montes de Oca et al., 2016; Pérez-Flores et al., 2016) fue menos variable en comparación con el poco explorado NADH en los análisis filogenéticos y de diversidad genética, lo cual lo vuelve un marcador candidato para estudios poblacionales, sin embargo, para propósitos filogenéticos puede sobreestimar la diversidad biológica a nivel de especie.

## 6.4 Estructura poblacional

Como es de esperarse en un evento de recolonización uniforme sur-norte, las poblaciones geográficamente más cercanas se encuentran más relacionadas entre sí en las redes de haplotipos que con poblaciones más alejadas. De manera general, algunas poblaciones se componen por dos haplotipos, sin embargo no hay haplotipos compartidos entre poblaciones diferentes, lo cual puede explicarse fácilmente por la ausencia de flujo génico según los valores de  $F_{st}$  (Tablas 6 y 7). Por otra parte, el número de mutaciones que separan a la población de Maryland del resto de las poblaciones es atípico y sugiere su pertenencia a otra especie de sanguijuela medicinal norteamericana. La red de haplotipos empleando el COI evidencia la menor resolución de este gen ya que es incapaz de distinguir claramente a las poblaciones de Caledon, Canadá; Parque Algonquin, Canadá y Minnesota, EUA. Por el contrario, el marcador mitocondrial NADH separa claramente dichas poblaciones con haplotipos únicos. Ambas redes de haplotipos distinguen marcadamente a las poblaciones del norte de las del sur, lo cual es un indicio de que existen al menos dos poblaciones a lo largo de este gradiente de distribución geográfica.

El análisis de asignación genética se ejecutó excluyendo la población de Maryland, EUA bajo el supuesto de que constituye potencialmente una nueva especie. El número óptimo de poblaciones calculadas fue  $K = 2$  (Fig. 16), en donde las secuencias de Caledon, Canadá; Parque Algonquin, Canadá y Minnesota, EUA constituyen una sola población claramente separada de la población comprendida por las secuencias de Massachusetts y Connecticut, EUA. Este resultado es congruente con los resultados obtenidos por los análisis filogenéticos en los que se obtienen al menos dos grandes clados bien soportados que incluyen a las poblaciones del sur y a las del norte, respectivamente. Sin embargo STRUCTRE v.2.3 es un programa diseñado para el análisis de microsatélites (dos alelos) que puede proporcionar resultados equivocados cuando se analizan genes en desequilibrio de ligamiento, como los del cromosoma Y o el DNA mitocondrial (un sólo locus), sin embargo puede ofrecer resultados confiables cuando el número de haplotipos en el análisis es considerablemente elevado (Pritchard et al., 2000). Por tal razón se deben considerar estos resultados con cautela, particularmente, se debe evitar usarlos como la única evidencia de estructura geográfica.

## 7. CONCLUSIONES

- La topología de los árboles filogenéticos, el análisis de datación de tiempos de divergencia, el comportamiento de las distancias genéticas, el resto de los parámetros de diversidad genética y la comparación de nuestros resultados con los obtenidos en otros estudios que utilizan modelos y métodos similares a los implementados en el presente manuscrito en

conjunto apoyan fuertemente que la distribución geográfica de las poblaciones actuales de *Macrobodella decora* obedece al último máximo glacial ocurrido entre hace 26500 y 19000 años ya que las poblaciones de *M. decora* se separaron entre hace 45 a 20 mil años.

- *Macrobodella* de Maryland mostró una gran diversidad genética por encima del nivel de especie utilizando distancias genéticas K2P. *Macrobodella* de Maryland se agrupó como el grupo hermano de *M. decora* en todos los análisis filogenéticos tanto con los genes concatenados como particionados, además, según el análisis de datación de tiempos de divergencia, *Macrobodella* de Maryland se separó de *M. decora* mucho antes de la última máxima glaciación entre hace 200 y 140 mil años. Cuando se ejecutó el análisis de asignación genética incluyendo la población de *Macrobodella* de Maryland fue asignada como una población independiente del resto. En el análisis de redes de haplotipos *Macrobodella* de Maryland se separa por más de 30 mutaciones del resto de las poblaciones y, por último pero no menos importante, la examinación morfológica reveló que el gonoporo femenino y las glándulas copulatorias se separan por solo 4 anillos y que la distancia entre los gonoporos es de 5 ½ , en cambio en *Macrobodella decora* la distancia entre el gonoporo femenino y las glándulas copulatorias así como la distancia entre los gonoporos es de 4 y 5 ½ anillos, respectivamente. Con base en todos los análisis del estudio se confirma el descubrimiento de una nueva especie de sanguijuela medicinal norteamericana cuya descripción se proporciona como un anexo de este trabajo.
- De acuerdo con los datos analizados existen al menos dos poblaciones de *Macrobodella decora*: Caledon, Canadá; Parque Algonquin, Canadá y Minnesota, EUA conforman la población del norte, mientras que Massachusetts, EUA y Connecticut, EUA constituyen la población del sur.
- La diversidad genética aumenta gradualmente de norte a sur.
- La examinación de los caracteres morfológicos externos e internos entre los organismos estudiados no reveló ninguna diferencia.
- Este es el primer estudio en el que se realiza datación de tiempos de divergencia en hirudíneos. La tasa de sustitución nucleotídica empleada parece confiable.

## 8. LITERATURA CITADA

- Apakupakul, K., M. E. Siddall y E. M. Burreson. 1999. Higher-level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 350-359.
- Arnason, U. 2000. The mitochondrial genome of the sperm whale and a new molecular reference for estimating eutherian divergence dates. *Journal of Molecular Evolution* 50: 569–578.
- Armbruster, P., W. E. Bradshaw y C. M. Holzapfel. 1998. Effects of postglacial range expansion on allozyme and quantitative genetic variation of the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Evolution* 52: 1697-1704.
- Aubry, K. B., M. J. Statham, B. N. Sacks, J. D. Perrine y S. M. Wisely. 2009. Phylogeography of the North American red fox: vicariance in Pleistocene forest refugia. *Molecular Ecology*, 18: 2668–2686.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb y N. C. Saunders. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Avise, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.
- Avise, J. C. 2000. *The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 447 pp.
- Avise, John C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3-15
- Awadalla, P. 1999. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* 286, 2524–2525
- Badets, M. y L. H. Du Preez. 2014. Phoretic interaction between the kangaroo leech *Marsupiobdella africana* (Hirudinea: Glossiphoniidae) and the Cape river crab *Potamonautes perlatus* (Decapoda: Potamonautidae). *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife* 3: 6-11.
- Ballard, J.W. 2000. Comparative genomics of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans*. *Journal Molecular Evolution* 51: 64–75.
- Beatty, G. y J. Provan. 2010. Refugial persistence and postglacial recolonization of North America by the cold-tolerant herbaceous plant *Orthilia secunda*. *Molecular Ecology* 19: 5009–5021.
- Brody, G. A., W. J. Maloney y V. R. Hentz. 1989. Digit replantation applying the leech *Hirudo medicinalis*. *Clinical Orthopedics and Related Research* 245: 133–137.
- Birren, B y E. D. Green. 1997. *Genome Analysis: A Laboratory Manual, Volume 4*. CSHL Press, - DNA - 494 pp.

- Cho, B. H. y H. B. Ahn. 1999. Microsurgical replantation of a partial ear, with leech therapy. *Annals of Plastic Surgery* 43:427–429.
- Clark, P. U., A. S. Dyke, J. D. Shakun, A. E. Carlson, J. Clark, B. Wohlfarth, J. X. Mitrovica, S. W. Hostetler y A. M. McCabe. 2009. The Last Glacial Maximum. *Science* 325: 710-714.
- Connior, M. B. y S.E. Trauth. 2010. Seasonal Activity of the Ozark Highlands Leech, *Macrobdella diplotertia*, (Annelida: Hirudinea) in North-central Arkansas. *Journal of the Arkansas Academy of Science* 64: 77-79.
- Cwynar, L.C. y G. M. MacDonald. 1987. Geographical variation of lodgepole pine in relation to population history. *The American Naturalist* 129: 463–469.
- DeWoody, J. A., y J. C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology* 56: 461–473.
- Earl, D. A. y B. M. VonHoldt. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Emerson, K. J., C. R. Merz, J. M. Catchen, P. A. Hohenlohe, W. A. Cresko, W. E. Bradshaw y C. M. Holzapfel. 2010. Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of the USA* 107: 16196-16200.
- Evanno, G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 4: 2611-2620.
- Galtier, N., y M. Gouy. 1995. Inferring phylogenies from DNA sequences of unequal base compositions. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 92: 11317-11321.
- Gillham, N.W. (1994) *Organelle Genes and Genomes*, Oxford University Press
- Garduño-Montes de Oca, R., G. Martínez-Flores, S. Contreras-Mirón, J. Jiménez-Armenta y A. Ocegüera-Figueroa. 2016. Primer registro de la sanguijuela introducida *Barbronia weberi* (Annelida: Clitellata) en Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87: 1124-1126.
- Goerge, E. F, C. R. Pechman y C. R. Woese. 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: Molecular approach to prokaryotic systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27: 44-57.
- Graham, C. E. 1995. Leeches. *British Medical Journal* 310: 605.
- Güneren, E., L. Erolu y H. Akba. 2000. The use of *Hirudo medicinalis* in nipple-areolar congestion. *Annals of Plastic Surgery* 45:679–681.

- Gutiérrez-García, T. A. y E. Vázquez-Domínguez. 2011. Comparative phylogeography: designing studies while surviving the process. *BioScience* 61: 857-868.
- Gyllensten, U. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352, 255–257
- Hare, M. P. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 700-706.
- Hoss, M., M. Kohn., S. Paabo, F. Knauer y W. Schroder. 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature* 359: 199.
- Hoarau, G. 2002. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. *Molecular Biology Evolution* 19: 2261–2264.
- Kaneda, H. 1995. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.* 92: 4542–4546.
- Karl, S. A. y J. C. Avise. 1993. PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. *Molecular Biology and Evolution* 10: 342-361.
- Khan, R.N., M. G. Frick. 1997. *Erpobdella punctata* (Hirudinea: Erpobdellidae) as phoronts on *Ambystoma maculatum* (Amphibia: Ambystomidae). *Journal of Natural History* 31: 157-161.
- 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):111-20.
- Klemm, D. J. 1982. Leeches (Annelida: Hirudinea) of North America. U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, Ohio. EPA-600/3-82-025. 177 pp.
- Knowles, L. 2009. Statistical Phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 593–612.
- Kondo, R. 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* 126, 657–663.
- Kotlik, P., V. Deffontaine, S. Mascheretti, J. Zima, J. R. Michaux y J. B. Searle. 2006. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *PNAS* 103(40): 14860 –14864.
- Kurtzman, C. P. 1987. Prediction of biological relatedness among yeasts from comparisons of nuclear DNA complementarity. *Studies in Mycology* 30: 459–468.
- Kvist, L. 2004. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). *Molecular Biology Evolution* 20(2): 243-247.
- Kvist, S. 2016. Does a global DNA barcoding gap exist in Annelida? *Mitochondrial DNA Part A*, 27: 2241-2252.
- Ladoukakis, E.D. y E. Zouros. 2001. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Molecular Biology Evolution* 18: 1168–1175.

- Latch, E. K., J. R. Heffelfinger, J. A. Fike y O. E. Rhodes. 2009. Species-wide phylogeography of North American mule deer (*Odocoileus hemionus*): cryptic glacial refugia and postglacial recolonization. *Molecular Ecology* 18: 1730–1745.
- Librado, P. y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lunt, D. H., L. E. Whipple y B.C. Hyman. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology* 7:1441-1455.
- Lunt, D.H. y B. C. Hyman. 1997. Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature* 387, 247
- Madill, J. y P. Hovingh. 2007. Freshwater leech (Annelida: Hirudinida) distribution in the Canadian Province of Newfoundland and Labrador and adjacent regions: Check-list, new records, new pigmentation forms, and Pleistocene refugia. *Zootaxa* 1657: 1-21.
- Maia-Carneiro, T., T. A. Dorigo, M. Wachlevski y C. F. Duarte-Rocha. 2012. Evidence of phoresy by leeches (Hirudinoidea) on *Rhinella abei* (Anura: Bufonidae) in the Atlantic Rainforest in the state of Santa Catarina, southern Brazil. *Acta Herpetologica* 7: 163-169.
- Magoulas, A. y E. Zouros. 1993. Restriction-site heteroplasmy in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) indicates incidental biparental inheritance of mitochondrial DNA. *Molecular Biology Evolution* 10: 319–325.
- Mann, K. H. 1962. Leeches (Hirudinea), Their Structure, Ecology, and Embryology. Pergamon Press, New York, U.S.A 201 pp.
- Meusel, M. S. y R. F. Moritz. 1993. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera*) eggs. *Current Genetics* 24: 539–543.
- Meyer, C. 1975. A new leech, *Macrobdeella diploteria* sp. n. (Hirudinea: Hirudinidae), from Missouri. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 42: 82-85.
- Moser, W. E., F. R. Govedich, A. Ocegüera-Figueroa, D. J. Richardson y A. J. Phillips. 2016. Subclass Hirudinida. En Thorp, J. H. y D. C. Rogers (Eds.), *Freshwater Invertebrates: Keys to Nearctic Fauna*, 4th ed. Volume II. Academic Press, London, United Kingdom. 740 pp.
- Moritz, C., T. E. Dowling y W. M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA-relevance for population biology and systematic. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 18: 269-292.
- Ocegüera-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: 24-29.

- Oceguera-Figueroa, A., A. K. Barrio, M. I. Aldea-Guevara & M. E. Siddall. 2012. Evaluation of the evolution of jaw morphology in New World hirudiniform leeches, with a description of a new blood-feeding species of *Oxyptychus* (Annelida: Hirudiniformes) from the Peruvian Amazon. *Invertebrate Systematics* 26: 17-24
- Papadopoulou, A., I. Anastasiou y A. P. Vogler. 2010. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: The mid-aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution* 27: 1659–1672.
- Palomo, L. I. 1989. Fauna hirudinológica (Annelida: Hirudinea) del norte y centro de Nuevo León, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Pantuck, A. J., M. R. Lobis, R. Ciocca y R. E. Weiss. 1996. Penile replantation using the leech *Hirudo medicinalis*. *Urology* 48: 953-6.
- Patwardhan, A., S. Ray y A. Roy A. 2014. Molecular markers in phylogenetic studies – A review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology* 2: 131.
- Pérez-Flores, J., H. Rueda-Calderon, Kvist, S., M. E. Siddall y A. Oceguera-Figueroa. 2016. From the worm in a bottle of mezcal: iDNA confirmation of a leech parasitizing the Antillean manatee. *Journal of Parasitology* In-Press.
- Pesole, G. C., A. De Chirico y C. Saccone. 1999. Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 48: 427-434.
- Phillips, A. J & M. E. Siddall. 2005. Phylogeny of the New World medicinal leech family Macrobdellidae (Oligochaeta: Hirudinida: Arhynchobdellida). *Zoologica Scripta* 34: 559-564.
- Phillips, A. J. & M. E. Siddall. 2009. Poly-paraphyly of Hirudinidae: many lineages of medicinal leeches. *Evolutionary Biology* 9: 246
- Phillips, A., R. Salas-Montiel y A. Oceguera-Figueroa. 2016. Distribution of the New England Medicinal Leech, *Macrobdella sestertia* Whitman, 1886 and redeterminations of specimens of *Macrobdella* (Annelida: Clitellata: Macrobdellidae) at the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 129: 103-113.
- Pritchard, J. K. M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Porshinsky, B. S., S. S. Grossman, P. R. Beery, S. P. Stawicki. 2011. Clinical uses of the medicinal leech: A practical review. *Journal of Postgraduate Medicine* 57: 65-71.
- Richardson, R. L: 1969. A contribution to the systematics of the hirudinid leeches, with description of new families, genera and species. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 15: 97-149.
- Ronquist, F. y J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rouse, G. W. y K. Fauchald. 1995. The articulation of annelids. *Zoologica Scripta* 24: 269-301.



- Sawyer, R. T. 1972. North American freshwater leeches, exclusive of the Piscicolidae, with a key to all species. University of Illinois Press, United States, 154 p.
- Sawyer, R. T. 1986. Leech biology and behavior. Vol. I, II y III. Feeding Biology, Ecology and Systematics. Clarendon Press. Oxford.
- Shitara, H. 1998. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* 148, 851–857.
- Siddall, M. E., K. Apakupakul, E. M. Burreson, K. A. Coates, C. Erséus, S. R. Gelder, M. Källersjö y H. Trapido-Rosenthal. 2001. Validating Livanow: Molecular data agree that leeches, branchiobdellidans and Acanthobdella peledina form a monophyletic group of oligochaetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 346-351.
- Singh, A. P. 2010. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): A brief overview. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 16: 213–215.
- Sket, B. & P. Trontelj. 2008. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 129-137.
- Smith, D. G. y S. Hanlon. 1997. *Macrobella sestertia* (Hirudinea: Hirudinidae) in Maine and a key to the hirudiniform leeches of Maine. *Northeastern Naturalist* 4: 231–236.
- Sutovsky, P. 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of Reproduction* 63: 582–590.
- Świątek, P., A. Świder y A. Bielecki. 2009. Sperm transfer through the vector tissue in *Piscicola respirans* (Clitellata, Hirudinea, Piscicolidae). *Zoologica Poloniae* 55:5–12.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tao, N., R. Richardson, R., W. Bruno y C. Kuiken. 2008. FindModel. Available online at <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>
- Walton, R. L., E. K. Beahm y R. E. Brown. 1998. Microsurgical replantation of the lip: a multi-institutional experience. *Plastic and Reconstructive Surgery* 102: 358–368.
- Wilke, T., R. Schultheiß y C. Albrecht. 2009. As time goes by: A simple fool's guide to molecular clock approaches in invertebrates. *American Malacological Bulletin*. 27: 25-45.
- Weinfeld, A. B., E. Yuksel, S. Boutros, D. H. Gura, M. Akyurek y J. D. Friedman. 2000. Clinical and scientific considerations in leech therapy for the management of acute venous congestion: an updated review. *Annals of Plastic Surgery* 45: 207-212.
- Wells, S. y W. Combes. 1987. The status and trade in the medicinal leech. *Traffic Bulletin* 8: 64–69.

- Whitaker, I., D. Izadi, D. Oliver y G. Monteath. 2004. *Hirudo medicinalis* and the plastic surgeon. *British Journal of Plastic Surgery* 57: 348–353.
- Wilgenbusch, J. C., D. L. Warren, D. L. Swofford. 2004. AWTY: A system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetic inference. <http://ceb.csit.fsu.edu/awty>.
- Woese, C. R., O. Kandler, y M. L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 87: 4576-4579.
- Yli-Mattila, T., S. Paavanen-Huhtala, B. Fenton y T. Tuovinen. 2000. Species and strain identification of the predatory mite *Euseius finlandicus* by RAPD-PCR and ITS sequences. *Experimental and Applied Acarology* 24: 863-880

## 9. ANEXOS

### 9.1 ANEXO 1

#### **New species of medicinal leech from North America, with description and phylogenetic position**

Se describe una nueva especie de sanguijuela medicinal, *Macrobdella* n.sp., a partir de especímenes recolectados en Maryland, EUA. Externamente, la nueva especie es similar a *Macrobdella decora* ya que ambas especies poseen 4 glándulas copulatorias (2 filas con 2 glándulas cada una), pero la nueva especie se distingue de *M. decora* porque tiene  $5 + \frac{1}{2}$  anillos (en lugar de  $4 + \frac{1}{2}$ ) entre los gonoporos y 4 anillos (en lugar de 5 anillos) entre el primer par de glándulas copulatorias y el gonoporo femenino. El análisis filogenético, con base en datos mitocondriales y nucleares para un conjunto de taxa cercanamente relacionados, confirma la ubicación de la nueva especie dentro de la familia Macrobdellidae y la ubica como grupo hermano de *Macrobdella decora*. Esta es la primera descripción de una sanguijuela medicinal norteamericana desde 1975.

**New species of medicinal leech from North America, with description and  
phylogenetic position**

Anna J. Phillips, Ricardo Salas-Montiel\*, Ted R. Kahn, Sebastian Kvist† and Alejandro Ocegüera-Figueroa‡

Department of Invertebrate Zoology. National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. 10th St and Constitution Ave NW, Washington, D.C. 20560-0163 USA.

\* Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, Copilco, Coyoacán. A.P. 70–153. C.P. 04510. Mexico City, Mexico.

† Royal Ontario Museum, 100 Queen’s Park, Toronto, Ontario M5S 2C6, Canada, and Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Toronto, 25 Willcocks Street, Toronto, ON M5S 2B4, Canada.

‡ Laboratorio de Helmintología. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer Circuito s/n, Ciudad Universitaria, Copilco, Coyoacán. A.P. 70–153. C.P. 04510. Mexico City, Mexico.

**ABSTRACT**

A new species of medicinal leech, *Macrobdella* n. sp., is described from specimens collected in Maryland, USA. Externally, the new species is similar to *Macrobdella decora* as both species possess 4 copulatory glands (2 rows with 2 glands each) but the new species is distinguished from *M. decora* by its bearing 5 + ½ annuli (as opposed to 4 + ½) between gonopores and 4 annuli (as opposed to 5 annuli) between the first pair of copulatory glands and the female gonopore. Phylogenetic analyses, based on both mitochondrial and nuclear data for a set of closely related taxa, confirms the placement of

the new species within the family Macrobdellidae and places it as the sister taxon to *Macrobdella decora*. This is the first description of a North American medicinal leech since 1975.

KEYWORDS: Hirudinea, Macrobdellidae, *Macrobdella*, medicinal leech, North America

## INTRODUCTION

For millennia, medicinal leeches have been used to treat a variety of human ailments, including mental disorders, whooping cough, gout, tumors, epilepsy, headaches, arthritis and obesity (Weinfeld et al., 2000; Porshinsky et al., 2011). The European medicinal leech, *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 was used for bloodletting in patients in an attempt to balance the internal “biological humours” (Graham, 1995). The earliest documented record of leeches being used to ameliorate medical conditions appears in an Egyptian ancient pictograph from around 1500 BC (Whitaker et al., 2004). In the Old World, leeches became the most popular mode of bloodletting during the 18<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> centuries and, in order to fulfill the heavy demand of medicinal leeches, their populations were harvested almost to the point of local extinction. As a consequence of its excessive use, in 1823, restrictions were implemented to manage the number of leeches being exported through Hannover, Germany, and temporal limitations were instituted in Russia (Wells and Combes, 1987; Whitaker et al., 2004). Currently, plastic surgeons use leeches to aid in the salvage of blood-congested extremities, such as digits and replanted flaps (Brody et al., 1989), nipples (Güneren et al., 2000), ears (Cho and Ahn, 1999), lips (Walton et al., 1998), nasal tips (Mortenson et al., 1998) and penis (Pantuck et al., 1996). Venous congestion may occur when there is an imbalance between arterial inflow of blood to a digit or appendage and venous outflow of blood back into the body. This results in stasis

of the blood, which causes a decrease in tissue perfusion, leading to arterial thrombi formation and tissue necrosis (Weinfeld et al., 2000). Medicinal leech therapy is useful in removing stagnate blood and promoting the healing of the veins (Singh, 2010; Porshinsky et al, 2011).

The freshwater leech genus *Macrobdella* includes four species of jawed blood-feeding leeches (Sawyer, 1986; Klemm, 1982; Phillips et al., 2016): *Macrobdella decora* (Say, 1824), *Macrobdella sestertia* Whitman, 1886, *Macrobdella ditetra* Moore, 1953, and *Macrobdella diplotertia* Meyer, 1975. Leeches of the genus are easily distinguishable by their olive green dorsum, sometimes with reddish orange metameric spots, and conspicuous external copulatory glands on the ventral surface posterior to the female gonopore (Klemm 1982; Sawyer 1972, 1986). Members of this genus are geographically restricted to North America, including Canada, USA and Mexico (Sawyer, 1986; Phillips and Siddall, 2009). Out of the four species, *Macrobdella decora* exhibits the widest geographical distribution, as it occurs from northern Mexico, through central and northeastern United States to southeastern Canada (Caballero, 1952; Klemm, 1985, 1995); *M. sestertia* is only known from New Hampshire, Massachusetts and Maine (Smith & Hanlon 1997, Phillips et al., 2016); *M. diplotertia* occurs throughout Arkansas, Kansas, and Missouri (Connior and Trauth, 2010), while *M. ditetra* inhabits the southern coastal-plain states, from eastern Texas to Florida, and northwards as far as North Carolina (Meyer, 1975).

During a survey study of freshwater leeches, specimens of a previously undescribed species of the genus *Macrobdella* were found in Maryland, USA. Herein, we present the morphological description of the new species and place it in a phylogenetic context using molecular data.

## MATERIALS AND METHODS

Six leech specimens were collected in a stream in eastern Maryland (38° 22' 28.6" N, 77° 14' 23" W) USA, in June, 2015. Individuals were captured by immersing legs into the water and periodically examining for leeches attached to the skin, which were removed before feeding. Leeches were transported to the laboratory in plastic containers and thereafter relaxed through the gradual addition of 70% ethanol; all specimens were fixed in 100% ethanol. Examination of external and internal morphology was accomplished with a stereomicroscope Zeiss Discovery V8. Photographs were taken with a Sony  $\alpha$ 330 camera. Drawings were made by superposition of vector art over images placed in Adobe Illustrator® 10 and Adobe Photoshop® 7. Additionally, DNA sequences of 41 specimens of *M. decora* from Canada and the USA were obtained and included in the present study, and sequences for the remaining species of *Macrobdeella* were downloaded from GenBank to allow for comparative analysis of the molecular data.

### **DNA extraction, amplification and sequencing**

Total DNA was extracted from tissue dissected from the posterior sucker of the leech in order to avoid contamination of host DNA of the gastric or intestinal regions. DNeasy Tissue Extraction Kit (Qiagen) was used for tissue lysis and DNA purification, following the manufacturer's protocol. Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) as well as the nuclear ribosomal DNA of the small (18S rDNA) and large subunits (28S rDNA) were obtained to investigate the phylogenetic position of the new species. DNA amplification via polymerase chain reaction (PCR) was performed in a 15- $\mu$ L volume containing 9.38  $\mu$ L of sterilized water, 3  $\mu$ L of 5X buffer, 0.25  $\mu$ L of each primer (10  $\mu$ M),

0.12  $\mu$ l of Taq polymerase and 2  $\mu$ L of genomic DNA. PCR reactions were performed in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler under the following thermal profiles: for COI, 95°C (5 min), followed by 35 cycles of 95° (30 sec), 49°C (30 sec), 72°C (30 sec) and final extension at 72°C (7 min); for 18S rDNA and 28S rDNA, 95°C (5 min), followed by 35 cycles of 95° (30 sec), 52°C (30 sec), 72°C (30 sec) and final extension at 72°C (7 min). Amplification products were sent to the University of Washington Genome Center, to the Laboratorio Nacional de Biología Molecular, IB-UNAM or, alternatively, to the Laboratory of Analytical Biology at the Smithsonian Institution for sequencing. Contig assembly and sequence editing was performed in Geneious Pro v7.1.5 (Biomatters, available from <http://www.geneious.com>). For comparative purposes, DNA sequences of species of the genera *Macrobdella*, *Oxyptychus*, *Patagoniobdella*, *Philobdella* and *Semicolex* (Phillips and Siddall 2005, 2009; Ocegüera-Figueroa et al., 2012) were selected and used to investigate the phylogenetic position of the new species of medicinal leech described here. Taxon names, collection localities and GenBank accession numbers of each terminal are given in Table 1. Separate alignment of each partition was accomplished using the European Bioinformatics Institute server for MUSCLE (Edgar, 2004) applying default settings and the final concatenated dataset was created by Mesquite ver. 3.04 (Maddison & Maddison, 2015).



Table 1. Taxa used for the phylogenetic analyses, collection localities and GenBank accession numbers.

Taxon	Locality	GenBank accession numbers		
		18S	28S	COI
<i>Macrobdella decora</i> AP	Algonquin Provincial Park, Ontario, Canada	n = 3	n = 3	n = 3
<i>Macrobdella decora</i> CA	Caledon, Ontario, Canada	n = 3	n = 3	n = 3
<i>Macrobdella decora</i> MN	Minnesota, USA	n = 3	n = 3	n = 3
<i>Macrobdella decora</i> MI	Michigan, USA	AF116007	EU100082	EU100095
<i>Macrobdella</i> n. sp. MD	Maryland, USA	n = 6	n = 6	n = 6
<i>Macrobdella ditetra</i> GA	Georgia, USA	AY425471	AY425391	AY425453
<i>Macrobdella ditetra</i> LA	Louisiana, USA	DQ097206-07	DQ097198-99	DQ097215-16
<i>Oxyptychus brasiliensis</i>	Brazil	AY425473	AY425398	AY425455
<i>Oxyptychus bora</i>	Peru	JX203381	JX203382	JX203383
<i>Oxyptychus striatus</i>		AY425474	AY425399	_____
<i>Philobdella gracilis</i>	Louisiana, USA	DQ097209	DQ097200	DQ097218
<i>Philobdella floridana</i>	South Carolina, USA	DQ097210-13	DQ097201-04	DQ097219-22
<i>Patagoniobdella variabilis</i>	Chile	AY425476	_____	AY425458
<i>Patagoniobdella fraterna</i>	Chile	AY425477	AY425405.1	AY425459
<i>Semiscolex lamothai</i>	México	GQ368801	_____	GU045563
<i>Semiscolex similis</i>	Bolivia	AY425475	AY425402	AY425457
<i>Semiscolex intermedius</i>	Argentina	GQ368800	_____	GU045562

## Phylogenetic analysis

Parsimony analysis of the concatenated dataset was performed for 100 replicates, each using a New Technology Search in TNT ver 1.1 (Goloboff et al., 2008), and employing five rounds of ratcheting and three rounds of tree fusing after the initial Wagner tree builds. All characters were equally weighted and non-additive and gaps were treated as missing data. Standard bootstrap values were obtained in TNT from 1000 pseudoreplicates, using random taxon addition and TBR branch swapping, as well as the same settings as mentioned above. Consistency and retention indices were thereafter

calculated in PAUP (Swofford, 2002). A GTR + Gamma model of evolution was applied to each unlinked data partition based on the Akaike Information Criterion, as suggested by FindModel (Tao et al., 2008). Using this model, a phylogenetic analysis under Bayesian Inference was conducted in MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). The data were also partitioned by gene (18S rDNA, 28S rDNA and COI). For the Metropolis-Coupled Markov Chain Monte Carlo (MCMCMC) analyses, default prior distributions of parameters were used for two runs, each with one cold and three hot chains for 5 million generations and trees were sampled every 1000th generation. Using the cumulative function, the web version of AWTY (Wilgenbusch et al., 2004) was used to verify that postburn-in generations had reached stationarity in all data sets.

## RESULTS

### Taxonomy

Order ARHYNCHOBDELLIDA Blanchard, 1894

Family MACROBDELLIDAE Richardson, 1969

Genus *MACROBDELLA* Whitman, 1886

*Macrobdeella* n. sp. (Figure 1a-b).

**Material examined:** Holotype USNM XXXX: Fixed in 70% ethanol and preserved in 100% ethanol. Length 86 mm, width 15 mm. Paratypes USNM XXXX: 4 specimens; CNHE 10262: 2 specimens.

**Type locality:** Nanjemoy, Charles County, Maryland, USA

Coordinates: 38° 22' 28.6" N, 77° 14' 23" W.

**Diagnosis:** Macrobdellid in general aspect. Olive green dorsum with 22 reddish orange metameric spots. Trignathous. Five +  $\frac{1}{2}$  annuli between gonopores. Two rows of 2 copulatory glands each with the first pair situated 4 annuli posterior to the female gonopore.

**Description:** Based on 6 specimens (2 dissections).

*External morphology:* Largest specimen 86 mm long, 15 mm wide; smallest specimen 74 mm long, 10 mm wide. Olive green dorsal surface with 22 reddish orange spots on a2 from somite V to XXVII, arranged in a median line. Dorsal surface with median line of whitish spots restricted to a2 of each somite; two longitudinal paramarginal rows (one on each side) of black spots restricted to a2 of each somite. Single solid, pigmented, uninterrupted longitudinal medial wide stripe and one pair of lateral slender pigmented lines partially interrupted from somite V to XXVII (Fig. 1a). Ventral surface reddish to orange when alive, pale yellow when fixed; without papillae, spots or stripes; pigments of the ventral surface faded post-fixation. Clitellum inconspicuous (Fig. 1a). Five pairs of eyespots arranged in parabolic arc on somites II, III, IV, V a2 and VI a2. One pair of nephridiopores in each posterior margin of b2 from somites VIII to XXIV, 17 pairs in total. Male gonopore on XII b1. Female gonopore on XIII b1/b2. Five +  $\frac{1}{2}$  annuli between gonopores. Two rows of two copulatory glands each on somites XIII b6 to XIV b2. Four annuli between female gonopore and the first pair of accessory glands (Fig. 1b). Anus located on the dorsal surface at XXVII a2. Somites I-IV uniannulate, somites V and VI biannulate, VII and VIII triannulate, IX quadriannulate, complete somites X-XXV quinquannulate, XXVI triannulate and XXVII biannulate.



Fig. 6a *Macrobdella n. sp.* Dorsal view (above). Ventral view (below). 1b. Ventral surface showing gonopores and copulatory glands (CG).

*Internal morphology:* Three jaws, one dorsal and two ventrolateral; monostichodont. Pharynx short. Crop from VIII to XIX. Crop in somites VIII and IX with single pair of caeca. Somites XI and XII with two pairs of equal caeca, XIII and XIV with anterior pair shorter (posterior pair slightly bilobed), XV to XVII two pairs equal size, XVIII anterior pair larger and posteriorly directed, posterior pair reduced. Somite XIX with pair of large postcaeca or diverticula extending to XXIV (Fig. 2). Intestine present as simple, acaecate tube from XX to XXVII.

*Male reproductive anatomy:* Testisacs ten pairs, at interganglionic intervals from XIV/XV to XXIII/XXIV. In somite XI, each sperm duct forming anteriorly directed loop, stretching to somite XIII and connecting with tightly coiled sperm ducts or epididymis (Fig. 2).

*Female reproductive anatomy:* Ovaries simple, spheroidal. Both right and left oviducts independently inserted into the anterior portion of vagina. Vagina opening in XXVIII.

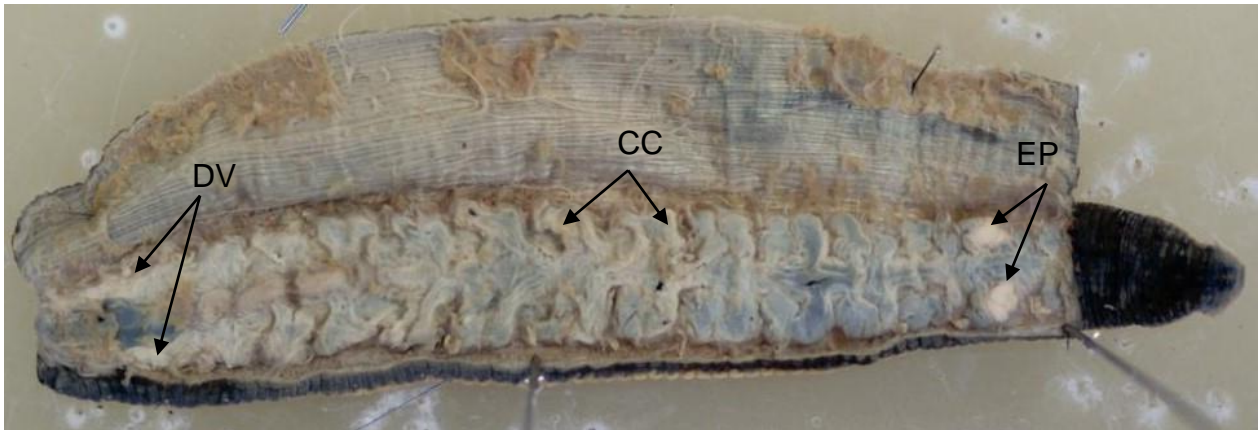


Fig. 7 *Macrobdella n. sp.* Dissection showing diverticula (DV), crop caeca (CC) and epididymis (EP).

**Remarks:** *Macrobdella n. sp.* is the only species within the genus that exhibits  $5 + \frac{1}{2}$  annuli between the gonopores and 4 annuli between the first pair of copulatory glands and the female gonopore. Historically, the number and arrangement of copulatory gland pores has been used to distinguish between the four species currently recognized within the genus (Sawyer, 1986; Klemm, 1982; Phillips et al., 2016). *Macrobdella sestertia* has 24 copulatory gland pores arranged in 4 transverse rows with 6 pores each; the gonopores are separated by  $2 \frac{1}{2}$  annuli. *M. ditetra* exhibits 8 copulatory gland pores arranged in 2 transverse rows with 4 pores each; the gonopores are separated by 2 annuli. *Macrobdella diplotertia* presents 3 transverse rows with 2 pores each for a total of 6 copulatory gland pores; the gonopores are separated by  $4\frac{1}{2}$  or 5 annuli. The new species described herein is easily distinguished from the above species based on the number and arrangement of copulatory gland pores, *Macrobdella n. sp.* possess 4 copulatory gland pores arranged in 2 transverse rows of 2 each. However, the same number and arrangement of the copulatory gland pores is shared by *M. decora*, but the latter has  $4 \frac{1}{2}$  annuli between the

gonopores and 5 annuli between the first transverse row of copulatory gland pores and the female gonopore, whereas the new species has 5 ½ annuli between the gonopores and 4 annuli between the first transverse row of copulatory gland pores and the female gonopore.

### **Phylogenetic analysis**

The combined COI, 18S rDNA, and 28S rDNA analysis contained 30 terminals with 3172 aligned characters. Parsimony analyses resulted in 2 most parsimonious trees with 1259 steps (CI = 0.683; RI = 0.746). Trees resulting from both the Parsimony and Bayesian analyses showed identical topologies, recognizing *Macrobdella n. sp.* as a well-supported distinct species, placing it as the sister taxon to *M. decora*. Both analyses support the monophyly of the family Macrobdellidae with good parsimony bootstrap support (>80%) and posterior probability (>0.95) (Fig. 3).

### **DISCUSSION**

Based on morphology and molecular data, we have described a new species of medicinal leech from North America. *Macrobdella n. sp.* represents the fifth described species of medicinal leech from the continent and both morphological and molecular data confirm its inclusion within the family Macrobdellidae and places the species as the sister species to *M. decora*. To date, *Macrobdella n. sp.* has only been recorded from the type locality in Maryland and from a single pond in Georgia. Insofar as the new species superficially resembles *M. decora*, it is likely that this new diversity has been obscured from leech research for an extended period of time. The two species overlap in their

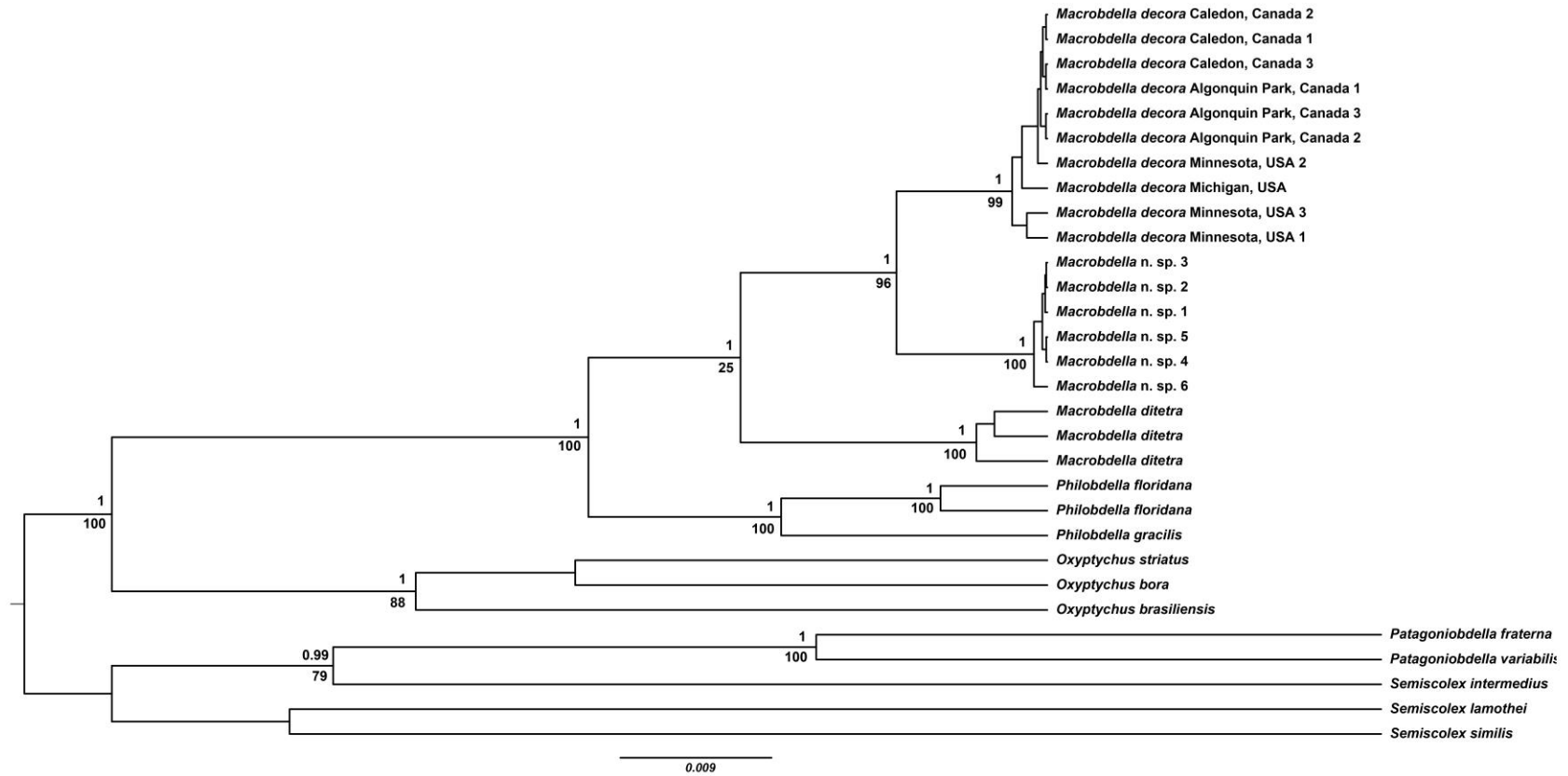


Fig. 3 Parsimony and Bayesian Inference tree topology based on 18S rDNA, 28S rDNA, and COI datasets combined. Posterior probabilities are above the node and bootstrap values are below the node.

geographic distribution, which has possibly exacerbated the situation. Because *M. decora* displays a much wider geographic range than the remaining species within the genus, it is possible that even more hidden diversity is present within this putatively cryptic species complex. Prior to the present study, the last medicinal leech species recorded in North America was described in 1975, supporting the notion that medicinal leech fauna of North America is well mapped out, given that no new species have been recorded throughout that period. However, the species described herein was initially flagged as new on the basis of DNA sequencing, specifically the COI locus. It is important to note that future studies into the diversity of medicinal leeches in North America necessarily should employ both morphological examination and DNA sequencing to robustly identify cryptic diversity.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Nallely Ruiz Torres for her assistance in the field. Special thanks to Andrea Jiménez Marín, Laura Márquez and Ofelia Delgado for their participation in the obtaining of DNA sequences, Susana Gómez for her assistance with the light microscopy images and Luis García Prieto for his assistance in the management of the CNHE. SK thanks NSERC (RGPIN-2016-06125) and the ROM (Schad Conservation Grant) for funding. This project was partially funded by the project PAPIIT (IA204114) to AO-F.



## LITERATURE CITED

- Apakupakul, K., M. E. Siddall, and E. M. Burreson. 1999. Higher-level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 350–359.
- Borda, E., and M. E. Siddall. 2004. Arhynchobdellida (Annelida: Oligochaeta: Hirudinida): phylogenetic relationships and evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 213–225.
- Brody, G. A., W. J. Maloney, and V. R. Hentz. 1989. Digit replantation applying the leech *Hirudo medicinalis*. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 245:133–137.
- Caballero y Caballero, E. 1952. Sanguijuelas de México. XVIII. Presencia de *Macrobdeella decora* (Say, 1824) Verrill, 1872, en el norte del país, y una nueva designación para los órdenes de Hirudínea. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México* 23: 203–209.
- Cho, B. H., and H. B. Ahn. 1999. Microsurgical replantation of a partial ear, with leech therapy. *Annals of Plastic Surgery* 43:427–429.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoen, R. Lutz, and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.
- Graham, C. E. 1995. Leeches. *British Medical Journal* 310: 605.
- Güneren, E., L. Erolu, and H. Akba. 2000. The use of *Hirudo medicinalis* in nipple-areolar congestion. *Annals of Plastic Surgery* 45:679–681.
- Klemm, D. J. 1982. Leeches (Annelida: Hirudinea) of North America. U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, Ohio. EPA-600/3-82-025. 177 pp.

- Klemm, D. J. 1985. Freshwater leeches (Annelida: Hirudinea). pp. 70-174. In Klemm, D. J. (ed.) A Guide to Freshwater Annelida (Polychaeta, Naidid and Tubificid Oligochaeta and Hirudinea) of North America. Kendall/Hunt, Dubuque, Iowa.
- Klemm, D. J. 1995. Identification guide to the freshwater leeches (Annelida: Hirudinea) of Florida and other Southern States. State of Florida Department of Environmental Protection Division of Water Facilities, Tallahassee, United States 82 p.
- Light, J. E., and M. E. Siddall. 1999. Phylogeny of the leech family Glossiphoniidae based on mitochondrial gene sequences and morphological data. *Journal of Parasitology* 85: 815–823.
- Maddison W. P., and D. R. Maddison. (2015) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. <http://mesquiteproject.org>.
- Meyer, M. 1975. A new leech, *Macrobdeella diplotertia* sp. n. (Hirudinea: Hirudinidae), from Missouri. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 42: 82–85.
- Mortenson, B. W., K. H. Dawson, and C. Murakami. 1998. Medicinal leeches used to salvage a traumatic nasal flap. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 36: 462–464.
- Pantuck, A. J., M. R. Lobis, R. Ciocca, and R. E. Weiss. 1996. Penile reimplantation using the leech *Hirudo medicinalis*. *Urology* 48: 953–956.
- Phillips, A. J., and M. E. Siddall. 2005. Phylogeny of the New World medicinal leech family Macrobdeellidae (Oligochaeta: Hirudinida: Arhynchobdeellida). *Zoologica Scripta* 34: 559–564.
- Phillips, A. J., and M. E. Siddall. 2009. Poly-paraphyly of Hirudinidae: many lineages of medicinal leeches. *Evolutionary Biology* 9: 246.

- Phillips, A., R. Salas-Montiel, and A. Ocegüera-Figueroa. 2016. Distribution of the New England Medicinal Leech, *Macrobdella sestertia* Whitman, 1886 and redeterminations of specimens of *Macrobdella* (Annelida: Clitellata: Macrobdellidae) at the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 129: 103–113.
- Porshinsky, B. S., S. Saha, and M. D. Grossman. 2011. Clinical uses of the medicinal leech: a practical review. *Journal of Postgraduate Medicine* 57: 65–71.
- Prendini, L., P. Weygoldt, and W. C. Wheeler. 2005. Systematics of the *Damon variegatus* group of African whip spiders (Chelicerata: Amblypygi): evidence from behaviour, morphology and DNA. *Organisms Diversity and Evolution* 5: 203–236.
- Sawyer, R. T. 1972. North American freshwater leeches, exclusive of the Piscicolidae, with a key to all species. University of Illinois Press, United States, 154 p.
- Sawyer, R. T. 1986. *Leech Biology and Behavior*. Clarendon Press, Oxford, United Kingdom, 1065 p.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, and H. Liu. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701.
- Singh, A. P. 2010. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): A brief overview. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 16: 213–215.
- Smith, D. G., and S. Hanlon. 1997. *Macrobella sestertia* (Hirudinea: Hirudinidae) in Maine and a key to the hirudiniform leeches of Maine. *Northeastern Naturalist* 4: 231–236.
- Walton, R. L., E. K. Beahm, and R. E. Brown. 1998. Microsurgical replantation of the lip: A multi-institutional experience. *Plastic and Reconstructive Surgery* 102: 358–368.

- Weinfeld, A. B., E. Yuksel, and S. Boutros. 2000. Clinical and scientific considerations in leech therapy for the management of acute venous congestion: an updated review. *Annals of Plastic Surgery* 45: 207–212.
- Wells, S., and W. Combes. 1987. The status and trade in the medicinal leech. *Traffic Bulletin* 8:64–69.
- Whitaker, I. S., J. Rao, D. Izadi, and P. E. Butler. 2004. Historical Article: *Hirudo medicinalis*: Ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 42: 133–137.
- Whiting, M. F. 2002. Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Zool Scripta* 31: 93–104.

## 9.2 ANEXO 2:

### **Distribution of the New England Medicinal Leech, *Macrobdella sestertia* Whitman, 1886 and redeterminations of specimens of *Macrobdella* (Annelida: Clitellata: Macrobdellidae) at the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution**

Se examinaron todos los registros del género *Macrobdella* del Museo Nacional de Historia Natural del Museo Smithsoniano y se re-determinó la identidad de 4 lotes de especímenes. Uno de estos lotes se re-determinó como *Macrobdella sestertia* y representa el primer reporte de esta especie en New Hampshire. Antes de este reporte, esta especie sólo se conocía a partir de unos cuantos reportes en el este de Massachusetts y Maine. Este también constituye el primer reporte de esta especie en simpatria con *Macrobdella decora*, un congénero más común con una distribución amplia.

**Distribution of the New England Medicinal Leech, *Macrobdella sestertia* Whitman, 1886 and redeterminations of specimens of *Macrobdella* (Annelida: Clitellata: Macrobdellidae) at the National Museum of Natural History, Smithsonian Institution**

Anna J. Phillips\*, Ricardo Salas-Montiel, and Alejandro Ocegüera-Figueroa

(AJP) Department of Invertebrate Zoology, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, 10<sup>th</sup> and Constitution Ave NW, Washington, D.C., 20560-0163 U.S.A.

(RSM) Posgrado en Ciencias Biológicas, Laboratorio de Helminología. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer Circuito sin número, Ciudad Universitaria, Copilco, Coyoacán. A.P. 70-153. Ciudad de México. C.P. 14510 Mexico.

(AOF) Laboratorio de Helminología “Eduardo Caballero y Caballero”. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Tercer Circuito sin número, Ciudad Universitaria, Copilco, Coyoacán. A.P. 70-153. Ciudad de México. C.P. 14510 Mexico.

*Abstract.*—The complete holdings of *Macrobdella* species at the Smithsonian’s National Museum of Natural History were examined and the identity of 4 specimen lots were redetermined. One of these lots was redetermined as *Macrobdella sestertia* and represents the first report of this species from New Hampshire. Prior to this report, this species was only known from a few occurrences in eastern Massachusetts and Maine. This is also the first report of this species to be found in sympatry with *Macrobdella decora*, a more common congener with a widespread distribution.

**Keywords:** copulatory glands, taxonomy, Hirudinea, geographic range, collections

Species of *Macrobdella* Verrill, 1872, also known as North American medicinal leeches, are large hirudineans found in freshwater habitats of North America, including the USA, Canada and Mexico (Klemm 1982). *Macrobdella* is comprised of four species (Sawyer 1986): *Macrobdella decora* (Say, 1824), *Macrobdella sestertia* Whitman, 1886, *Macrobdella ditetra* Moore, 1953, and *Macrobdella diplosteria* Meyer, 1975. *Macrobdella* spp. are easily identified by the olive green dorsum sometimes with reddish-orange spots, and external morphological features of the ventral clitellar region (Klemm 1982; Sawyer 1972, 1986).

*Macrobdella sestertia* is one of the rarest hirudiniform leeches in North America. It is considered a poorly known species with few occurrence records and even fewer specimens in scientific collections (Whitman 1886; Sawyer 1972; Smith 1977; Klemm 1982; Smith & Hanlon 1997). It is listed under the State of Massachusetts Endangered Species Act as a Species of Special Concern (SSC) in the Massachusetts State Wildlife Action Plan (Massachusetts Division of Fisheries & Wildlife 2015). This species was only known from coastal areas of eastern Massachusetts and was an elusive species thought possibly to be extinct prior to its rediscovery in 1977 (Smith 1977). It was collected again from Sebec Lake, Maine in 1993 (Smith & Hanlon 1997). The

\* Corresponding author.

geographic distribution of *M. sestertia* has been presumed to be restricted to coastal habitats of New England (Smith 1977; Smith & Hanlon 1997) and in the western extent of its distribution possibly to overlap with that of *M. decora* (Sawyer 1972), but the two species have yet to be found in sympatry.

In 2015, the holdings of *Macrobdella* specimens at the National Museum of Natural History (NMNH), Smithsonian Institution, were assessed and the identifications of four specimen lots were re-determined.

### Materials and Methods

RSM and AJP critically examined diagnostic external morphological features of the gonopores and copulatory glands of specimens identified as *Macrobdella* species from the Department of Invertebrate Zoology annelid collection (NMNH, Smithsonian Institution, Washington, D.C.). Specimens were examined with the aid of a Leica® M125 stereomicroscope. Photographs were taken with a Leica® IC80 HD attached to the stereomicroscope and images were adjusted for levels to improve clarity in Adobe® Photoshop® CS6.

### Results

A total of 117 specimen lots of *Macrobdella* were examined. A complete list of the holdings of *Macrobdella* specimen lots at the NMNH with specimen information is provided in Table 1. The identification of USNM 38898 (*M. ditetra*) could not be verified because the specimens were shriveled, as well as 3 of the 29 specimens of USNM 38912 (*M. ditetra*) because the specimens were creased on the ventral side in the gonopore region, an artifact of preservation. Of the specimen lots examined, the identity of 4 lots was re-determined as follows.

Genus *Macrobdella* Verrill, 1872

*Macrobdella decora* (Say, 1824)

*Material examined.*—One lot identified as *Macrobdella ditetra*: USNM 43544, ex 1, collected from near Great Falls of the Potomac, Virginia, by Paul Bartsch, no collecting date given.

*Remarks.*—The leech had  $4 + \frac{1}{2}$  annuli between the gonopores and two accessory pores in each of two rows, with the first row of pore openings five annuli posterior to the female gonopore. Based on these features the specimen was re-determined to be *M. decora*.

*Macrobdella ditetra* Moore, 1953

*Material examined.*—Two lots identified as *Macrobdella* sp.: USNM 41353, ex 1, collected from Station MCM 642, Chatham, Jackson Parish, Louisiana, by G. H. Penn and G. H. Bick, on 1 April 1952; USNM 41354, ex 1, collected from Station MCM 642, Eureka, Ouachita Parish, Louisiana, by G. H. Penn and G. H. Bick, on 1 April 1950.

*Remarks.*—These leeches had two annuli between the gonopores and four accessory pores in each of two rows, with the first row of pores opening eight annuli posterior to the female gonopore. Based on these features the specimens were re-determined to be *M. ditetra*.

*Macrobdella sestertia* Whitman, 1886

Figs. 1–3

*Material examined.*—One lot identified as *Macrobdella decora*: USNM 50162, ex 4, collected from Suncoop Pond, 2.75–3.25 miles East of Epsom, Rockingham County, New Hampshire, by R.M. Bailey and Oliver, on 3 June 1938.

*Remarks.*—One leech had four accessory gland pores on the ventral surface posterior to the gonopores with  $4 + \frac{1}{2}$  annuli between the gonopores, characters diagnostic of *M. decora*. Three leeches

Table 1.—*Macrobaddella* specimens of the NMNH with identifications confirmed or redetermined in this study. USNM catalog numbers marked with a section sign (§) indicate the identification of the specimens as it was redetermined in this study. USNM catalog numbers marked with an asterisk (\*) indicates the designation of holotype and caret (^) indicates the designation of paratype. (°) indicates the specimen lot is part of the collection of C.O. Whitman.

Catalog number	Scientific name	Specimen count	Collection date	Country of origin	State/province of origin	Precise locality
USNM 209	<i>Macrobaddella decora</i>	3	—	U.S.A.	Connecticut	New Haven
USNM 1037	<i>Macrobaddella decora</i>	2	23 September 1883	U.S.A.	Massachusetts	Woods Hole
USNM 4599	<i>Macrobaddella decora</i>	2	—	U.S.A.	Virginia	Wytheville
USNM 19076	<i>Macrobaddella decora</i>	1	June 1921	U.S.A.	Maryland	Plummer's Island, near Washington, D.C.
USNM 19128	<i>Macrobaddella decora</i>	2	2 April 1922	U.S.A.	Maryland	Potomac near Plummer's Island
USNM 20693	<i>Macrobaddella decora</i>	1	—	Canada	Quebec	No locality label, probably Trois Pistoles
USNM 20694	<i>Macrobaddella ditetra</i>	1	15 June 1938	U.S.A.	Florida	Osceola National Forest, Lake City
USNM 30210	<i>Macrobaddella ditetra</i>	4	24 January 1935	U.S.A.	Florida	Near Knight's Station
USNM 30215	<i>Macrobaddella ditetra</i>	1	—	U.S.A.	Florida	Lake Homey, Lakeland
USNM 30218	<i>Macrobaddella ditetra</i>	4	4 June 1904	U.S.A.	Texas	O' Connor's Lake, Refugio County
USNM 30224	<i>Macrobaddella ditetra</i>	8	23 February 1935	U.S.A.	Florida	Near Gainesville
USNM 30226	<i>Macrobaddella decora</i>	1	10 May 1911	U.S.A.	Maryland	Laurel
USNM 30228	<i>Macrobaddella ditetra</i>	1	21 August 1957	U.S.A.	Florida	Everglades City
USNM 30235	<i>Macrobaddella ditetra</i>	1	18 February 1906	U.S.A.	Florida	Turkey Hammock Magnetic Station, U.S. Coast Survey, Kissimmee River
USNM 30248	<i>Macrobaddella ditetra</i>	2	4 June 1904	U.S.A.	Texas	O' Connor's Lake, Refugio County
USNM 36345*	<i>Macrobaddella ditetra</i>	1	May 1916	U.S.A.	Louisiana	Marshes near New Orleans
USNM 36346^	<i>Macrobaddella ditetra</i>	3	1916	U.S.A.	Louisiana	Marshes near New Orleans
USNM 36347^	<i>Macrobaddella ditetra</i>	14	May 1916	U.S.A.	Louisiana	Near New Orleans
USNM 36400^	<i>Macrobaddella ditetra</i>	1	1934	U.S.A.	North Carolina	Washington
USNM 38860	<i>Macrobaddella decora</i>	33	August 1889	U.S.A.	Massachusetts	Woods Hole
USNM 38861 <sup>a</sup>	<i>Macrobaddella decora</i>	15	—	—	—	—
USNM 38862	<i>Macrobaddella decora</i>	4	30 August 1919	U.S.A.	New York	Carr Pond, Palisades Interstate Park
USNM 38863	<i>Macrobaddella decora</i>	6	8 July 1919	U.S.A.	New York	Palisades Interstate Park
USNM 38864	<i>Macrobaddella decora</i>	2	September 1938	U.S.A.	North Carolina	Elon College
USNM 38865	<i>Macrobaddella decora</i>	16	Summer 1950	U.S.A.	Iowa	Lakes near Marshalltown



Table 1.—Continued.

Catalog number	Scientific name	Specimen count	Collection date	Country of origin	State/province of origin	Precise locality
USNM 38866	<i>Macrobella decora</i>	26	August 1923	U.S.A.	Michigan	Mud Lake, Cheboygan County
USNM 38867	<i>Macrobella decora</i>	2	—	—	—	—
USNM 38868	<i>Macrobella decora</i>	1	12 August 1922	Canada	Ontario	Hill Lake
USNM 38869	<i>Macrobella decora</i>	1	June 1924	Canada	Ontario	Lake Nipigon
USNM 38870	<i>Macrobella decora</i>	1	3 August 1933	Canada	Ontario	Perch Lake
USNM 38871	<i>Macrobella decora</i>	1	15 July 1934	Canada	Ontario	Small Muskeg Lake
USNM 38872	<i>Macrobella decora</i>	1	1933	Canada	Alberta	Fawcett
USNM 38873	<i>Macrobella decora</i>	4	Summer 1932	U.S.A.	Massachusetts	Cape Cod, Sandwich County
USNM 38874	<i>Macrobella decora</i>	1	19 June 1929	U.S.A.	New Hampshire	Grafton Mountains
USNM 38875	<i>Macrobella decora</i>	3	10 June 1934	U.S.A.	Vermont	Belmont
USNM 38876	<i>Macrobella decora</i>	5	Summer 1948	U.S.A.	Maine	Stoneham
USNM 38877	<i>Macrobella decora</i>	3	8 September 1934	U.S.A.	New York	Black Pond
USNM 38878	<i>Macrobella decora</i>	2	September 1937	U.S.A.	New York	Davenport Lake, Cold Spring Harbor, Long Island
USNM 38879	<i>Macrobella decora</i>	4	5 August 1940	U.S.A.	New York	Cold Spring Harbor, Long Island
USNM 38880	<i>Macrobella decora</i>	4	March 1957	U.S.A.	Iowa	—
USNM 38882	<i>Macrobella decora</i>	8	December 1907	U.S.A.	Minnesota	—
USNM 38883	<i>Macrobella decora</i>	2	December 1907	U.S.A.	Minnesota	—
USNM 38884	<i>Macrobella decora</i>	3	December 1907	U.S.A.	Minnesota	—
USNM 38885	<i>Macrobella decora</i>	1	December 1907	U.S.A.	Minnesota	—
USNM 38886	<i>Macrobella decora</i>	1	29 July 1913	U.S.A.	Michigan	Whitefish Point, Chippewa County
USNM 38887	<i>Macrobella decora</i>	1	24 August 1925	U.S.A.	Michigan	Thomas Lake, Obsego County
USNM 38888	<i>Macrobella decora</i>	2	16 August 1925	U.S.A.	Michigan	"S" Lakes, Obsego County
USNM 38889	<i>Macrobella decora</i>	6	1926	U.S.A.	Michigan	Marquette
USNM 38890	<i>Macrobella decora</i>	1	13 August 1937	U.S.A.	Michigan	Chicago Lake, Delta County
USNM 38891	<i>Macrobella decora</i>	2	15 April 1930	Mexico	Nuevo Leon	Arroyo Alamo, near Juarez
USNM 38892	<i>Macrobella decora</i>	1	—	U.S.A.	Wisconsin	Wabekon Lake, Forest County
USNM 38896	<i>Macrobella ditetra</i>	1	18 June 1918	U.S.A.	Louisiana	Walnut Bayou
USNM 38897	<i>Macrobella ditetra</i>	2	—	U.S.A.	South Carolina	Charleston
USNM 38898	<i>Macrobella ditetra</i>	1	19 February 1933	U.S.A.	North Carolina	Washington
USNM 38899	<i>Macrobella ditetra</i>	1	9 July 1934	U.S.A.	North Carolina	Washington
USNM 38900	<i>Macrobella ditetra</i>	1	1934	U.S.A.	North Carolina	Washington
USNM 38901	<i>Macrobella ditetra</i>	1	1934	U.S.A.	North Carolina	Washington

Table 1.—Continued.

Catalog number	Scientific name	Specimen count	Collection date	Country of origin	State/province of origin	Precise locality
USNM 38902	<i>Macrobdeella ditetra</i>	1	1 May 1948	U.S.A.	Texas	Hardin County
USNM 38903	<i>Macrobdeella ditetra</i>	1	16 December 1948	U.S.A.	Louisiana	Iberville Parish
USNM 38904	<i>Macrobdeella ditetra</i>	1	7 April 1950	U.S.A.	Mississippi	Forrest County
USNM 38905	<i>Macrobdeella ditetra</i>	1	25 March 1923	U.S.A.	Louisiana	Covington
USNM 38906	<i>Macrobdeella ditetra</i>	3	Probably 1918	U.S.A.	Louisiana	Mound
USNM 38907	<i>Macrobdeella ditetra</i>	2	15 April 1914	U.S.A.	Louisiana	Bermudcy Lake, New Orleans
USNM 38908	<i>Macrobdeella ditetra</i>	1	6 December 1923	U.S.A.	Louisiana	New Orleans
USNM 38909	<i>Macrobdeella ditetra</i>	5	Summer 1939	U.S.A.	Florida	Lake City
USNM 38910	<i>Macrobdeella ditetra</i>	1	1 May 1952	U.S.A.	Florida	Peace River, Polk County
USNM 38911	<i>Macrobdeella ditetra</i>	11	March 1952	U.S.A.	Florida	Alachua County
USNM 38912	<i>Macrobdeella ditetra</i>	11	April 1923	U.S.A.	Louisiana	New Orleans
USNM 40534	<i>Macrobdeella decora</i>	1	13 August 1919	U.S.A.	New York	Carr Pond, Palisades Park
USNM 41353 <sup>§</sup>	<i>Macrobdeella</i> sp.	1	1 April 1950	U.S.A.	Louisiana	Chatham, Jackson Parish
USNM 41354 <sup>§</sup>	<i>Macrobdeella</i> sp.	1	1 April 1950	U.S.A.	Louisiana	Eureka, Ouachita Parish
USNM 42507	<i>Macrobdeella decora</i>	1	29 July 1941	U.S.A.	Louisiana	Welch Lake
USNM 42558	<i>Macrobdeella ditetra</i>	2	1923	U.S.A.	Louisiana	New Orleans
USNM 42615	<i>Macrobdeella ditetra</i>	1	1951	U.S.A.	Florida	Gamesville
USNM 42667	<i>Macrobdeella decora</i>	1	26 July 1935	Canada	Ontario	Joe Lake, Algonquin Park
USNM 42668	<i>Macrobdeella decora</i>	11	7 August 1935	Canada	Ontario	Hilliard Lake, Algonquin Park
USNM 42694	<i>Macrobdeella decora</i>	3	July 1920	U.S.A.	New York	Carr Pond, Palisades Park
USNM 43306	<i>Macrobdeella decora</i>	1	—	U.S.A.	Rhode Island	Providence
USNM 43544 <sup>§</sup>	<i>Macrobdeella ditetra</i>	1	—	U.S.A.	Virginia	Near Great Falls of the Potomac
USNM 43562	<i>Macrobdeella decora</i>	4	13 September 1911	U.S.A.	New York	North Rose
USNM 46292	<i>Macrobdeella ditetra</i>	1	14 May 1969	U.S.A.	Mississippi	Grenada County
USNM 49410	<i>Macrobdeella decora</i>	1	28 June 1968	U.S.A.	Illinois	Kyte River, Ogle County
USNM 50152	<i>Macrobdeella decora</i>	1	20 August 1927	U.S.A.	New Jersey	Ramapo River, Mahwah
USNM 50153	<i>Macrobdeella decora</i>	1	24 June 1930	U.S.A.	Texas	Near Austin
USNM 50154	<i>Macrobdeella decora</i>	4	27 July 1930	U.S.A.	Michigan	Blue Lake, Kalkaska County
USNM 50155	<i>Macrobdeella decora</i>	3	24 August 1930	Canada	Ontario	Anderson Lake
USNM 50156	<i>Macrobdeella decora</i>	3	15 October 1934	U.S.A.	Michigan	Putnam Township, Livingston County
USNM 50157	<i>Macrobdeella decora</i>	1	10 August 1936	U.S.A.	New York	Moodna Creek, Hudson drainage, Orange County
USNM 50158	<i>Macrobdeella decora</i>	2	3 July 1937	U.S.A.	Michigan	Mitchell Lake, Wexford County

Table 1.—Continued.

Catalog number	Scientific name	Specimen count	Collection date	Country of origin	State/province of origin	Precise locality
USNM 50159	<i>Macrobella decora</i>	2	8 July 1937	U.S.A.	Maine	Great Brook, York County
USNM 50160	<i>Macrobella decora</i>	2	23 July 1937	U.S.A.	Michigan	Craig Lake, Baraga County
USNM 50161	<i>Macrobella decora</i>	1	6 August 1937	U.S.A.	Michigan	Kewardin Lake, Marquette, Baraga County
USNM 50162 <sup>§</sup>	<i>Macrobella decora</i>	1	3 June 1938	U.S.A.	New Hampshire	Suncoop Pond, Rockingham County
USNM 50163	<i>Macrobella decora</i>	1	29 June 1938	U.S.A.	Michigan	Lake of the Clouds, Ontonagon County
USNM 50164	<i>Macrobella decora</i>	1	3 July 1938	U.S.A.	Kansas	White Woman Creek, Wichita County
USNM 50165	<i>Macrobella decora</i>	4	12 July 1938	U.S.A.	Michigan	Gogebic County
USNM 50166	<i>Macrobella decora</i>	1	16 July 1938	U.S.A.	Michigan	Sucker Lake, Gogebic County
USNM 50167	<i>Macrobella decora</i>	1	30 August 1938	U.S.A.	Michigan	Wilson Lake, Marquette County
USNM 50168	<i>Macrobella decora</i>	2	4 May 1939	U.S.A.	Michigan	Utica, Macomb County
USNM 50169	<i>Macrobella decora</i>	1	31 July 1940	U.S.A.	Michigan	Chain of Lakes, Marquette County
USNM 50904	<i>Macrobella decora</i>	2	26 June 1952	U.S.A.	Michigan	Dyer Lake, Dickinson County
USNM 51540	<i>Macrobella ditetra</i>	1	5 November 1973	U.S.A.	North Carolina	Duplin
USNM 51562	<i>Macrobella ditetra</i>	1	15 September 1972	U.S.A.	South Carolina	Francis Marion National Forest
USNM 51699	<i>Macrobella ditetra</i>	4	—	U.S.A.	South Carolina	Georgetown
USNM 51738	<i>Macrobella ditetra</i>	1	26 July 1959	U.S.A.	Georgia	McIntosh County
USNM 51739	<i>Macrobella ditetra</i>	2	27 February 1970	U.S.A.	South Carolina	Fox Gully Branch, Francis Marion National Forest
USNM 51740	<i>Macrobella ditetra</i>	1	14 March 1970	U.S.A.	South Carolina	Near Charleston
USNM 51741	<i>Macrobella ditetra</i>	1	27 October 1970	U.S.A.	South Carolina	Turkey Creek, Francis Marion National Forest
USNM 51742	<i>Macrobella ditetra</i>	3	7 March 1971	U.S.A.	South Carolina	Santee River
USNM 51762	<i>Macrobella ditetra</i>	1	3 March 1972	U.S.A.	South Carolina	Bull's Island
USNM 51789*	<i>Macrobella diplotertia</i>	1	—	U.S.A.	Missouri	Osage River, Osage County
USNM 51790 <sup>^</sup>	<i>Macrobella diplotertia</i>	6	—	U.S.A.	Missouri	Osage River, Osage County
USNM 53512	<i>Macrobella decora</i>	2	7 May 1969	U.S.A.	Michigan	Fleming Creek, Washtenaw County

Table 1.—Continued.

Catalog number	Scientific name	Specimen count	Collection date	Country of origin	State/province of origin	Precise locality
USNM 56782	<i>Macrobodella ditetra</i>	2	25 April 1977	U.S.A.	Arkansas	Locust Bayou
USNM 1007614	<i>Macrobodella diplotertia</i>	1	30 April 2001	U.S.A.	Arkansas	Wildlife Management Area, Madison County
USNM 1007615	<i>Macrobodella diplotertia</i>	1	3 May 2001	U.S.A.	Arkansas	Wildlife Management Area, Madison County
USNM 1405211 <sup>§</sup>	<i>Macrobodella sestertia</i>	3	3 June 1938	U.S.A.	New Hampshire	Rockingham County

possessed 2 + 1/2 annuli between the gonopores and 24 accessory gland pores on the ventral surface with the first row of pores seven annuli posterior to the female gonopore (Figs. 1, 2). The accessory gland pores occur in pairs on top of swollen tubercles in two groupings of two rows of three tubercles in each row (Fig. 3). These characters are diagnostic of *M. sestertia*. The three specimens of *M. sestertia* were removed from USNM 50162 and now comprise USNM 1045211.

### Conclusions

This is the first report of *M. sestertia* from New Hampshire and represents the sixth time this poorly known species has ever been reported. The redetermination of the specimens of *M. decora* and *M. ditetra* are consistent with the geographic distributions of these common species.

Smith's (1977) suggestion that *M. sestertia* is distributed in Coastal Till Plains of New England is consistent with the previously known localities of this species (Fig. 4). The new locality in New Hampshire falls within the Northeastern Coastal Zone (map region 8.1.7) as defined by the Commission for Environmental Conservation (Wiken et al. 2011) along with the localities in Massachusetts. This region is characterized by warm summers and severe winters and is considered predominantly Dry Appalachian Oak forest (formerly Dry Appalachian Oak-Hickory forest) and Northeast Oak-Pine forests (Wiken et al. 2011). Sebec Lake, Maine is within the Maine/New Brunswick Plains and Hills (map region 8.1.8) with a climate that resembles the Northeastern Coastal Zone but predominantly Mixedwood forests. Smith and Hanlon (1977) reported finding, but not collecting, a sub-adult of *M. sestertia* from Harwich, Massachusetts, which falls within the Atlantic Coastal Pine Barrens (map region 8.5.4), a region with hot summers and cold winters and



Fig. 1. USNM 1405211 *Macrobdella sestertia*. Top row: dorsal view. Bottom row: ventral view. Scale bar = 5 mm.

predominantly Oak-Pine forests (Wiken et al. 2011). These 3 ecoregions have similar climate of warm to hot summers and cold, sometimes severe winters, 110–230 frost free days per yr, mean annual tempera-

tures between 4–11°C, mean annual precipitation between 890–1270 ml, and elevation below 500 masl, with abundant perennial streams, and deciduous forests with Oak (*Quercus*) and Pine (*Pinus*)

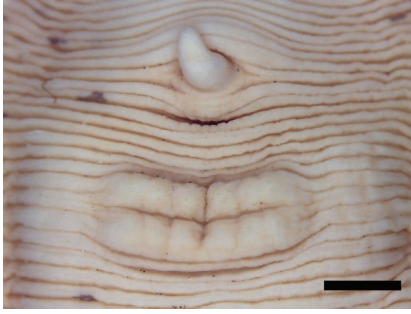


Fig. 2. USNM 1405211 *Macrobdella sestertia*. Ventral side with  $2 + 1/2$  annuli between the gonopores and 24 copulatory glands, diagnostic features of the species. Scale bar = 2 mm.

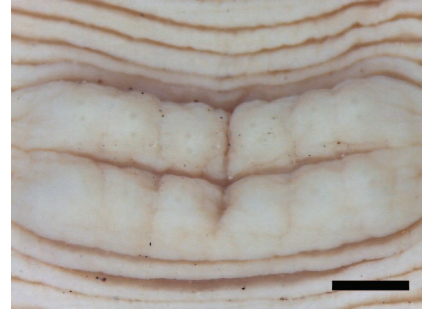


Fig. 3. USNM 1405211 *Macrobdella sestertia*. Copulatory glands with pores that occur in pairs on top of swollen tubercles in two groupings of two rows of three glands in each row. Scale bar = 1 mm.

species. *Macrobdella sestertia* likely has a patchy distribution throughout the coastal areas of New England predominantly within the Northeastern Coastal Zone but also within the Maine/New Brunswick Plains and Hills and the Atlantic Coastal Pine Barrens of New England (Fig. 4). This species likely prefers specialized microhabitats that are distributed within these map regions that may have changed with land use during the past 100 years.

In the time since Whitman collected the specimens of *M. sestertia* in the late 1800s, New England has experienced a period of forest recovery as farmers abandoned farmland and forest has returned, although since 2005 forest coverage has decreased and been replaced by new residential and commercial development in suburban areas (Jeon et al. 2014). The highest rate of forest loss has been in southern New Hampshire and eastern Massachusetts, a region central to the known geographic distribution of *M. sestertia*. Habitat degradation that alters these microhabitats within lakes and ponds of this region through changes in land use poses an imminent threat to this rarely encountered species (Massachusetts 2015 State Wildlife Action Plan).

An anecdotal report of 9 individuals of *M. sestertia* collected in 2008 from Edgefield County, South Carolina (Kohlsaet et al. 2005; Poly 2005) has not been verified and there is no mention of these specimens being deposited in a scientific collection. If corroborated, this would represent a significant range expansion for *M. sestertia*.

This is the first report of *M. decora* and *M. sestertia* being collected during the same collecting event. Sawyer (1972) and Smith (1977) suggested that the western extent of the geographic distribution of *M. sestertia* overlaps with that of *M. decora*. This new locality in New Hampshire indicates that the distribution of *M. decora* extends eastward, overlapping with *M. sestertia* and that these 2 species do occur in sympatry.

#### Acknowledgements

Thank you to William E. Moser and Karen Reed (both Department of Invertebrate Zoology, NMNH) for visitor support during the visit of RSM to the Museum Support Center, Smithsonian Institution and for access to specimens in the collection. The visit of RSM to the NMNH was supported by CONACYT and Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Thank you to Ted R. Kahn for

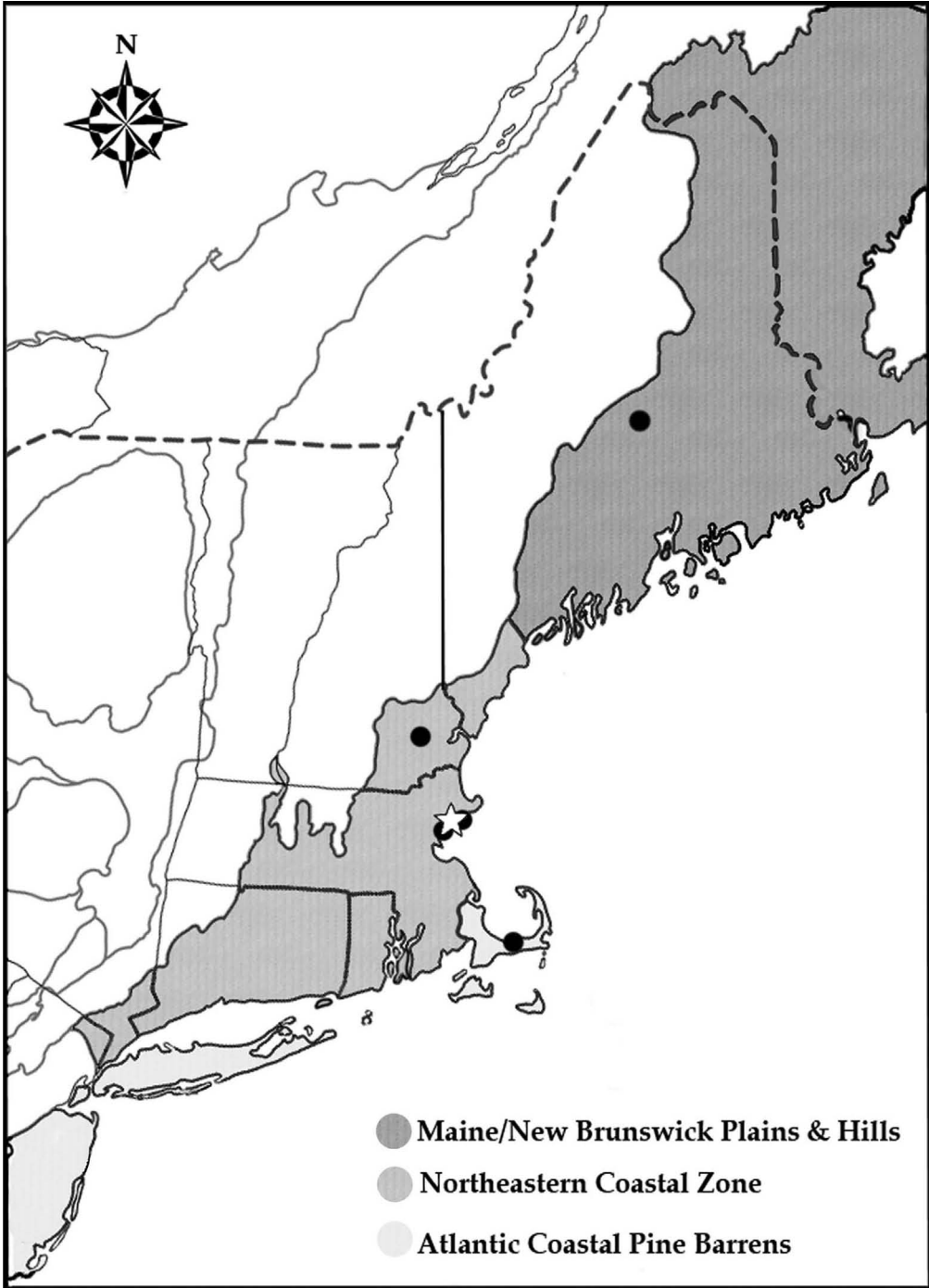


Fig. 4. CEC ecoregions (level III) of New England with the type locality (star) and distribution records (dots) of *Macrobdella sestertia*. Modified from Wiken et al. (2011).

his expertise and assistance with the figures and to Joseph O. Sexton (University of Maryland) for his thoughtful advice about ecoregions.

### Literature Cited

- Jeon, S. B., P. Olofsson, & C. E. Woodcock. 2014. Land use change in New England: a reversal of the forest transition. *Journal of Land Use Science* 9: 105–130.
- Klemm, D. J. 1982. Leeches (Annelida: Hirudinea) of North America. U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, Ohio. EPA-600/3-82-025. 177 pp.
- Kohlsaatt, T., L. Quattro, & J. Rinehart. 2005. South Carolina Comprehensive Wildlife Conservation Strategy 2005–2010. South Carolina Department of Natural Resources, 287 pp.
- Massachusetts State Wildlife Action Plan. 2015. Massachusetts Division of Fisheries and Wildlife. 413 pp.
- New England Medicinal Leech Fact Sheet. 2015. Natural Heritage & Endangered Species Program, Massachusetts Division of Fisheries and Wildlife. 2 pp.
- Poly, W. J. 2005. Marine, Freshwater, and Terrestrial Leeches, Appendices – Leech Accounts, Pp. 2–2. *in* South Carolina Comprehensive Wildlife Conservation Strategy 2005–2010, 2 pp.
- Sawyer, R. T. 1972. North American freshwater leeches, exclusive of the Piscicolidae, with a key to all species. *Illinois Biological Monographs* 46, 154 pp.
- Sawyer, R. T. 1986. Leech Biology and Behaviour. Volume II. Feeding Biology, Ecology, and Systematics. Oxford University Press, Oxford, England. 419–793 pp.
- Smith, D. G. 1977. The rediscovery of *Macrobella sestertia* Whitman (Hirudinea: Hirudinidae). *Journal of Parasitology* 63(4): 759–760.
- Smith, D. G. & S. Hanlon. 1997. *Macrobella sestertia* (Hirudinea: Hirudinidae) in Maine and a key to the hirudiniform leeches of Maine. *Northeastern Naturalist* 4(4): 231–236.
- Whitman, C. O. 1886. The leeches of Japan. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 26: 317–416.
- Wiken, E., F. Jiménez Nava, & G. Griffith. 2011. North American Terrestrial Ecoregions – Level III. Commission for Environmental Cooperation, Montreal, Canada.

Associate Editor Anja Schulze.