



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

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL RATÓN
TLACUACHE (*TLACUATZIN CANESCENS*) ENDÉMICO DE
MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
JÉSICA ARCANGELI ÁLVAREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JORGE ORTEGA REYES
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN
DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

Cd. Mx. JUNIO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL RATÓN
TLACUACHE (*TLACUATZIN CANESCENS*) ENDÉMICO DE
MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
JÉSICA ARCANGELI ÁLVAREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JORGE ORTEGA REYES
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN
DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx.

JUNIO, 2018

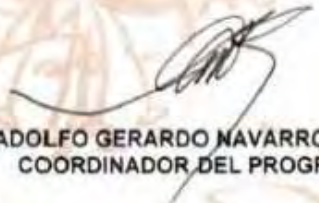
Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de enero de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna ARCANGELI ÁLVAREZ JÉSICA con número de cuenta 98046984 con la tesis titulada: "Diversidad y estructura genética del ratón tlacuache (*Tlacuatzin canescens*) endémico de México", realizada bajo la dirección del DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA:

Presidente:	DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Vocal:	DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Secretario:	DR. JORGE ORTEGA REYES
Suplente:	DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN
Suplente:	DR. JOAQUÍN ARROYO CABRALES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 6 de junio de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas (PCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por los siguientes apoyos económicos:

- Beca para estudios de posgrado.
- Beca complementaria para la estancia de investigación en *Texas A&M University*, College Station, TX, USA

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por el financiamiento otorgado al proyecto IN215711 a cargo del Dr. Fernando A. Cervantes Reza.

Al Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM por los siguientes apoyos económicos otorgados:

- Beca PAEP-2013, para Estancia Internacional: *Texas A&M University*, College Station, TX, USA, Abril de 2013.
- Beca PAEP-2013, para Estancia Internacional: *American Museum of Natural History*, Nueva York, NY y *National Museum of Natural History*, Washington, D. C., USA, Enero de 2014.

A los miembros de mi comité tutor: Dr. Fernando A. Cervantes Reza (tutor principal), Dr. Jorge Ortega Reyes y Dr. José Martín García Varela, por aceptar la dirección de esta tesis y por aportar sugerencias y críticas certeras para mejorar el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres Teresa y Adolfo por su apoyo incondicional, por su comprensión y por querer siempre lo mejor para mí.

A Carlos por todo su cariño y por toda la paciencia que ha tenido.

A mi hermana Erika por estar siempre para mí.

Al Dr. Fernando A. Cervantes por todo el apoyo que me ha brindado, por todos sus consejos, por compartir conmigo su experiencia y sus conocimientos en esta profesión y en la vida y por ser el director de esta tesis.

A los miembros del jurado: Dr. Jorge Ortega Reyes, Dra. Livia León Paniagua, Dra. Ella Vázquez, Dr. Alejandro Zaldivar y Dr. Joaquín Arroyo por el tiempo invertido en la corrección y enriquecimiento de este trabajo y por sus valiosas aportaciones a mi formación académica.

A la M. en C. Yolanda Hortelano y a la M. C. Julieta Vargas por su valiosa ayuda en el trabajo de campo y de laboratorio.

Al personal de la Estación Biológica “Chamela” del Instituto de Biología UNAM por todo el apoyo brindado durante mi estancia.

A la Dra. Jessica E. Light por su valioso apoyo y todas las facilidades otorgadas durante mi estancia de investigación en Texas A&M University.

A Celia López-González (CIDIIR-Durango), Consuelo Lorenzo (ECOSUR-SC- M), Oscar Retana (CMUAC), Robert S. Voss (AMNH), Robert M. Timm (KU), Bruce Patterson (FMNH), Jessica Light (Texas A&M University), Suzanne Peurach (NMNH) y Juan Carlos López Vidal (ENCB-IPN) por su apoyo en la obtención de las muestras de tejido y en la toma de medidas craneales.

A la M. en C. Laura Márquez por la secuenciación de las muestras en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología, UNAM

Al Dr. Jorge Ortega por el diseño de los microsatélites y la genotipificación de las muestras.

A la Dra. Silvia López-Betancourt y la Biol. Eréndira Estrella por su apoyo en el trabajo de campo en la Estación de Campo “Hobonil” de la Universidad Autónoma de Yucatán.

A Moisés López, Antonio Mejía, Uriel Jiménez, Amyra Ruíz, Omar Villegas, Alfredo Bárcenas y Alejandro Rosas por su valiosa ayuda en el trabajo de campo realizado en Colima y Jalisco.

A todos los integrantes de la Colección Nacional de Mamíferos por todos los momentos que siempre recordare como miembro de este grupo.

A todas las personas que de mi memoria escapan que han ayudado a mi formación académica y personal. Muchas gracias por ayudarme a llegar hasta aquí.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL	II
ÍNDICE	III
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
Objetivos	11
CAPÍTULO I. “MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL EVIDENCES OF THE DIVERSIFICATION IN THE GRAYISH MOUSE OPOSSUM, <i>TLACUATZIN CANESCENS</i> (DIDELPHIMORPHIA), WITH DESCRIPTION OF A NEW SPECIES”	12
Supplementary data	34
CAPÍTULO II. “ TWENTY-FOUR MICROSATELLITE MARKERS FOR THE GRAY MOUSE OPOSSUM (<i>TLACUATZIN CANESCENS</i>): DEVELOPMENT FROM ILLUMINA PAIRED-END SEQUENCES”	44
CAPÍTULO III. “GENÉTICA POBLACIONAL DEL RATÓN TLACUACHE (<i>TLACUATZIN CANESCENS</i>) EVALUADA CON DNA MITOCONDRIAL Y MICROSATÉLITES”	49
CAPÍTULO IV. “DNA BARCODING OF MEXICAN MARSUPIALS (MAMMALIA: DIDELPHIMORPHIA)”	99
DISCUSIÓN FINAL	123
CONCLUSIONES	126
Literatura Citada.....	127

RESUMEN

El ratón tlacuache (*Tlacuatzin canescens* Allen, 1893) es un marsupial endémico de México cuya biología ha sido escasamente estudiada. El objetivo general de este trabajo fue documentar la historia evolutiva de este taxón y describir la diversidad genética de sus poblaciones. En el Capítulo I se examinaron secuencias de DNA para probar su exclusividad y evaluar las relaciones genealógicas entre sus poblaciones y con especies de géneros cercanamente relacionados. Asimismo, se realizó el análisis morfométrico de variables cráneo-dentales para distinguir fenotípicamente los clados obtenidos en el análisis filogenético. Los resultados apoyaron la exclusividad de *Tlacuatzin* y revelaron que este género está formado por cinco clados bien diferenciados tanto morfológica como molecularmente. El análisis de reloj molecular relajado reveló que la diversificación de especies de este género empezó hace 2.35 millones de años durante el Pleistoceno temprano y terminó en el Pleistoceno tardío hace 0.19 millones de años en respuesta a los cambios ambientales y a la presencia de barreras geográficas. Como resultado, se propusieron cambios en la taxonomía del género que incluyen el reconocimiento de *T. gaumeri*, *T. insularis* y *T. sinaloae* como especies válidas y la descripción de una nueva especie *T. balsasensis*. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que *Tlacuatzin* es el grupo hermano del clado formado por *Marmosa* y *Monodelphis*. En el Capítulo II se documentó la diversidad genética de las cinco especies del género *Tlacuatzin* utilizando secuencias de DNA mitocondrial y microsatélites. Se hicieron análisis de demografía histórica y diferenciación genética. Los análisis revelaron que las cinco especies despliegan niveles altos de diversidad genética. Los análisis de demografía histórica sugieren que esta diversidad es consecuencia de un crecimiento poblacional rápido a partir de un tamaño poblacional pequeño, mientras que los análisis de diferenciación revelaron que existe una fuerte estructuración genética dentro del género. En el Capítulo III se utilizó la herramienta del código de barras para documentar las diferencias genéticas que existen entre las cinco especies que conforman el género *Tlacuatzin* y entre este taxón y los demás tlacuaches mexicanos. La divergencia genética documentada entre los clados de *Tlacuatzin* fue mayor al 2%, similar a la reportada en las comparaciones interespecíficas, lo que corroboró que estos clados deben ser reconocidos como especies diferentes. El análisis de distancias genéticas identificó correctamente la identidad taxonómica de las especies morfológicamente similares, *D. virginiana*, *D. marsupialis*, *T. canescens* y *M. mexicana*. Se documentan todas las especies de marsupiales que se distribuyen en México. Los resultados obtenidos en este trabajo tienen consecuencias importantes para la implementación de acciones para la conservación de las especies de *Tlacuatzin*.

Palabras clave: análisis filogenético, código de barras, Didelphimorphia, DNA mitocondrial, marsupial, microsatélites, morfometría

ABSTRACT

The gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens* Allen, 1893) is a poorly known marsupial endemic to México. The aim of this research was to document the evolutionary history of this taxon and describe the genetic diversity of its populations. In Chapter I, we examined DNA sequences to test the exclusivity of *T. canescens* and assess the relationships among its populations and with species of closely related genera. In addition, we performed morphometric analyses of cranio-dental variables to assess phenotypic distinctiveness of mitochondrial clades. Our results supported the exclusivity of *Tlacuatzin* and revealed that this taxon is divided into five well-differentiated clades. The relaxed molecular clock analyses suggested that the species diversification of this genus began 2.35 million years ago during the early Pleistocene and finished in the late Pleistocene 0.19 millions of years ago in response to climatic changes and the presence of geographical barriers. We proposed changes in the current taxonomy of the genus *Tlacuatzin*, which include the recognition of *T. gaumeri*, *T. insularis*, and *T. sinaloae* as valid species and the description of a new species, *T. balsasensis*. Our results supported that *Tlacuatzin* is the sister group of the clade conformed by *Marmosa* and *Monodelphis*. In Chapter II we documented the genetic diversity of the five species of the genus *Tlacuatzin* using mitochondrial DNA and microsatellites. We performed analyses of historical demography and genetic differentiation. Our results revealed that the five species display high levels of genetic diversity. The historical demography analyses suggested that this diversity was consequence of a rapid population growth from a small population size, while the differentiation analyses supported a strong genetic structure within this genus. In Chapter III we used DNA barcoding to document the genetic differences among the five species that conform the genus *Tlacuatzin*, and among this taxon and other Mexican marsupials. The genetic divergence documented among the five clades of *Tlacuatzin* was higher than 2%, similar to those reported for interspecific comparisons which supported that these clades should be recognized as different species. The NJ analysis correctly identified the taxonomic identity of morphologically similar species, *D. virginiana*, *D. marsupialis*, *T. canescens*, and *M. mexicana*. We documented the presence of the nine species of marsupials distributed in México. Our results have important consequences to implement actions for the conservation of the *Tlacuatzin* species.

Key words: phylogenetic analyses, DNA barcoding, Didelphimorphia, mitochondrial DNA, marsupial, microsatellites, morphometrics

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los mamíferos tradicionalmente se han dividido en tres grupos: Prototheria, que incluye a los mamíferos nacidos de huevo; Metatheria, que reúne a todos marsupiales; y Eutheria, que comprende a los mamíferos placentados (Svartman 2009). Los marsupiales, además de poseer las características típicas de un mamífero como son el pelo y las glándulas mamarias, se distinguen por tener un desarrollo intrauterino muy corto que es completado en el exterior de la madre, en una bolsa abdominal llamada marsupio, aunque algunas especies carecen del mismo (Svartman 2009; Vaughan et al. 2010). Este grupo incluye más de 330 especies que se distribuyen tanto en América (Ameridelphia) como en Australasia (Australidelphia; Springer et al. 1994; Meredith et al. 2009). Actualmente, se reconocen siete órdenes, de los cuales Dasyuromorphia, Diprotodontia, Notoryctemorphia y Peramelemorphia se distribuyen en la región australiana, mientras que Microbiotheria, Paucituberculata y Didelphimorphia evolucionaron en el nuevo mundo (Meredith et al. 2009; Abello 2013).

Dentro de los marsupiales americanos, el orden Microbiotheria está representado por una sola especie (*Dromiciops gliroides*), mientras que el orden Paucituberculata agrupa a seis especies en tres géneros (*Caenolestes*, *Lestoros* y *Rhyncholestes*). Ambos órdenes son considerados relictos en la fauna actual debido al escaso número de especies que contienen y a lo restringido de su distribución geográfica (Voss y Jansa 2009). En contraste, el Orden Didelphimorphia agrupa a la mayor parte de los marsupiales del continente americano, aproximadamente 100 especies en 19 géneros (Jansa et al. 2013), por lo que ocupa el tercer lugar en riqueza de especies dentro de la fauna mastozoológica Neotropical después de roedores y quirópteros (Catzefflis et al. 1997). Los didelfimorfios representan al orden más antiguo de la Infraclasse Metatheria, apareciendo en el registro fósil del Cretácico tardío de Norteamérica, por lo que sus integrantes son considerados la base de la radiación de los marsupiales actuales (Patton et al. 1996).

Los didelfimorfios de la familia Didelphidae se caracterizan por tener un hocico largo y puntiagudo, cinco dedos en cada una de sus patas, pulgar oponible y sin uña en las patas traseras, cola desnuda y prensil y un marsupio que puede tener diferentes grados de desarrollo (Villa y Cervantes 2003; Vaughan et al. 2010). Estos marsupiales son solitarios y nocturnos y la mayoría son de hábitos escansoriales y omnívoros (Vaughan et al. 2010). La distribución geográfica de los didelfimorfios se extiende desde el sureste de Canadá hasta la Patagonia (Arcangeli y Cervantes

2009). La mayoría de las especies se encuentran confinadas a los ambientes tropicales en tierras bajas, siendo muy pocas las que se han podido establecer en ambientes templados y a grandes altitudes (Jansa et al. 2013). Asimismo, estos mamíferos despliegan una amplia variedad de estrategias adaptativas, lo que les permiten ocupar una gran diversidad de nichos ecológicos, presentes en casi todos los hábitats desde el desierto hasta el bosque tropical (Fonseca 2003).

Actualmente, existen pocas revisiones taxonómicas que reflejen el conocimiento actual sobre las relaciones evolutivas de los didélfidos (Voss y Jansa 2003; Fig. 1). Sin embargo, existen evidencias contundentes, tanto morfológicas como moleculares, que apoyan: 1) la monofilia de la subfamilia Didelphinae; 2) la monofilia de los didelfimorfios de talla grande y número diploide de 22 cromosomas ($2n = 22$); 3) una relación de grupo hermano entre *Marmosa* y *Monodelphis*; y 4) un grupo que incluye a *Thylamys*, *Lestodelphys* y *Gracilinanus* (Reig et al. 1987; Kirsch et al. 1995; Patton et al. 1996; Voss y Jansa 2003). En contraste, las relaciones filogenéticas de algunos taxones como *Tlacuatzin* no están bien definidas aunque se sabe que este género está estrechamente relacionado con *Marmosa* y *Monodelphis* (Voss y Jansa 2009).

El orden Didelphimorphia está representado en México por nueve especies y siete géneros, todos ellos incluidos dentro de la familia Didelphidae (Ramírez-Pulido et al. 2014). Estos mamíferos se conocen con el nombre de tlacuaches o zarigüeyas y están presentes en casi todo el país excepto en la Península de Baja California y la Meseta Central (Villa y Cervantes 2003). La mayoría de las especies que se distribuyen en México están restringidas a los ambientes tropicales y húmedos del sureste, sin embargo, el tlacuache de Virginia (*Didelphis virginiana*) y el ratón tlacuache (*Tlacuatzin canescens*) están adaptados a los ambientes templados y secos del centro y oeste del país (Gardner 1973; Voss y Jansa 2003). Por otra parte, *Tlacuatzin* es un género endémico y monotípico de México cuya biología ha sido escasamente estudiada y que muestra características biológicas, ecológicas y evolutivas distintivas, entre las que destaca la distribución disyunta de sus poblaciones en el oeste de México y la Península de Yucatán (Voss y Jansa 2003, 2009).

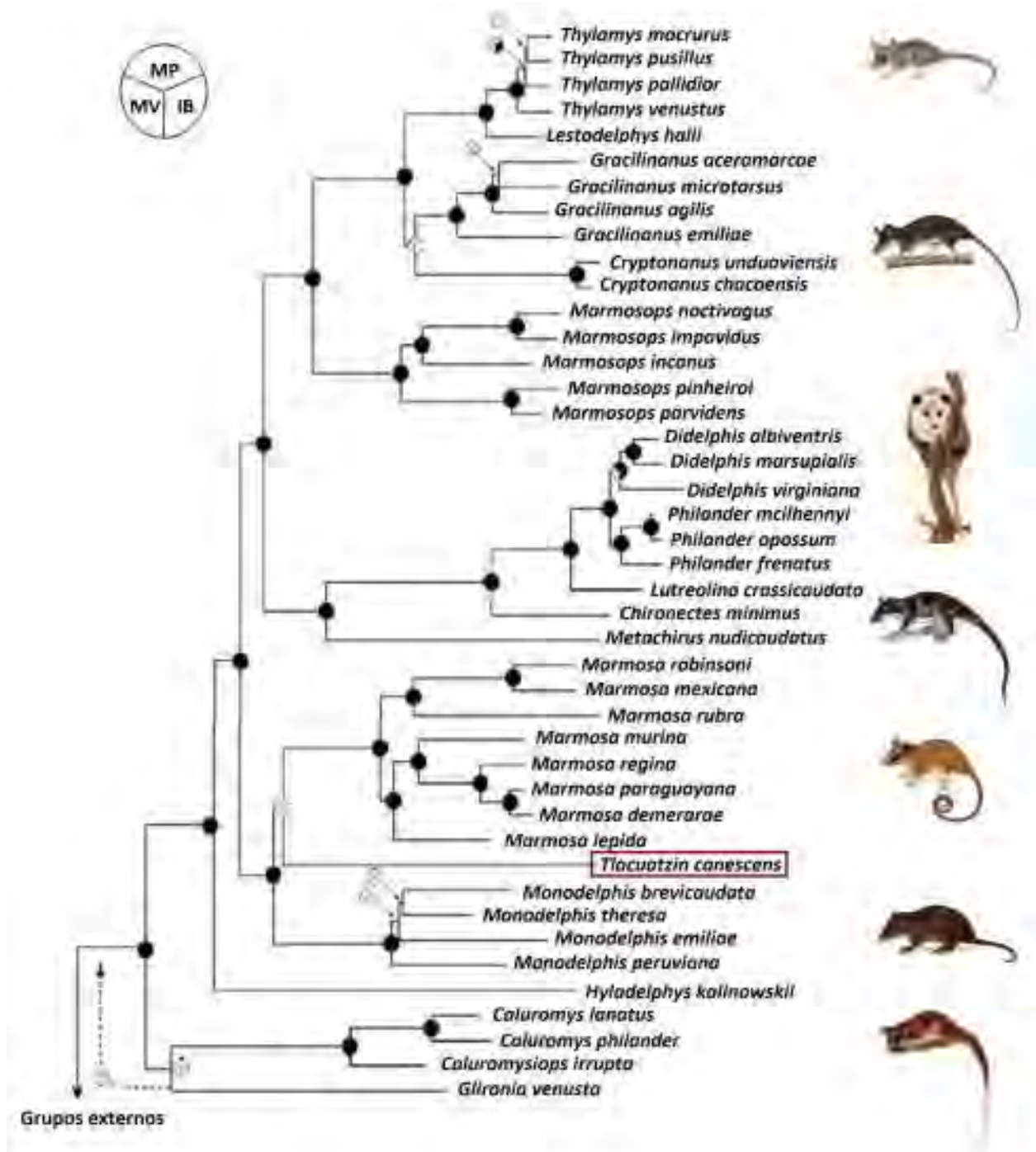


Figura 1.—Relaciones filogenéticas del Orden Didelphimorphia con base en cinco genes nucleares (modificada de Voss y Jansa 2009; Jansa et al. 2013). Los valores de bootstrap de los análisis de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) e inferencia bayesiana (IB) se indican en cada nodo. Para MP y MV el color negro indica valores de bootstrap $\geq 75\%$. Para IB el negro indica una probabilidad posterior ≥ 0.95 . En el recuadro se muestra la ubicación del ratón tlacuache *Tlacuatzin canescens*.

Tlacuatzin canescens Allen, 1893

El ratón tlacuache o tlacuachin, *Tlacuatzin canescens*, es el marsupial más pequeño que se distribuye en México, similar a un ratón y pesa entre 38 y 60 g (Zarza et al. 2003); se caracteriza por un pelaje dorsal de color gris a canela con una máscara de color negro alrededor de los ojos mientras que el vientre es de color crema; las orejas son grandes redondas, de color blanco y sin pelo; y la cola es prensil, desnuda excepto en la base y ligeramente bicolor en su parte distal (Zarza et al. 2003; Arcangeli et al. 2013; Fig. 2). Las hembras carecen de marsupio, sin embargo, poseen una capa de pelo en la región ventral donde las crías terminan su desarrollo (Ceballos y Miranda 2000).



Figura 2.—Ratón tlacuache (*Tlacuatzin canescens*) en la Estación de Biología Chamela, Instituto de Biología, UNAM, en Jalisco, México (fotografía: J. Arcangeli).

Originalmente, *T. canescens* estuvo clasificado dentro del género *Marmosa*; sin embargo, tras un análisis combinado de datos moleculares y morfológicos se encontró que divergía considerablemente de las otras especies del género, por lo que fue removido y clasificado en un nuevo género, cuyo nombre hace referencia al vocablo náhuatl para referirse a un tlacuache (Voss y Jansa 2003). *Tlacuatzin canescens* se distingue de los ratones tlacuache del género *Marmosa*, con los que converge morfológicamente, en primer lugar por su tamaño ya que *Tlacuatzin* es un poco más pequeño (Fig. 3; Zarza et al. 2003). Asimismo, la presencia de un proceso postorbital, una fenestra accesoria a cada lado del molar superior dos y la ausencia de un proceso rostral en la premaxila de *Tlacuatzin*, hacen que su cráneo sea corto y robusto, mientras que el de *M. mexicana*

es largo y angosto (Fig. 4; Voss y Jansa 2003, 2009; Vázquez 2011). Además, el número cromosómico de *Marmosa* es $2n = 14$, mientras que el de *Tlacuatzin* es $2n = 22$ (Biggers et al. 1965; Engstrom y Gardner 1988; Svartman 2009).



Figura 3.—Vista dorsal ejemplares de museo de tres especies de ratones tlacuache (de arriba a abajo): *Tlacuatzin canescens* (National Museum of Natural History; NMNH 512187), *Marmosa mexicana* (NMNH 329396) y *Marmosa murina* (NMNH 584463; fotografía J. Arcangeli).

El tlacuachin se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas a través de la cuenca del Río Balsas y hasta la costa este de México, en la Península de Yucatán y en el archipiélago de las islas Tres Mariás frente a las costas de Nayarit (Voss y Jansa 2009; Guzmán-Soriano et al. 2013; González-Christen y Rodríguez 2014; Fig. 5). *Tlacuatzin canescens* es un componente distintivo de la fauna de la selva baja caducifolia, tanto del Pacífico como de la Península de Yucatán, aunque también se le puede encontrar en una gran variedad hábitats que van desde el bosque de pino-encino hasta el matorral xerófilo (Voss y Jansa 2003; Hernández-Cardona et al. 2007; Monroy-Vilchis et al. 2011). En el Pacífico, este marsupial cohabita con un gran número de mamíferos endémicos, entre los que destacan: la musaraña *Megasorex gigas*, el murciélago *Musonycteris harrisoni*, los ratones *Hodomys alleni*, *Osgoodomys banderanus*, *Peromyscus perfulvus* y *Xenomys nelsoni* y el zorrillo *Spilogale pygmaea*. En contraste, en la Península de Yucatán comparte distribución con algunas especies propias de la región por ejemplo, el ratón *Otonyctomys hatti* y el venado tamazate *Mazama pandora* (Villa y Cervantes 2003; Voss y Jansa 2003).

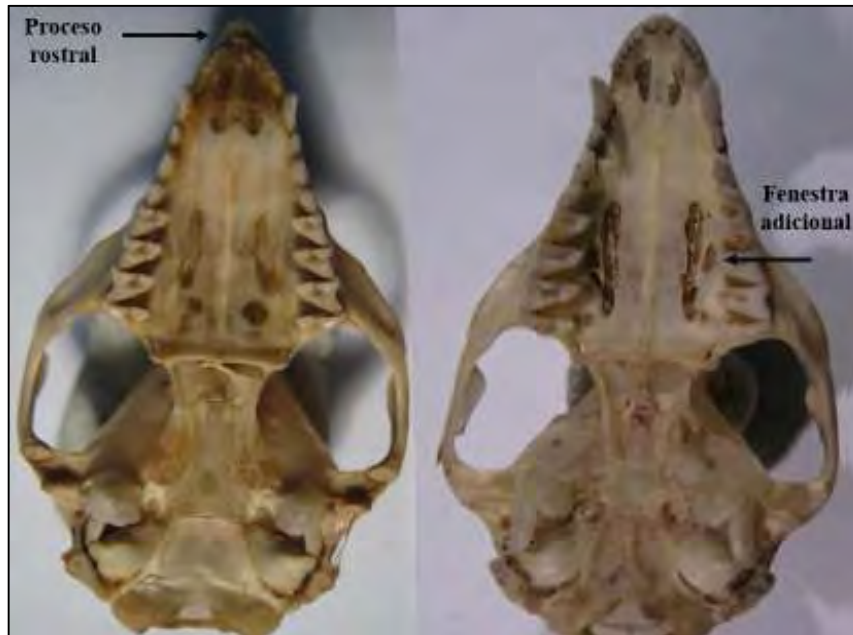


Figura 4.—Vista ventral del cráneo de los ratones tlacuache *Marmosa mexicana* (izquierda; Colección Mastozoológica del Colegio de la Frontera Sur en San Cristóbal de las Casas; ECO-SC-M 4137) y *Tlacuatzin canescens* (derecha; Colección Nacional de Mamíferos; CNMA 43132). Las flechas señalan la fenestra adicional en *T. canescens* y el proceso rostral en *M. mexicana* (fotografías J. Arcangeli).

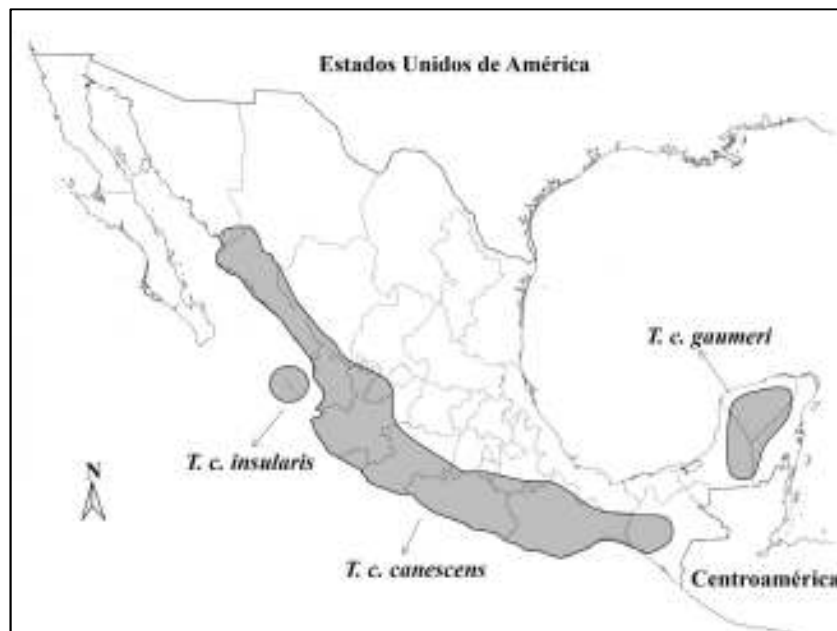


Figura 5.—Distribución geográfica del ratón tlacuache (*Tlacuatzin canescens*) en México, mostrando los límites de las subespecies actualmente reconocidas (modificada de Zarza et al. 2003; Ramírez-Pulido et al. 2014).

Los tlacuachines se refugian en árboles huecos, madrigueras hechas en el suelo y en nidos abandonados de aves (Zarza et al. 2003); son de hábitos omnívoros y su dieta consiste principalmente de insectos y frutos, razón por la cual desempeñan un papel importante como dispersores de semillas y control biológico de plagas, ocasionalmente pueden alimentarse de pequeños vertebrados como lagartijas (Zarza et al. 2003); se reproducen todo el año y llegan a tener hasta 14 crías (Ceballos 2014). *Tlacuatzin canescens* es una especie abundante, capaz de sobrevivir en ambientes severamente perturbados (Hernández-Cardona et al. 2007). Actualmente, se reconocen tres subespecies: *T. c. canescens* a lo largo de la costa del Pacífico; *T. c. gaumeri* al norte de la Península de Yucatán y *T. c. insularis* en las islas Tres Marías (Ramírez-Pulido et al. 2014).

La mayoría de los trabajos publicados sobre *T. canescens* se han concentrado en estudiar su ecología y poco se sabe sobre su historia evolutiva y la diversidad genética de sus poblaciones (Zarza et al. 2003; Ceballos 2014). Además, son escasos los trabajos de este tipo en mamíferos mexicanos y se encuentran dirigidos a los grupos con mayor diversidad en el país, roedores y quirópteros (Sullivan et al. 1996; León-Paniagua et al. 2007; Ortega et al. 2009). El estudio de la historia evolutiva de *T. canescens* permitiría conocer cómo fue el proceso de diversificación de este taxón en México, mientras que el análisis de la diversidad genética de sus poblaciones permitiría determinar el estado de conservación de la especie, así como identificar poblaciones vulnerables y proponer acciones para su conservación (Esteva et al. 2011; Frankham et al. 2010).

Historia evolutiva

La filogeografía es la disciplina que estudia la distribución de los linajes genealógicos en el tiempo y en el espacio, partiendo de la idea de que la mayoría de las especies exhiben cierto grado de estructura genética asociada con la geografía (Avice 2000; Vázquez-Domínguez 2007). Actualmente, los estudios filogeográficos se basan en el análisis de secuencias de DNA mitocondrial para encontrar patrones que puedan describir eventos históricos como la fragmentación de hábitats o expansión del rango de distribución de las especies (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009). Dichos patrones son el resultado de la presencia de barreras geográficas y procesos paleoclimáticos que originan tanto el aislamiento geográfico de las poblaciones naturales como la divergencia genética de las mismas (Balloux y Lugon-Moulin 2002). Por ejemplo, las especies con distribuciones geográficas muy amplias y poca vagilidad, en general presentan patrones

filogeográficos particulares, como son la diferenciación de haplogrupos y la presencia de alopatría (Hernández-Romero 2016). Asociado con lo anterior, se puede hipotetizar que los cambios climáticos del pasado y la compleja historia geológica de México tengan un efecto sobre la distribución geográfica de muchas de las especies que se distribuyen en el país (Fernández et al. 2012).

Estudios filogeográficos en diferentes taxones mexicanos han mostrado coincidencia entre los límites geográficos de los clados filogenéticos coinciden y la presencia de barreras geográficas (por ejemplo, Devitt 2006; Light et al. 2015). De tal manera que, algunos patrones que se han observado son, que en la costa del Pacífico algunos clados filogenéticos están aislados por la presencia del Eje Volcánico Transversal y la Sierra Madre del Sur (Amman y Bradley 2004; Ortega et al. 2009), mientras que en el sureste el límite geográfico de otros clados es el Istmo de Tehuantepec, una barrera geográfica importante para los mamíferos pequeños (Léon-Paniagua et al. 2007; Vázquez-Domínguez et al. 2009). Asimismo, algunos autores han propuesto que los cambios climáticos que ocurrieron durante el Pleistoceno son la causa principal de la diversificación a nivel específico de ciertos mamíferos (Sullivan et al. 1996). Por lo tanto, es de esperar que las características paleoclimáticas hayan influido en el ratón tlacuache produciendo patrones similares. Sin embargo, este marsupial no ha sido estudiado desde esta perspectiva. Asimismo, se desconoce el impacto que los eventos históricos pudieran tener en la diversidad genética de *T. canescens*.

Diversidad genética

La diversidad genética de una especie está directamente relacionada con la adecuación y la capacidad de adaptación de la misma (Frankham et al. 2010). Usualmente, la diversidad genética se evalúa utilizando marcadores moleculares como el DNA mitocondrial y loci de microsatélites ya que éstos poseen altos niveles de variación, lo que permite determinar parámetros demográficos históricos y actuales (Sunnucks 2000).

Entre los genes mitocondriales más utilizados se encuentran el citocromo-*b* (*Cyt-b*) y el citocromo oxidasa subunidad I (*CoxI*), los cuales han sido ampliamente utilizados en mamíferos silvestres, como roedores y quirópteros (Bradley y Baker 2001; Borisenko et al. 2008). Estos genes han sido utilizados para estimar la variación genética en tlacuaches del Orden Didelphimorphia y para evaluar hipótesis filogenéticas entre taxones estrechamente relacionados, aunque no han sido

utilizados en *T. canescens* (Cervantes et al. 2010; Sousa et al. 2012; Voss et al. 2014). En contraste, los microsatélites han sido ampliamente utilizados para describir la diversidad genética de los marsupiales australianos, mientras que en los marsupiales americanos han sido escasamente empleados aunque existen microsatélites aislados para varios géneros, entre ellos *Tlacuatzin* (Samollow et al. 2004; Fike et al. 2009; Eldridge 2010; Arcangeli et al. 2013). De hecho, durante el diseño de los microsatélites para el tlacuachin se encontró que exhibía niveles de diversidad de bajos a moderados (Arcangeli et al. 2013). Sin embargo, el ensayo incluyó un número limitado de ejemplares, por lo que se podría estar subestimando la diversidad genética de *Tlacuatzin*. Por tal motivo, es necesario evaluar a detalle la variación genética de este género utilizando varios marcadores moleculares, con el fin de evaluar adecuadamente su diversidad y estructura genéticas actuales e históricas. Asimismo, el conocimiento de la diversidad genética presente en *T. canescens* es un componente clave para la implementación de acciones de conservación para esta especie en un ecosistema amenazado como la selva baja caducifolia.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue documentar la historia evolutiva de *T. canescens* y describir la diversidad genética de sus poblaciones con abse en el análisis de secuencias de DNA mitocondrial, microsatélites, así como y morfometría. Con este fin, el presente trabajo se dividió en tres capítulos:

CAPÍTULO I. “Molecular and morphological evidences of the diversification in the Grayish mouse opossum, *Tlacuatzin canescens* (Didelphimorphia), with description of a new species”. El objetivo de este capítulo fue investigar el origen y la diversificación de este taxón utilizando evidencia morfológica y molecular.

CAPÍTULO II. “Genética poblacional del ratón tlacuache (*Tlacuatzin canescens*) evaluada con DNA mitocondrial y microsatélites”. El objetivo del capítulo fue documentar la diversidad genética de las poblaciones de esta especie a lo largo de su distribución.

CAPÍTULO III: “DNA barcoding of Mexican marsupials (Mammalia: Didelphimorphia)”. El objetivo de este capítulo fue caracterizar a las especies de tlacuache que se distribuyen en México a través del uso del locus del código de barras.

CAPÍTULO I

**Molecular and morphological evidence of the diversification in the gray mouse opossum,
Tlacuatzin canescens (Didelphimorphia), with description of a new species**



Molecular and morphological evidence of the diversification in the gray mouse opossum, *Tlacuatzin canescens* (Didelphimorphia), with description of a new species

JÉSSICA ARCANGELI,* JESSICA E. LIGHT, AND FERNANDO A. CERVANTES

Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04360, Coyoacán, Ciudad de México, México (JA)

Colección Nacional del Mamíferos, Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 70-153, C.P. 04510, Ciudad de México, México (JA, FAC)

Department of Wildlife and Fisheries Sciences, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA (JEL)

* Correspondent: jeaa@st.ib.unam.mx

The gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) is a poorly studied marsupial endemic to México. Phylogenetic or phylogeographic information on this species and its evolutionary history is scarce and scattered. We investigated the origin and the diversification of this taxon using molecular and morphological data. We examined mitochondrial (cytochrome-*b*) and nuclear (interphotoreceptor retinoid-binding protein) sequences to test species monophyly and assess phylogenetic relationships within the species. We also used multivariate statistical analyses of 13 craniodental variables to assess the phenotypic distinctiveness of mitochondrial haplotypic clades. Phylogenetic analyses revealed that *T. canescens* is a monophyletic group divided into 5 well-differentiated clades. Genetic divergence among clades was 3.1–8.9%, while the intragroup divergence was 0.5–3.7%. Our molecular clock estimates indicate that the diversification of this taxon occurred during the Pleistocene, which suggests that climatic changes and the presence of geographical barriers influenced the genetic differentiation of its populations. Morphological analyses also showed that there are cranial differences among these clades. Our results suggest the recognition of *T. gaumeri*, *T. insularis*, and *T. sinaloae* as valid species, and the recognition of 1 clade that we describe here as a new species.

El ratón tlacuache (*Tlacuatzin canescens*) es un marsupial endémico de México que ha sido escasamente estudiado. No existen trabajos sistemáticos, filogenéticos o filogeográficos enfocados en esta especie por lo que su historia evolutiva se desconoce. Por lo tanto, el propósito de esta contribución fue investigar el origen y la diversificación de este mamífero utilizando evidencia molecular y morfológica. Se examinaron dos genes, uno mitocondrial (citocromo *b*) y uno nuclear (interfotorreceptor retinoide), para probar la monofilia de la especie y evaluar las relaciones filogenéticas dentro de la misma. Además, se examinaron 13 variables craneales y dentales con estadística multivariada para examinar diferencias entre haplogrupos. El análisis filogenético reveló que *T. canescens* es un grupo monofilético que está dividido en 5 clados bien diferenciados. La distancia genética entre clados fue de 3.1–8.9%, mientras que la divergencia al interior de éstos fue de 0.5–3.7%. Nuestras estimaciones indican que la diversificación de este marsupial ocurrió durante el Pleistoceno lo que sugiere que los cambios climáticos y la presencia de barreras geográficas dentro de su distribución pudieron haber influenciado la divergencia genética de sus poblaciones. Asimismo, el análisis morfológico del cráneo mostró que existen diferencias morfométricas en el cráneo entre estos linajes. Nuestros resultados sugieren el reconocimiento de *T. gaumeri*, *T. insularis* y *T. sinaloae* como especies válidas y el reconocimiento de un clado que describimos aquí como una nueva especie.

Key words: Didelphimorphia, endemic, marsupial, México, morphometrics, new species, phylogenetics

The gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) is a marsupial endemic to México that represents a distinctive mammalian component of tropical dry forests of western México and the Península de Yucatán (Voss and Jansa 2003). Gray mouse opossums are small, ca. 20 g, and are characterized by a gray or brownish gray dorsal fur, a black mask around the eyes, and the absence of the typical marsupial pouch (Zarza et al. 2003). This taxon occurs on Tres Mariás Islands off the Mexican Pacific coast and on the mainland along the Pacific lowlands from Sonora to Chiapas, and through the Balsas river basin to east México and the Península de Yucatán (Voss and Jansa 2009; González-Christen and Rodríguez 2014).

Allen (1893) described *T. canescens* as *Didelphis (Micoureus) canescens* based on 6 specimens from Santo Domingo de Guzmán, Oaxaca, and later transferred it to the genus *Marmosa* Gray, 1821 (Allen 1897). In 1898, J. A. Allen described *M. sinaloae* from mouse opossums collected in the northern portion of the species range (Tatemales, Sinaloa; see Allen 1898). Merriam (1897, 1898) also named *M. oaxacae* and *M. insularis* from specimens collected near Oaxaca City and on the Tres Mariás Islands, respectively. Later, Osgood (1913) collected specimens in the Península de Yucatán and described *M. gaumeri*. These authors emphasized differences in size and fur color among these taxa and *M. canescens*, and noted that skulls were very similar, showing only variation in proportions. In his systematic revision of the genus *Marmosa*, Tate (1933) was unable to identify the differences that Merriam (1897, 1898), Allen (1898), and Osgood (1913) reported. Therefore, he considered *M. insularis*, *M. oaxacae*, and *M. sinaloae* as subspecies of *M. canescens*, and synonymized *M. gaumeri* under *M. c. canescens* (Tate 1933).

This arrangement remained until Voss and Jansa (2003) assessed the phylogenetic relationships within the Order Didelphimorphia using molecular and morphological data, and found that *M. canescens* strongly diverged from the other species of the genus. As such, Voss and Jansa (2003) recognized a new genus (*Tlacuatzin*) for this species, although they did not document any subspecies within *T. canescens* and treated *insularis*, *oaxacae*, *sinaloae*, and *gaumeri* as synonyms (Voss and Jansa 2009). However, due to the geographical disjunct distribution of this marsupial in the dry forests that occur both in Yucatán and western México and the substantial morphological variation in size and color found by Wilson (1991) between mainland and Tres Mariás Islands specimens, Voss and Jansa (2003) pointed out that a critical systematic revision of the genus is needed. Subsequently, Gardner (2005) recognized 2 subspecies, *T. c. canescens* distributed in western and south-central México and *T. c. gaumeri* distributed in the Península de Yucatán. On the other hand, Ceballos (2014) recognized *T. c. oaxacae* and *T. c. sinaloae* as valid taxa and synonymized *gaumeri* under *T. c. canescens*. The current taxonomy of *T. canescens*, which is based on morphological traits, recognizes 3 subspecies (Fig. 1): *T. c. canescens* along the Pacific versant and through the Balsas river basin; *T. c. gaumeri* from the northern part of the Península de Yucatán; and *T. c. insularis* from Tres Mariás Islands (Ramírez-Pulido et al. 2014).

Phylogenetic relationships among *Tlacuatzin* and closely related genera, *Monodelphis* and *Marmosa*, are unclear, although there is some support that *Tlacuatzin* and *Marmosa* are sister taxa (Voss and Jansa 2009). Jansa et al. (2014) proposed that the genus *Tlacuatzin* diverged from a clade that

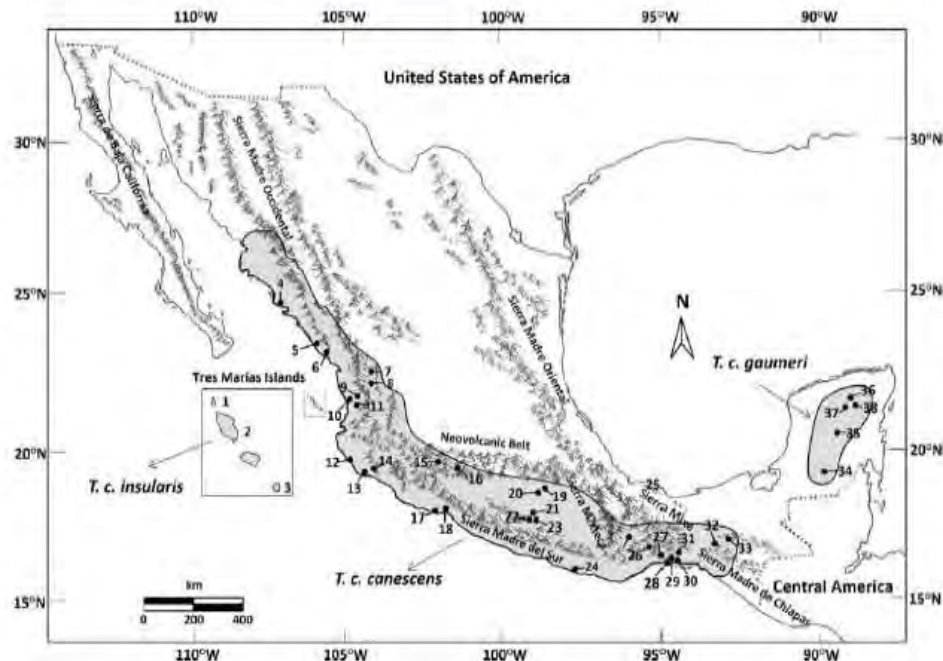


Fig. 1.—Geographical distribution of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) showing ranges of currently recognized subspecies (sensu Ramírez-Pulido et al. 2014), and collection localities sampled for molecular analyses. Numbers correspond to population samples listed in Table 1.

comprises *Marmosa* and *Monodelphis* ca. 17 million years ago (Ma; 13.0–21.5, 95% HPD) in South America; however, there is no fossil record to document either the presence of this taxon in South America or its migration through the Panama Isthmus. If *Tlacuatzin* did originate in South America, its ancestor might have reached North America by stepping-stone dispersal over the Miocene archipelago that emerged between the North and South American plates. Alternatively, *Tlacuatzin* may have reached North America much later in the Pliocene when the Panamanian land bridge was completely formed, as it has been suggested for other didelphid opossums (Marshall et al. 1982; Coates et al. 2004; Jansa et al. 2014). The past climatic fluctuations and the rugged topography of México might have shaped the current distribution of this species through cycles of expansion and range fragmentation (Fernández et al. 2012). Of particular interest are the populations of *Tlacuatzin* from the Tres Marias Islands and the Peninsula de Yucatán, which are isolated from the populations of western and central México by the presence of the Pacific Ocean and the Isthmus of Tehuantepec, respectively. These geographical barriers may have promoted the isolation and genetic differentiation of *Tlacuatzin* populations as they have in other species (Giarla and Jansa 2014). In addition, previous reports on herpetofauna from the Tres Marias Islands and the Península de Yucatán have suggested that these populations may have originated during the Pleistocene when the sea level was low and the semiarid environments were continuous in the isthmus, respectively (Duellman 1960; Casas-Andreu 1992). Past phylogeographic studies focused on Mexican taxa have stated that the distributional boundaries of genetic clades are concordant with existing geographical barriers such as mountain ranges or rivers (e.g., Zaldivar-Riverón et al. 2004; Devitt 2006; Cortés-Rodríguez et al. 2013; Light et al. 2016). Some authors also have proposed that the climatic changes during the Pleistocene are the cause of species-level diversification in mammals and birds (e.g., Sullivan et al. 1997; Barber and Klicka 2010). Therefore, these landscape features and climatic fluctuations may have affected *T. canescens*, generating similar evolutionary responses.

At present, there have been no systematic studies focused on *T. canescens*, the status of the currently recognized subspecies is controversial, and the phylogeographic evolutionary history of this species has not been studied. Therefore, a systematic and taxonomic assessment of the gray mouse opossum is necessary. We investigated the origin and diversification of this marsupial using molecular and morphological data. We also reassess the taxonomic status of the currently recognized subspecies as well as relationships between *Tlacuatzin* and other didelphid genera.

MATERIALS AND METHODS

Molecular analyses

Specimens examined.—Tissue samples from *T. canescens* were obtained from specimens trapped in the field under the collecting permit FAUT-0002 issued to one of us (FAC) and through loans from mammal collections (Table 1; Fig. 1). Collection

abbreviations are as follows: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango (CIDIIR); Colección de Mamíferos de la Universidad Autónoma de Campeche (CMUAC); Colección Nacional de Mamíferos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (CNMA); Colección Mastozoológica de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal de las Casas (ECO-SC-M); Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB); Universidad Autónoma de Morelos, Centro de Investigaciones Biológicas (UAEM); American Museum of Natural History (AMNH); Field Museum of Natural History (FMNH); Kansas University Natural History Museum (KU); National Museum of Natural History (USNH); Biodiversity Research and Teaching Collections at Texas A&M University (TCWC). The collection and processing of samples were undertaken following the guidelines of the American Society of Mammalogists for use of wild animals in research (Sikes et al. 2016). DNA sequences from 51 specimens were included in the analyses (Table 1). Samples included 9 frozen tissues from recently captured specimens, 5 alcohol-preserved tissues from museum specimens, 3 alcohol-preserved ear biopsies without voucher specimens, and 33 skin snips from museum specimens. In addition, we obtained 1 *Tlacuatzin* sample from GenBank.

Laboratory procedures.—Laboratory procedures implemented for skin snips were performed in a separated area used for ancient DNA. To obtain skin snips, museum specimens were handled with disposable gloves, wearing a lab coat and facemask. All tools used (scissors and forceps) were cleaned in 10% hypochlorite before the procedure and between samples. In addition, prior to laboratory procedures, all materials to be used with these samples were sterilized using UV radiation to avoid possible contamination.

DNA was extracted from frozen tissues and alcohol-preserved tissues following the instructions of the AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, Union City, California). We used the same protocol with some modifications to extract DNA from skin snips: 1) prior to DNA extractions samples were cleaned with STE (NaCl₂ 0.1 M, Tris 0.05 pH 7.5, EDTA 0.001 M) to hydrate and eliminate impurities (Hillis et al. 1996); 2) we incubated skin snips with STE at 56°C for 20 min up to 5 times; and 3) after the incubation step, we sliced the samples in small pieces for better digestion, which was performed overnight. All subsequent steps were implemented according to the manufacturer's instructions, except the final elution that was made in 150 µl of water at 65°C for skin snips. DNA quality of all samples was evaluated through electrophoresis in 1% agarose gels and its concentration was measured with a spectrophotometer.

Two genes, 1 mitochondrial (cytochrome-*b*; *Cytb*) and 1 nuclear (interphotoreceptor retinoid-binding protein; *IRBP*), were amplified through the polymerase chain reaction (PCR). PCRs were performed in a thermocycler (Maxygene Gradient Thermal Cycler; Axgen Biosciences, Union City, California) according to the following conditions: total volume of 25 µl with 1.0 unit of *Taq* polymerase (Qiagen, México City,

Table 1.—Collection localities across México for samples of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) examined in the phylogenetic analyses. Locality numbers are shown in Fig. 1 and type of tissue (skin snip from a museum specimen, frozen or alcohol-preserved tissue such as muscle, liver, or ear) is indicated. One sequence from GenBank (locality 17) was also included in these analyses. See “Materials and Methods” for collection acronyms. Field collection number of Fernando A. Cervantes (FAC).

Locality number	Locality (number of specimens examined)	Tissue	Mammalian collection and catalog number	GenBank accession numbers	
				<i>Cytb</i>	<i>IRBP</i>
<i>Tlacuatzin canescens insularis</i>					
1	San Juanito, Tres Marias Islands (1)	Skin	NMNH 512188	MG029706	MG029757
2	Marta Madre, Tres Marias Islands (4)	Skin	CNMA 27512, NMNH 89216–89218	MG029702–MG029705	MG029753–MG029756
3	Marias Cloofás, Tres Marias Islands (3)	Skin	NMNH 512185–512187	MG029707–MG029709	MG029758–MG029760
<i>Tlacuatzin canescens canescens</i>					
4	Culiacán, Sinaloa (1)	Skin	CNMA 5720	MG029660	MG029711
5	Panuco, Sinaloa (1)	Skin	CNMA 26123	MG029661	MG029712
6	Los Otates, Sinaloa (1)	Skin	TCWC 41947	MG029662	MG029713
7	Platanitos, Durango (1)	Muscle	CIDIIR 6430	MG029663	MG029714
8	San Blasito, Nayarit (1)	Muscle	CIDIIR 7507	MG029664	MG029715
9	Navarrete, Nayarit (1)	Muscle	CNMA 46170	MG029665	MG029716
10	San Blas, Nayarit (1)	Skin	CNMA 13635	MG029666	MG029717
11	Tepic, Nayarit (1)	Skin	CNMA 35151	MG029667	MG029718
12	Chamela, Jalisco (4)	Liver	CNMA 42992, 43132–43134	MG029668–MG029671	MG029719–MG029722
13	Playa de Oro, Colima (1)	Muscle	CNMA 47758	MG029672	MG029723
14	Pueblo Juárez, Colima (4)	Muscle, skin	CNMA 46538–46340; ENCB 4497	MG029673–MG029676	MG029724–MG029727
15	Panindicuaro, Michoacán (1)	Skin	ENCB 26195	MG029677	MG029728
16	Pátzcuaro, Michoacán (1)	Skin	ENCB 25316	MG029678	MG029729
17	Playa Azul, Michoacán (1)	GenBank		HM106340	AY233767
18	Petacalco, Guerrero (1)	Skin	ENCB 35793	MG029679	MG029730
19	Tehuixtla, Morelos (1)	Skin	CNMA 27514	MG029680	MG029731
20	Xochicalco, Morelos (1)	Ear	UAEM (s/n)	MG029681	MG029732
21	Tuxpan, Guerrero (2)	Ear	FAC 5220–5221	MG029682–MG029683	MG029733–MG029734
22	Nejapa, Guerrero (1)	Skin	TCWC 5643	MG029684	MG029735
23	Acahuzotla, Guerrero (1)	Skin	TCWC 5832, 6461	MG029685–MG029686	MG029736–MG029737
24	Zacatepec, Oaxaca (1)	Skin	CNMA 39092	MG029687	MG029738
25	Oaxaca, Oaxaca (1)	Skin	AMNH 213753	MG029688	MG029739
26	Tequisistlán, Oaxaca (1)	Skin	AMNH 149104	MG029689	MG029740
27	Tehuantepec, Oaxaca (1)	Skin	AMNH 213751	MG029690	MG029741
28	Mazahuito, Oaxaca (1)	Skin	AMNH 185770	MG029691	MG029742
29	Paso Tilemo, Oaxaca (1)	Skin	AMNH 148969	MG029692	MG029743
30	Huamuchil, Oaxaca (1)	Muscle	ECO-SC-M 1876	MG029693	MG029744
31	Zanatepec, Oaxaca (1)	Skin	AMNH 208224	MG029694	MG029745
32	Cintalapa, Chiapas (1)	Skin	AMNH 147571	MG029695	MG029746
33	Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (1)	Skin	CNMA 7557	MG029696	MG029747
<i>Tlacuatzin canescens guameri</i>					
34	Calakmul, Campeche (1)	Muscle	CMUAC 754	MG029697	MG029748
35	Tzucabab, Yucatán (1)	Muscle	ECO-SC-M 2240	MG029698	MG029749
36	Yaxcaba, Yucatán (1)	Skin	FMNH 19995	MG029799	MG029750
37	Piste, Yucatán (1)	Skin	KU 91461	MG029700	MG029751
38	Chichen Itza, Yucatán (1)	Skin	FMNH 63890	MG029701	MG029752

México), 1× PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP (Promega, Pittsburgh, Pennsylvania), 0.4 mM each primer, and 50 ng of DNA. For DNA obtained from frozen and alcohol-preserved tissues extractions, amplification of the *Cytb* gene was performed using universal primers (MVZ05 and MVZ14) from Smith and Patton (1993), and the *IRBP* gene was amplified using the primers and 119A and 1312D1 reported by Jansa and Voss (2000; Table 2). For degraded skin snips, both genes were amplified using multiple primer pairs resulting in a series of overlapping 100–400 base pair (bp) fragments. The *Cytb* gene was amplified using the primer combinations MVZ05/MVZ06, MVZ05/MVZ04, MVZ03/MVZ10, MVZ45/

MVZ26, MVZ23/MVZ16, MVZ45/MVZ16, MVZ17/MVZ14, and MVZ05/MVZ14 following Esteva et al. (2010; Table 2). Amplification of the *IRBP* gene was performed using the primer pairs 119A/350G, 266H/584I, 477J/878F, 461E/1090K, and 1004L/1312D1 following Jansa and Voss (2000; Table 2). For quality amplifications in degraded skin snips, the thermocycler program included 10 additional cycles. The optimal PCR conditions for *Cytb* gene were as follows: initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 30–40 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 45 s and 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min (modified from Arcangeli and Cervantes 2009). The thermocycler program for the *IRBP* gene was as follows: initial

Table 2.—Primers used to amplify the cytochrome-*b* (*Cytb*) and interphotoreceptor retinoid-binding protein (*IRBP*) genes in samples of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*). All *Cytb* primers are from Smith and Patton (1993), and all *IRBP* primers are from Jansa and Voss (2000).

Primer	Sequence (5'→3')
<i>Cytb</i>	
MVZ03	GCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATG
MVZ04	GCAGCCCTCAGAATGATATTGTCCTC
MVZ05	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG
MVZ06	GCTGTGTCTGATGTAGTGTAT
MVZ10	TATGAGCCGTAGTARAKKCTC
MVZ14	GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC
MVZ16	AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT
MVZ17	ACCTCTAGGAGAYCCAGAHAAYT
MVZ23	TACTCTTCTCCACGAAACJGGNTC
MVZ26	AGATCTTTGATTGTGTAGTAGGGGT
MVZ45	ACJACHATAGCJACAGCAITTCGTAGG
<i>IRBP</i>	
119A	ATGGCCAAGGTCCTCTTGGATACTACTGCTT
1312D1	CATCATCAAACCGCAGATAGCCCA
461E	AACAGATGGCAGGGCCATCGT
878F	CTCCACTGCCCTCCCATGTCT
350G	CCTGGTACTTGATCATTTGCT
266H	AATGACCCACCGCTAGTGATCTC
584I	ATGGCCGGTCATAAACTGTGTCTA
477J	AACATCTGGAAGAAGCTCATG
1090K	CTTGGCGGCCAAATCTTCTC
1004L	GCCATTCACGTCTCATGGAAGT

denaturation at 94°C for 1 min, followed by 30–40 cycles of 94°C for 25 s, 56°C for 20 s, and a final extension of 70°C for 1 min (modified from Jansa and Voss 2000).

PCR products were visualized with SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, California) through electrophoresis in 1.5% agarose gels and purified using the AxyPrep PCR Clean-up Kit (Axygen Biosciences, Union City, California) following manufacturer's instructions. DNA was sequenced in both directions using the IB automated sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, México City, México) with primer pairs used for PCRs. Sequences were edited and aligned manually using BioEdit v7.0.9 software (Hall 1999). GenBank accession numbers for *Cytb* and *IRBP* are MG029660–MG029709 and MG029711–MG029760, respectively.

Phylogenetic analyses.—Phylogenetic analyses were used to test species monophyly, assess phylogenetic relationships within *T. canescens*, and assess relationships among didelphid genera. In addition, phylogenetic constraint analyses were performed to test the monophyly of the currently recognized subspecies of *T. canescens*. Phylogenetic analyses included maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) as implemented in PAUP* 4.0d10 (Swofford 2003) and MrBayes v3.2.2 (Ronquist et al. 2012), respectively. The phylogenetic constraint analyses were performed using the stepping-stone sampling method of Xie et al. (2011) and competing topologies were evaluated using Bayes factors in MrBayes. Additional taxa in the analyses included 10 *Marmosa* and *Monodelphis* specimens, 20 other didelphid marsupials, and 3 non-didelphid

marsupials representing the orders Paucituberculata (*Caenolestes fuliginosus* and *Rhyncholestes raphanurus*) and Microbiotheria (*Dromiciops gliroides*), as well as 1 placental mammal representing the order Carnivora (*Canis lupus*) as outgroup taxa. DNA sequences from these specimens were obtained from GenBank, with the sole exception of *Marmosa mexicana*, whose data were collected as part of this study following the methods above (Appendix I).

Prior to ML and BI analyses, the most appropriate model of DNA substitution and the best-partitioning scheme for each gene as determined by Bayesian Information Criterion (BIC) were determined using PartitionFinder 1.1.1 (Lanfear et al. 2012). The combined data set was partitioned by gene and codon position and analyzed using the best-fit model for each partition in both ML and BI analyses. In addition, each gene was analyzed separately to evaluate potential conflict among gene trees and identify the phylogenetic signal of each component.

ML analysis was performed with starting trees obtained through 100 random stepwise additions followed by tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping. Node support was tested by bootstrap analysis with 100 pseudoreplicates (Felsenstein 1981). BI was implemented using random starting trees and four Markov chains. Two independent analyses of 10 million generations were conducted simultaneously sampling every 250 generations. Burn-in was determined by plotting log-likelihood values against number of generations. The first 1,000 trees of each run were discarded as burn-in and trees collected after that were used to construct majority-rule consensus tree and estimate nodal support as posterior probabilities. BI consensus trees were visualized with FigTree 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Distance analysis.—To allow direct comparison with previous studies involving didelphid opossums (Patton et al. 1996; Giarla et al. 2010; Voss et al. 2013; Pavan et al. 2014; Voss et al. 2014), genetic divergence among *Cytb* sequences was estimated using MEGA 7.0.14 (Kumar et al. 2015). We computed uncorrected *p*-distance values for comparisons among *Tlacuatzin* clades and Kimura 2-parameter (K2P) distances (Kimura 1980) for comparisons among didelphid genera.

Divergence dating analysis.—Divergence times were estimated using BEAST 1.8.3 (Drummond et al. 2012) to place our results in a biogeographic context. We used a relaxed clock with an uncorrelated lognormal distribution allowing rate variation among sites. The analyses included 1 *Cytb* sequence for each outgroup (other marsupial and placental taxa; Appendix I) and all *Cytb* sequences of *T. canescens*. We used a Yule tree prior and assumed an exponential distribution with mean = 10 and *SD* = 0.33. Chains were run for 10 million generations, sampling every 1,000 generations. The consensus tree was generated using Tree Annotator v1.8.3 (Rambaut and Drummond 2009) after elimination of 10% of the trees as burn-in, as implemented in Tracer v1.6 (Rambaut et al. 2014), and visualized with FigTree 1.4.3. We used 2 divergence dates from the sparse didelphid fossil record as reference for calibration, and assumed a lognormal distribution with the following means and *SD* of 1.0 for each: the split between *Marmosa* and *Monodelphis* at

12.1 Ma and the split between *Didelphis* and *Philander* at 3.3 Ma. Likewise, based on the fossil record we set a normal prior on the age of the basal divergence within Metatheria and the split of Theria (Metatheria and Eutheria) with minimum and maximum bounds of 54.6 and 83.5 Ma and 125 and 200 Ma, respectively (Jansa et al. 2014).

Morphological analyses

Specimens examined.—Cranial measurements were obtained from voucher specimens of *T. canescens* housed in mammalian collections (Appendix II), with the aim of assessing the phenotypic distinctiveness of the 5 mitochondrial clades. Forty-seven out of the 51 specimens examined in the phylogenetic analyses were included in the morphological analyses. Four samples used in the genetic analyses do not have voucher specimens, including 3 alcohol-preserved tissues, and 1 sequence downloaded from GenBank.

Age.—Specimens were aged using the dental criteria suggested by Giarla et al. (2010): juvenile if the deciduous premolar three (dP3) was still in place; subadult if dP3 had been shed but premolar three (P3) was still incompletely erupted; and adult if the permanent dentition was complete.

Variables.—Most variables reported in this study have been used in studies with other taxa of mammals such as bats (Gutiérrez and Molinari 2008), rodents (Espinoza et al. 2011), shrews (Ramírez-Pulido et al. 2004), and opossums (Rossi et al. 2010). External variables were recorded from specimen labels or field notes and include total length (TL), length of tail (LT), length of the hind foot (HF), and length of ear (E). Thirteen craniodental variables (as defined by Giarla et al. 2010) were taken with a digital caliper (Mitutoyo) and recorded to the nearest 0.01 mm. Variables included: condyle basal length (CBL), nasal breadth (NB), nasal length (NL), least interorbital breadth (LIB), zygomatic breadth (ZB), palatal length (PL), palatal breadth (PB), maxillary toothrow length (MTR), length of molar (LM), length of M1–M3 (M1–M3), width of M3 (WM3), bullar width (BW), and interbullar width (IBW).

Statistical analyses.—Ontogenetic variation and sexual dimorphism within phylogenetic clades and currently recognized subspecies were evaluated through a multivariate analysis of variance (MANOVA) followed by a Duncan test to identify significant values. Univariate statistics included computations of mean, *SD*, and range for each variable. All characters were log-transformed to decrease the effect of individual size variation. Principal component analyses (PCAs) were performed to assess morphological variation and identify high-variance components within the multivariate space. Discriminant function analyses (DFAs) were performed to observe data distribution within the multivariate space and test a priori identifications (molecular clades and currently recognized subspecies). Multivariate analyses were also implemented to characterize the genus *Tlacuatzin* and compare it with the genera *Marmosa* and *Monodelphis* (Appendix II). All statistical analyses were performed using XLSTAT (Addinsoft, Mexico City, México) at a significance level of $\alpha < 0.05$.

RESULTS

Molecular analyses

Sequences.—Laboratory procedures were successful for the 50 specimens of *T. canescens* examined (Table 1). The genes *Cytb* and *IRBP* were amplified in a single PCR in 14 samples, while in 36 samples both genes were amplified in a series of overlapping fragments. The final length of the sequences was 1,146 bp for *Cytb* and 1,162 bp for *IRBP* in the 50 samples, including the type specimen of *T. c. gaumeri* (sequenced in 2013). No partial sequences were obtained.

Models of evolution and partitions.—The best models of evolution for *Cytb* and *IRBP* were GTR+G (Tavaré 1986) and K80+I+G (Kimura 1980), respectively. The best data-partitioning scheme for *Cytb* contained 3 partitions, which correspond to each codon position, with best-fitting nucleotide substitution models of SYM+G (Zharkikh 1994), HKY+G (Hasegawa et al. 1985), and TrN+G (Tamura and Nei 1993) for codon positions 1, 2, and 3, respectively. The best-partitioning scheme for *IRBP* contained 2 partitions, the first partition included positions 1 and 2 and the second partition included position 3, with best-fitting nucleotide evolution models of HKY+I and H80+G, respectively.

Phylogenetic and distance analyses.—Phylogenetic analyses were conducted with *Cytb* and *IRBP* genes concatenated and partitioned (2,308 bp); 387 of these sites were variable and informative. In addition, we conducted these analyses for each gene individually. We included 85 terminals in the analyses, 51 correspond to *T. canescens* and 34 to other marsupial and placental outgroup taxa (Appendix I). Specimens of *T. canescens* from the same locality were genetically identical.

Bayesian and ML analyses showed identical topologies, although there were differences in support values (Fig. 2). We recovered a strongly supported *Tlacuatzin* comprised of 5 strongly supported clades corresponding to discrete geographic areas: 1) Tres Mariás Islands; 2) Northern Pacific coastal plain and the inland valley from Durango; 3) Balsas river basin; 4) Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca City and western Chiapas; and 5) Península de Yucatán (Figs. 2 and 3). Our results support a sister relationship between the Tres Mariás Islands and the Northern Pacific coastal plain clades, and between the Balsas river basin clade and the Península de Yucatan and Isthmus of Tehuantepec clades, although support values for these groups are low. ML and BI analyses of the *Cytb* sequences showed the same tree as Fig. 2 (Supplementary Data SD1). Likewise, the separate analyses of *IRBP* showed little resolution and did not recover the clades seen in the analyses of *Cytb* (Supplementary Data SD2).

These analyses included specimens of the 3 recognized subspecies, *T. c. canescens* ($n = 41$), *T. c. gaumeri* ($n = 2$), and *T. c. insularis* ($n = 8$). We found that *T. c. gaumeri* and *T. insularis* are monophyletic while *T. c. canescens* is paraphyletic because it includes descendants of 3 different lineages. Topological constraint analyses supported the monophyly of *T. c. gaumeri* and *T. c. insularis*; monophyly of *T. c. canescens* was rejected with

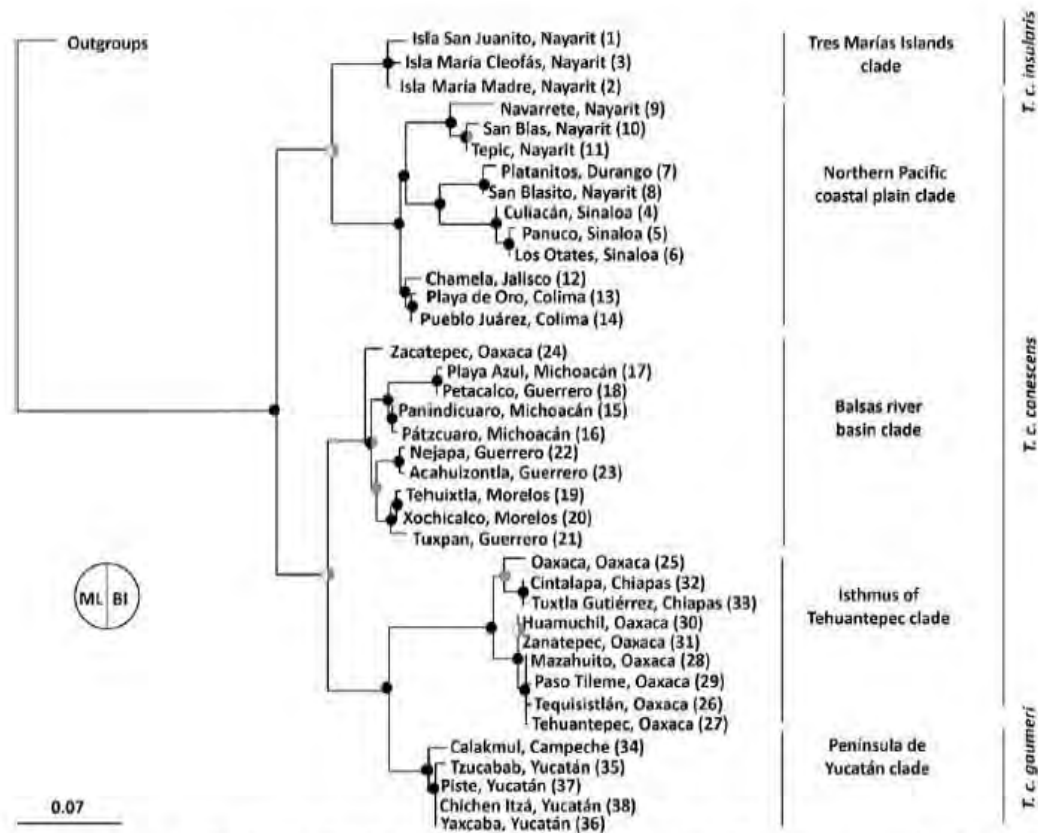


Fig. 2.—Bayesian phylogram of the phylogenetic relationships within the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) based on a concatenated and partitioned analyses of 2 genes (cytochrome-*b* [*Cytb*] and interphotoreceptor retinoid-binding protein [*IRBP*]). Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) support values are indicated by filled circles at nodes, with ML on left and BI on the right. For ML, white indicates nodal support $\leq 50\%$, gray indicates nodal support between 50% and 75%, and black indicates nodal support $\geq 75\%$. For BI, gray indicates nodal support < 0.95 and black indicates nodal support ≥ 95 .

log differences between marginal likelihood models > 7 (a log difference above 5 is a very strong support in favor of a better model—Kass and Raftery 1995; Light et al. 2016).

Uncorrected *p*-distance values for *Cytb* within *T. canescens* varied from 0% to 8.9%, intra-clade divergences ranged from 0.5% to 3.6%, and inter-clade divergences ranged from 4.4% (between the Isthmus of Tehuantepec and Península de Yucatán clades) to 8.4% (between the Tres Marias Islands and Isthmus of Tehuantepec clades; Table 3). Our analyses also strongly supported that *Tlacuatzin* is sister to the clade that includes *Marmosa* and *Monodelphis* (Supplementary Data SD3). K2P distances between *Tlacuatzin* and *Marmosa* varied from 18.7% to 20.9%, and 16.2% to 20.5% between *Tlacuatzin* and *Monodelphis*.

Divergence dating analysis.—Diversification of *T. canescens* into 5 clades was estimated to have begun 2.35 Ma in the early Pleistocene with the split of 2 major clades (Fig. 4). The first major clade includes Tres Marias Islands and Northern Pacific coastal plain clades (diverging 1.22 Ma), and the second major clade comprises the clades from Balsas river basin, Isthmus of Tehuantepec, and Península de Yucatán (diverging 1.86 Ma).

Likewise, we estimated the end of the diversification of this marsupial at 0.19 Ma with the differentiation of the Península de Yucatán clade (Fig. 4).

Morphological analyses

Age.—Age classes for 115 specimens from *T. canescens* were determined following dental criteria. We classified 94 specimens as adults, 5 specimens as subadults, and 12 specimens as juveniles; 4 specimens were not classified because the skulls were broken (these specimens were excluded from the analyses). All specimens were measured and grouped according to their phylogenetic clade and currently recognized subspecies.

Ontogenetic variation and sexual dimorphism.—The MANOVA for ontogenetic variation showed significant differences among age classes for a few variables in some clades (MANOVA analyses were not conducted on the Tres Marias Islands clade because all specimens examined were adults; Supplementary Data SD4). No significant differences among age classes were found in the Península de Yucatán clade. Morphometric differences between age classes were found in 1 (PL), 3 (NL, PL, IBM), and 1 (LIB) variable(s) for Balsas,

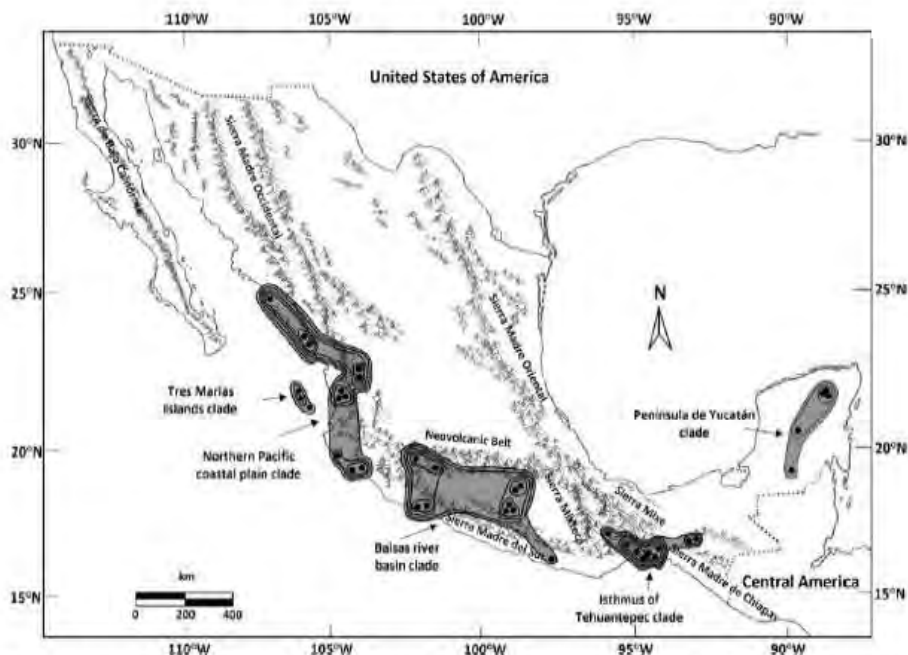


Fig. 3.—Major mountain ranges of México and area cladogram for the 5 major clades recovered in the phylogenetic analyses of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*). Monophyletic groups are successively circled to indicate geographic patterns of genetic structure.

Table 3.—Cytochrome-*b* (*Cytb*) genetic distances within and among 5 clades of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*). Intra-clade uncorrected *p*-distances are along the diagonal and inter-clade uncorrected *p*-distances are below the diagonal. Records represent the observed range and the mean (in parentheses) within and among clades.

Clade	Isthmus of Tehuantepec	Península de Yucatán	Tres Marias Islands	Pacific coastal plain	Balsas river basin
Isthmus of Tehuantepec	0.2–1.9 (1.0)				
Península de Yucatán	4.1–4.8 (4.4)	0.1–1.0 (0.5)			
Tres Marias Islands	8.0–8.9 (8.4)	7.0–7.7 (7.2)	0.1–1.0 (0.5)		
Pacific coastal plain	7.2–8.9 (7.9)	5.8–7.6 (6.5)	3.1–5.6 (4.6)	0.0–6.0 (3.6)	
Balsas river basin	6.1–7.6 (6.6)	4.8–6.0 (5.4)	4.5–6.9 (5.4)	4.0–6.5 (5.1)	0.0–3.7 (1.9)

Northern Pacific coastal plain, and the Isthmus of Tehuantepec clades, respectively. The MANOVA showed significant differences among age classes in 9 (CBL, NB, NL, LIB, ZB, PL, MTR, LM, IBM) variables for *T. c. canescens*, whereas no significant differences among age classes were found in *T. c. gaumeri*. MANOVA analyses were not conducted on *T. c. insularis* because all specimens examined were adults (Supplementary Data SD4). For each variable, there was a trend of increasing size with age (data available upon request). Duncan tests supported differentiation among the 3 age categories. Given these results, only adults ($n = 94$) were analyzed in subsequent analyses.

The MANOVA for sexual dimorphism was generally not significant (Supplementary Data SD5). Analyses were not conducted on specimens from the Península de Yucatán because all examined specimens were males. We did not find differences between males and females from Balsas river basin or the Isthmus of Tehuantepec clades. Morphometric differences between males and females were found in 3 (NL, LIB, MTR) and 7 (CBL, NB, NL, LIB, ZB, PL, MTR) variables for

Northern Pacific coastal plain and Tres Marias Islands clades, respectively. Likewise, the MANOVA showed significant differences between males and females in 7 (CBL, NL, LIB, ZB, PL, MTR, LM) and 7 (CBL, NB, NL, LIB, ZB, PL, MTR) variables for *T. c. canescens* and *T. c. insularis*, respectively (Supplementary Data SD5). MANOVA analyses were not conducted on specimens of *T. c. gaumeri* because all examined specimens were males. In all measured variables, males tended to be larger than females (data available upon request). Given these results, adult males and females were analyzed as a single data set in subsequent analyses.

Univariate statistics.—Univariate statistics including sample size, mean, *SD*, and range were calculated for each variable with adult specimens given the results of the MANOVA for ontogenetic variation (Supplementary Data SD6).

Multivariate analyses among phylogenetic clades.—These analyses were conducted with 91 specimens, which represented the 5 phylogenetic clades: Tres Marias Islands clade ($n = 8$), Northern Pacific coastal plain clade ($n = 38$), Balsas river basin clade ($n = 21$), Isthmus of Tehuantepec clade ($n = 22$), and

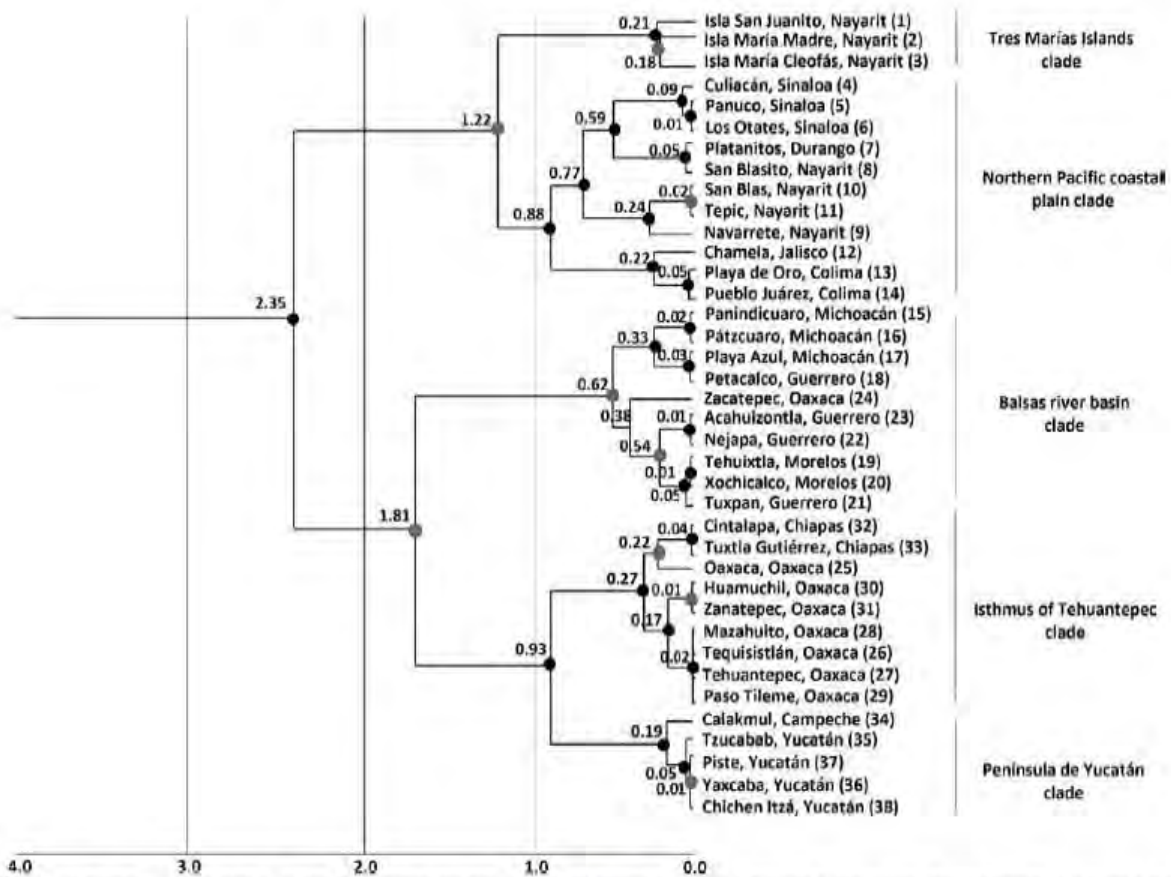


Fig. 4.—Chronogram tree with the divergence times estimated for gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) diversification. *Tlacuatzin* terminal taxa correspond to geographic locality and locality number (Table 1). Numbers indicate millions of years. Conventions for indicating Bayesian inference nodal support are described in the caption to Fig. 2.

Península de Yucatán clade ($n = 2$). A PCA revealed that the principal components 1 and 2 explained 71.9% of the variation of the data (PC1 = 57.6% and PC2 = 14.3%; Table 4). PC1 was interpreted as a size component, whereas PC2 was interpreted as a form component. PC1 was correlated with all variables, while PC2 was correlated with molar length (ML, M1–M3, and WM3). Sample dispersion along the 2 axes did not reveal morphological differences among *Tlacuatzin* clades but showed an increase in variable dimensions along the 2 axes (Fig. 5a). The PCA also revealed that the specimens from the Northern Pacific coastal plain clade are the smallest individuals, whereas the specimens from the other 4 clades tended to be larger.

The first discriminant function (DF) of the DFA accounted for over 57.8% of the explained variance (Table 5), which was greatly influenced by ZB, IBW, and LM, while the second function was heavily weighted by CBL and represented 23% of the variation of the data. A plot of the 2 canonical axes revealed that all examined specimens formed 1 group. We distinguished 4 overlapped subgroups that are consistent with the clades from the Northern Pacific coastal plain, the Balsas river basin, the Isthmus of Tehuantepec, and the Tres Marias Islands (Fig. 5b). The specimens from the Península de

Yucatán were nested within the range of morphological variation observed in the Northern Pacific coastal plain clade. The classification function allocated 93.0% of specimens into their a priori group.

Multivariate analyses among recognized *Tlacuatzin* subspecies.—The 91 specimens examined for these analyses represented all 3 subspecies, *T. c. canescens* ($n = 81$), *T. c. gaumeri* ($n = 2$), and *T. c. insularis* ($n = 8$). The first 2 components (PC1 = 60.3% and PC2 = 11.2%; Table 4) explained 71.5% of the variation of the data (Fig. 6a). PC1 was interpreted as a size component and correlated with all variables, whereas PC2 was interpreted as a form component and correlated with the molar form (ML, M1–M3, and WM3; Table 4). Sample dispersion along the 2 axes did not reveal morphological differences among *Tlacuatzin* subspecies but showed an increase in variable dimensions along the 2 axes (Fig. 6a).

The plot of the 2 canonical axes revealed that the examined specimens formed 2 groups (Fig. 6b). The first group includes the specimens of *T. c. canescens* and *T. c. insularis*, while the second group contains the 2 specimens of *T. c. gaumeri* (Fig. 6b). The first function represented 67.1% of the variance and was greatly influenced by MTR, whereas the second

Table 4.—Loading of the first 2 principal component (PC) axes based on 13 log-transformed craniodental variables from 5 clades of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*), from the 3 currently recognized subspecies of *T. canescens*, and from the didelphid genera *Tlacuatzin*, *Marmosa*, and *Monodelphis*. Abbreviations of variables are described in "Materials and Methods."

Variable	Clades		Subspecies		Genera	
	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2
CBL	0.897	-0.229	0.954	-0.179	-0.960	-0.176
NB	0.738	-0.380	-0.093	0.015	-0.086	-0.200
NL	0.866	-0.177	0.854	-0.242	-0.913	-0.039
LIB	0.859	-0.211	0.866	-0.209	-0.757	-0.460
ZB	0.910	-0.173	0.954	-0.111	-0.919	-0.177
PL	0.895	-0.165	0.942	-0.188	-0.947	-0.210
PB	0.888	-0.077	0.915	-0.014	-0.959	-0.041
MTR	0.868	-0.155	0.929	-0.002	-0.970	-0.061
LM	0.547	-0.774	0.673	0.553	-0.838	-0.432
M1-M3	0.487	-0.788	0.586	0.609	-0.765	-0.539
WM3	0.539	-0.492	0.561	0.365	-0.683	-0.619
BW	0.237	-0.087	0.305	-0.045	-0.562	-0.084
IBM	0.771	-0.168	0.861	-0.072	-0.671	-0.616
Explained variance (%)	57.5	14.3	60.3	11.2	65.1	12.4
Cumulative variance (%)	57.5	71.8	60.3	71.5	65.1	77.5

function represent 32.9% of the variance and was weighted by PL (Table 5). The classification function allocated 94.6% of specimens into their a priori group.

Intergeneric analyses.—We determined the age class of 34 specimens of *Marmosa* and 24 specimens of *Monodelphis*. We classified 29 specimens of *Marmosa* as adults, 4 specimens as subadults, and 1 specimen as juvenile; 20 specimens of *Monodelphis* were classified as adults and 4 specimens as juveniles. The MANOVA for ontogenetic variation revealed significant differences among age classes for both *Marmosa* and *Monodelphis*, while the MANOVA for sexual dimorphism did not show significant differences between males and females in either *Marmosa* or *Monodelphis* (Supplementary Data SD7). Given these results, only adult specimens were analyzed in subsequent analyses. Multivariate analyses among genera included 91 specimens of *Tlacuatzin*, 29 of *Marmosa*, and 20 of *Monodelphis* (Appendix II).

PC1 and PC2 explained 77.5% of the variation of the data (PC1 = 65.1% and PC2 = 12.4%; Fig. 7a). PC1 was correlated with all variables, while PC2 was correlated with molar length (ML, M1-M3, and WM3; Table 4). PC1 was interpreted as a size component and PC2 as a form component. Sample dispersion along the 2 axes indicated morphological differences among the 3 genera. We observed a remarkable separation between *Monodelphis* and the 2 mouse opossums, *Tlacuatzin* and *Marmosa*, with some overlap between the latter 2 taxa (Fig. 7a). These results showed that *Monodelphis* is the largest taxon while *Marmosa* and *Tlacuatzin* are smaller and similar in size and form to each other.

A plot of the 2 canonical axes revealed that all examined specimens formed 3 well-defined groups (Fig. 7b). The first function represented 55.8% of the variance and was heavily weighted by ZB, M1-M3, and WM3, whereas the second function was greatly influenced by LIB and CBL and accounted for over 44.2% of the variance (Table 5; Fig. 7b). The classification function allocated 98.2% of the specimens into their a priori genus.

DISCUSSION

Phylogenetic and morphological analyses.—Our phylogenetic analyses revealed a genetic subdivision that is not concordant with currently recognized subspecies: *T. c. canescens* from along the Pacific versant and through the Balsas river basin, *T. c. gaumeri* from the northern part of the Península de Yucatán, and *T. c. insularis* from the Tres Marias Islands (Ramírez-Pulido et al. 2014). Instead, ML and BI analyses recovered a strongly supported monophyletic group divided into 5 genetically well-differentiated clades over the distributional range of *Tlacuatzin*. The first clade contains all the haplotypes from Tres Marias Islands. The second clade contains haplotypes from the Northern Pacific coastal plain and 1 haplotype from the inland valley from Durango. The third clade includes the haplotypes from the Balsas river basin. The fourth clade clusters the haplotypes from the Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca City, and western Chiapas. The fifth clade contains the haplotypes from the Península de Yucatán. This phylogenetic arrangement is not similar to any previous taxonomic classification but it is close to those suggested by Tate (1933) and Ceballos (2014), where *sinloae*, *oaxacae*, and *insularis* are regarded as subspecies of *T. canescens* and *gaumeri* is synonymized under *T. c. canescens*.

This phylogenetic pattern is consistent with the vicariant allopatric divergence-speciation model since the distributional boundaries of clades are concordant with existing geographical barriers (Fig. 3; Devitt 2006). The clade from Tres Marias Islands is restricted to a continental archipelago located in the Pacific Ocean off the coast of Nayarit (Casas-Andreu 1992). The clade from the Northern Pacific coastal plain is limited to the east by the Sierra Madre Occidental and to the south by the Transvolcanic Belt and the Sierra Madre del Sur (Espinosa et al. 2008; Ortega et al. 2009). The clade from the Balsas river basin is flanked by the 2 mountain ranges cited above (Zaldívar-Riverón et al. 2004; Sotuyo 2007). The clade from the Isthmus

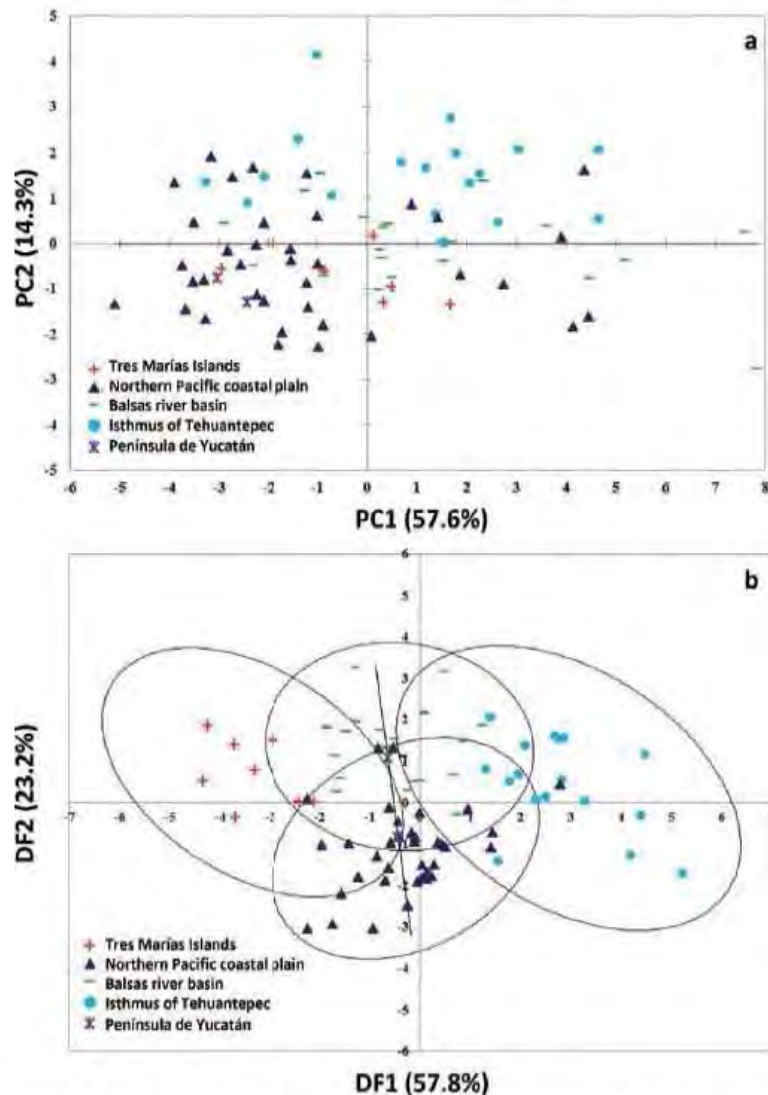


Fig. 5.—Multivariate analyses of 13 craniodental variables from 5 mitochondrial clades of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*): a) Plot showing sample dispersion along the first 2 axes from a principal component analysis. b) Plot of the first 2 canonical axes from a discriminant function analysis.

of Tehuantepec is bordered by the Sierra Mixe to the west and the Sierra Madre de Chiapas to the east (Cortés-Rodríguez et al. 2013). The clade from the Península de Yucatán is restricted to the tropical dry forest that occurs to the north of this Peninsula (Duno-de Stefano et al. 2012). Therefore, these findings support the results of Giarla and Jansa (2014) who demonstrated that geographical barriers promote the isolation and genetic differentiation of a recent radiation of Neotropical marsupials in South America.

Our results are similar to those reported for other Mexican small mammals. For instance, Light et al. (2016) found that populations of the pygmy mouse (*Baiomys taylori*) were structured in 2 haplogroups segregated by the Transvolcanic Belt; while Ortega et al. (2009) documented that banana bat

(*Musonycteris harrisoni*) populations are divided into 2 haplogroups separated by the Sierra Madre de Sur. High intra-specific genetic variation was also found in populations of the Verapaz shrew (*Sorex veraepacis*) from both sides of the Isthmus of Tehuantepec (Esteva et al. 2010). Similarly, Sullivan et al. (1997) and León-Paniagua et al. (2007) found that the major mountain ranges of México drove the isolation and genetic diversification of the *Peromyscus aztecus* species group and the mouse genus *Habromys*, respectively. Those authors pointed out that the Isthmus of Tehuantepec represent a strong biogeographic barrier for small mammals. In addition, some amphibians (Zaldivar-Riverón et al. 2004), reptiles (Devitt 2006; Zarza et al. 2008), and birds (González et al. 2011; Cortés-Rodríguez et al. 2013) display similar biogeographical

Table 5.—Standardized coefficients of canonical variables based on 13 log-transformed craniodental variables from 5 clades of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*), from the 3 currently recognized subspecies of *T. canescens*, and from the didelphid genera *Tlacuatzin*, *Marmosa*, and *Monodelphis*. Abbreviations of variables are described in “Materials and Methods.” DF = discriminant function.

Variable	Clades		Subspecies		Genera	
	DF1	DF2	DF1	DF2	DF1	DF2
CBL	-0.694	0.976	-0.172	-1.619	0.351	0.521
NB	-1.055	0.022	-0.005	0.057	0.095	-0.058
NL	-0.130	-0.677	0.430	0.168	0.384	-0.072
LIB	-0.249	0.600	0.447	0.727	-0.563	0.692
ZB	1.809	0.268	-1.210	-1.746	0.531	-1.334
PL	-0.093	-0.848	-0.023	2.715	-0.669	0.100
PB	-0.284	-0.196	-0.148	-0.661	0.162	0.300
MTR	-1.203	0.689	1.339	0.095	-0.302	0.255
LM	0.984	0.387	-0.498	-0.215	0.223	0.355
M1-M3	-0.279	0.207	0.240	0.644	0.427	0.127
WM3	0.392	-0.345	-0.035	0.372	0.558	-0.384
BW	-0.164	0.615	0.675	-0.294	0.011	0.100
IBM	1.175	-0.665	-0.702	0.416	-0.427	0.315
Explained variance (%)	57.8	23.2	67.1	32.9	55.8	44.2
Cumulative variance (%)	57.8	81.0	67.1	100.0	55.8	100.0

patterns over their distributional ranges. For example, the populations of the western lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*) are structured in 5 well-differentiated clades, which are consistent with the subspecies they belong to and whose boundaries are concordant with existing geographical barriers such as the Transvolcanic Belt, the Gulf of California, and Guatemala highlands (Devitt 2006).

Genetic divergence values of the *Cytb* gene among clades also indicated that these clades are well differentiated. Comparisons among clades revealed an inter-clade divergence averaging from 4.4% and 8.4% (Table 3). These values are similar to those reported in other didelphids such as *Monodelphis domestica* (4.8%—Pavan et al. 2014), *Tylamys pallidior* (5%—Giarla et al. 2010), and *M. mexicana* (6.6%—Voss et al. 2014). In contrast, intragroup values are low, means ranging from 0.5% to 3.6% (Table 3). These values are similar to those found among conspecific individuals of other didelphids such as *Marmosops pakaraimae* (0.1%—Voss et al. 2013) and *Tylamys sponsorius* (1.8%—Giarla et al. 2010). High inter-group genetic divergence, between 2% and 11%, had a high probability of being indicative of valid species and merit additional study concerning specific status (Bradley and Baker 2001). Therefore, the inter-clade *p*-distances we recorded suggest that *T. canescens* as currently recognized may include several taxa.

The PCA for molecular clades did not form clusters but show that the specimens from the Northern Pacific coastal plain clade display the smallest dimensions, which is consistent with previous reports (Fig. 5a; Allen 1898; Tate 1933). In contrast, the DFA showed that the specimens are clustered in 4 overlapped groups. These clusters are consistent with the clades from Tres Marias Islands, the Northern Pacific coastal plain, the Balsas river basin, and the Isthmus of Tehuantepec (Fig. 5b). Specimens belonging to the Peninsula de Yucatán clade are located in the area where the ellipses from the Northern Pacific coastal plain and Balsas river basin clades overlap. The DFA also showed the clusters from Tres Marias Islands and the

Isthmus of Tehuantepec are the most differentiated. Likewise, 93% of the specimens were correctly assigned to their own molecular clade indicating that there are morphometric differences among these.

The PCA for currently recognized subspecies did not form clusters either. In contrast, the DFA revealed that the ellipses of *T. c. canescens* and *T. c. insularis* are overlapped, while the 2 specimens of *T. c. gaumeri* are well differentiated from each other (Figs. 6a and 6b). This result supports previous classifications where *T. c. gaumeri* is recognized as a valid subspecies (Gardner 2005; Ramirez-Pulido et al. 2014) and not as a synonym for *T. c. canescens* as considered by Tate (1933) and Ceballos (2014). Likewise, the fact that 100% of the specimens were correctly assigned to their a priori group indicates that the currently recognized subspecies are well differentiated morphologically. However, this result differs from that obtained in the phylogenetic analyses in which the subspecies *T. c. canescens* is paraphyletic and included 3 different clades (the Balsas river basin clade, the Isthmus of Tehuantepec clade, and the Peninsula de Yucatán clade). Therefore, given that the current taxonomic arrangement does not reflect phylogenetic relationships among molecular clades of this marsupial, this classification should not be valid.

Historical biogeographical inferences.—Our results suggest that the genus *Tlacuatzin* was present in the Pleistocene, which is consistent with the fossil record of this species (Tate 1933; Álvarez and Arroyo-Cabrales 1990; Zarza et al. 2003). Therefore, the climatic fluctuations that occurred during the Pleistocene may have affected *T. canescens*, shaping its geographical distribution through cycles of expansion (during the glacial periods) and range contraction (during the interglacial periods—Fernández et al. 2012). Similarly, the diversification of *Tlacuatzin* could be the result of spatial and temporal fragmentation of their populations during interglacial periods, which promoted their isolation and genetic divergence as has been proposed for some mammals and birds (e.g., Sullivan et al. 1997; Barber and Klicka 2010).

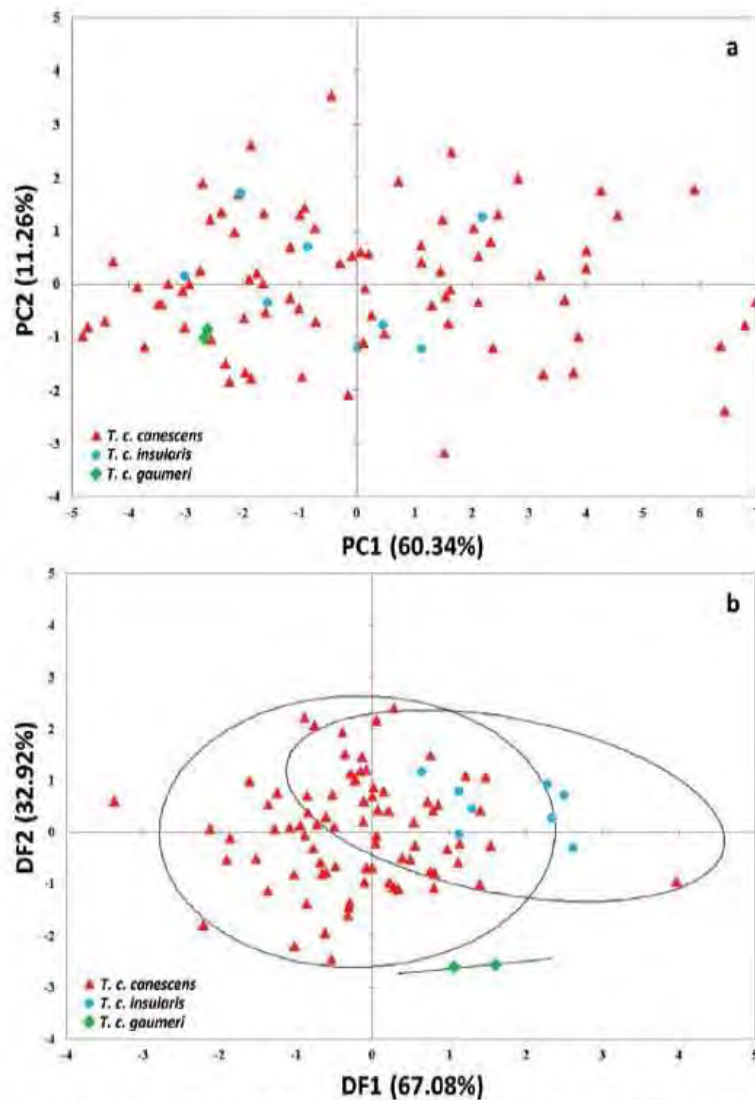


Fig. 6.—Multivariate analyses 13 craniodental variables from the 3 currently recognized subspecies of (*Tlacuatzin canescens*): a) Plot showing sample dispersion along the first 2 axes from a principal component analysis. b) Plot of the first 2 canonical axes from a discriminant function analysis.

In addition, geographical barriers such as mountain ranges and rivers could also play an important role as effective reproductive barriers, interrupting gene flow among their populations (Fig. 4; Giarla and Jansa 2014). Our results confirmed that the geographical barriers within the distribution of *Tlacuatzin* were present when this mouse opossum started to diverge. The Sierra Madre Occidental was formed in the Oligocene and early Miocene, promoting the establishment of the tropical dry forest in western and central México (Ortega et al. 2009). The Transvolcanic Belt started its formation in the late Miocene, finishing in the Pliocene (Zaldivar-Riverón et al. 2004); while the Sierra Madre del Sur was formed during the late Mesozoic (Cretaceous—Sotuyo 2007). The Isthmus of Tehuantepec was formed from the late Miocene to the end of the Pleistocene

(González et al. 2011), while Tres Marias Islands were separated from the continent during the late Miocene (Casas-Andreu 1992). Therefore, these geographical barriers promoted the isolation of *Tlacuatzin* populations during the interglacial periods, driving the differentiation of this genus into 5 phylogenetic clades.

It is difficult to determinate when *Tlacuatzin* arrived in México from South America since there is no fossil record to document the presence of this taxon in South America nor its migration through the Panama Isthmus. However, Jansa et al. (2014) suggested that the ancestor of *Tlacuatzin* arose 17 Ma. Our results suggest that after *Tlacuatzin* arrived in Mexico, this mouse opossum extended its distribution along the Pacific coast until it arrived at its northern range. *Tlacuatzin* might

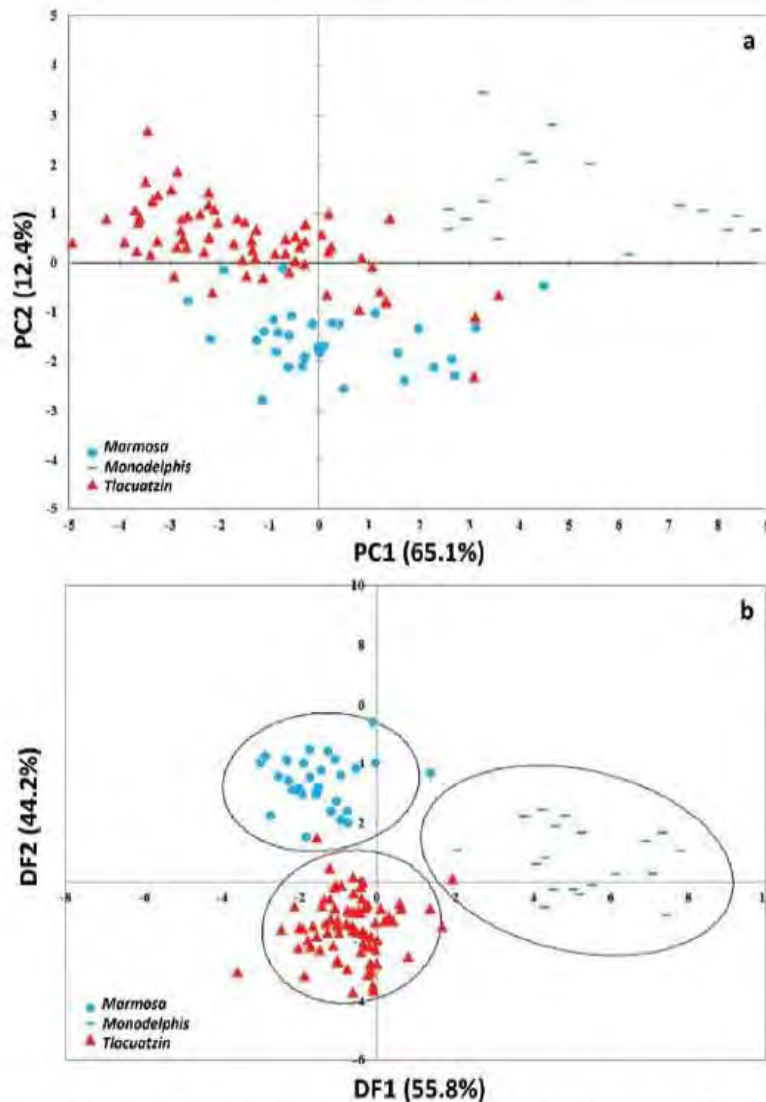


Fig. 7.—Multivariate analyses of 13 craniodental variables from the didelphid genera *Tlacuatzin*, *Marmosa*, and *Monodelphis*. a) Plot showing sample dispersion along the first 2 axes from a principal component analysis. b) Plot of the first canonical axes from a discriminant function analysis.

have reached Tres Marías Islands by using a terrestrial bridge during a glacial period when the sea level was low, as has been suggested for some amphibians and reptiles that inhabit those islands (Casas-Andreu 1992). Similarly, *Tlacuatzin* might have arrived in the Península of Yucatán across the Isthmus of Tehuantepec during a glacial period when the lowlands of the isthmus were more extensive due to lower sea level and the semiarid environments were continuous from the Pacific lowlands to the Gulf of México lowlands, as has been proposed for other taxa that inhabit lowlands on both sides of the Isthmus of Tehuantepec (Supplementary Data SD8; Duellman 1960).

Taxonomic implications.—Our phylogenetic analyses revealed 2 major clades within *Tlacuatzin* (Fig. 2). The first major clade (A) supports a sister relationship between Tres Marías Islands and the Northern Pacific coastal plain clades, while the second

major clade (B) shown a sister relationship between the Balsas river basin clade and the Península de Yucatán and Isthmus of Tehuantepec clades, although support values for these groups are low. This hypothesis suggests that *Tlacuatzin* might include 2 different taxa. However, the genetic distances within these 2 major clades are high (0.0–6.2% within clade A and 0.0–8.0% within clade B), similar to those expected between different species (Bradley and Baker 2001). In addition, *p*-distances between the clades belonging to each major clade are also high (Table 3), which suggests that each major clade may include several taxa. On the other hand, morphological evidence indicates that the 5 clades are differentiated from each other (Fig. 5b), particularly the Tres Marías Islands clade is considerably distinct from the Northern Pacific coastal plain clade. Therefore, our data support that the 2 major clades of *Tlacuatzin* may include several taxa.

The clades from Tres Marías Islands, the Northern Pacific coastal plain, and the Península de Yucatán were originally described as *M. insularis* (Merriam 1898), *M. gaumeri* (Osgood 1913), and *M. sinaloae* (Allen 1898), respectively. However, Tate (1933) was unable to identify the differences in size and color that those authors reported among these taxa and *M. canescens*. Therefore, he considered *M. insularis* and *M. sinaloae* subspecies of *M. canescens*, and synonymized *M. gaumeri* under *M. c. canescens* (Tate 1933). The current taxonomy of *T. canescens*, which is based on morphological traits, recognizes 3 subspecies: *T. c. canescens* from along the Pacific versant and through the Balsas river basin; *T. c. gaumeri* from the northern part of the Península de Yucatán; and *T. c. insularis* from Tres Marías Islands (Ramírez-Pulido et al. 2014).

Based on our morphological analyses we state that *T. c. canescens*, *T. c. gaumeri*, and *T. insularis* are somewhat differentiated from each other (Fig. 6b). Regarding the phylogenetic analyses, we find that *T. c. gaumeri* is consistent with the geographical distribution of the Península de Yucatán clade, while *T. c. insularis* is consistent with the area occupied by Tres Marías Islands clade. In contrast, our molecular analyses reveal that *T. c. canescens* as currently recognized includes 3 different phylogenetic clades, of which 2 are consistent with previously described taxa. The Northern Pacific coastal plain clade is consistent with the range of *sinaloae*, a synonym of *canescens* used to describe the populations along the Pacific versant from Sonora to Colima, while the Isthmus of Tehuantepec clade is consistent with the area occupied by *T. c. canescens* in Oaxaca and Chiapas. The Balsas river basin clade is not consistent with any previously described taxon.

According to our analyses, the 5 clades that comprise *T. canescens* are genetically and morphologically well differentiated. Genetic divergence among these clades is high (4–9%), while intra-clades divergence values are low (0.5–3.6%). In addition, we found strong morphological differences in ZB, IBM, and LM that can help diagnose the clades. Furthermore, the DFA suggests that the Tres Marías Islands clade is considerably distinct from the Northern Pacific coastal plain clade (Fig. 5b), which supports the conclusions of Merriam (1898) and Wilson (1991) who stated that island populations differed sufficiently from the mainland populations to warrant species recognition. Similarly, our analyses show that the Península de Yucatán clade is well differentiated from the Isthmus of Tehuantepec clade (Fig. 5b) which differs from the observations made by Tate (1933) who did not find differences among specimens from these regions. Moreover, the *Cytb* evidence suggests that the 5 clades that conform *Tlacuatzin* have been genetically and geographically isolated for approximately 2 Ma. We believe that the sum total evidence suggests that these clades may represent different taxa. Therefore, we propose the recognition of *T. gaumeri* (Península de Yucatán clade), *T. insularis* (Tres Marías Islands clade), and *T. sinaloae* (Northern Pacific coastal plain clade) as valid taxa and restrict *T. canescens* to Oaxaca and Chiapas (Isthmus of Tehuantepec clade).

Our results also suggest that the clade from the Balsas river basin represents an additional and unnamed taxon. We found this clade is highly genetically divergent (above 5%) from the other

4. Morphologically, it is similar to the other clades, with some differentiation (Fig. 5b). This result is similar to those found in the other species of *Tlacuatzin* documented in this study, which differ each other genetically and morphologically. We recognize the Balsas river basin clade as an undescribed taxon.

Differences among genera.—K2P distances we recorded between *Tlacuatzin* and other genera were much greater than those registered among *Tlacuatzin* clades: 18.7–20.9% between *Tlacuatzin* and *Marmosa*, and 16.2–20.5% between *Tlacuatzin* and *Monodelphis*. Our results are consistent with those found by Patton et al. (1996), which recorded an extensive range of intergeneric divergence among didelphids, ranging from 13.7% to 52.7%. Regarding the phylogenetic relationships among these genera, our results suggest that *Tlacuatzin* is sister to the clade that includes *Marmosa* and *Monodelphis*, which is similar to 1 of the 3 hypotheses proposed by Voss and Jansa (2009; Supplementary Data SD3).

The multivariate analyses for *Tlacuatzin*, *Marmosa*, and *Monodelphis* indicated that there are significant differences among the 3 genera (Figs. 7a and 7b). *Tlacuatzin* and *Marmosa* are similar in size and form, which explains why *Tlacuatzin* was previously included within the genus *Marmosa* (Tate 1933; Voss and Jansa 2003). However, our results suggest that these 2 mouse opossums are well differentiated with *Tlacuatzin* significantly smaller than *Marmosa*, and therefore the smallest didelphid distributed in México (Zarza et al. 2003). The fact that our research included *Tlacuatzin* specimens from its entire distribution and representatives of *Marmosa* and *Monodelphis* from México and South America may help understand better the evolutionary history of the gray mouse opossum.

In conclusion, our genetic and morphological data support *Tlacuatzin* monophyly and suggest this taxon is formed by 5 well-differentiated phylogenetic clades. According to expectations, the diversification of this taxon occurred during the Pleistocene in response to climatic changes and the presence of geographical barriers, which promoted the isolation and genetic differentiation of its populations. We propose changes in the current taxonomy of the genus *Tlacuatzin*, which include the recognition of *T. gaumeri*, *T. insularis*, and *T. sinaloae* as valid species and the recognition of 1 taxon that is not consistent with any other previously described. Likewise, both morphological and molecular evidence presented here support that the genus *Tlacuatzin* is well differentiated from its relatives, *Marmosa* and *Monodelphis*.

SPECIES ACCOUNT

Tlacuatzin canescens (Allen, 1893)

Gray mouse opossum

Didelphis (Micoureus) canescens Allen, 1893:235. Type locality “Santo Domingo de Guzmán, Isthmus of Tehuantepec”, Oaxaca, México. Type specimen AMNH 3111-2433, adult male, collected by Dr. A. C. Buller in 1890.

Marmosa canescens Allen, 1897:58. Transferred to the genus *Marmosa*.

Marmosa oaxacae Merriam, 1897:43. Type locality “Oaxaca”, Oaxaca, México.

Geographic range.—This species is known from the Isthmus of Tehuantepec in Oaxaca and western Chiapas. It also occurs in the inland valley of Oaxaca, near Oaxaca City.

Diagnosis.—Pale gray dorsal fur and white underparts, feet grayish, and pale brown tail. Skull short and broad, long and broad palatine.

Tlacuatzin insularis (Merriam, 1898)

Tres Mariás pygmy opossum

Marmosa insularis Merriam, 1898:14. Type locality “María Madre Island, Tres Marias Islands”, Nayarit, México. Type specimen USNM 89215, adult male, collected by E. W. Nelson and E. A. Goldman in 1897.

Geographic range.—This species is restricted to Tres Mariás Islands. It has been collected in the islands María Madre, María Cleofas, and San Juanito.

Diagnosis.—Cinnamon grayish dorsal fur and cream-buff underparts, feet buffy-brown, and brown tail. Skull and palatine long and narrow, nasals long and narrow.

Tlacuatzin sinaloae (Allen, 1898)

Northern mouse opossum

Marmosa sinaloae Allen, 1898:143. Type locality “Tatemales”, Sinaloa, México. Type specimen, British Museum 98.3.2.161, adult male, collected by P. O. Simons in 1897.

Geographic range.—This species occurs along the Pacific littoral from Sonora to Colima and inland valleys from Durango, Jalisco, and Zacatecas.

Diagnosis.—Brownish gray dorsal fur and yellow underparts, cream white feet, and tail brownish in the base and pale at the tip. Skull and palatine short and broad.

Tlacuatzin gaumeri (Osgood, 1913)

Península de Yucatán mouse opossum

Marmosa gaumeri Osgood, 1913:175. Type locality “Yaxcaba southern Chichen Itza”, Yucatán, México. Type specimen FMNH 19995, subadult male, collected by G. F. Gaumer in 1912.

Geographic range.—This species is known from Yucatán. Recent records indicate that this species also occurs in Campeche, near the archaeological ruins of Calakmul.

Diagnosis.—Dark brownish gray dorsal fur and pale cream underparts; feet creamy white, tail brownish above and pale below. Skull and nasals small and narrow.

Tlacuatzin balsasensis, new species

Balsas mouse opossum, ratón tlacuache del Balsas

Holotype.—Skin and skull of an adult male (Colección de Mamíferos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, ENCB 26195), collected 21 November 1986 by José Juan Hernández Chávez (collector number 577).

Type locality.—14 Km N, 11 Km E Panindicuaro, municipality of Puruandiro de Calderón, Michoacán, México (20°6′35″N, 101°38′38″W).

Distribution.—This species occurs through the Balsas river basin, which is delimited by the Transvolcanic Belt to the north and the Sierra Madre del Sur to the south. Its distribution extends from Jalisco to Puebla. It is present in the states of Jalisco, Michoacán, Guerrero, Morelos, Estado de México, and Puebla. It also occurs in adjacent regions of Oaxaca.

Etymology.—The specific epithet *balsasensis* refers to the geographic region of the Balsas river basin, area in which the species is distributed. We suggest the common names Balsas mouse opossum, and ratón tlacuache del Balsas.

Diagnosis.—Brownish slightly gray dorsal fur and yellow-buff underparts, feet yellowish, and tail slightly bicolored, brownish above and pale below. Skull long and broad, nasals and palatine long and broad.

Remarks.—*Tlacuatzin balsasensis* is a distinctive mammalian component of tropical dry forests of western México although it also occurs in a great variety of habitats ranging from pine-oak forest to scrubs (Voss and Jansa 2003; Hernández-Cardona et al. 2007; Monroy-Vilchis et al. 2011). This species co-occurs with other taxa restricted to the Balsas river basin such as the scrub *Caesalpinia oyamae* (Sotuyo and Lewis 2007), the scorpion *Centruroides balsasensis* (Ponce and Francke 2004), and the iguana *Ctenosauria clarki* (Pérez and Saldaña 2002). The conservation status of this marsupial is unknown; however, it may be a threatened species since it occurs in the tropical dry forest, an ecosystem highly fragmented and disturbed in México (Meave et al. 2012).

Nomenclatural statement.—A life science identifier (LSID) number was obtained for the new species *Tlacuatzin balsasensis*: urn:lsid:zoobank.org:pub:9634C86D-BE27-43D7-82E7-D571E569537B.

KEY TO THE SPECIES OF *Tlacuatzin*

1a. Tail brownish.....	2
1b. Tail bicolored.....	3
2a. Cinnamon grayish dorsal fur.....	<i>T. insularis</i>
2b. Grayish dorsal fur.....	<i>T. canescens</i>
3a. Tail brownish at the base and pale at the tip.....	<i>T. sinaloae</i>
3b. Tail brownish above and pale below.....	4
4a. Skull short (CBL < 28.5 mm); length of M1–M3 < 5.4 mm.....	<i>T. gaumeri</i>
4b. Skull long (CBL > 28.5 mm); length of M1–M3 ≥ 5.4 mm.....	<i>T. balsasensis</i>

ACKNOWLEDGMENTS

J. Vargas, Y. Hortelano, and several undergraduate students helped collect field samples and curate museum specimens at Colección Nacional de Mamíferos (CNMA). C. López-González (CIDIIR-Durango), C. Lorenzo (ECOSUR-SC-M), O. Retana (CMUAC), J. C. López Vidal (ENCB-IPN), M. A. Lozano (UAEM), R. S. Voss (AMNH), S. Peurach (NMNH), R. M. Timm (KU), B. Patterson (FMNH), and the BRTC at Texas A&M University graciously provided tissue samples and museum specimens. Financial support was partly by FAC (Universidad Nacional Autónoma de México through a research grant; PAPIIT program project number IN215711) and by JEL (Texas A&M University). JA is grateful to Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, and Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) for grants and fellowships provided.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at *Journal of Mammalogy* online.

Supplementary Data SD1.—Bayesian phylogram of the phylogenetic relationships among didelphids and within the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) based on a partitioned analysis of the cytochrome-*b* gene. Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) support values are indicated by filled circles at nodes, with ML on left and BI on the right. For ML, white indicates nodal support $\leq 50\%$, gray indicates nodal support between 50% and 75%, and black indicates nodal support $\geq 75\%$. For BI, gray indicates nodal support < 0.95 and black indicates nodal support ≥ 95 .

Supplementary Data SD2.—Bayesian phylogram of the phylogenetic relationships among didelphids and within the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) based on a partitioned analysis of the interphotoreceptor retinoid gene. Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) support values are indicated by filled circles at nodes, with ML on left and BI on the right. For ML, white indicates nodal support $\leq 50\%$, gray indicates nodal support between 50% and 75%, and black indicates nodal support $\geq 75\%$. For BI, gray indicates nodal support < 0.95 and black indicates nodal support ≥ 95 .

Supplementary Data SD3.—Bayesian phylogram of the phylogenetic relationships among didelphids and within the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) based on a concatenated and partitioned analyses of 2 genes (cytochrome-*b* and interphotoreceptor retinoid-binding protein). Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) support values are indicated by filled circles at nodes, with ML on left and BI on the right. For ML, white indicates nodal support $\leq 50\%$, gray indicates nodal support between 50% and 75%, and black indicates nodal support $\geq 75\%$. For BI, gray indicates nodal support < 0.95 and black indicates nodal support ≥ 95 .

Supplementary Data SD4.—Multivariate analysis of variance (MANOVA) performed for 13 craniodental variables among age categories of 4 clades resulting from the phylogenetic analysis and 2 subspecies of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*); analyses among age categories were not conducted on Tres Marias Islands clade and *Tlacuatzin canescens insularis*

because all specimens examined for this region and subspecies were adults. Significant differences ($P \leq 0.05$) are marked with as asterisk (*). *F* value (*F*); *F* probability ($Pr > F$). Abbreviations of variables are described in "Materials and Methods."

Supplementary Data SD5.—Multivariate analysis of variance (MANOVA) performed for 13 craniodental variables between males and females of 4 clades resulting from the phylogenetic analysis and 2 subspecies of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*); analyses were not conducted on the Peninsula de Yucatán clade and *Tlacuatzin canescens gumeri* because all examined specimens from this region and subspecies were males. Significant differences ($P \leq 0.05$) are marked with as asterisk (*). *F* value (*F*); *F* probability ($Pr > F$). Abbreviations of variables are described in "Materials and Methods."

Supplementary Data SD6.—Univariate statistics of external and craniodental variables from the 5 clades resulting from the phylogenetic analysis and 3 subspecies of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*). Calculations are based on adult specimens. Abbreviations of variables are described in "Materials and Methods."

Supplementary Data SD7.—Multivariate analysis of variance (MANOVA) performed for 13 craniodental variables among age categories and between males and females of *Marmosa* and *Monodelphis* genera. Significant differences ($P \leq 0.05$) are marked with as asterisk (*). *F* value (*F*); *F* probability ($Pr > F$). Abbreviations of variables are described in "Materials and Methods."

Supplementary Data SD8.—Diversification of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) in 5 mitochondrial clades during the Pleistocene.

LITERATURE CITED

- ALLEN, J. A. 1893. Description of a new species of opossum from the Isthmus of Tehuantepec, Mexico. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 5:235–236.
- ALLEN, J. A. 1897. Further notes on mammals collected in Mexico by Dr. Audley C. Buller, with descriptions of new species. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 9:47–58.
- ALLEN, J. A. 1898. Description of new mammals from Western Mexico and Lower California. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 10:143–158.
- ÁLVAREZ, T., AND J. ARROYO-CABRALES. 1990. Variación osteométrica de *Marmosa* (Didelphidae: Marsupialia) del Reciente y Pleistoceno de Yucatán, México, con descripción de una nueva especie. *Instituto Nacional de Antropología e Historia, Colección Científica* 188:333–345.
- AMRINE-MADSEN, H., M. SCALLY, M. WESTERMAN, M. J. STANHOPE, C. KRAJEWSKI, AND M. S. SPRINGER. 2003. Nuclear gene sequence provides evidence for monophyly of australidelphian marsupials. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28:186–196.
- ARCANGELI, J., AND F. A. CERVANTES. 2009. Identificación molecular de dos especies de tlacuache: *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*, utilizando enzimas de restricción. Pp. 251–262 in 60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM. Aportaciones al conocimiento y conservación de los mamíferos de México (F. A. Cervantes, Y. Hortelano, and J. Vargas, eds.). Instituto de Biología, UNAM, México, D.F., México.
- BARBER, B. R., AND J. KLICKA. 2010. Two pulses of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican bird fauna. *Proceedings of the Royal Society B* 277:2675–2681.

- BARROS, M., F. F. NASCIMENTO, J. ALVES DE OLIVEIRA, AND C. RODRIGUES. 2013. Biogeographic determinants of genetic diversification in the mouse opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Journal of Heredity* 104:613–626.
- BRADLEY, R. D., AND R. J. BAKER. 2001. A test of genetic species concept: cytochrome b sequences and mammal. *Journal of Mammalogy* 82:960–970.
- CASAS-ANDRÉU, G. 1992. Anfibios y reptiles de las Islas Marias y otras islas adyacentes a la costa de Nayarit, México. Aspectos sobre su biogeografía y conservación. *Anales del Instituto de Biología, Serie Zoología* 63:95–112.
- CEBALLOS, G. 2014. Gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*). Pp. 82–83 in *Mammals of Mexico* (G. Ceballos, ed.). John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- COATES, A., I. COLLINS, M. AUBRY, AND W. BERGGREN. 2004. The geology of the Darien, Panama, and the late Miocene-Pliocene collision of the Panama arc with northwestern South America. *Geological Society of America Bulletin* 116:1227–1344.
- CURTIS-RODRÍGUEZ, N., F. JACOBSEN, B. E. HERNÁNDEZ-BAROS, A. G. NAVARRO-SIGUENZA, J. L. PETERS, AND K. E. OMLAND. 2013. Coalescent analyses show isolation without migration in two closely related orioles: the case of *Icterus graduacaudata* and *Icterus chrysater*. *Ecology and Evolution* 3:4377–4387.
- DEVITT, T. J. 2006. Phylogeography of the western lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*): testing aridland biogeographical hypotheses across the Nearctic-Neotropical transition. *Molecular Ecology* 15:4387–4407.
- DÍAZ-NIETO J. F., S. A. JANSA, AND R. S. VOSS. 2016. Phylogenetic relationships of *Chacodelphys* (Marsupialia: Didelphidae: Didelphinae) based on “ancient” DNA sequences. *Journal of Mammalogy* 97:394–404.
- DRUMMOND, A. J., M. A. SUCHARD, D. XIE, AND A. RAMBAUT. 2012. Bayesian phylogenetic with BEAUTI and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29:1969–1973.
- DUELLMAN, W. E. 1960. A distributional study of the amphibians of the Isthmus of Tehuantepec, México. University of Kansas Publications, Museum of Natural History 13:19–72.
- DUNO-DE STEFANO, R., L. L. CAN-ITZA, A. RIVERA-RUIZ, AND L. M. CALCO-IRABIÉN. 2012. Regionalización y relaciones biogeográficas de la Península de Yucatán con base en los patrones de distribución de la familia Leguminosae. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83:1053–1072.
- ESPIÑOZA, J., C. LORENZO, AND E. RÍOS. 2011. Variación morfológica y morfométrica de *Heteromys desmarestianus* en Chiapas, México. *Therya* 2:139–154.
- ESPINOSA, D., S. OCUGUEDA, C. AGUILAR, O. FLORES, J. LLORENTE-BOUSQUETS, AND B. VÁZQUEZ. 2008. El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural. Pp. 33–65 in *Capital natural de México* (J. Sarukhán, ed.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D.F., México.
- ESTIVA, M., F. A. CERVANTES, S. V. BRANT, AND J. A. COOK. 2010. Molecular phylogeny of long-tailed shrews (genus *Sorex*) from México and Guatemala. *Zootaxa* 2615:47–65.
- FELSENSTEIN, J. 1981. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- FERNÁNDEZ, J. A., F. A. CERVANTES, AND M. S. HAFNER. 2012. Molecular systematics and biogeography of the Mexican endemic kangaroo rat, *Dipodomys phillipsii* (Rodentia: Heteromyidae). *Journal of Mammalogy* 93:560–571.
- GARDNER, A. L. 2005. Order Didelphimorphia. Pp. 3–20 in *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds.). Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- GIARLA, T. C., AND S. A. JANSA. 2014. The role of physical geography and habitat type in shaping the biogeographical history of a recent radiation of Neotropical marsupials (*Thylamys*: Didelphidae). *Journal of Biogeography* 41:1547–1558.
- GIARLA, T. C., R. S. VOSS, AND S. A. JANSA. 2010. Species limits and phylogenetic relationships in the didelphid marsupial genus *Thylamys* based on mitochondrial DNA sequences and morphology. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 346:1–67.
- GONZÁLEZ, C., J. F. ORNELAS, AND C. GUTIERREZ-RODRÍGUEZ. 2011. Selection and geographic isolation influence hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological divergence in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*). *BMC Evolutionary Biology* 11:1–19.
- GONZÁLEZ-CHRISTEN, A., AND N. V. RODRÍGUEZ. 2014. Primer registro de *Tlacuatzin canescens*, (Mammalia, Didelphimorphia, Marmosidae) en Veracruz, México. *Therya* 5:845–854.
- GUTIERREZ, E. E., S. A. JANSA, AND R. S. VOSS. 2010. Molecular systematics of mouse opossum (Didelphidae: *Marmosa*) assessing species limits using mitochondrial DNA sequences, with comments on phylogenetic relationships and biogeography. *American Museum Novitates* 3692:1–22.
- GUTIERREZ, E. E., AND J. MOLINARI. 2008. Morphometrics and taxonomy of bats of the genus *Pteronotus* (subgenus *Phyllodia*) in Venezuela. *Journal of Mammalogy* 89:292–305.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Research* 41:95–98.
- HASEGAWA, M., H. KISHINO, AND T. YANO. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160–174.
- HERNÁNDEZ-CARDONA, A., L. A. LAGO-TORRES, I. IBARRA-GONZÁLEZ, J. C. FALLER-MÉNÉNDEZ, AND Y. PEREYRA-ARRELLANO. 2007. Registro del tlacuachín (*Tlacuatzin canescens*) en el Área de Conservación “El Zapotal”, en el noreste del estado de Yucatán. *Revista Mexicana de Mastozoología* 11:85–90.
- HILLIS, D. M., C. MORITZ, AND B. K. MABLE. 1996. *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- JANSA, S. A., F. K. BARKER, AND VOSS, R. S. 2014. The early diversification history of didelphid marsupials: a window into South America’s “Splendid Isolation”. *Evolution* 68:684–695.
- JANSA, S. A., AND R. S. VOSS. 2000. Phylogenetics studies on didelphid marsupials I. Introduction and preliminary results from nuclear IRBP gene sequences. *Journal of Mammalian Evolution* 7:43–77.
- JANSA, S. A., AND R. S. VOSS. 2005. Phylogenetic relationships of the marsupial genus *Hyladelphys* based on nuclear gene sequences and morphology. *Journal of Mammalogy* 86:853–865.
- KASS, R. E., AND A. E. RAFTERY. 1995. Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association* 90:773–795.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111–120.
- KOEPLI, K. P., S. M. JENKS, E. EIZRIK, T. ZAHEDIPOUR, B. VAN VALKENBURGH, AND R. K. WAYNE. 2006. Molecular systematics of the Hyacridae: relationships of a relictual lineage resolved by a molecular supermatrix. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:60–620.
- KUMAR, S., G. STECHER, AND K. TAMURA. 2015. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870–1874.
- LANFAR, R., B. CALCOIT, S. Y. W. HO, AND S. GUINDON. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29:1695–1701.

- LEÓN-PANIAGUA, L., A. G. NAVARRO-SIGÜENZA, B. E. HERNÁNDEZ-BARROS, AND H. C. MORALES. 2007. Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42:653–664.
- LIGHT, J. E., M. O. OSTROFF, AND D. J. HAFNER. 2016. Phylogeographic assessment of the northern pygmy mouse, *Baiomys taylori*. *Journal of Mammalogy* 97:1081–1094.
- MARSHALL, L. G., S. D. WEBB, J. J. SEPKOSKI, AND D. M. RAUP. 1982. Mammalian evolution and the Great American interchange. *Science* 204: 272–279.
- MEAVE, J. A., M. A. ROMERO-ROMERO, S. H. SALAS-MORALES, E. A. PÉREZ-GARCÍA, AND J. A. GALLARDO-CRUZ. 2012. Diversidad, amenazas y oportunidades para la conservación del bosque tropical caducifolio en el estado de Oaxaca, México. *Ecosistemas* 21:85–100.
- MERRIAM, C. H. 1897. Description of two new murine opossums from Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 11:43–44.
- MERRIAM, C. H. 1898. Mammals of Tres Marias Islands, off western Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 12:13–19.
- MONROY-VILCHIS, O., M. M. ZARCO-GONZÁLEZ, J. RAMÍREZ-PULIDO, AND Y. U. AGUILERA-REYES. 2011. Diversidad de mamíferos de la Reserva Natural Sierra de Nanchititla, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82:237–248.
- NILSSON, M. A., A. GULLBERG, A. E. SPOTORNO, U. ARNASON, AND A. JANKE. 2003. Radiation of extant marsupials after the K/T boundary: evidence from complete mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 57:S3–S12.
- ORTEGA, J., M. TSCHAPKA, T. P. GONZÁLEZ-TERRAZAS, G. SUZÁN, AND R. A. MEDELLIN. 2009. Phylogeography of *Musonycteris harrisoni* along the Pacific coast of Mexico. *Acta Chiropterologica* 11:259–269.
- OSGOOD, W. H. 1913. Two new mouse opossums from Yucatan. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 26:175–176.
- PATTON, J. L., S. F. DOS REIS, AND M. N. F. DA SILVA. 1996. Relationships among didelphid marsupials based on sequence variation in mitochondrial cytochrome b gene. *Journal of Mammalian Evolution* 3:3–29.
- PAVAN, S. E., S. A. JANSA, AND R. S. VOSS. 2014. Molecular phylogeny of short-tailed opossums (Didelphidae: *Monodelphis*): taxonomic implications and test of evolutionary hypotheses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79:199–214.
- PÉREZ, E., AND L. SALDANA. 2002. Distribución ecológica del “Nopilchi” *Ctenosaura clarki* (Reptilia: Iguanidae), en las regiones de “Tierra Caliente” y “El Infiernillo”, Guerrero-Michoacán, México. *Revista Electrónica Universitaria*. <http://www.revista.unam.mx/index30jun2002.htm>. Accessed June 2017.
- PONCE, J., AND O. F. FRANCKE. 2004. Una nueva especie de alacrán del género *Centruroides* Marx (1890) (Scorpiones, Buthidae) de la Depresión del Balsas, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.) 20:221–232.
- RAMBAUT, A., AND A. J. DRUMMOND. 2009. Tree Annotator v1.6.0: MCMC output analysis. <http://beast.bio.ed.ac.uk/TreeAnnotator>. Accessed February 2017.
- RAMBAUT, A., M. A. SUCHARD, D. XIE, AND A. J. DRUMMOND. 2014. Tracer v1.6. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Accessed February 2017.
- RAMÍREZ-PULIDO, J., A. CASTILLO-MORALES, A. SALAME-MÉNDEZ, AND A. CASTRO-CAMPILLO. 2004. Características morfológicas y morfométricas de cinco especies de *Cryptotis* (Mammalia: Soricomorpha). *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.) 20:9–37.
- RAMÍREZ-PULIDO, J., N. GONZÁLEZ-RUIZ, A. L. GARDNER, AND J. ARROYO-CABRALES. 2014. List of recent land mammals of Mexico, 2014. Special Publications Museum of Texas Tech University 63:1–69.
- RONQUIST, F., ET AL. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539–542.
- ROSSI, R. V., R. S. VOSS, AND D. P. LUNDE. 2010. A revision of the didelphid marsupial *Marmosa*. Part 1. The species in Tate’s “mexicana” and “mitis” sections and other closely related forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 334:1–83.
- SIKES, R. S., AND THE ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. 2016. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammal in research and education. *Journal of Mammalogy* 97:663–688.
- SMITH, M. P., AND J. L. PATTON. 1993. The diversification of the South American rodents: evidence from the mitochondrial sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50:149–177.
- SOTUYO, S. 2007. Historia evolutiva del complejo *Caesalpinia hintonii* (Leguminosae: Caesalpinioideae): filogenia, estructura genética y aislamiento reproductivo. Ph.D. dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.
- SOTUYO, S., AND G. P. LEWIS. 2007. A new species of *Caesalpinia* from the Río Balsas Depression, México and updated taxonomic circumscription of the *Caesalpinia hintonii* complex (Leguminosae: Caesalpinioideae: Caesalpinieae: Poincianella group). *Brittonia* 59:33–36.
- SPRINGER, M. S., A. BURK, J. R. KAVANAGH, V. G. WADDELL, AND M. J. STANHOPE. 1997. The interphotoreceptor retinoid binding protein gene in therian mammals: implications for high-level relationships and evidence of loss of function in the marsupial mole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:13754–13759.
- SPRINGER, M. S., M. WESTERMAN, J. R. KAVANAGH, A. BURK, M. O. WOODBURN, D. J. KAO, AND C. KRAJEWSKI. 1998. The origin of the Australasian marsupial fauna and the phylogenetic affinities of the enigmatic monito de monte and marsupial mole. *Proceedings of the Royal Society of London, B, Biological Sciences* 265:2381–2386.
- SULLIVAN, J., J. A. MARKERT, AND C. W. KILPATRICK. 1997. Phylogenetic and molecular systematics of the *Peromyscus attecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic Biology* 46:426–440.
- SWOFFORD, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b2.0a. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- TAMURA, K., AND M. NEI. 1993. Model selection in the estimation of the number of nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 10:512–526.
- TAVARE, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* (American Mathematical Society) 17:57–86.
- TATE, G. H. H. 1933. A systematic revision of the marsupial genus *Marmosa*. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 66:1–250.
- VOSS, R. S., E. E. GUTIÉRREZ, S. SOLARI, R. V. ROSSI, AND S. A. JANSA. 2014. Phylogenetic relationships of mouse opossum (Didelphidae, *Marmosa*) with a revised subgeneric classification and notes on sympatric diversity. *American Museum Novitates* 3817:1–27.
- VOSS, R. S., AND S. A. JANSA. 2003. Phylogenetic studies on didelphids II. Nonmolecular data and new Irbp sequences: separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxon sampling. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 276:1–82.

- VOSS, R. S., AND S. A. JANSA. 2009. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of the New World metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 322:1–177.
- VOSS, R. S., B. K. LIM, J. E. DIAZ-NIETO, AND S. A. JANSA. 2013. A new species of *Marmosops* (Marsupialia: Didelphidae) from Pakaraima highlands of Guyana, with remarks on the origin of the endemic Pantepui mammal fauna. *American Museum Novitates* 3778:1–27.
- VOSS, R. S., D. P. LUNDE, AND S. A. JANSA. 2005. On the contents of *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. *American Museum Novitates* 3482:1–4.
- WILSON, D. W. 1991. Mammals of Tres Marias Islands. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 206:214–250.
- XIE, W., P. O. LEWIS, Y. FAN, L. KUO, AND M.-H. CHEN. 2011. Improving marginal likelihood estimation for Bayesian phylogenetic model selection. *Systematic Biology* 60:150–160.
- YU, L., Q. W. LI, O. A. RYDER, AND Y. P. ZHANG. 2004. Phylogenetic relationships within mammalian order Carnivora indicated by sequences of two nuclear gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33:694–705.
- ZALDIVAR-RIVERÓN, A., V. LEÓN-REGAGNON, AND A. NIETO-MONTES DE OCA. 2004. Phylogeny of the Mexican coastal leopard frogs of the *Rana berlandieri* group based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:38–49.
- ZARZA, H., G. CEBALLOS, AND M. A. STEELE. 2003. *Marmosa canescens*. *Mammalian Species* 725:1–4.
- ZARZA, E., V. H. REYNOSO, AND B. C. EMERSON. 2008. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosauria pectinata* and related species. *Molecular Ecology* 17:3259–3275.
- ZHARKIKH, A. 1994. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 39:315–329.

Submitted 7 April 2017. Accepted 23 November 2017.

Associate Editor was Ricardo Moratelli.

APPENDIX I

Species and GenBank accession numbers of cytochrome-*b* (*Cytb*) and interphotoreceptor retinoid-binding protein (*IRBP*) sequences used for phylogenetic analyses.

Species	<i>Cytb</i>	Reference	<i>IRBP</i>	Reference
Order Carnivora				
<i>Canis lupus</i>	AY928668	Koepfli et al. (2006)	AY525044	Yu et al. (2004)
Order Didelphimorphia				
<i>Caluromys derbianus</i>	KU171185	Díaz-Nieto et al. (2016)	KU171200	Díaz-Nieto et al. (2016)
<i>Caluromys lanatus</i>	KJ129898	Giarla and Jansa (2014)	AF257690	Jansa and Voss (2000)
<i>Caluromys philander</i>	KJ129897	Giarla and Jansa (2014)	AY233766	Voss and Jansa (2003)
<i>Chironectes minimus</i>	KJ129892	Giarla and Jansa (2014)	AF257679	Jansa and Voss (2000)
<i>Didelphis albiventris</i>	KM071410	Pavan et al. (2014)	AF257683	Jansa and Voss (2000)
<i>Didelphis marsupialis</i>	HM589701	Arcangeli and Cervantes (2009)	AF257708	Jansa and Voss (2000)
<i>Didelphis virginiana</i>	HM589699	Arcangeli and Cervantes (2009)	AF257678	Jansa and Voss (2000)
<i>Gllronia venusta</i>	U34666	Patton et al. (1996)	AF257688	Jansa and Voss (2000)
<i>Gracilinanus agilis</i>	KF313981	Barros et al. (2013)	AY957490	Voss et al. (2005)
<i>Gracilinanus microtarsus</i>	KF313982	Barros et al. (2013)	AF257687	Jansa and Voss (2000)
<i>Hyladelphys kalinowskii</i>	KJ129891	Giarla and Jansa (2014)	DQ112325	Jansa and Voss (2005)
<i>Lestodelphys halli</i>	HM583365	Giarla et al. (2010)	AF257710	Jansa and Voss (2000)
<i>Lutreolina crassicaudata</i>	KJ129893	Giarla and Jansa (2014)	AF257685	Jansa and Voss (2000)
<i>Marmosa lepida</i>	HM106378	Gutiérrez et al. (2010)	AF257681	Jansa and Voss (2000)
<i>Marmosa mexicana</i>	MG029659	This study	MG029710	This study
<i>Marmosa murina</i>	HM106395	Gutiérrez et al. (2010)	AF257709	Jansa and Voss (2000)
<i>Marmosa robinsoni</i>	HM106354	Gutiérrez et al. (2010)	AY233775	Voss and Jansa (2003)
<i>Marmosa rubra</i>	HM106366	Gutiérrez et al. (2010)	AY233776	Voss and Jansa (2003)
<i>Marmosops incanus</i>	KJ129890	Giarla and Jansa (2014)	AY233785	Voss and Jansa (2003)
<i>Marmosops parvidens</i>	KC954761	Voss et al. (2013)	AF257680	Jansa and Voss (2000)
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	KJ129889	Giarla and Jansa (2014)	AF257707	Jansa and Voss (2000)
<i>Monodelphis adusta</i>	U34677	Patton et al. (1996)	AF257694	Jansa and Voss (2000)
<i>Monodelphis americana</i>	KM071586	Pavan et al. (2014)	KM071063	Pavan et al. (2014)
<i>Monodelphis breviceaudata</i>	KM071471	Pavan et al. (2014)	KM071072	Pavan et al. (2014)
<i>Monodelphis domestica</i>	KM071437	Pavan et al. (2014)	KM071085	Pavan et al. (2014)
<i>Philander opossum</i>	KJ129894	Giarla and Jansa (2014)	AY233789	Voss and Jansa (2003)
<i>Philander mcilhennyi</i>	U34680	Patton et al. (1996)	AF257706	Jansa and Voss (2000)
<i>Thylamys macrura</i>	HM583383	Giarla et al. (2010)	AY957491	Voss et al. (2005)
<i>Thylamys pallidior</i>	HM583408	Giarla et al. (2010)	AF257689	Jansa and Voss (2000)
<i>Thylamys venustus</i>	HM583488	Giarla et al. (2010)	AY233791	Voss and Jansa (2003)
Order Microbiotheria				
<i>Dromiciops gliroides</i>	AJ508402	Nilsson et al. (2003)	AF025384	Springer et al. (1997)
Order Paucituberculata				
<i>Caenolestes fuliginosus</i>	AF102816	Springer et al. (1998)	AF025381	Springer et al. (1997)
<i>Rhyncholestes raphanurus</i>	NC_005829	Nilsson et al. (2003)	AY243440	Amrine-Madsen et al. (2003)

APPENDIX II

Specimens examined for morphological analyses listed by taxon, locality, and catalog number. Sample size follows the taxon name. See "Materials and Methods" for museum acronyms.

Marmosa mexicana ($n = 21$).—MÉXICO: **Campeche**: Reserva de la Biosfera "Los Petenes" Comunidad Balamtauché, Mpio. Calkini (CMUAC 609); 27.5 km S, 70 km E Constitución (CNMA 30794); 44 km S, 70 km E Constitución (CNMA 30795); Calakmul (zona arqueológica), Mpio. Champotón (CNMA 37265); **Chiapas**: Volcán Tacana, Mpio. Jaltenango de la Paz (CNMA 15); Cerro Cintepec, 1 milla S Zapopan (CNMA 8143); Santa Rosa, Mpio. Mapastepec (CNMA 8970); Finca Argovia, 2.5 km NW Tapachula, Mpio. Tapachula (ECO-SC-M 4085, 4137); **Oaxaca**: 11 km SW La Esperanza, camino lodoso hacia San Isidro, Mpio. Santiago Comaltepec (CNMA 29408, 29409, 29410, 29411, 29412); **Veracruz**: Banderilla, 6 Km NW Xalapa (CNMA 34215); Cascadas de Texolo, 1.5 km Se Xico, Mpio. Xico (CNMA 34216, 34217); Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas," Mpio. San Andrés Tuxtla. Sendero Vigía 5 (400 m; CNMA 45105, 45106, 45107, 45108).

Marmosa murina ($n = 13$).—BOLIVIA: **Beni**: Itenez Province Curicha (USNH 551648, 551650, 551651); **La Paz**: Iturralde Province, Alto Río Madidi (USNH 579248); **Santa Cruz**: Velasco Province, Parque Nacional Kempff Mercado, El Refugio, 3 km NE (USNH 584462); Velasco Province, El Refugio (USNH 584463); **ECUADOR**: **Guayas**: Huerta Negra, Ca 20 Km ESE Balao, E Tenguel (USNH 534287); **Los Ríos**: Puerto Nuevo, sobre el Río Nuevo, N Vines (USNH 534288); Lima Pareja, 4 km SW Pueblo Viejo, near San Juan (USNH 53489); Vines cerca Puerto Nuevo y Vines (USNH 53490); **VENEZUELA**: **Amazonas**: Tamatama, Río Orinoco (USNH 38876); **Monagas**: Agustín, 5 Km Caripe (USNH 406935, 406936).

Monodelphis domestica ($n = 10$).—BRAZIL: **Ceará**: Quixadá (USNH 259431); Santana Do Cariri (USNH 304586); **Mato Grosso**: Corumba, São Marcus Rd, 10 km NE Urueum (USNH 390016, 390017); **BOLIVIA**: **Santa Cruz**: Cordillera Brazilio, 3.4 Km S Basilio, 45 Km SSW Santa Cruz (USNH 390566, 390567); **Beni**: Corquillera Basilio, 45 km SSW Santa Cruz (USNH 390568); San Joaquín (USNH 460728, 460731); La Granja, 4 km N Magdalena, La Granja (USNH 461347).

Monodelphis brevicaudata ($n = 15$).—VENEZUELA: **Amazonas**: Esmeralda (NMNH 385010); Tamatama, Río Orinoco (NMNH 388355, 388357, 406906); Capibara, 106 km SW Esmeralda, Brazo Casiquiare (NMNH 406907, 406908, 415277); Pto. Agacucho, 32 km S Pto. Ayacucho, Raya (NMNH 406910, 406911, 406912, 406913); **Bolívar**: Icabaru, 45 km NE Icabaru, Santa Lucia de Surukun (NMNH 443781, 443782); San Ignacio de Yuruani (NMNH 448511, 448512).

Tlacuatzin balsasensis ($n = 24$).—MÉXICO: **Guerrero**: 1 Km N, 3.5 Km E Petacaleo (ENCB 35421); 6 km N, 4.7 km E Petacaleo (ENCB 35793); Sochi (USNH 70238); Tlapa (USNH 70239, 70240, 70241); Acapulco (USNH 70767); Chilpancingo (FMNH 47487); 3 Km E Nejapa, Mpio. Chilapa de Álvarez (TCWC 5643); Acahuizotla, Mpio. Chilpancingo de los Bravo (TCWC 5832, 6461); **México**: 15.0 km S, 10 km E Amatepec (ENCB 23252); Ixtapan del Oro (ENCB 32778); **Michoacán**: 14 km N, 11 km E Panindicuaro (ENCB 26195); 6 km NE Patzeuro (ENCB 25316); 11 km S, 13 km W Arteaga (ENCB 9176); 10 km S, 18 km W Arteaga (ENCB 9175); Los Reyes (USNH 125659, 125925); **Morelos**: Tehuixtla, Mpio. Tehuixtla (CNMA 27514); 6.0 km N, 3.5 km E Ticuman (ENCB 19109); Cañón de Lobos (AMNH

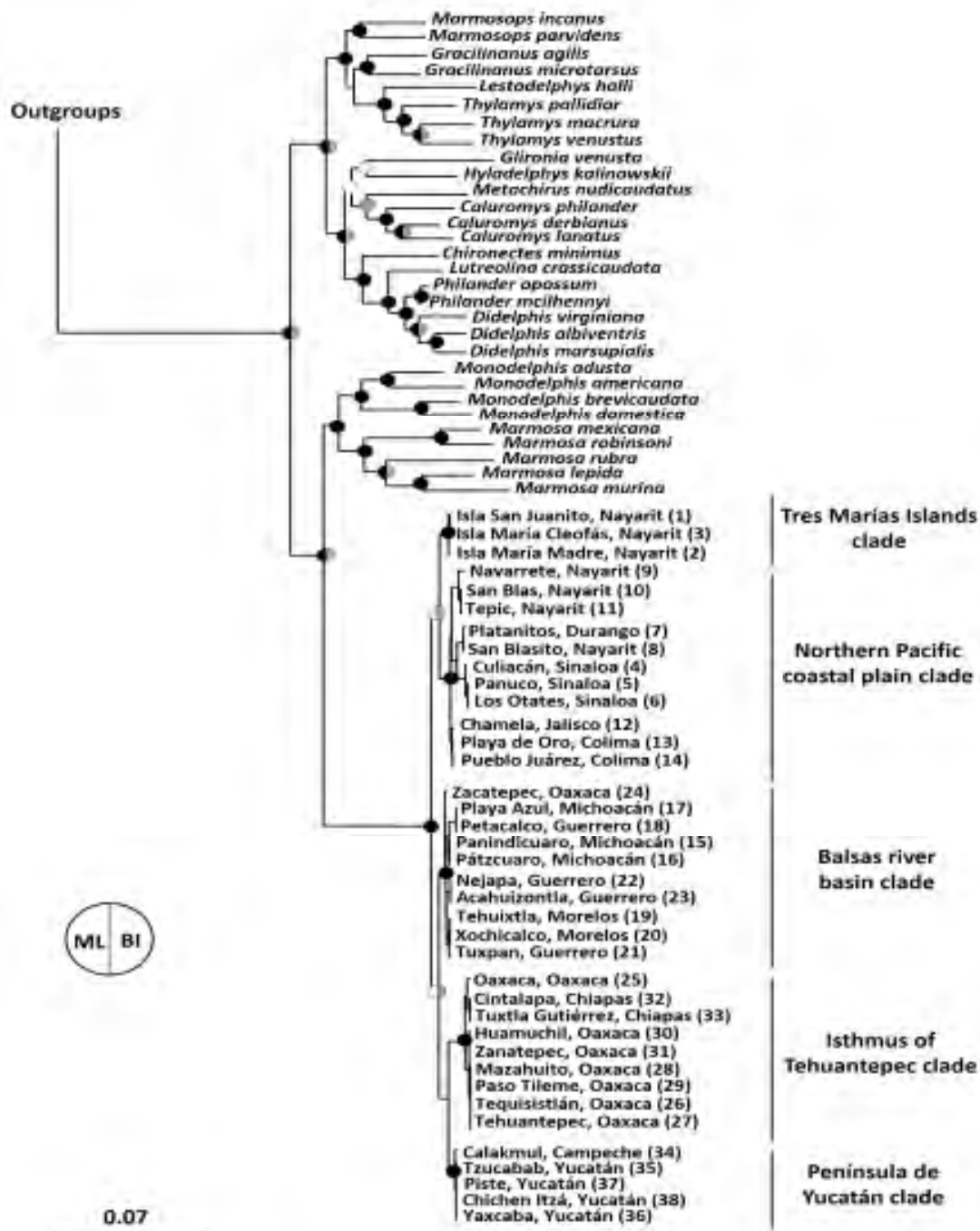
172128); **Puebla**: 10 km S Ajalpan (ENCB 4346); Amolac (USNH 70237).

Tlacuatzin canescens ($n = 35$).—MÉXICO: **Chiapas**: 2 km NO Tuxtla Gutiérrez, Mpio. Tuxtla Gutiérrez (CNMA 7557); Cinco Cerros, Mpio. Cintalapa (AMNH 147571); **Oaxaca**: 1.5 km NE La Reforma, Mpio. Santa María Zacatepec (CNMA 39092); 2.33 km NE Huamuchil, Mpio. San Dionisio de Mar (ECO-SC-M 1876); 4 km E Huayapan (ENCB 3640); Tehuantepec, Santo Domingo (AMNH 3112, 3113, 3114); Tehuantepec, Santo Domingo de Guzmán (AMNH 3115); Tehuantepec, Bisilana (AMNH 145234, 145235, 145236, 145237, 145238); Tehuantepec, San Pedro Jilotepec (AMNH 148809); San Mateo del Mar, Paso Tileme, Mpio. Tehuantepec (AMNH 148969); Tehuantepec, Cerro Arrenal (AMNH 148970); Tequisistlán, Ocotepéc, Mpio. Tehuantepec (AMNH 149104); Tehuantepec, Las Tejas (AMNH 165651); Tehuantepec (AMNH 165653); Mazahuito 18 mi S Matías Romeo (AMNH 185769); 28.9 Km S Matías Romero, Mazahuito, Mpio. Juchitán (AMNH 185770); Tehuantepec, Limón (AMNH 204663); Santo Domingo Tehuantepec, Mpio. Tehuantepec (AMNH 213751, 213752); Cerro San Felipe, Mpio. Oaxaca de Juárez (AMNH 213753); Tehuantepec (USNH 9505); Tehuantepec, Santa Eligenia (USNH 9437, 9438, 9439); Oaxaca (USNH 68241); Tlapancingo (USNH 70242); Puerto Ángel (USNH 71527); Santo Domingo (USNH 73319, 73320).

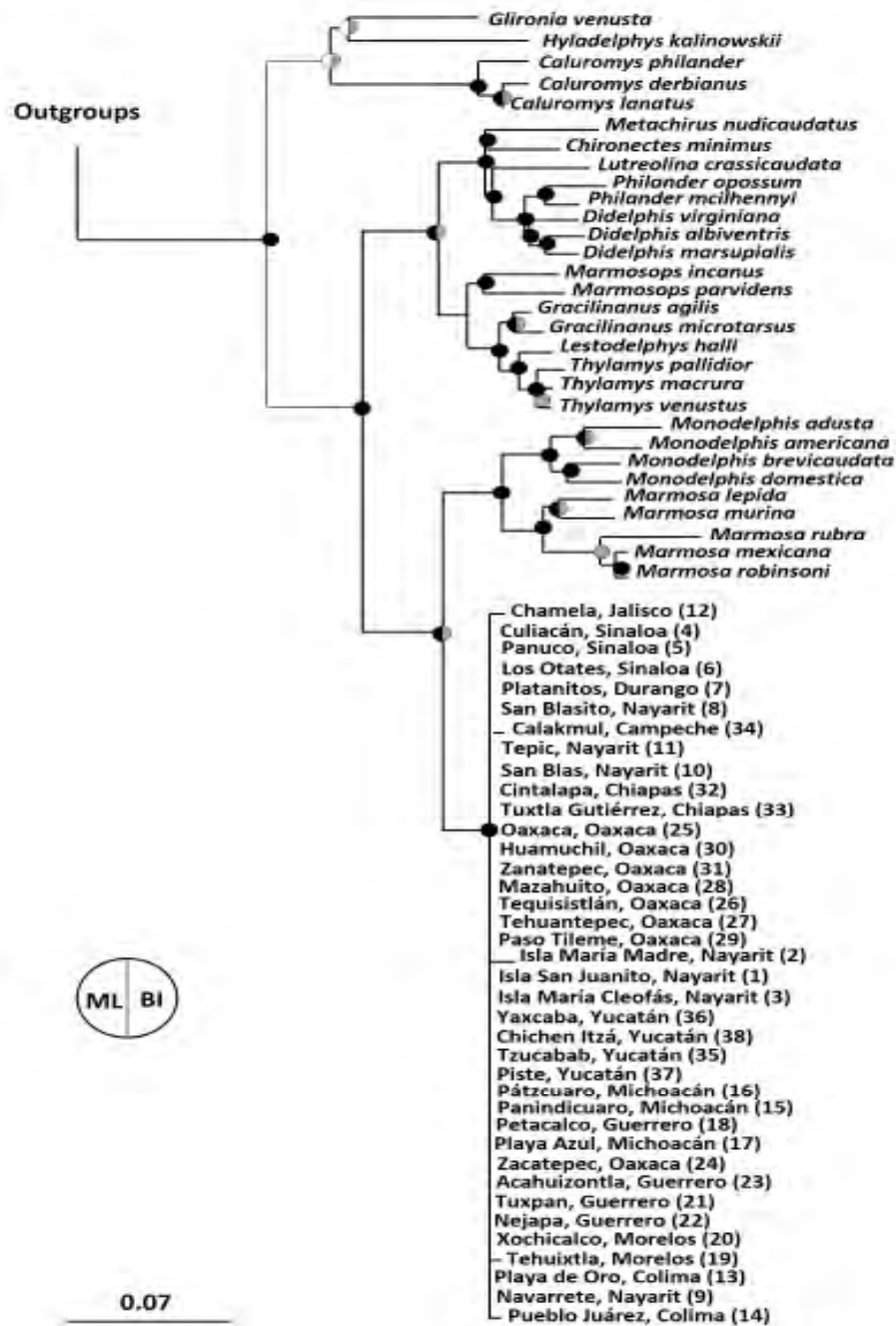
Tlacuatzin gaumeri ($n = 5$).—MÉXICO: **Campeche**: Km 5 carretera hacia la zona arqueológica de Calakmul, Mpio. Calakmul (CMUAC 754); **Yucatán**: Rancho Hobonil, 2.5 km N, 1 km W Tzucabab, Mpio. Tzucabab (ECO-SC-M 2240); Piste, Mpio. Tinum (KU 91461); Yaxcaba, Mpio. Yaxcaba (FMNH 19995); Chichen Itzá, Mpio. Tinum (FMNH 63890).

Tlacuatzin insularis ($n = 8$).—MÉXICO: **Nayarit**: Isla María Madre, Sierra Arroyo Viejo (CNMA 27512); Tres Marias Islands (USNH 89215, 89216, 89218); Tres Marias Islands, María Cleofás (USNH 512185, 512186, 512187); Tres Marias Islands, San Juanito (USNH 512188).

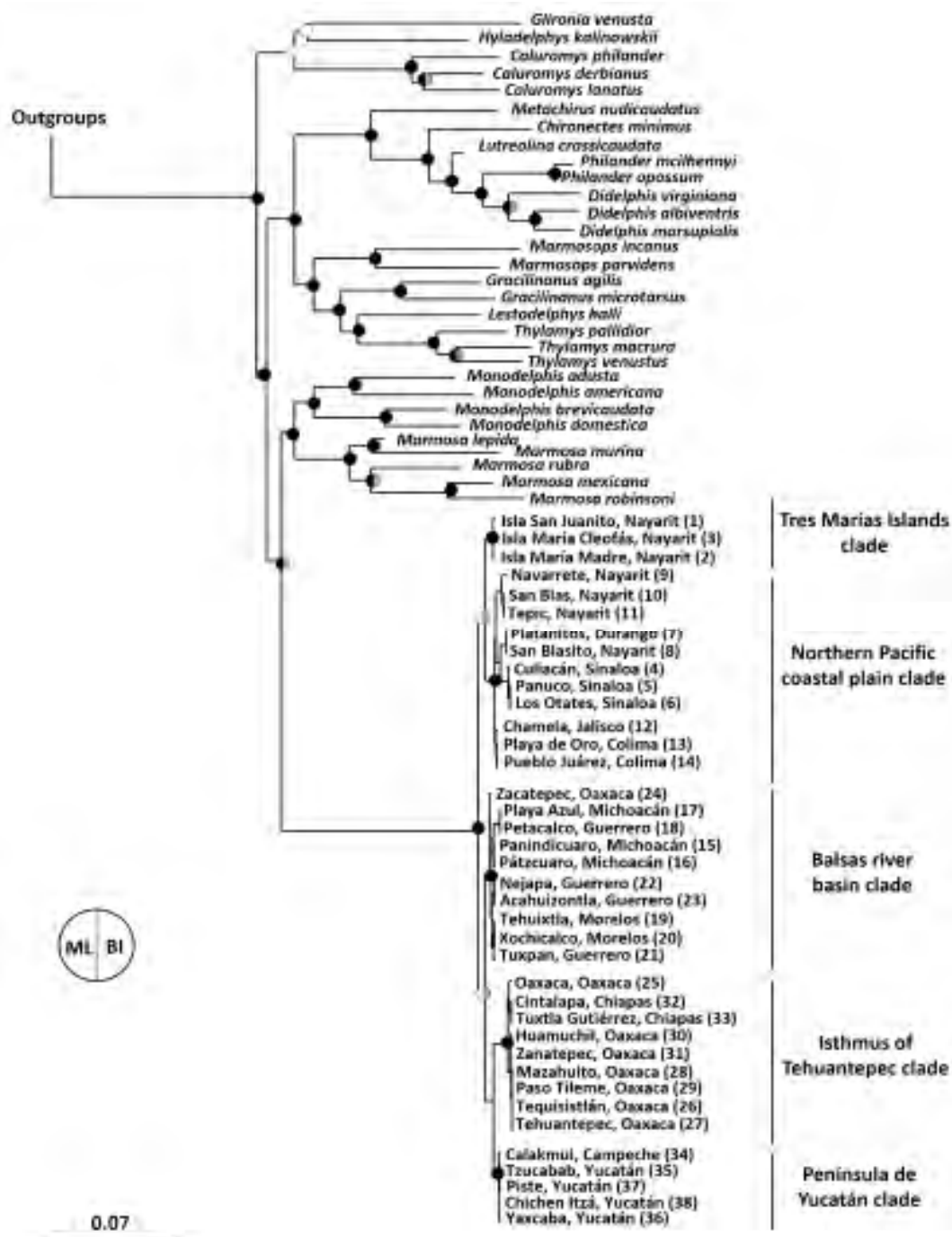
Tlacuatzin sinaloa ($n = 43$).—MÉXICO: **Colima**: La Encampanada, 6 km ESE Pueblo Juárez, Mpio. Coquimatlán (CNMA 46538, 46539); La Encampanada, 5.75 km ESE Pueblo Juárez, Mpio. Coquimatlán (CNMA 46540); Playa de Oro, Mpio. Manzanillo (CNMA 47758); 9 Km W Pueblo Juárez (ENCB 4497); Pueblo Juárez (AMNH 171947, 171948); Hacienda la Magdalena (USMNH 33283); **Jalisco**: Estación de Biología Chamela, 5.5 km SE Chamela, Mpio. La Huerta, (CNMA 42992, 43132, 43133, 43134, 43135); 7 km W Ocotlán (ENCB 32951); 1.6 km S, 5 km E Contla (ENCB 32952); **Nayarit**: 8 km NE San Blas, Mpio. San Blas (CNMA 13636); Arroyo de los Bueyes, 38.4 km N-10.1 km E Tepic, Mpio. Tepic (CNMA 35151); 3 km (by road) NE Navarrete, Mpio. San Blas (CNMA 46170); 1 km SW San Blasito, Mpio. Acaponeta (CIDHR 7507); Amatlán, Rancho Palo Amarillo (AMNH 25287); Tepic (USNH 88045); Cuautla, 1 mi S (USNH 508351); El venado, 3.5 mi E (by road); USNH 508352); Paso de Soquilpa, 8.8 mi E San Blas (USNH 508353); San Pedro Lagunillas, 2 mi E Iago (USNH 588354); Rancho Sapotito (USNH 511261, 511262); 2 mi SW San Juan de Abajo (USNH 512184); **Sinaloa**: Cerro Chinacatera, Monte largo, 60 km NW Culiacán, Mpio. Culiacán (CNMA 5720); 1.6 km W Panuco (CNMA 26123); Tatemales (AMNH 13763); Escuinapa (AMNH 24136, 24137, 24512, 24513, 24847, 24892, 24893, 24894, 24895, 24923); Mazatlán, near Mazatlán (USNH 96753); Culiacán (USNH 96754); 0.8 km W Los Ótates (TCWC 41947).



Supplementary Data S1. Bayesian phylogram of the phylogenetic relationships among didelphids and within Grayish mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) based on a partitioned analysis of the cytochrome-b gene. Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) support values are indicated by filled circles at nodes, with ML on left and BI on the right. For ML white indicates nodal support $\leq 50\%$, grey indicates nodal support between 50 and 75%, and black indicates nodal support $\geq 75\%$. For BI, grey indicates nodal support < 0.95 and black indicates nodal support ≥ 0.95 .



Supplementary Data S2. Bayesian phylogram of the phylogenetic relationships among didelphids and within Grayish mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) based on a partitioned analysis of the interphotoreceptor retinoid gene. Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) support values are indicated by filled circles at nodes, with ML on left and BI on the right. For ML white indicates nodal support $\leq 50\%$, grey indicates nodal support between 50 and 75%, and black indicates nodal support $\geq 75\%$. For BI, gray indicates nodal support < 0.95 and black indicates nodal support ≥ 95 .



Supplementary Data S3. Bayesian phylogram of the phylogenetic relationships among didelphids and within Grayish mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) based on a concatenated and partitioned analyses of two genes (cytochrome-b and interphotoreceptor retinoid-binding protein). Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) support values are indicated by filled circles at nodes, with ML on left and BI on the right. For ML white indicates nodal support $\leq 50\%$, grey indicates nodal support between 50 and 75%, and black indicates nodal support $\geq 75\%$. For BI, gray indicates nodal support < 0.95 and black indicates nodal support ≥ 95 .

Supplementary Data S4. Multivariate analysis of variance (MANOVA) performed for 13 cranio-dental variables among age categories of 4 clades resulting from the phylogenetic analysis and 2 subspecies of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*); analyses among age categories were not conducted on Tres Marias Islands clade and *Tlacuatzin canescens insularis* because all specimens examined for this region and subspecies were adults. Significant differences ($P \leq 0.05$) are marked with an asterisk (*). F value (F); F probability ($Pr > F$). Abbreviations of variables are described in “Materials and Methods”.

Variable	Clades												Subspecies			
	Isthmus of Tehuantepec		Balsas river basin		Peninsula de Yucatán		Northern Pacific coastal plain		<i>T. canescens canescens</i>		<i>T. canescens gaumeri</i>					
	F	$Pr > F$	F	$Pr > F$	F	$Pr > F$	F	$Pr > F$	F	$Pr > F$	F	$Pr > F$				
CBL	0.200	0.658	2.901	0.078	1.228	0.330	1.194	0.282	10.149	0.0001*	1.228	0.330				
NB	0.448	0.508	1.028	0.376	0.003	0.961	0.452	0.466	4.927	0.009*	0.003	0.961				
NL	0.126	0.726	2.918	0.077	3.364	0.141	4.296	0.045*	8.947	0.0002*	3.364	0.141				
LIB	12.537	0.001*	1.370	0.277	2.095	0.221	0.532	0.470	4.616	0.0123*	2.095	0.221				
ZB	0.023	0.882	2.306	0.126	4.411	0.104	0.579	0.451	8.068	0.0005*	4.411	0.104				
PL	0.061	0.807	3.820	0.039*	6.010	0.070	6.293	0.016*	19.310	>0.0001*	6.010	0.070				
PB	0.111	0.741	0.526	0.599	0.344	0.589	0.477	0.494	0.802	0.451	0.344	0.589				
MTR	0.077	0.783	0.591	0.563	0.340	0.591	0.433	0.514	5.093	0.008*	0.340	0.591				
LM	0.715	0.405	2.985	0.073	0.007	0.939	0.295	0.590	3.589	0.0315*	0.007	0.939				
M1—M3	0.104	0.749	0.106	0.900	1.638	0.270	0.817	0.371	3.011	0.054	1.638	0.270				
WM3	1.193	0.284	0.482	0.625	0.166	0.705	0.685	0.413	2.247	0.111	0.166	0.705				
BW	0.489	0.490	1.399	0.270	0.352	0.585	0.011	0.916	1.604	0.206	0.352	0.585				
IBM	0.058	0.811	1.594	0.228	0.119	0.747	5.716	0.022*	6.641	0.002*	0.119	0.747				

Supplementary Data S5. Multivariate analysis of variance (MANOVA) performed for 13 cranio-dental variables between males and females of 4 clades resulting from the phylogenetic analysis and 2 subspecies of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*); analyses were not conducted on the Peninsula de Yucatán clade and *Tlacuatzin canescens gaumeri* because all examined specimens from this region and subspecies were males. Significant differences ($P \leq 0.05$) are marked with an asterisk (*). F value (F); F probability ($Pr > F$). Abbreviations of variables are described in “Materials and Methods”.

Variable	Clade												Subspecies			
	Isthmus of Tehuantepec		Tres Mariás Islands		Balsas river basin		Northern Pacific coastal plain		<i>T. canescens canescens</i>		<i>T. canescens insularis</i>		F	$Pr > F$		
CBL	0.627	0.439	24.308	0.002*	2.933	0.102	2.215	0.145	7.001	0.009*	24.308	0.002*				
NB	0.062	0.807	7.969	0.026*	1.944	0.178	3.679	0.063	3.929	0.051	7.969	0.026*				
NL	4.027	0.061	9.148	0.019*	3.190	0.089	8.550	0.006*	14.247	0.0003*	9.148	0.019*				
LIB	0.848	0.370	31.348	0.001*	2.633	0.120	5.379	0.026*	8.878	0.003*	31.348	0.001*				
ZB	0.628	0.439	11.674	0.014*	2.717	0.114	2.225	0.145	5.156	0.026*	11.674	0.014*				
PL	2.810	0.112	27.171	0.001*	2.866	0.105	3.884	0.056	9.888	0.002*	27.171	0.001*				
PB	0.237	0.633	4.651	0.068	0.759	0.393	0.846	0.364	2.106	0.150	4.651	0.068				
MTR	3.533	0.077	19.047	0.003*	0.358	0.556	4.490	0.041*	8.905	0.003*	19.047	0.003*				
LM	1.280	0.274	3.273	0.113	0.150	0.702	3.080	0.088	4.501	0.037*	3.273	0.113				
M1—M3	0.986	0.335	0.094	0.768	0.617	0.441	2.066	0.159	3.570	0.062	0.094	0.768				
WM3	0.001	0.980	0.333	0.582	0.063	0.805	0.417	0.523	0.191	0.663	0.333	0.582				
BW	1.120	0.305	3.150	0.136	1.619	0.217	0.316	0.578	1.859	0.176	3.150	0.136				
IBM	2.004	0.175	2.378	0.167	3.977	0.059	0.645	0.427	2.302	0.133	2.378	0.167				

Supplementary Data S6. Univariate statistics of external and cranio-dental variables from the 5 clades resulting from the phylogenetic analysis and 3 subspecies of the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*). Calculations are based on adult specimens. Abbreviations of variables are described in Materials and Methods.

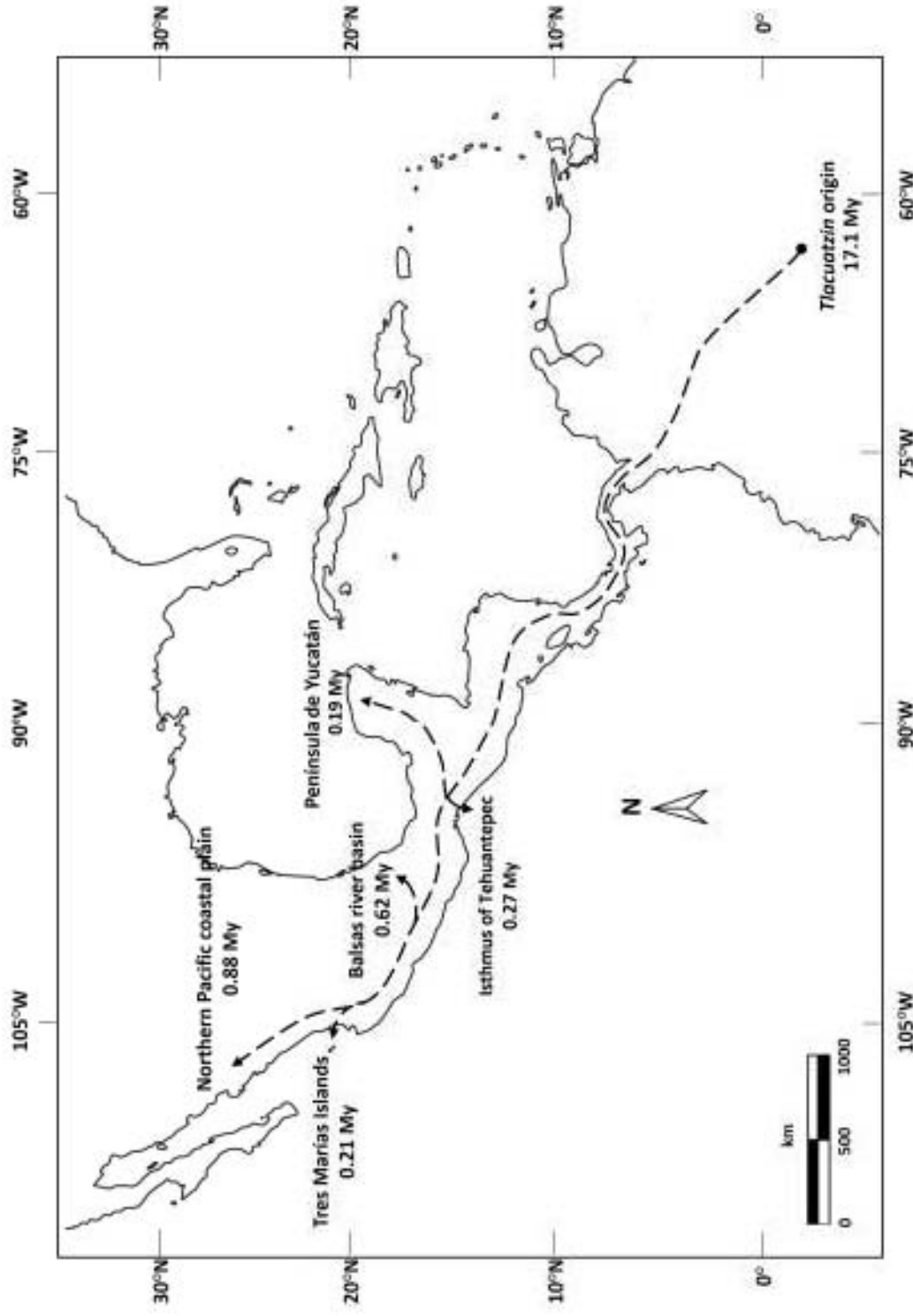
Variables	Isthmus of Tehuantepec	Clade				Subspecies		
		Península de Yucatán	Tres Mariás Islands	Northern Pacific coastal plain	Balsas river basin	<i>T. canescens canescens</i>	<i>T. canescens gaumeri</i>	<i>T. canescens insularis</i>
TL								
Mean \pm SD	232 \pm 34	216 \pm 21	247 \pm 24	228 \pm 29	248 \pm 31	236 \pm 31	215 \pm 21	247 \pm 24
Range	281–172	230–201	283–210	290–195	302–205	302–172	230–201	283–210
<i>n</i>	10	2	7	28	19	57	2	7
LT								
Mean \pm SD	124 \pm 13	120 \pm 14	145 \pm 10	125 \pm 17	131 \pm 16	127 \pm 16	120 \pm 14	145 \pm 10
Range	144–105	130–110	162–131	155–104	158–100	158–100	130–110	162–131
<i>n</i>	9	2	7	27	19	55	2	7
HB								
Mean \pm SD	18 \pm 2	15 \pm 1	18 \pm 2	17 \pm 2	18 \pm 2	18 \pm 2	15 \pm 1	18 \pm 2
Range	20–16	16–15	20–15	22–15	22–15	22–15	16–15	20–15
<i>n</i>	9	2	7	28	19	56	2	7
E								
Mean \pm SD		17 \pm 5	24 \pm 2	22 \pm 3	22 \pm 3	22 \pm 3	17 \pm 5	24 \pm 2
Range		20–14	26–22	26–13	26–15	26–13	20–13.5	26–22
<i>n</i>	1	2	5	25	13	38	5	5
CBL								
Mean \pm SD	30.6 \pm 2.6	28.2 \pm 0.2	30.0 \pm 1.4	29.4 \pm 2.5	31.7 \pm 2.8	30.3 \pm 2.7	28.2 \pm 0.2	30.0 \pm 1.4
Range	35.8–27.0	28.4–28.1	31.6–28.1	34.5–26.1	37.4–27.8	37.4–26.1	28.4–28.1	31.6–28.1
<i>n</i>	16	2	8	30	17	63	2	8

NB	Mean \pm SD	3.4 \pm 0.5	3.1 \pm 0.3	4.0 \pm 0.3	3.4 \pm 0.4	3.8 \pm 0.5	3.5 \pm 0.5	3.1 \pm 0.3	4.0 \pm 0.3
	Range	4.2–2.3	3.3–2.9	4.2–3.7	4.5–2.8	5.0–2.9	5.0–2.3	3.3–2.9	4.2–3.7
	<i>n</i>	22	2	8	38	21	81	2	8
NL	Mean \pm SD	14.3 \pm 1.1	13.1 \pm 0.2	14.7 \pm 0.9	14.0 \pm 1.4	15.5 \pm 1.8	14.5 \pm 1.6	13.1 \pm 0.2	14.7 \pm 0.9
	Range	16.6–12.2	13.3–13.0	16.1–13.5	16.6–11.0	18.8–12.3	18.8–11.1	13.3–13.0	16.1–13.5
	<i>n</i>	14	2	8	38	19	71	2	8
LB	Mean \pm SD	4.8 \pm 0.4	4.4 \pm 0.3	4.8 \pm 0.2	4.6 \pm 0.5	5.2 \pm 0.7	4.8 \pm 0.6	4.4 \pm 0.3	4.8 \pm 0.2
	Range	5.5–4.1	4.6–4.2	5.1–4.5	5.9–4.0	6.8–4.0	6.8–3.9	4.6–4.2	5.1–4.5
	<i>n</i>	22	2	8	37	21	80	2	8
ZB	Mean \pm SD	17.6 \pm 1.3	16.2 \pm 0.4	16.3 \pm 1.0	16.5 \pm 1.5	18.3 \pm 2.2	17.3 \pm 1.8	16.2 \pm 0.4	16.3 \pm 1.0
	Range	20.1–15.7	16.4–15.9	17.9–15.3	19.8–14.8	22.3–15.7	22.3–14.8	16.4–15.9	17.9–15.3
	<i>n</i>	19	2	7	30	19	68	2	7
PL	Mean \pm SD	17.4 \pm 1.3	15.8 \pm 0.6	17.3 \pm 0.8	16.6 \pm 1.3	18.2 \pm 1.4	17.2 \pm 1.4	15.8 \pm 0.6	17.3 \pm 0.8
	Range	20.4–15.0	16.2–15.4	18.3–16.1	19.8–14.8	20.5–15.6	20.5–14.8	16.2–15.4	18.3–16.1
	<i>n</i>	21	2	8	35	19	75	2	8
PB	Mean \pm SD	10.2 \pm 0.7	9.5 \pm 0.1	9.7 \pm 0.5	9.6 \pm 0.7	10.2 \pm 0.7	9.9 \pm 0.8	9.5 \pm 0.1	9.7 \pm 0.5
	Range	12.1–9.0	9.5–9.4	10.6–9.0	11.4–7.8	11.6–9.1	12.1–7.8	9.5–9.4	10.6–9.0
	<i>n</i>	22	2	8	38	20	80	2	8
MTR	Mean \pm SD	12.7 \pm 0.8	11.8 \pm 0.6	12.5 \pm 0.5	12.0 \pm 0.7	12.9 \pm 0.6	12.4 \pm 0.8	11.8 \pm 0.6	12.5 \pm 0.5
	Range	14.2–11.2	11.9–11.8	13.2–11.6	13.7–10.5	14.4–11.7	14.4–10.5	11.9–11.8	13.2–11.6
	<i>n</i>	21	2	8	38	20	79	2	8
LM	Mean \pm SD	6.7 \pm 0.2	6.1 \pm 0.6	6.3 \pm 0.2	6.2 \pm 0.2	6.5 \pm 0.1	6.4 \pm 0.3	6.1 \pm 0.6	6.3 \pm 0.2
	Range	7.1–6.3	6.12–6.0	6.6–6.0	6.7–5.9	6.7–6.2	7.1–5.9	6.1–6.0	6.6–6.0
	<i>n</i>	21	2	8	37	21	79	2	8

MI-M3									
Mean \pm <i>SD</i>	5.7 \pm 0.2	5.2 \pm 0.2	5.4 \pm 0.1	5.3 \pm 0.2	5.6 \pm 0.2	5.5 \pm 0.3	5.2 \pm 0.2	5.4 \pm 0.1	
Range	6.0–5.3	5.2–5.1	5.6–5.3	5.9–4.9	5.9–5.3	6.0–4.9	5.2–5.1	5.6–5.3	
<i>n</i>	21	2	8	37	21	79	2	8	
WM3									
Mean \pm <i>SD</i>	2.3 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	
Range	2.5–1.9	2.1–2.0	2.4–2.0	2.5–1.8	2.4–2.0	2.5–1.8	2.1–2.0	2.4–2.0	
<i>n</i>	21	2	8	37	21	79	2	8	
BW									
Mean \pm <i>SD</i>	2.4 \pm 0.2		2.5 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2	2.5 \pm 0.3	2.4 \pm 0.2		2.5 \pm 0.2	
Range	2.7–2.0		2.8–2.2	2.7–2.0	3.3–2.3	3.3–2.0		2.8–2.2	
<i>n</i>	18	1	7	26	12	56	1	7	
IBW									
Mean \pm <i>SD</i>	5.1 \pm 0.5		4.5 \pm 0.4	4.7 \pm 0.4	4.9 \pm 0.6	4.9 \pm 0.5		4.5 \pm 0.4	
Range	6.0–4.4		5.0–3.9	5.8–4.0	6.4–4.0	6.4–4.0		5.0–3.9	

Supplementary Data S7. Multivariate analysis of variance (MANOVA) performed for 13 cranio-dental variables among age categories and between males and females of *Marmosa* and *Monodelphis* genera. Significant differences ($P \leq 0.05$) are marked with an asterisk (*). F value (F); F probability ($Pr > F$). Abbreviations of variables are described in “Materials and Methods”.

Variable	<i>Marmosa</i>			<i>Monodelphis</i>		
	Ontogenetic variation F	Sexual dimorphism $Pr > F$	Sexual dimorphism F	Ontogenetic variation F	Sexual dimorphism $Pr > F$	Sexual dimorphism F
CBL	7.585	0.002*	3.101	5.834	0.025*	2.619
NB	9.361	0.0006*	0.150	3.902	0.060	3.802
NL	7.754	0.002*	0.715	4.367	0.050	2.576
LIB	2.696	0.083*	2.945	1.083	0.309	0.008
ZB	4.975	0.014*	0.090	6.215	0.022*	2.334
PL	8.920	0.0009*	3.534	7.129	0.015*	2.482
PB	2.697	0.083	0.496	2.578	0.010*	4.606
MTR	2.183	0.130	6.214	2.374	0.045*	25.249
LM	0.141	0.868	0.865	0.374	0.367	0.078
M1-M3	0.497	0.612	3.562	5.847	0.027*	1.483
WM3	7.975	0.001*	0.968	0.524	0.479	0.095
BW	0.264	0.769	2.840	3.058	0.105	0.171
IBM	5.938	0.008*	1.033	5.384	0.033*	0.877



Supplementary Data S8. Diversification of the Grayish mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) in five mitochondrial clades during the Pleistocene.

CAPÍTULO II

Twenty-four microsatellite markers for the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*): development from illumina paired-end sequences

Twenty-four microsatellite markers for the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*): development from illumina paired-end sequences

Jésica Arcangeli · Fernando A. Cervantes ·
Stacey L. Lance · Ma. Isabel Salazar ·
Jorge Ortega

Received: 19 October 2012 / Accepted: 29 October 2012
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Abstract *Tlacuatzin canescens* is an opossum species endemic to Mexico from southern Sonora to Oaxaca, with populations in Tres Mariás Islands and in central Peninsula of Yucatan. A technique based on Illumina paired-end sequencing of a library highly enriched for microsatellite repeats was used to develop loci. Twenty-four polymorphic (tri- and tetranucleotide) microsatellites were developed and tested as markers in the target species. All markers were genotyped on 18 different individuals from distinct locations. We observed medium to low genetic variation across most loci (mean number of alleles per locus = 8).

Levels of expected heterozygosity across all markers was fairly low (mean $H_E = 0.477$, mean $H_D = 0.480$).

Keywords Illumina · PAL_FINDER · Microsatellites · *Tlacuatzin canescens*

J. Arcangeli · F. A. Cervantes
Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153, 04510 México, Distrito Federal, México

J. Arcangeli
Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, 04510 México, Distrito Federal, México

S. L. Lance
Savannah River Ecology Laboratory, University of Georgia, Aiken, SC 29803, USA

Ma. I. Salazar
Laboratorio de Inmunología Celular e Inmunopatogénesis, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Sto. Tomás, 11340 México, Distrito Federal, México

J. Ortega (✉)
Laboratorio de Ictiología y Limnología, Posgrado en Ciencias Químico-biológicas, Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Sto. Tomás, 11340 México, Distrito Federal, México
e-mail: artibeus2@aol.com

The gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) is an endemic Mexican marsupial (Ramírez-Pulido et al. 2005), occurring in seasonally dry tropical forest along the Pacific versant from south Sonora to Chiapas; through the Balsas river basin, with some isolated populations occurring in the Peninsula of Yucatán and in Tres Mariás Islands (Voss and Jansa 2003). Its dorsal fur is gray or brownish gray with a black mask around eyes and color white or cream in ventral area. The ears are broad, rounded and naked; its tail is prehensile, naked except in the base and faintly bicolor; pouch is absent in females (Zarza et al. 2003). Referring to its taxonomic status, after a combined analysis with molecular and morphological data, authors concluded that *Marmosa canescens* diverged from other species of the genera, and was nominated *Tlacuatzin*, the náhuatl word for "opossum" (Voss and Jansa 2003). Likewise, recent phylogenetic studies show that this genus is related with the genera *Marmosa* and *Monodelphis* although their relationships are not defined yet (Voss and Jansa 2009).

Tissue samples (muscle and liver) were collected and kept in alcohol (96 %), from 18 wild individuals of *T. canescens* from all its distributional range in Mexico. We also, collected skin samples that were washed with STE (NaCl 0.1 M, Tris 0.05 pH 7.5, EDTA 0.001 M) to hydrate and eliminate impurities (Hillis et al. 1996). DNA was extracted following instructions of the Qiagen protocol (Blood and Tissue Kit, Cat No. 69504). Samples from 2 voucher individuals were used to develop the

Table 1 Primer sequences and characteristics of the 24 microsatellites isolated for *T. crumenon*

Microsat	Primer (forward)	Primer (reverse)	Motif	R _L	R _R	Alleles range	Amplifying T
Thera115	5AMGAAATZAAATAGT AAACTGCTCTGGC	GGCTGACACAGATTAAGCTTGC	AAAG ₇₋₉	0.782	0.771	124–132	56
Thera151	5AMGGTCAATGAGCTTTGT CAATTTTAGG	GGAAACAGAAAGCCACGAGAGGG	ATCT ₁₀₋₁₄	0.456	0.426	175–250	60
Thera186	5AMGCCATTTATGAAAGCA GAGACAAAGC	AAATGGGTTTGAGAGGCCC	ATCT ₁₀₋₁₄	0.394	0.393	112–160	60
Thera189	5AMTTGACAGCTATAATGG TTCTACAAACTTGC	ATNCAGCATGGATTTCCAAAGGTAGG	AAAG ₁₀₋₁₄	0.256	0.250	226–280	56
Thera227	5AMCATTCCTCCAGCCCTT CCC	GAGCTGGCCACTGATTTGG	TTCG ₁₂₋₁₄	0.741	0.739	110–196	60
Thera311	5AMAGCCCTCCTAGAATG GGAGC	TGAAATCCAGTGGAGCTGACATCG	ATNC ₁₀₋₁₄	0.563	0.555	215–275	60
Thera413	5AMTGTGTTGTTGTAAGGA CTGTGGC	CAAACTGCTCTCCAGCTTGC	ATCT ₁₀₋₁₄	0.451	0.443	168–182	58
Thera586	5AMAAAGCATGTTGGGTTT GGAGC	CACACATATCTCCGCGGTTTGC	ATNC ₁₀₋₁₄	0.371	0.352	316–324	60
Thera590	5AMGGAACAGCTGACAAAC TGTTGTATTC	GGTCTAGTCTTTATCCATGCTGGC	TCTG ₁₀₋₁₄	0.562	0.668	244–256	60
Thera594	5AMCTTAGGGAAATGGAGT TTGCG	TTTGTGCTAGATTTGCTGCTGGC	AAAC ₁₀₋₁₄	0.215	0.220	164–210	60
Thera596	5AMACAGGCCACACTCAA TGAGC	TGGAGACCAGAGAGACTTGG	AGCG ₁₀₋₁₄	0.316	0.325	114–182	58
Thera770	5AMHQAATGGATAGAGG ATGGGC	GGAAATGCTAAATTTTATCAATGGC	ATCT ₁₀₋₁₄	0.478	0.485	325–330	60
Thera118	5AMCACAATGCTCTCAGA ACTTCAGCC	AAACATGCTGCATAAACTTTTGG	ATC ₁₀₋₁₄	0.258	0.241	88–117	60
Thera122	5AMCTGCGCTCACAGGAG TTTACC	GGCAGCTGCTGTAGAGATGC	ATT ₁₀₋₁₄	0.145	0.157	212–236	60
Thera124	5AMCAGCACAAATGGCTCT GTGG	GCATAGATTGAAAGCTTTGAGGC	AACT ₁₀₋₁₄	0.021	0.089	172–198	58
Thera126	5AMGAACTCCAGCCAAATC ALATAGG	TTTCTCTGGATTTCTAGAGGAGCC	AACT ₁₀₋₁₄	0.774	0.752	222–198	60
Thera135	5AMGABAAGGAAAGATAC TCCAGAGGCC	TCAAAGTCCAGGCGCAAGAGGG	TTC ₁₀₋₁₄	0.554	0.621	318–344	60

Table 1 continued

Microsat	Primer (forward)	Primer (reverse)	Motif	H _e	H _o	Alleles range	Annealing °C
Thasna137	FAM-TCACCTGATTTTGTCC CAAGC	CACTGACCCCTGGAGACCACC	ATC ₍₃₀₎	0.881	0.893	124–132	60
Thasna146	FAM-TCACCCCTAACATCTAT TATTCCTATTCC	CAGGGAGTGCATCAGTTAGGG	AGT ₍₂₇₎	0.335	0.371	250–271	60
Thasna153	FAM-CCCTGCTGTGATGAGC AOC	CCAAATTCCAACTCCGCC	TGC ₍₂₄₎	0.477	0.513	217–223	58
Thasna163	FAM-AACAACGATGCTCTC AAAGTCC	TTTGGTTTGAGCTTCAGTTTGG	ATC ₍₂₄₎	0.812	0.796	114–138	56
Thasna173	FAM-TCTTCTCAATCCTCTT ATGCG	TTGCCAAATCTTAGAGTCTTTGATGG	ATC ₍₂₁₎	0.475	0.462	236–298	60
Thasna187	FAM-CTGGAGTCAAAGGCTC ATGGG	AGGCAACAACAGCCACAGC	CGG ₍₂₁₎	0.374	0.386	186–214	60
Thasna203	FAM-TTGGCTGGGAGAGAC CTAGC	CCTCTGTCTATCCGCCCTCC	TGC ₍₁₈₎	0.614	0.652	245–269	60

microsatellites. An Illumina paired-end shotgun library was prepared by shearing 1 µg of DNA using a Covaris S220 and following the standard protocol of the Illumina TruSeq DNA Library Kit and using a multiplex identifier adaptor index. This library was pooled with those from other species and Illumina sequencing was conducted on the HiSeq with 100 bp paired-end reads. Five million of the resulting reads were analyzed with the program *PAL_FINDER_v0.02.03* (Castoe et al. 2012) to extract those reads that contained di-, tri-, tetra-, penta-, and hexanucleotide microsatellites. Once positive reads were identified in *PAL_FINDER_v0.02.03* they were batched to a local installation of the program Primer3 (version 2.0.0) for primer design.

We recovered 7,048 unique loci (30 hexa, 64 penta, 1,062 tetra, 1,595 tri and 4,297 dinucleotide), but only 24 were chosen for polymerase chain reaction (PCR) trials. We selected only tri- and tetra-nucleotide motifs because they had the most perfect and large repeats, increasing the chance of having more polymorphism (Weber 1990). We directly labelled forward primers (FAM) for each of the chosen loci. PCR reactions were performed in a 15 µL volume containing 30 ng of DNA, 0.3 mM of dNTP's, 0.5 µM of each primer, 1× *Taq* buffer (2.0 µM of MgCl₂, 10 mM of Tris-HCl, 50 mM of KCl), 2.5× of BSA, and 1.0 U of *Flexi**Taq* polymerase (PROMEGA). PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 92 °C for 1 min, gradient temperature for 1 min (range from 49 to 60 °C), and 72 °C for 60 s, and ending with 72 °C for 1 min. Exact annealing temperatures for each primer are given in Table 1. We visualized the product by electrophoresis on 1.5 % agarose gel. Markers were tested for amplification success, polymorphism and specificity in 18 individuals of *T. canescens* from distinct locations of Mexico.

The results of the microsatellite profiles were examined using GENEMAPPER (Applied Biosystems) and peaks were scored by hand. We estimated the proportion of polymorphic loci and the average of number of alleles per locus by using the GDA software (Lewis and Zaykin 2001), and the observed (H_o) and the expected heterozygosity (H_e), linkage disequilibrium and Hardy-Weinberg proportions using POPGENE (Yeh and Boyle 1997). MICROCHECKER was used to screen null alleles in each locus (van Oosterhout et al. 2004).

All 24 loci were polymorphic, and we were able to get proper amplification (Table 1). We found moderate levels of allelic richness, with an average of 8 alleles per locus because we screened individuals from its entire distributional range. We did not observe loci out of Hardy-Weinberg equilibrium. Levels of H_e ranged from medium-low to high for all markers (mean H_e = 0.477, and mean H_o = 0.480). There was no evidence of null alleles. These

particular molecular markers represent important resource for landscape genetic studies and population analyzes to *T. canescens*, with a particular potential application to the other two genera of the mouse opossum group (*Marmosa* and *Thylamys*), and other members of the Didelphidae family.

Acknowledgments Financial support was provided by CONACyT Ciencia Básica (156725). Some tissue samples were obtained from field work supported by UNAM through grant PAPIIT (222206-2). Jéssica Arcangeli thanks Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, and presents this paper as a requirement to obtain Ph. D. degree. Tissue samples/museum specimens were provided by C. López-González (CIDIR-Durango), and C. Lorenzo (ECOSUR-SC-M). Manuscript preparation was partially supported by the DOE under Award Number DE-FC09-07SR22506 to the University of Georgia Research Foundation. Jéssica Arcangeli is supported by a scholarship provided by CONACyT (23059) as a Ph.D. student in Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

References

- Casao TA, Poole AW, de Koning APJ, Jones KL, Tomback DF, Oyley-McCaule SJ, Fike JA, Lance SL, Streicher JW, Smith EN, Pollack DD (2012) Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *PLoS ONE* 7:e30953
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK (1996) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA
- Lewis P, Zaykin D (2001) *Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic data*. Version 1.0 (d16c). <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewis/home/software.html>. Consulted on september 2012
- Ramírez-Pulido J, Arroyo-Caballero J, Castro-Campillo A (2005) Estado actual y relación nomenclatural de los mamíferos terrestres de México. *Acta Zool Mexicana, nueva ser* 21:21–82
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Voss RS, Jansa SA (2003) Phylogenetic studies on Didelphids II. Nonmolecular data and new *Irbis* sequences: separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxon sampling. *Bull Am Mus Nat Hist* 276:1–82
- Voss RS, Jansa SA (2009) Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of the New World metatherian mammals. *Bull Am Mus Nat Hist* 322:1–177
- Weber JL (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7:524–530
- Yeh C, Boyle B (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg J Bot* 129:157
- Zarza H, Ceballos G, Steele MA (2003) *Marmosa canescens*. *Mammal Species* 725:1–4

CAPÍTULO III

Genética poblacional del ratón tlacuache (*Tlacuatzin canescens*) evaluada con DNA mitocondrial y microsatélites

Genética poblacional del ratón tlacuache (*Tlacuatzin canescens*) evaluada con DNA mitocondrial y microsátélites

Jésica Arcangeli* , Jessica E. Ligth, Jorge Ortega & Fernando A. Cervantes

Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Ciudad Universitaria 3000, C. P. 04360, Coyoacán, Ciudad de México, México (JA)

Colección Nacional del Mamíferos, Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. A. P. 70-153, C. P. 04510, Ciudad de México, México (JA, FAC)

Department of Wildlife and Fisheries Sciences, Texas A &M University, College Station, Texas 77843, USA. (JEL)

Laboratorio de Ictiología y Limnología, Posgrado en Ciencias Quimicobiológicas, Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Sto. Tomas, 11340, Ciudad de México, Mexico (JO)

* *Correspondent: jeaa@st.ib.unam.mx*

RESUMEN

Desde el punto de vista filogenético el género *Tlacuatzin* es un grupo monofilético compuesto por cinco clados bien diferenciados tanto genética como morfológicamente. A pesar de que existen numerosos trabajos sobre su biología, la diversidad genética de sus poblaciones ha sido escasamente estudiada con marcadores moleculares. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue documentar la diversidad genética de este taxón con base en DNA mitocondrial y microsátélites. La diversidad genética del gen mitocondrial citocromo-*b* se evaluó mediante el número de haplotipos y el cálculo de las diversidades haplotípica y nucleotídica; mientras que la variación genética de los microsátélites se evaluó por medio del número de alelos, alelos únicos, su frecuencia y la heterocigosidad. Adicionalmente, se hicieron análisis de demografía histórica y diferenciación poblacional para conocer algunas características de la estructura poblacional. Los resultados mostraron

altos niveles de diversidad en los clados filogenéticos, así como una alta diferenciación genética (estructura poblacional) entre clados. Asimismo, los análisis de demografía histórica sugieren un crecimiento poblacional rápido a partir de un tamaño poblacional pequeño. Así, nuestros resultados apoyan los cambios nomenclaturales sugeridos para el género en el capítulo I, por lo que se cumplió el objetivo de documentar la diversidad genética de este marsupial utilizando DNA mitocondrial y microsatélites.

Palabras clave: didelphimorphia, endémico, diversidad genética, marcadores moleculares, marsupial, México

ABSTRACT

The gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*) form a monophyletic group that is composed of five clades well differentiated both morphologically and genetically. Although there are several studies about the biology of these marsupials, the genetic variation of their populations had been poorly studied using molecular markers. Therefore, the aim of the present chapter was to document the genetic diversity of this taxon base on DNA mitochondrial and microsatellites. Genetic diversity of the mitochondrial cytochrome-*b* gene was evaluated through the number of haplotypes and the haplotype and nucleotide diversities, while the genetic variation in microsatellites was assessed through the number of alleles, unique alleles, frequency and heterozygosity. In addition, we performed analyses of historical demography and genetic differentiation to document several characteristics of the population structure. The results showed high levels of diversity in the five clades, as well as a high genetic differentiation (population structure) among them. Likewise, historical demography analyses suggested rapid population growth from a small population size. Thus, our results support the nomenclatural changes suggested for the genus in Chapter I, and therefore, the objective of documenting the genetic diversity of this marsupial using mitochondrial DNA and microsatellites was fulfilled.

Key words: didelphimorphia, endemic, genetic diversity, marsupial, México, molecular markers

La diversidad genética es un componente clave en la conservación de las especies ya que es un indicador de su estado de conservación, el cual está directamente relacionado con la adecuación y la capacidad de las especies para adaptarse a un ambiente en constante cambio (Frankham et al. 2010; Villalobos y Mendoza-Vega 2010). Es decir, las especies con una variabilidad genética alta podrán adaptarse mejor y dejar más descendientes, mientras que en especies con una diversidad genética baja la adaptación será limitada aumentando el riesgo de extinción (Firestone et al. 2000). Tal es el caso del tigre de Tasmania (*Thylacinus cynocephalus*), el cual exhibía niveles de diversidad genética muy bajos antes de su extinción (Menzies et al. 2012).

Usualmente, la diversidad genética de una especie se evalúa utilizando marcadores moleculares, entre los que destacan por sus características el DNA mitocondrial y los microsátélites, los cuales brindan información sobre los parámetros poblacionales, genéticos y demográficos (Sunnucks 2000). El DNA mitocondrial es una molécula circular que se hereda a través del linaje materno y que tiene una tasa de mutación muy elevada; razón por la cual, es ampliamente utilizado para documentar la variación intraespecífica (Sunnucks 2000; Rentería 2007; Nabholz et al. 2008). Esta variación se evalúa en relación al número de haplotipos, el número de sitios en donde existe una mutación (sitios segregados) y el número de nucleótidos que son diferentes entre dos secuencias (diversidad nucleotídica; Hamilton 2009). Asimismo, este marcador molecular es de mucha utilidad para inferir las relaciones filogenéticas entre especies estrechamente relacionadas o evaluar hipótesis filogeográficas (Piñero et al. 2008).

Entre los genes mitocondriales más utilizados se encuentra en gen citocromo-*b* (*Cytb*), el cual ha sido exitosamente amplificado en mamíferos silvestres, particularmente en roedores y quirópteros (Bradley y Baker 2001). De igual forma, este marcador ha sido utilizado en los otros grupos, como el Orden Didelphimorphia, específicamente los géneros *Monodelphis* y *Marmosa* (Pavan et al. 2014; Voss et al. 2014). Adicionalmente, en el género *Didelphis* se ha empleado el gen citocromo oxidasa subunidad I para documentar la variación genética presente en *D. virginiana*, *D. marsupialis* y *D. albiventris* (Cervantes et al. 2010; Sousa et al. 2012). Asimismo, la región control de la mitocondria ha sido utilizada para evaluar la diversidad genética de algunos marsupiales australianos, por

ejemplo los canguros del género *Macropus* (Eldridge 2010; Neaves et al. 2010). Por lo tanto, el DNA mitocondrial ha sido de gran utilidad en el estudio de la genética poblacional de los marsupiales del Nuevo y del Viejo Mundo.

Los microsatélites son secuencias cortas, de dos a seis nucleótidos, que se repiten en tándem un número elevado de veces y que están delimitadas por secuencias altamente conservadas (González 2003; Akemi et al 2012). Los microsatélites presentan una tasa de mutación muy alta y son marcadores codominantes que siguen los patrones de herencia mendeliana (Akemi et al. 2012; Oliveira et al. 2000). Entre sus principales aplicaciones se encuentra la de describir la diversidad genética de una especie, lo que se hace en términos del polimorfismo, la frecuencia de los alelos y la heterocigosidad esperada (H_E ; Frankham et al. 2010). Los microsatélites pueden revelar la estructura poblacional de las especies e identificar cuellos de botella, hibridación entre especie o depresión por endogamia (González 2003; Akemi et al 2012).

Existen un gran número de trabajos que evalúan la diversidad genética de mamíferos silvestres a través de los microsatélites. En lo que concierne a los marsupiales, este grupo ha sido ampliamente estudiado en la región australiana siendo las especies más carismáticas, como el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisii*), en las que más se ha aplicado esta herramienta (Eldridge 2010). En contraste, los marsupiales del continente americano han sido poco estudiados con este marcador molecular aunque existen microsatélites aislados para varios géneros, entre los que destacan: *Didelphis*, *Monodelphis*, *Philander* y *Tlacuatzin* (Samollow et al. 2004; Fike et al. 2009; Guillemín et al. 2000; Arcangeli et al. 2013). Sin embargo, sólo en dos especies (*D. virginiana* y *Didelphis marsupialis*) se ha evaluado la diversidad genética con microsatélites (Beatty et al. 2012; Cruz-Salazar et al. 2014). Por lo tanto, hace falta que se utilicen estas herramientas en el estudio de la variación genética de los marsupiales americanos.

El género *Tlacuatzin* ha sido escasamente estudiado con marcadores moleculares y no se conoce la diversidad genética a lo largo de su distribución. Sin embargo, se sabe que este género diverge genéticamente de *Marmosa* y *Monodelphis* y que su genoma mitocondrial posee una estructura conservada, similar a la de otros marsupiales (Voss y Jansa 2009; Pang 2015). Asimismo, el estudio filogenético de las secuencias de los genes

Cytb e interfotoreceptor retinoide (*IRBP*) reveló que este género es un grupo monofilético constituido por cinco clados filogenéticos bien diferenciados tanto genética como morfológicamente (Planicie costera del Pacífico, cuenca del Río Balsas, Istmo de Tehuantepec, Península de Yucatán e islas Tres Marías—Arcangeli et al. 2018). Adicionalmente, durante el diseño de los microsátélites para *Tlacuatzin* se encontró que exhibe niveles de diversidad genética de bajos a moderados. (Arcangeli et al. 2013). Sin embargo, aunque este trabajo incluyó muestras de toda su distribución, utilizó un número limitado de ejemplares, lo que podría estar subestimando la variación genética de *Tlacuatzin*. Aunque este marsupial no está en ninguna categoría de riesgo, sus poblaciones podrían estar en riesgo ya que se distribuye en la selva baja caducifolia, uno de los ecosistemas más amenazados del país (Zarza et al. 2003; Ortega et al. 2009). Así, el objetivo de este capítulo fue documentar la diversidad y estructura genética de estos marsupiales con base en marcadores genéticos (DNA mitocondrial y microsátélites).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras.—Se obtuvieron muestras del género *Tlacuatzin* de ejemplares colectados en el campo (permiso de colector FAUT-0002 expedido por SEMARNAT a Fernando A. Cervantes) y a través de préstamos con colecciones mastozoológicas, nacionales e internacionales (Fig. 1; Apéndice I). Las muestras incluyen 10 tejidos frescos, 8 tejidos en alcohol y 36 biopsias de piel de ejemplares de museo (Fig. 1; Apéndice I).

Extracción de DNA.—Antes de la extracción, las biopsias de piel se lavaron con solución STE (NaCl₂ 0.1 M, Tris 0.05 ph 7.5, EDTA 0.001 M) para hidratarlas y remover impurezas (Hillis et al. 1996). El DNA se extrajo utilizando el kit comercial AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, Union City, California, Estado Unidos de América), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del DNA se evaluó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos de América) y su concentración se midió por espectrofotometría.

DNA mitocondrial

Amplificación y secuenciación.—El gen citocromo-*b* (*Cytb*) se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en un termociclador (Maxygene Gradient Thermal Cycler, Axygen Biosciences; Union City, California, Estados Unidos de América), utilizando primers universales (Apéndice II; Smith y Patton 1993). Debido a que el DNA estaba muy degradado en las biopsias de piel, la amplificación del gen *Cytb* se hizo en fragmentos de 100—400 pb. Asimismo, el programa del termociclador en estas muestras incluyó un número adicional de ciclos para mejorar la calidad de las amplificaciones. Las concentraciones finales de los reactivos en un volumen de reacción de 25 μ l fueron: 50 ng de DNA, 0.2 mM de cada dNTP (Promega, Pittsburgh, Pennsylvania, Estados Unidos de América), 1 x buffer de PCR, 1 U de Taq polimerasa (Qiagen, Ciudad de México, México), 0.4 mM de cada primer y 2.5 mM de MgCl₂. Las condiciones óptimas de amplificación fueron: desnaturalización inicial 95°C por 3 min, seguida de 30 a 40 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 45 seg y 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min (modificado de Arcangeli y Cervantes 2009).

El DNA amplificado se visualizó con SYBR por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se purificó utilizando el kit AxyPrep PCR Clean-up Kit (Axygen Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA se secuenció en ambas direcciones utilizando el secuenciador automático del IB (ABI Prism 3 100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Ciudad de México, México) y los primers utilizados para su amplificación. Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon manualmente utilizando el programa BioEdit v7.0.9 (Hall 1999). Adicionalmente, se obtuvo la secuencia de un ejemplar de GeneBank. En total, 51 ejemplares del género *Tlacuatzin* fueron examinados con DNA mitocondrial (Fig. 1; Apéndice I).

Análisis de los datos.—El polimorfismo genético de las poblaciones del género *Tlacuatzin* se evaluó a través de la estimación del número de haplotipos, y las diversidades haplotípica (*h*) y nucleotídica (π), utilizando el programa DNAsp v.5 (Librado y Rozas 2009). Este programa también fue usado para calcular la distribución Mismatch y las pruebas de neutralidad de Tajima (*D*; Tajima 1989) y Fu (*F_s*; Fu 1997). Se evaluó la señal de cambio en el tamaño poblacional histórico con el índice Harpending (raggedness;

Harpending et al. 1993) y la desviación de la suma de cuadrados (DSC) entre la distribución Mismatch observada y la esperada, utilizando un bootstrap paramétrico (1000 réplicas; Schneider y Excoffier 1999) en el programa Arlequin v.3.4.1.3 (Excoffier y Lischer 2010).

El programa Arlequin v.3.4.1.3 también fue usado para evaluar la diferenciación genética de las poblaciones de este marsupial a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA) y de la estimación del coeficiente de diferenciación (F_{ST}). La correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de los haplotipos se evaluó por medio de una prueba de Mantel. Para esto, se construyó una matriz de distancia genética (valores no corregidos) con el programa MEGA v.7.0.14 (Kumar et al. 2015) y una matriz de distancia geográfica con el programa Geographic Distance Matrix Generator v.1.2.3. (Ersts 2016). Las distancias geográficas obtenidas en km se transformaron a \log_{10} para ajustar los datos a un modelo lineal. Finalmente, se construyó una red de haplotipos para estimar las relaciones genealógicas entre las secuencias de los ratones tlacuache del género *Tlacuatzin*, utilizando el programa Network v.5 (Bandelt et al. 1999).

Microsatélites

Amplificación y genotipificación.—La amplificación de 12 microsatélites (*Tlacu119*, *Tlacu151*, *Tlacu169*, *Tlacu193*, *Tlacu227*, *Tlacu311*, *Tlacu413*, *Tlacu506*, *Tlacu530*, *Tlacu575*, *Tlacu670* y *Tlacu730*) se hizo por medio de la PCR en un termociclador (Maxygene Gradient Thermal Cycler, Axygen Biosciences; Union City, California, Estados Unidos de América), utilizando primers específicos (Cuadro 2; Arcangeli et al. 2013). Las reacciones de amplificación se hicieron en un volumen de reacción de 15 μ l; en donde las concentraciones de los reactivos fueron: 30 ng DNA, 0.3 mM dNTP's, 0.5 μ M cada primer, 1X Buffer (2.0 μ M MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl), 2.5X BSA y 1.0 U FlexiTaq Polimerasa (Promega). Las condiciones óptimas de amplificación fueron: desnaturalización inicial 94°C por 10 min, 35 ciclos de 92°C por 1 min, temperatura de alineamiento para cada microsatélite (Apéndice III) por un min y 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. El DNA amplificado se analizó en un secuenciador automático (ABI Prism 3 100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Ciudad de México, México). El tamaño de los alelos y el genotipo de cada individuo se determinaron manualmente mediante la lectura de los electroferogramas en el software Genemapper v.3.7 (Applied Biosystems). En total, 54 ejemplares del género *Tlacuatzin* fueron examinados con microsatélites (Fig. 1; Apéndice I).

Análisis de los datos.—La desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), el coeficiente de consanguineidad (F_{IS}) según Weir y Cockerham y el desequilibrio de ligamiento para cada locus y especie se estimaron con el programa Genepop v.4.2 (Raymond y Rousset 1995; Rousset 2008). Para obtener los valores significativos tanto en los análisis del equilibrio Hardy-Weinberg como en las pruebas de desequilibrio de ligamiento se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice 1989). Los errores de genotipificación y la presencia de alelos nulos se detectaron con el programa Microchecker v.2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004). El número de alelos por locus y su frecuencia se estimó con el programa Fstat v.2.9.3.2 (Goudet 2001), mientras que la heterocigosidad observada (H_O) y la esperada (H_E) por locus y por especie se calculó a partir del estimador de Nei con el program Arlequin v.3.4.1.3.

La distribución de la variabilidad genética se examinó por medio de un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en el programa Arlequin v3.4.1.3. La diferenciación genética se evaluó a través de la estimación de los coeficientes de diferenciación, F_{ST} y R_{ST} , entre las especies, utilizando el programa Genepop v.4.2. La estructura genética del género *Tlacuatzin* se infirió con el programa Structure v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Las simulaciones se hicieron variando el número de grupos (K) de 1 a 5, usando un modelo mixto y asumiendo frecuencias alélicas correlacionadas, con un burn-in inicial de 10 000 iteraciones. El análisis se repitió 20 veces por cada K para asegurar consistencia en los resultados. El número de grupos se determinó mediante el método gráfico de Evano et al. (2005) basado en la tasa de cambio de la función de verosimilitud con respecto a K (ΔK), en donde el número más probable de grupos está dado por el valor más alto de ΔK .

El flujo genético se evaluó a través de la estimación del número de migrantes por generación entre clados, utilizando los valores de F_{ST} a través del método de Wright (1985): $N = (1 - F_{ST}) / 4 F_{ST}$. Asimismo, se hizo una prueba de asignación para identificar posibles migrantes y colocarlos en su grupo original con el programa GeneClass v.2 (Piry et al. 2004), utilizando el algoritmo de Paetkau et al. (2004).

RESULTADOS

DNA mitocondrial

Caracterización molecular de las secuencias.— Se secuenciaron 1146 pares de bases (pb) del gen *Cytb* en 51 muestras del género *Tlacuatzin* (Apéndice I). De este total, 899 fueron sitios constantes, 47 fueron sitios variables no informativos y 200 fueron sitios variable e informativos. El promedio de las frecuencias de los nucleótidos para este grupo de secuencias fue: 31.8% adenina (A), 25.7% citosina (C), 11.7% guanina (G) y 30.8% timina (T). En ninguna secuencia se encontraron inserciones, deleciones o codones de paro.

Diversidad genética.—Se identificaron 48 haplotipos diferentes, de los cuales 16 pertenecen al clado de la Planicie costera del Pacífico, 11 al clado de la cuenca del Río Balsas, nueve al clado del Istmo de Tehuantepec, cinco al clado de la Península de Yucatán y siete al clado de las islas Tres Marías. No se encontraron haplotipos compartidos entre localidades. La diversidad haplotípica estimada para el género *Tlacuatzin* fue $h = 0.998 \pm 0.004$, mientras que la diversidad nucleotídica fue de $\pi = 0.052 \pm 0.001$. Similarmente, la diversidad haplotípica dentro de los clados varió de 0.993 a 1.0, mientras que la diversidad nucleotídica fue de 0.035 a 0.005 (Cuadro 1).

Demografía histórica.—La prueba de neutralidad de Tajima para el género arrojó un valor positivo aunque estadísticamente no significativo ($D = 0.381$, $p = 0.723$), mientras que la prueba de Fu arrojó un valor negativo significativo ($F_s = -9.402$, $p = 0.013$). Los valores de la D para los clados de la Planicie costera del Pacífico y la cuenca del Río Balsas fueron positivos, mientras que en los clados del Istmo de Tehuantepec, la Península de

Yucatán y las islas Tres Marías fueron negativos, todos estadísticamente no significativos. Asimismo, los valores de la prueba de Fu para todas las especies fueron negativos y pero no significativos (Cuadro 2). Se obtuvo una distribución Mismatch multimodal tanto para el género *Tlacuatzin* como para cada uno de los clados (Fig.2). Los valores del índice de Harpending (raggedness) y la desviación de la suma de cuadrados bajo el modelo de expansión demográfica no fueron estadísticamente significativos para ninguno de los clados ni para el género (Cuadro 2).

Diferenciación genética.—El AMOVA reveló que el 64.93% de la variación presente en la muestra se encuentra distribuida entre los clados, el 31.09% está repartida entre las poblaciones dentro de los clados y el 3.99% se encuentra dentro de las poblaciones (Cuadro 3). Los valores del F_{ST} obtenidos de la comparación entre clados variaron de 0.443 a 0.928 (Cuadro 4), siendo significativos en todas las comparaciones ($p < 0.05$). En la prueba de Mantel para el género *Tlacuatzin* se obtuvo un coeficiente de correlación r de 0.797 ($p = 0.000$; Fig. 3). Asimismo, se obtuvieron valores significativos para los clados de la Planicie costera del Pacífico ($r = 0.732, p = 0.000$), la cuenca del Río Balsas ($r = 0.723, p = 0.001$) y la Península de Yucatán ($r = 0.770, p = 0.047$). El análisis de la red de haplotipos reveló 48 haplotipos diferentes agrupados en cinco grupos, los cuales son consistentes con los clados filogenéticos (Fig. 4). El mayor número de sustituciones nucleotídicas (137) se registró entre los clados de las islas Tres Marías y el Istmo de Tehuantepec, mientras que el menor número de sustituciones (17) se encontró entre el clado de las islas Tres Marías y el clado de la Planicie costera del Pacífico.

Microsatélites

Diagnosis de los datos.—El análisis de Hardy-Weinberg reveló que los clados de la Planicie costera del Pacífico, la Cuenca del Río Balsas, el Istmo de Tehuantepec y las islas Tres Marías presentan loci en desequilibrio (Apéndice IV). Sin embargo, la combinación de probabilidades indicó que ningún locus presenta una desviación significativa del EHW. Por otro lado, el coeficiente de consanguineidad (F_{IS}) presenta una desviación significativa de cero en todos los loci y todos los clados, variando de 0.16 a 0.48 y de 0.21 a 0.38,

respectivamente (Apéndice IV). Asimismo, ningún locus mostró desequilibrio de ligamiento (Apéndice V). No se identificaron errores de genotipificación en ningún clado y la presencia de alelos nulos fue detectada en los clados de la Planicie costera del Pacífico, la Cuenca del Río Balsas y el Istmo de Tehuantepec (Cuadro 9).

Diversidad genética.—Todos los microsatélites analizados fueron polimórficos. El promedio de alelos por locus fue de 15 ± 2.52 , sumando en total de 180 alelos (Fig.5). El 60.5% (109) fueron alelos privados y el 35% (64) alelos raros (frecuencia < 0.10 ; Luikart et al. 1998). La heterocigosidad observada ($H_O = 0.456 \pm 0.074$; Cuadro 11) fue menor a la heterocigosidad esperada ($H_E = 0.72 \pm 0.035$). El clado de la Planicie costera del Pacífico fue el que presentó los valores de diversidad más altos, con un media de 5.9 ± 0.99 alelos por locus y una $H_E = 0.757 \pm 0.61$, mientras que los clados de la Península de Yucatán y las islas Tres Marías registraron los más bajos, ambos con un promedio de 3.5 alelos por locus y una H_E de 0.672 ± 0.10 y 0.688 ± 0.05 , respectivamente. No se encontró ningún alelo que estuviera presente en los cinco clados. El 3.2% de los alelos presentó frecuencias > 0.5 (Apéndice VI).

Diferenciación genética.—El AMOVA reveló que el 79.13% de la variación se encuentra distribuida entre los clados filogenéticos, el 14.34% de ésta está repartida entre las poblaciones dentro de los clados y el 6.53% se encuentra dentro de las poblaciones (Cuadro 5). Los valores del F_{ST} obtenidos de la comparación entre clados variaron de 0.107 a 0.299, mientras que los valores del R_{ST} variaron de 0.304 a 0.978 (Cuadro 6). Los valores más altos se registraron entre los clados de las islas Tres Marías y la Península de Yucatán, mientras que los valores más bajos se encontraron entre el clados de Planicie costera de Pacífico y el de las islas Tres Marías.

Estructura genética.—El método gráfico de Evano reveló que el género *Tlacuatzin* está estructurado en cinco grupos genéticos bien diferenciados ($\Delta K_{MAX} = 64.448$ en $K=5$). Las simulaciones indicaron que los grupos 1 y 2 son consistentes con el clado de la Planicie costera del Pacífico, mientras que el grupo 3 es consistente con el clado de la cuenca del Río Balsas, excepto por la muestra de Zacatepec, Oaxaca que se encuentra en el grupo 4. Los grupos 4 y 5 son consistentes con los clados del Istmo de Tehuantepec y la Península de Yucatán, respectivamente; mientras que el clado de las islas Tres Marías está ubicado

dentro del grupo 1 (Fig.6). Por otro lado, la prueba de asignación colocó el 40.7% de la muestra en el grupo 1, el 0.74% en el grupo 2, el 22.2% en el grupo 3, el 20.4% en el grupo 4 y el 0.93% al grupo 5 (Apéndice VII).

Flujo genético.—El número de migrantes por generación estimado entre los clados varió de 0.586 a 2.087 (Cuadro 8). Asimismo, se identificaron dos posibles migrantes ($p < 0.01$).

DISCUSIÓN

Diversidad genética.—La diversidad genética documentada en el género *Tlacuatzin* fue alta. Para gen *Cytb* se identificaron 48 haplotipos diferentes, los cuales se caracterizaron por una alta diversidad haplotípica ($h = 0.998 \pm 0.004$) y una baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0.052 \pm 0.001$). Dicha combinación sugiere un proceso de expansión demográfica rápido a partir de un tamaño poblacional pequeño (Avise, 2000). Similar a lo reportado en el ratón tlacuache tlacuache (*Marmosa murina*) cuyos valores de diversidad fueron $h = 0.8 \pm 0.1$ y $\pi = 0.01$ (Steiner y Catzeflis 2003).

La prueba de Tajima ($D = 0.381$, $p = 0.723$) no fue significativa. En contraste, la prueba de Fu ($F_s = -9.402$, $p = 0.013$) indicó que *Tlacuatzin* atravesó por un proceso de expansión demográfica (Fu y Li 1993), lo que corroboró los resultados derivados de la estimación de las diversidades haplotípica y nucleotídica. Por otro lado, se obtuvo una distribución Mismatch multimodal, la cual es consistente con un modelo de equilibrio demográfico (Hernández-Baños et al. 2006). Sin embargo, los valores de la DSC y del índice de Harpending al no ser significativos sugieren que la distribución Mismatch encontrada refleja estructuración genética (Harpending 1994). Dicha estructura se puede observar en la red de haplotipos, en donde, se distinguen 5 grupos, los cuales coinciden con los clados filogenéticos.

El número de alelos por locus varió de 11 a 19 ($\bar{x} = 15 \pm 2.52$), siendo más alto que el número de alelos reportado para *Tlacuatzin* anteriormente ($\bar{x} = 8$ —Arcangeli et al. 2013). Valores similares han sido reportados en el tlacuache de Virginia (*Didelphis virginiana*) y el wallaby cola de cepillo (*Petrogale penicillata*), en los cuales se documentó un promedio

de 10.54 ± 3.18 y 13.4 ± 1.01 alelos por locus, respectivamente (Beatty et al. 2012; Hazlitt et al. 2014). Este valor es considerablemente mayor al promedio de alelos por locus documentado en los marsupiales australianos ($\bar{x}=7.0 \pm 0.2$ —Eldridge 2010). La heterocigosidad esperada ($H_E = 0.67-0.76$) fue alta y comparable con la reportada para el betong norteño (0.65-0.75) y el bilby (0.75-0.81—Pope et al. 2000; Moritz et al. 1997). Asimismo, la H_E documentada en *Tlacuatzin* es similar al promedio de la H_E reportada tanto para los marsupiales australianos (0.66 ± 0.01) como para los mamíferos placentarios (0.67 ± 0.1 —Eldridge 2010). Niveles de diversidad altos como los que presenta *Tlacuatzin* son propios de taxones conspicuos y de amplia distribución en los que existe una estructura genética bien definida (Eldridge 2010).

Diferenciación genética.—Con base en los análisis de DNA mitocondrial y microsatélites se encontró que el género *Tlacuatzin* presenta una fuerte estructura geográfica a lo largo de su distribución. Los datos apoyan la hipótesis de que este género está conformado por cinco grupos genéticos delimitados por la presencia de barreras geográficas. El primer grupo se está restringido a las islas Tres Marías, frente a las costas de Nayarit. El segundo grupo está delimitado por la presencia de la Sierra Madre Occidental al este y al sur por el Eje Volcánico Transversal y Sierra Madre del Sur. El tercer grupo se encuentra flanqueado al norte por el Eje Volcánico Transversal y al sur por la Sierra Madre del Sur. El cuarto se distribuye en la región del Istmo de Tehuantepec. El quinto grupo está restringido a la Península de Yucatán.

Este patrón responde a un modelo de aislamiento por distancia ($r = 0.797, p = 0.000$), en el cual las barreras geográficas como el Istmo de Tehuantepec o el Eje Volcánico Transversal juega un papel importante en la diferenciación genética de las poblaciones ya que actúan como una barrera reproductiva al impedir el flujo genético entre éstas. Algunos autores han reportado patrones similares en otros mamíferos mexicanos. Por ejemplo, el ratón pigmeo (*Baiomy taylori*) cuyas poblaciones están estructuradas en dos haplogrupos separados por el Eje Volcánico Transversal (Light et al. 2016) o la rata arrocera (*Oryzomys couesi*) cuyas poblaciones en ambos extremos del Istmo de Tehuantepec han divergido considerablemente (Vázquez-Domínguez et al. 2009). Del igual manera, estas barreras geográficas han moldeado los patrones filogeográficos de

otros vertebrados terrestres, entre los que destacan la iguana negra (*Ptenosauria pectinata*; Zarza et al. 2008) y el colibrí ruiseñor (*Campylopterus curvipennis*; González et al. 2011). Similarmente, la cordillera de los Andes en Sudamérica representa una barrera importante para los ratones tlacuache del género *Thylamys* (Giarla y Jansa 2014).

Asimismo, el hecho de que *Tlacuatzin* estuvo presente durante el Pleistoceno sugiere que las fluctuaciones climáticas que ocurrieron en este periodo promovieron la diferenciación genética del género en cinco grupos divergentes (Arcangeli et al. 2018), a través de ciclos de expansión (durante los periodos glaciares) y de contracción de sus rangos de distribución (durante los periodos interglaciares; Fernández et al. 2012), como ha sido propuesto en otros vertebrados (Barber y Klicka 2010; Cortes-Rodríguez et al. 2013). De esta manera, el aislamiento geográfico de las poblaciones de *Tlacuatzin* por largos periodos de tiempo aunado al efecto a deriva génica que promovió la pérdida o la fijación de diferentes alelos en cada población, originó la diferenciación genética de las mismas (Amman y Bradley 2004; Vázquez-Domínguez et al. 2012).

Dicha diferenciación se ve reflejada en los niveles de diversidad al interior de cada grupo, tanto en el DNA mitocondrial como en los microsatélites. Para el gen *Cytb* se documentaron 48 haplotipos diferentes, de los cuales 16 se distribuyen en la Planicie costera del Pacífico, 11 en la cuenca del Río Balsas, nueve en el Istmo de Tehuantepec, cinco en la Península de Yucatán y siete en las islas Tres Marias. La diversidad haplotípica al interior de estos grupos fue alta (0.993—1.0), mientras que la diversidad nucleotídica fue baja (0.035—0.005). El número de alelos por locus varió de 4 a 6 y la heterocigosidad esperada fue de 0.72 ± 0.073 . Asimismo, el hecho de que no se compartan haplotipos del gen *Cytb* ni alelos de los microsatélites entre los grupos, indica que éstos han divergido considerablemente.

Esta divergencia es soportada por los valores del coeficiente de diferenciación. El F_{ST} exhibió valores de moderados a altos tanto para en DNA mitocondrial (0.443—0.928) como para los microsatélites (0.107—0.299). Similar a lo reportado en marsupiales australianos en los que se ha documentado una diferenciación genética alta, como el bandicut rayado (*Perameles bougainville*) o el cuol tigre (*Dasyurus maculatus*) cuyos valores del F_{ST} en el DNA mitocondrial y los microsatélites variaron de 0.38 a 0.87 y de 0.016-0.180,

respectivamente (Firestone et al. 2000; Smith y Hughes 2008) . Asimismo, los AMOVA realizados tanto para el gen *Cytb* como para los loci de microsatelites indican que la mayor parte de la diversidad genética presente en *Tlacuatzin* (64.95% y 79.13%, respectivamente) se debe a la diferenciación genética de los grupos. Sin embargo, estos grupos retienen gran parte de la diversidad genética del género lo que sugiere que existió históricamente flujo genético entre ellos.

Por otro lado, el análisis en STRUCTURE sugiere no existe una diferenciación genética importante entre el grupo de la planicie costera del Pacífico y el grupo de las islas Tres Marías (Fig. 6). Similar a lo documentado por Taylor et al. (2004) para la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*), en la cual se encontró una alta afinidad genética entre las poblaciones continentales y las de islas adyacentes. Esta discrepancia se debe a que los alelos presentes tanto en el grupo de la planicie costera del Pacífico como en el de las islas Tres Marías son similares aunque parte de la variación genética que existe en el grupo de la planicie costera del Pacífico se ha perdido en el de las islas Tres Marías, incluyendo los alelos raros. Este hecho sugiere que el grupo genético que se distribuye en las islas se fundó partir de una población pequeña que llegó del continente tras un evento de dispersión que pudo ocurrir durante un período glacial cuando el nivel del mar bajo lo suficiente para que se estableciera un puente terrestre entre las islas y el continente, como ha sido propuesto para otros vertebrados que habitan las islas (Casas-Andreu 1993; Vázquez-Domínguez et al. 2012).

Implicaciones en taxonomía y conservación.—Dado que los cinco grupos han divergido significativamente tanto en el DNA mitocondrial como en los microsatélites, nuestros datos apoyan la taxonomía actual del género, en donde, se reconocen cinco especies: *T. sinaloae* en la costa del Pacífico, desde Sonora hasta Colima; *T. balsasensis* en la cuenca del Río Balsas; *T. canescens* en el Istmo de Tehuantepec; *T. gaumeri* en la Península de Yucatán; y *T. insularis* en las islas Tres Marías (Arcangeli et al. 2018) .

Por otro lado, los resultados de este trabajo tienen repercusiones importantes en la conservación de *Tlacuatzin*, que aunque no se considera en riesgo de extinción, se distribuye en la selva baja caducifolia, tanto en el oeste y centro de México como en la Península de Yucatán (Voss y Jansa 2003; Hernández-Cardona et al. 2007). Este

ecosistema es biológicamente importante para el sostenimiento de una gran cantidad de especies y se distingue por albergar un gran número de mamíferos endémicos, entre los que destacan la musaraña sureña (*Megasorex gigas*), el murciélago platanero (*Musonycteris harrisoni*), el zorrillo pigmeo (*Spilogale pymaea*) y los ratones arborícolas (*Xenomys nelsoni* y *Osgoodomys banderanus*—Ceballos et al. 2002). Asimismo, la selva baja caducifolia es uno de los ecosistemas más amenazados por las actividades antropogénicas (Ortega et al. 2009). De hecho, se estima que el 20% de este ecosistema en la costa del Pacífico se ha convertido en agrosistemas o en asentamientos humanos (Trejo 2010). Sin embargo, también existen áreas bien conservadas en el centro y el sur de la distribución de *Tlacuatzin* que incluyen la Reserva de la Biosfera Islas Tres Marías en Nayarit, la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala en Jalisco y el parque Nacional Lagunas de Chacahua en Oaxaca, en donde ha sido registrado este marsupial (Wilson 1991; Ceballos y García 1995; Buenrostro-Silva et al. 2012).

Los efectos ecológicos de la transformación y fragmentación del hábitat en poblaciones silvestres incluyen la reducción del flujo genético, la cual puede conducir a una disminución de la variabilidad genética por efecto de la deriva génica (Sánchez-Mejía 2017). Esta disminución puede limitar la capacidad de las especies para evolucionar y adaptarse a los cambios ambientales aumentando así la probabilidad de extinción (Firestone et al. 2000). Nuestros resultados muestran que los cinco los grupo genéticos que conforman el género *Tlacuatzin* despliegan una diversidad única por lo que las acciones de conservación deben estar encaminadas a retener la mayor parte de la variación genética. Por lo tanto, el establecimiento de áreas protegidas en lugares donde existen grandes remanentes de la selva baja caducifolia es esencial para la conservación de este marsupial (Ceballos y Valenzuela 2010). Asimismo, los instrumentos de política ambiental como el ordenamiento ecológico del territorio, las unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre, las normas oficiales o los instrumentos económicos como el pago de servicios ambientales pueden favorecer la conservación de las selvas secas a nivel paisaje (Ceballos et al. 2010).

En conclusión, nuestros resultados indican que *Tlacuatzin* despliega niveles altos de variación genética tanto en el DNA mitocondrial como en los microsátélites, lo cual sugiere

que su estado de conservación es bueno. La diferenciación genética que existe entre los grupos sugiere una fuerte estructura poblacional definida definida por la presencia de barreras geográficas que limitan el flujo genético entre los grupos. Nuestros resultados apoyan la taxonomía actual del género, en donde, se reconocen cinco especies: *T. insularis*, *T. gaumeri*, *T. sinaloae*, *T. canescens* y *T. balsasensi*. Dado que especies dichas despliegan una diversidad única el establecimiento de reservas que protejan las selvas secas y la aplicación de instrumentos políticos y económicos son esenciales para la conservación de este marsupial.

AGRADECIMIENTOS

A Julieta Vargas, Yolanda Hortelano y alumnos de la CNMA que ayudaron a la colecta en el campo y curación de ejemplares. A Celia López-González (CIDIIR-Durango), Consuelo Lorenzo (ECOSUR-SC-M), Oscar Retana (CMUAC), Juan Carlos López Vidal (ENCB-IPN), Marco Antonio Lozano (UAEM), Robert S. Voss (AMNH), Suzanne Peurach (NMNH), Robert M. Timm (KU) y Bruce Patterson (FMNH) por el préstamo de tejidos. Este proyecto fue parcialmente financiado por la Universidad Nacional Autónoma de México a través del programa PAPIIT (IN215711) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Ciencia Básica (156725). Jérica Arcangeli agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas y al CONACyT por el financiamiento y la becas otorgadas.

LITERATURA CITADA

- AKEMI, A., J. PEREIRA, P. MACEDO Y K. A. MORELLI. 2012. Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. Pp. 149—170, en Genetic diversity in microorganisms (M. Caliskan, Ed). Intech Rijeka, Croacia.
- AMMAN, B. R. Y R. D. BRADLEY. 2004. Molecular evolution in *Baiomys* (Rodentia: Sigmodontinae): evidence for genetic subdivision in *B. musculus*. Journal of Mammalogy 85:162—166.

- ARCANGELI, J. Y F. A. CERVANTES. 2009. Identificación molecular de dos especies de tlacuache: *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*, utilizando enzimas de restricción. Pp. 251—262 en 60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM. Aportaciones al conocimiento y conservación de los mamíferos de México (F. A. Cervantes, Y. Hortelano y J. Vargas, eds.). Instituto de Biología, UNAM, México, D. F., México.
- ARCANGELI, J., F. A. CERVANTES, S. L. LANCE, M. I. SALAZAR Y J. ORTEGA. 2013. Twenty-four microsatellite markers for the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*): development from illumina paired-end sequences. *Conservation Genetics Resources* 5:367—370.
- ARCANGELI, J., J. E. LIGHT Y F. A. CERVANTES. 2018. Molecular and morphological evidences of the diversification in the Grayish mouse opossums, *Tlacuatzin canescens* (Didelphiorphia), with description of a new species. *Journal of Mammalogy* 99:138—158.
- AVISE, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge. Pp. 447.
- BARBER, B. R. Y J. KLICKA. 2010. Two pulses of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican birds fauna. *Proceedings of the Royal Society B* 227:2675—2681.
- BEATTY, W. S., J. C. BEASLEY, G. DHARMARAJAN Y O. E. RHODES JR. 2012. Genetic structure of a Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) population inhabiting fragmented agricultural ecosystem. *Canadian Journal of Zoology* 90:101—109.
- BRADLEY, R. D. Y R. J. BAKER. 2001. A test of genetic species concept: cytochrome *b* sequences and mammal. *Journal of Mammalogy* 82:960—970.
- BUENROSTRO-SILVA, A., M. ANTONIO-GUTIÉRREZ Y J. GARCÍA-GRAJALES. 2012. Mamíferos del Parque Nacional Lagunas de Chacahua y la Tuza de Monroy, Oaxaca, México. *Acta Zoológica Mexicana, Nueva Serie* 28:56—72.
- CASAS-ANDREU, G., 1992. Anfíbios y reptiles de las Islas Marías y otras islas adyacentes a la costa de Nayarit, México. Aspectos sobre su biogeografía y conservación. *Anales del Instituto de Biología, Serie Zoología*, 63:95—112.
- CEBALLOS, G. Y A. GARCÍA. 1995. Conserving Neotropical biodiversity: the role of dry forests in Western Mexico. *Conservation Biology* 9:1349—1353.
- CEBALLOS, G., J. ARROYO-CABRALES Y R. A. MEDELLÍN. 2002. The mammals of México: composition, distribution and status. *Occasional Papers, Texas Tech University* 218:1—27.
- CEBALLOS, G. Y D. VALENZUELA. 2010. Diversidad, ecología y conservación de los vertebrados de Latinoamérica. Pp. 93—118 en *Diversidad, amenazas y áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del Pacífico de México* (G. Ceballos, A. Martínez, A. García, E. Espinoza, J. Bezaury y R. Dirzo, eds.). CONABIO. México, D. F., México.

- CEBALLOS, G., L. MARTÍNEZ, A. GARCÍA, E. ESPINOZA Y J. BEZAURY. 2010. Áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del Pacífico Mexicano. Pp. 387—382 en *Diversidad, amenazas y áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del Pacífico de México* (G. Ceballos, A. Martínez, A. García, E. Espinoza, J. Bezaury y R. Disrzo, eds.). CONABIO. México, D. F., México.
- CERVANTES, F. A., J. ARCANGELI, Y. HORTELANO-MONCADA Y A. V. BORISENKO. 2010. DNA barcodes effectively identify the morphologically similar Common opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. *Mitochondrial DNA* 21(S1):44—50.
- CORTES-RODRÍGUEZ, N., F. JACOBSEN, B. E. HERNÁNDEZ-BAÑOS, A. NAVARRO-SIGÜENZA, J. L. PETERS Y K. E. OMLAND. 2013. Coalescent analyses show isolation without migration in two closely related orioles: the case of *Icterus gradicaudata* and *Icterus chrysater*. *Ecology and Evolution* 3:4377—4387.
- CRUZ-SALAZAR, B., L. RUIZ-MONTOYA, D. NAVARRETE-GUTIÉRREZ, E. E. ESPINOZA-MEDINILLA, E. VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ Y L. B. VÁZQUEZ. 2014. Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85:251—261.
- ELDRIDGE, M. D. B. 2010. Marsupial population and conservation genetics. Pp. 461—497, en *Marsupial genetics and genomics*. (J. E. Deakin, P. D. Waters y J. A. Marshall-Graves, eds). Australian Museum, Sydney, Australia.
- ERSTS, P. J. 2016. Geographic Distance Matrix Generator (version 1. 2. 3). American Museum of Natural History, Center of Biodiversity and Conservation. Disponible en: http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg. Acceso: 25 de febrero 2016.
- EVANO, G., S. REGNAUT Y J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611—2620.
- EXCOFFIER, L. Y H. E. L. LISCHER. 2010. Arlequin suite ver.3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564—567.
- FERNÁNDEZ, J. A., F. A. CERVANTES Y M. S. HAFNER. 2012. Molecular systematics and biogeography of the Mexican endemic kangaroo rat, *Dipodomys phillipsii* (Rodentia: Heteromyidae). *Journal of Mammalogy* 93:560—571.
- FIKE, J. A., J. C. BEASLEY Y O. E. RHODES JR. 2009. Isolation of 21 polymorphic microsatellite markers for the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Molecular Ecology Resources* 9:1200—1202.
- FIRESTONE, K. B., B. A. HOULDEN, W. B. SHERWIN Y E. GEFFERN. 2000. Variability and differentiation of microsatellite in the genus *Dasyurus* and conservation implication for the large Australian carnivorous marsupials. *Conservation Genetics* 1:115—133.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU Y D. A. BRISCOE. 2010. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.

- FU, Y. X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-9125.
- FU, Y. X Y LI. W. 1993. Statistical test of neutrality mutations. *Genetics* 133:693—709.
- GIARLA, T. Y S. A. JANSA. 2014. The role of physical geography and habitat type in shaping the biogeographical history of a recent radiation of Neotropical marsupials (*Thylamys*: Didelphidae). *Journal of Biogeography* 41:1547—1558.
- GONZÁLEZ, E. G. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59:377—388.
- GONZÁLEZ., D., J. F. ORNELAS Y C. GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ. 2011. Selection and geographical isolation influence hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological divergence in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*). *BMC Evolutionary Biology* 11:1—9.
- GOUDET, J. 1995. FSTAT (Version 12): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86:485—486.
- GUILLEMIN, M. L., A. LAVERGNE Y F. CATZEFLIS. 2000. Microsatellite markers in the common grey four-eyed opossum (*Philander opossum*: Didelphidae, Marsupialia). *Molecular Ecology* 9:1440—1442.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Research* 41:95-98.
- HAMILTON, M. B. 2009. *Population Genetics*. Wiley-Blackwell. Chichester, Reino Unido.
- HARPENDING, H. C., S. T. SHERRY, A. R. ROGERS Y M. STONEKING. 1993. Genetic structure of ancient human population. *Current Anthropology* 34:483—496.
- HAZLITT, S. L. A. W. GOLIZEN, J. A. NICHOLLS Y M. D. B. ELDRIDGE. 2014. The divergent lineages within an Australian marsupial (*Petrogale penicillata*) suggest multiple major refugia for mesic taxa in southeast Australia. *Ecology and Evolution* 4:1102—1116.
- HERNÁNDEZ-BAÑOS, B. E., M. HONEY-ESCANDÓN, M. N. CORTÉS-RODRÍGUEZ Y G. GARCÍA. 2006. Filogeografía de aves mexicanas. Pp. 467—495 in *Ecología molecular* (L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre, eds.). Instituto de Ecología, UNAM, Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, México, D. F., México.
- HERNÁNDEZ-CARDONA, A., L. A. LAGO-TORRES, L. IBARRA-GONZÁLEZ, J. C. FALLER-MENÉNDEZ Y Y. PEREYRA-ARRELLANO. 2007. Registro del tlacuachin (*Tlacuatzin canescens*) en el área de conservación El Zapotal, en el noreste del estado de Yucatán. *Revista Mexicana de Mastozoología* 11:85—90.
- HILLIS, D. M., C. MORITZ Y B. K. MABLE. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, E. U. A.
- KUMAR, S., G. STECHER Y K. TAMURA. 2015. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870—1974.

- LIBRADO, P. Y J. ROZAS. 2009. DnaSP v5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451—1452.
- LIGHT, J. E., M. O. OSTROFF Y D. J. HAFNER. 2016. Phylogeographic assessment of the northern pygmy mouse, *Baiomys taylori*. *Journal of Mammalogy* 97:1081—1094.
- LUIKART, G., F. W. ALLENDORF, J. M. CORNUET Y W. B. SHERWIN. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent bottlenecks. *Journal of Heredity* 89:238—247.
- MENZIES, B. R., M. B. RENFREE, T. HEIDER, F. MAYER, T. B. HILDEBRANDT Y A. J. PASK. Limited genetic diversity preceded extinction of the Tasmanian tiger. *PloS One* 7:1—7.
- MORITZ, C., A. HEIDEMAN, E. GEFFEN Y P. MCRAE. 1997. Genetic population structure of the greater bilby, *Macrotis lagotis*, a marsupial in decline. *Molecular Ecology* 6:925—936.
- NABHOLZ, B., S. GLÉMIN, Y N. GALTIER. 2009. The erratic mitochondrial clock, variation size, affect mtDNA diversity across birds and Mammals. *BMC Evolutionary Biology* 9:45—467.
- NEAVES, L. E., K. R. ZENGER, D. W. COOPER Y M. D. B. ELDRIDGE. 2010. Molecular detection of hybridization between sympatric kangaroo species in south-eastern Australia. *Heredity* 104:502—512.
- OLIVEIRA, E. J., J. GOMEZ, M. I. ZUCCHI, R. VENCOVSKY Y M. L. CARNEIRO. 2000. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294—307.
- ORTEGA, J., M. TSCHAPKA, T. P. GONZÁLEZ-TERRAZAS, G. SUZÁN, AND R. A. MEDELLÍN. 2009. Phylogeography of *Musonycteris harrisoni* along the Pacific coast of Mexico. *Acta Chiropterologica* 11:259—269.
- PANG, X. 2015. Complete mitochondrial genome of *Tlacuatzin canescens* (Grayish mouse opossum). *Mitochondrial DNA* doi:10.3109/19401736.2015.1118081.
- PAVAN, S. E., S. A. JANSA Y R. S. VOSS. 2014. Molecular phylogeny of short-tailed opossums (Didelphidae: *Monodelphis*): Taxonomic implications and test of evolutionary hypotheses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79:199—214.
- PAETKAU, D., R. SLADE, N. BURDEN Y A. ESTOUP. 2004. Genetic assignment methods for direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13:55—56.
- PIÑERO, D., A. BARAHONA, L. EGUIARTE, A. ROCHA Y R. SALAS. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. Pp. 415—435 en *Capital natural de México, Vol. 1: Conocimiento actual de la biodiversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F., México.
- PIRY, S., A. ALAPETITE, J. CORNUET, D. PAETKAU, L. BAUDOUIN Y A. ESTOUP. 2004. GeneClass 2: software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95:536—539.

- PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS Y P. DONNELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- POPE, L. C., A. ESTOUP Y C. MORITZ. 2000. Phylogeography and population structure of an ecotonal marsupial, *Bettongia tropica*, determined using mtDNA and microsatellites. *Molecular Ecology* 9:20141—2053.
- RAYMOND, M., Y F. ROUSSET. 1995. GENEPOP v. 4.0. Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248—249.
- RENTERÍA, M. 2007. Breve descripción de los marcadores moleculares. Pp.541—566 en *Ecología Molecular* (L. E. Eguiarte, V. Sousa y X. Aguirre, eds.). Instituto de Ecología, UNAM y la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F., México.
- RICE, R. M. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223—225.
- ROUSSET, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementación of the Genepop software for Window and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103—106.
- SÁNCHEZ-MEJÍA, J. A. 2018. Influencia de la deforestación en la diversidad genética y distribución geográfica de especies selectas de mamíferos de la selva baja caducifolia. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- SAMOLLOW P. B., C. M. KAMMERER, S. M. MAHANEY, ET AL. 2004. First-generation linkage map of the gray, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*, reveals genome-wide reduction in female recombination rates. *Genetics* 166:307—329.
- SCHNEIDER, S. Y L. EXCOFFIER. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152:1079—1089.
- SMITH, M. P. Y J. L. PATTON. 1993. The diversification of the South American rodents: Evidence from the mitochondrial sequence data for the akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society* 50:149—177.
- SMITH, S. Y J. HUGHES. 2008. Microsatellite and mitochondrial DNA variation defines island genetic reservoirs for reintroductions of an endangered Australian marsupial, *Perameles bougainville*. *Conservation Genetics* 9:547—557.
- SOUSA, L. C. C., C. M. F. GONTIJO, H. A. BOTELHO Y C. G. FONSECA. 2012. Mitochondrial genetic variability of *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia, Didelphidae) in Brazilian localities. *Genetics and Molecular Biology* 35: 522—529.
- SUNNUCKS, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trend in Ecology and Evolution* 15:199—203.
- STEINER, C. Y F. M. CATZEFLIS. 2003. Mitochondrial diversity and morphological variation of *Marmosa murina* (Didelphidae) in French Guiana. *Journal of Mammalogy* 84:822—831.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585—595.

- TAYLOR, A. C., P. E. COWAN, B. L. FRICKE, S. GEDDES, B. D. HANSEN, M. LAM Y D. W. COOPER. 2004. High microsatellite diversity and differential structuring among population of the introduced common brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*, in New Zealand. *Genetics Research* 83:101—111.
- TREJO, I. 2010. Las selvas secas del Pacífico Mexicano. Pp.41—51 en *Diversidad, amenazas y áreas prioritarias para la conservación de las Selvas Secas del Pacífico de México* (G. Ceballos, A. Martínez, A. García, E. Espinoza, J. Bezaury y R. Dirzo, eds.). CONABIO. México, D. F., México.
- VAN OOSTERHOUT, C., W. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS Y P. SHIPLEY. 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:35—538.
- VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., A. MEJÍA-PUENTE Y R. VEGA. 2009. *Oryzomys couesi* en el sureste de México: estimaciones genéticas y filogeográficas. Pp. 197—211 en *60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM. Aportaciones al conocimiento y conservación de los mamíferos mexicanos* (F. A. Cervantes, Y. Hortelano y J. Vargas, eds.). Instituto de Biología, UNAM. México, D. F., México.
- VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., M. SUÁREZ-ATILANO, W. BOOTH, C. GONZÁLEZ-BACA Y A. D. CUARÓN. 2012. Genetic evidence of a recent successful colonization of introduced species on islands: *Boa constrictor imperator* on Cozumel Island. *Biological Invasions* 14:2101—2116.
- VILLALOBOS, G. J. Y J. M. MENDOZA-VEGA. 2010. La biodiversidad de Campeche: Estudio de estado. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO), Gobierno del Estado de Campeche y El Colegio de la Frontera Sur. México.
- VOSS, R. S. Y S. A. JANSA. 2003. Phylogenetic studies on didelphids II. Nonmolecular data and new *Irbp* sequences: separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxon sampling. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 276:1—82.
- VOSS, R. S. Y S. A. JANSA. 2009. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of the New World metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 322:1—177.
- VOSS, R. S., E. E. GUTIÉRREZ, S. SOLARI, R. V. ROSSI Y S. A. JANSA. 2014. Phylogenetic relationships of mouse opossum (Didelphidae, *Marmosa*) with a revised subgeneric classification and notes on sympatric diversity. *American Museum Novitates* 3817:1—27.
- WILSON, D. W. 1991. Mammals of Tres Mariás Islands. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 206:214—250.
- WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19: 395—420.
- ZARZA, H., G. CEBALLOS, AND M. A. STEELE. 2003. *Marmosa canescens*. *Mammalian Species* 725:1—4.

Cuadro 1.—Índices de diversidad genética estimados a partir del gen citocromo-*b* para cinco clados genéticos del género *Tlacuatzin*. *N*, tamaño de la muestra; *H*, número de haplotipos detectados; *h*, diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica.

Clado	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>h</i>	π
Planicie costera del Pacífico	17	16	0.993 ± 0.023	0.035 ± 0.003
Cuenca del Río Balsas	12	11	0.985 ± 0.040	0.019 ± 0.002
Istmo de Tehuantepec	9	9	1.0 ± 0.052	0.009 ± 0.001
Península de Yucatán	5	5	1.0 ± 0.126	0.005 ± 0.001
Islas Tres Marías	8	7	0.964 ± 0.077	0.005 ± 0.0009
Total	51	48	0.098 ± 0.004	0.052 ± 0.001

Cuadro 2.—Pruebas de neutralidad de Tajima (*D*) y Fu (*F_s*). Los valores en negritas muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$). DSC, desviación de la suma de cuadrados; R, Índice de Harpending (raggedness).

Clado	<i>D</i>	<i>F_s</i>	DSC	R
Planicie costera del Pacífico	0.727	-1.213	0.01072	0.01660
Cuenca del Río Balsas	0.040	-0.830	0.02447	0.04201
Istmo de Tehuantepec	-0.289	-2.489	0.01558	0.03704
Península de Yucatán	-1.015	-1.011	0.08578	0.16000
Islas Tres Marías	-0.320	-1.573	0.05807	0.09056
Total	0.381	-9.402	0.00317	0.00183

Cuadro 3.—Análisis de varianza molecular efectuado para cinco clados filogenéticos del género *Tlacuatzin* utilizando secuencias del gen citocromo-*b*. F_{ST} , coeficiente de diferenciación. p , probabilidad.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de variación (%)
Entre clados genéticos	4	988.146	23.07786 Va	64.93
Entre poblaciones dentro de los clados genéticos	33	510.849	11.04869 Vb	31.09
Dentro de las poblaciones	13	18.417	1.41667 Vc	3.99
Total	50	1517.412	35.54322	

$F_{ST} = 0.96014$, $p = 0.000$

Cuadro 4.—Valores del coeficiente de diferenciación (F_{ST}) obtenidos de la comparación pareada entre clados filogenéticos del género *Tlacuatzin*. Los valores en negritas muestran diferencias significativas ($p = 0.05$).

Clado	Planicie costera del Pacífico	Cuenca del Rio Balsas	Istmo de Tehuantepec	Península de Yucatán	Islas Tres Marias
Planicie costera del Pacífico	-				
Cuenca del Rio Balsas	0.476	-			
Istmo de Tehuantepec	0.670	0.770	-		
Península de Yucatán	0.587	0.724	0.809	-	
Islas Tres Marias	0.443	0.751	0.908	0.928	-

Cuadro 5.— Heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_O) por microsatélite y por clado filogenético del género *Tlacuatzin*. d. e. = desviación estándar. Los valores en negritas muestran $H_E < H_O$.

Locus	Planicie costera del Pacífico		Cuenca del Río Balsas		Istmo de Tehuantepec		Península de Yucatán		Islas Tres Marias		Promedio		d. e
	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	
<i>Tlacu119</i>	0.758	0.611	0.790	0.384	0.752	0.600	0.822	0.600	0.716	0.625	0.767	0.564	0.101
<i>Tlacu151</i>	0.752	0.444	0.747	0.384	0.721	0.500	0.530	0.600	0.775	0.375	0.705	0.460	0.099
<i>Tlacu169</i>	0.819	0.388	0.849	0.538	0.710	0.500	0.644	0.200	0.625	0.375	0.729	0.400	0.132
<i>Tlacu193</i>	0.761	0.333	0.775	0.538	0.821	0.400	0.688	0.400	0.641	0.500	0.737	0.434	0.083
<i>Tlacu227</i>	0.638	0.555	0.760	0.384	0.684	0.400	0.711	0.600	0.691	0.500	0.696	0.487	0.094
<i>Tlacu311</i>	0.785	0.388	0.686	0.461	0.652	0.400	0.777	0.600	0.741	0.500	0.728	0.469	0.085
<i>Tlacu413</i>	0.779	0.555	0.701	0.461	0.752	0.600	0.555	0.600	0.700	0.625	0.697	0.568	0.065
<i>Tlacu506</i>	0.633	0.277	0.640	0.461	0.694	0.700	0.511	0.200	0.708	0.375	0.637	0.402	0.193
<i>Tlacu530</i>	0.796	0.388	0.778	0.615	0.694	0.300	0.733	0.400	0.575	0.375	0.715	0.415	0.118
<i>Tlacu575</i>	0.746	0.500	0.858	0.615	0.694	0.500	0.644	0.600	0.666	0.500	0.721	0.543	0.059
<i>Tlacu670</i>	0.815	0.444	0.744	0.384	0.763	0.500	0.822	0.200	0.691	0.500	0.767	0.405	0.124
<i>Tlacu730</i>	0.800	0.388	0.833	0.461	0.742	0.400	0.622	0.000	0.725	0.375	0.744	0.324	0.184
Promedio	0.757	0.439	0.763	60.474	0.723	0.483	0.672	0.416	0.688	0.468	0.720	0.456	0.111
d. e.	0.061	0.098	0.066	0.857	0.045	0.111	0.106	0.216	0.054	0.094	0.035	0.074	0.042

Cuadro 6.— Análisis de varianza molecular efectuado para cinco clados filogenéticos del género *Tlacuatzin* utilizando 12 microsatélites. F_{ST} , coeficiente de diferenciación; p , probabilidad.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de variación (%)
Entre clados genéticos	4	307078.702	3579.49418 Va	79.13
Entre poblaciones dentro de los clados genéticos	34	67722.381	648.64544 Vb	14.34
Dentro de las poblaciones	69	20373.167	295.26329 Vc	6.53
Total	107	395174.250	4523.40291	

$F_{ST} = 0.93473$, $p = 0.000$

Cuadro 7.—Valores de los coeficientes de diferenciación, F_{ST} (debajo de la diagonal) y R_{ST} (arriba de la diagonal), obtenidos de la comparación pareada entre clados genéticos del género *Tlacuatzin*. Los valores en negritas muestran diferencias significativas ($p = 0.05$).

Clado	Planicie costera del Pacífico	Cuenca del Rio Balsas	Istmo de Tehuantepec	Península de Yucatán	Islas Tres Marías
Planicie costera del Pacífico	-	0.772	0.924	0.955	0.304
Cuenca del Rio Balsas	0.172	-	0.634	0.824	0.724
Istmo de Tehuantepec	0.237	0.189	-	0.855	0.951
Península de Yucatán	0.256	0.255	0.262	-	0.978
Islas Tres Marías	0.107	0.176	0.267	0.299	-

Cuadro 8.—Número de migrantes por generación estimado entre clados filogenéticos del género *Tlacuatzin*. Las estimaciones fueron realizadas con los valores del coeficiente de diferenciación (F_{ST}).

Clado	Planicie costera del Pacífico	Cuenca del Río Balsas	Istmo de Tehuantepec	Península de Yucatán	Islas Tres Marías
Planicie costera del Pacífico	-				
Cuenca del Río Balsas	1.203	-			
Istmo de Tehuantepec	0.805	1.073	-		
Península de Yucatán	0.727	0.730	0.704	-	
Islas Tres Marías	2.087	1.170	0.686	0.586	-

APÉNDICE I

Procedencia de las muestras del género *Tlacuatzin* utilizadas en este estudio. AMNH, American Museum of Natural History; CIDIIR, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango; CMUAC, Colección de Mamíferos de la Universidad Autónoma de Campeche; CNMA, Colección Nacional de Mamíferos; ECO-SC-M, Colección Mastozoológica de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal de las Casas; ENCB, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; FMNH, Field Museum of Natural History; KU, Kansas University Natural History Museum; USNM National Museum of Natural History; TCWC, Texas Cooperative and Wildlife Collection; UAEM, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigaciones Biológica; s/n, sin número de catálogo; FAC, número de colecta de Fernando A. Cervantes. Las muestras marcadas con un asterisco (*) fueron analizadas únicamente con microsatélites.

No. de localidad	Localidad	No. de muestras	Tejido	Colección y No. de catálogo
1	San Juanito, Islas Tres Marias, Nayarit	1	Piel	USNM 512188
2	María Madre, Islas Tres Marias, Nayarit	4	Piel	CNMA 27412; USNM 89216-89218
3	Mariás Cleofás, Islas Tres Marias, Nayarit	3	Piel	USNM 5121585-512187
4	Culiacán, Sinaloa	1	Piel	CNMA 5720
5	Panuco, Sinaloa	1	Piel	CNMA 26123
6	Los Otates, Sinaloa	1	Piel	TCWC 41947
7	Platanitos, Durango	1	Músculo	CIDIIR 6430
8	San Blasito, Nayarit	1	Músculo	CIDIIR 7507
9	Navarrete, Nayarit	1	Músculo	CNMA 46170
10	San Blas, Nayarit	1	Piel	CNMA 12636
11	Tepic, Nayarit	1	Piel	CNMA 35151
12	Chamela, Jalisco	5	Hígado	CNMA 42992, 45132-45135*

13	Playa de Oro, Colima	1	Músculo	CNMA 47758
14	Pueblo Juárez, Colima	4	Músculo	CNMA 46538-46540; ENCB 4497
15	Panindicuaro, Michoacán	1	Piel	ENCB 26195
16	Pátzcuaro, Michoacán	1	Piel	ENCB 25316
17	Playa Azul, Michoacán	1	GenBank	HM106340 (número de acceso)
18	Petacalco, Guerrero	1	Piel	ENCB 35421
19	Amatepec, Estado de México	1	Piel	ENCB 23252*
20	Ixtapan del Oro, Estado de México	1	Piel	ENCB 32778*
21	Tehuixtla, Morelos	1	Piel	CNMA 27514
22	Xochicalco, Morelos	1	Oreja	UAEM s/n
23	Tuxpan, Guerrero	2	Oreja	FAC 5220, FAC 5221
24	Nejapa, Guerrero	1	Piel	TCWC 5643
25	Acahizotla, Guerrero	2	Piel	TCWC 5832, 6461
26	Zacatepec, Oaxaca	1	Piel	CNMA 39092
27	Oaxaca, Oaxaca	1	Piel	AMNH 213753
28	Tequisistlán, Oaxaca	1	Piel	AMNH 149104
29	Tehuantepec, Oaxaca	2	Piel	AMNH 213751, 213752*
30	Matías Romero, Oaxaca	1	Piel	AMNH 185770
31	Paso Tileme, Oaxaca	1	Piel	AMNH 148969
32	Huamuchil, Oaxaca	1	Hígado	ECO-SC-M 1876
33	Zanatepec, Oaxaca	1	Piel	AMNH 208224
34	Cintalapa, Chiapa	1	Piel	AMNH 147571
35	Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	1	Piel	CNMA 7557
36	Calakmul, Campeche	1	Hígado	CMUAC 754
37	Tzucabab, Yucatán	1	Hígado	ECO-SC-M 2240
38	Yaxcaba, Yucatán	1	Piel	FMNH 19995
39	Piste, Yucatán	1	Piel	KU 91461
40	Chichen Itzá, Yucatán	1	Piel	FMNH 63890

APÉNDICE II

Primers utilizados para la amplificación del gen citocromo-b en muestras del género *Tlacuatzin*. Debido a que el DNA en las biopsias de piel estaba muy degradado se utilizaron las siguientes combinaciones de primers para la amplificación: MVZ05/MVZ06, MVZ05/MVZ04, MVZ03/MVZ10, MVZ45/MVZ26, MVZ23/MVZ16, MVZ45/MVZ16, MVZ17/MVZ14 y MVZ05/MVZ14 (Esteva et al. 2010).

Nombre del Primer	Secuencia (5'→3')
MVZ03	GCTTCATCCAACATCTCAGCATGATG
MVZ04	GCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC
MVZ05	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG
MVZ06	GCTGTGTCTGATGTGTAGTGTAT
MVZ10	TATGAGCCGTAGTARAKKCCTC
MVZ14	GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC
MVZ16	AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT
MVZ17	ACCTCCTAGGAGAYCCAGAHAAAYT
MVZ23	TACTCTTCCTCCACGAAACJGGNTC
MVZ26	AGATCTTTGATTGTGTAGTAGGGGT
MVZ45	ACJACHATAGCJACAGCATTCGTAGG

APÉNDICE III

Primers utilizados para la amplificación de 12 microsatélites en muestras del género *Tlacuatzin*, secuencia repetida del microsatélite, tamaño de los alelos y temperatura de alineación de los primers. F = forward; R = reverse; T = temperatura.

Microsatélite	Secuencia de los primers (5'→3')	Secuencia	T (°C)
<i>Tlacu119</i>	F GAAGTTAAATAGTAAACTGTCCTGCCC R GCCTGACACAGAGTAGCTTGC	AAAG ₍₇₂₎	56
<i>Tlacu151</i>	F GGTTCATGAGCTTTGTCAATTTAGG R GGAAACAGAAAGCCAGGAGAGG	ATCT ₍₆₄₎	60
<i>Tlacu169</i>	F GCATTTATGAAAGCAGAGACAAAGC R AAGTGGGTTTGAGAGGCC	ATCT ₍₆₀₎	60
<i>Tlacu193</i>	F TTGACAGCTATATGGTTCTACAACTTGC R ATACAGCATGGATTCCAAGGTAGG	AAAG ₍₅₆₎	56
<i>Tlacu227</i>	F CATTCTCCACCCTTCCC R GAGCTCGGCACTGATTGG	TTCC ₍₅₂₎	60
<i>Tlacu311</i>	F ACCCTCCCTAGAATGGGAGC R TGAATCTCAGTGACCTGACATCG	ATAC ₍₄₄₎	60
<i>Tlacu413</i>	F TGTTGTTGTTAAGGACTGTGGC R CAAACTGTCTCTCCACCTCCC	ATCT ₍₄₀₎	58
<i>Tlacu506</i>	F AAGCATGTTGGGTTTGGAGC R CACACATATCTCCTGGGTGTTCC	ATAC ₍₃₆₎	60
<i>Tlacu530</i>	F GGAACAGTGACAACTGTGTGTATCC R GCTCTAGTTCTTTATCCATGGTGCC	TCTG ₍₃₂₎	60
<i>Tlacu575</i>	F CTCAGGGAATGGAGTTTGGG R TTTGTGCTAGATTTGTGGTTGC	AAAC ₍₃₂₎	60
<i>Tlacu670</i>	F ACAGGCCACACCAATGAGG R TGGAGAGCAGAAGAGTTGG	AGGG ₍₂₈₎	58
<i>Tlacu730</i>	F GGATGGATAGACAGATGGGC R GAAATGCTAAATTTCTATCAGTGGC	ATCT ₍₂₈₎	60

APÉNDICE IV

Desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) coeficiente de consanguinidad (F_{IS}) y presencia de alelos nulos por locus y por clado filogenético del género *Tlacuatzin*. Los valores en negritas muestran diferencias significativas tras la corrección de Bonferroni ($p = 0.01$). La presencia de alelos nulos se marca con asterisco (*).

	Planicie costera del Pacífico	Cuenca del Río Balsas	Istmo de Tehuantepec	Península de Yucatán	Islas Tres Marias	Promedio
<i>Tlacu119</i>						
Desviación EHW	0.0018	0.0142	0.4152	0.3442	0.7390	0.3028
F_{IS}	0.1991	0.4608	0.2117	0.2941	0.1358	0.2603
Alelos nulos	NO	SI	NO	NO	NO	
<i>Tlacu151</i>						
Desviación EHW	0.0294	0.0004	0.0776	1.0000	0.1202	0.2455
F_{IS}	0.3529	0.5349	0.3182	-0.0667	0.5333	0.3345
Alelos nulos	SI	NO	NO	NO	NO	
<i>Tlacu169</i>						
Desviación EHW	0.0002	0.0663	0.2474	0.0502	0.2403	0.1208
F_{IS}	0.5324	0.3755	0.3077	0.7143	0.4167	0.4693
Alelos nulos	SI	SI	NO	NO	NO	
<i>Tlacu193</i>						
Desviación EHW	0.0000	0.0427	0.0097	1.0000	0.3232	0.2752
F_{IS}	0.5021	0.3143	0.5263	0.1724	0.2329	0.3496
Alelos nulos	SI	NO	SI	NO	NO	

<i>Tlacu227</i>													
Desviación EHW	0.2091	0.0172	0.1102	1.0000	0.8073	0.4287							
F_{IS}	0.1327	0.5041	0.4286	0.1724	0.1139	0.2703							
Alelos nulos	NO	SI	NO	NO	NO								
<i>Tlacu311</i>													
Desviación EHW	0.0117	0.0965	0.1837	0.6546	0.4855	0.2864							
F_{IS}	0.3793	0.3364	0.4000	0.0000	0.3412	0.2913							
Alelos nulos	SI	NO	NO	NO	NO								
<i>Tlacu413</i>													
Desviación EHW	0.0062	0.0316	0.0603	1.0000	0.8064	0.3809							
F_{IS}	0.2931	0.3514	0.2117	-0.0909	0.1139	0.1758							
Alelos nulos	NO	NO	NO	NO	NO								
<i>Tlacu506</i>													
Desviación EHW	0.0074	0.3375	0.8802	0.6177	0.0076	0.3700							
F_{IS}	0.4167	0.2871	-0.0080	0.3600	0.4878	0.3087							
Alelos nulos	SI	NO	NO	NO	NO								
<i>Tlacu530</i>													
Desviación EHW	0.0005	0.2288	0.1268	1.0000	0.4327	0.3577							
F_{IS}	0.4538	0.2195	0.4331	0.1724	0.3636	0.3284							
Alelos nulos	SI	NO	NO	NO	NO								
<i>Tlacu575</i>													
Desviación EHW	0.0668	0.0612	0.3037	1.0000	0.2855	0.3434							
F_{IS}	0.2076	0.2967	0.1818	-0.1852	0.3253	0.1652							
Alelos nulos	NO	SI	NO	NO	NO								

Tlacu670										
<i>Desviación EHW</i>										
F_{IS}	0.0005	0.0253	0.0985	0.0401	0.5055	0.1339				
Alelos nulos	0.4516	0.4937	0.2448	0.5556	0.2911	0.4073				
	SI	SI	NO	NO	NO					
Tlacu730										
<i>Desviación EHW</i>										
F_{IS}	0.0000	0.0025	0.0717	0.2310	0.0869	0.0784				
Alelos nulos	0.5163	0.4686	0.4745	0.474	0.5000	0.4866				
	SI	SI	NO	NO	NO					
Promedio										
<i>Desviación EHW</i>	0.0278	0.0770	0.2154	0.6614	0.4033					
F_{IS}	0.3698	0.3869	0.3108	0.2143	0.3212					

APÉNDICE V

Probabilidad de ligamiento entre pares de loci en todos los clados filogenéticos del género *Tlacuatzin*. Los valores en negritas muestran diferencias significativas tras la corrección de Bonferroni ($p = 0.002$). g. l. = grados de libertad; p = probabilidad.

Par de loci	X^2	g. l.	p	Par de loci	X^2	g. l.	p
<i>Tlacu119 & Tlacu151</i>	0.195336	6	0.995530	<i>Tlacu227 & Tlacu311</i>	7.274179	8	0.507360
<i>Tlacu119 & Tlacu169</i>	15.503451	8	0.050064	<i>Tlacu119 & Tlacu413</i>	1.907059	8	0.983730
<i>Tlacu151 & Tlacu169</i>	1.006178	8	0.998209	<i>Tlacu151 & Tlacu413</i>	3.173752	8	0.922985
<i>Tlacu119 & Tlacu193</i>	2.271283	8	0.971545	<i>Tlacu169 & Tlacu413</i>	3.701023	10	0.959828
<i>Tlacu151 & Tlacu193</i>	3.644644	6	0.724637	<i>Tlacu193 & Tlacu413</i>	0.176395	8	0.999998
<i>Tlacu169 & Tlacu193</i>	8.768600	8	0.362191	<i>Tlacu227 & Tlacu413</i>	0.390036	8	0.999948
<i>Tlacu119 & Tlacu227</i>	10.011953	8	0.264188	<i>Tlacu311 & Tlacu413</i>	5.489876	10	0.856149
<i>Tlacu151 & Tlacu227</i>	6.667135	6	0.352730	<i>Tlacu119 & Tlacu506</i>	5.509717	8	0.701963
<i>Tlacu169 & Tlacu227</i>	4.793572	8	0.779394	<i>Tlacu151 & Tlacu506</i>	4.242194	8	0.834637
<i>Tlacu193 & Tlacu227</i>	8.851589	8	0.354970	<i>Tlacu169 & Tlacu506</i>	10.116583	10	0.430325
<i>Tlacu119 & Tlacu311</i>	4.689088	8	0.790231	<i>Tlacu193 & Tlacu506</i>	11.008945	8	0.201193
<i>Tlacu151 & Tlacu311</i>	6.603828	8	0.579915	<i>Tlacu227 & Tlacu506</i>	2.722033	8	0.950573
<i>Tlacu169 & Tlacu311</i>	3.613444	10	0.963105	<i>Tlacu311 & Tlacu506</i>	1.256700	10	0.999515
<i>Tlacu193 & Tlacu311</i>	0.588984	8	0.999752	<i>Tlacu413 & Tlacu506</i>	12.335891	10	0.263205
<i>Tlacu119 & Tlacu530</i>	5.969812	8	0.650614	<i>Tlacu169 & Tlacu670</i>	3.944922	8	0.862058

<i>Tlacu151 & Tlacu530</i>	9.119130	6	0.166988	<i>Tlacu193 & Tlacu670</i>	8.274652	8	0.407112
<i>Tlacu169 & Tlacu530</i>	17.929553	8	0.021761	<i>Tlacu227 & Tlacu670</i>	2.635683	8	0.955103
<i>Tlacu193 & Tlacu530</i>	4.952447	8	0.762646	<i>Tlacu311 & Tlacu670</i>	2.169005	8	0.975387
<i>Tlacu227 & Tlacu530</i>	2.986067	8	0.935229	<i>Tlacu413 & Tlacu670</i>	6.736429	8	0.565319
<i>Tlacu311 & Tlacu530</i>	4.795563	8	0.779186	<i>Tlacu506 & Tlacu670</i>	5.911485	8	0.657146
<i>Tlacu413 & Tlacu530</i>	4.644131	8	0.794846	<i>Tlacu530 & Tlacu670</i>	3.442192	8	0.903630
<i>Tlacu506 & Tlacu530</i>	13.628911	8	0.091965	<i>Tlacu575 & Tlacu670</i>	4.290137	8	0.830043
<i>Tlacu119 & Tlacu575</i>	4.822129	8	0.776407	<i>Tlacu119 & Tlacu730</i>	0.886583	8	0.998868
<i>Tlacu151 & Tlacu575</i>	4.134873	8	0.844754	<i>Tlacu151 & Tlacu730</i>	11.541828	8	0.172847
<i>Tlacu169 & Tlacu575</i>	6.372333	10	0.783072	<i>Tlacu169 & Tlacu730</i>	3.379516	10	0.971032
<i>Tlacu193 & Tlacu575</i>	5.156794	8	0.740694	<i>Tlacu193 & Tlacu730</i>	8.716620	8	0.366763
<i>Tlacu227 & Tlacu575</i>	6.566515	8	0.584040	<i>Tlacu227 & Tlacu730</i>	2.408584	8	0.965858
<i>Tlacu311 & Tlacu575</i>	1.028062	10	0.999805	<i>Tlacu311 & Tlacu730</i>	0.910940	10	0.999888
<i>Tlacu413 & Tlacu575</i>	4.207305	10	0.937511	<i>Tlacu413 & Tlacu730</i>	0.545561	10	0.999990
<i>Tlacu506 & Tlacu575</i>	2.163451	10	0.994927	<i>Tlacu506 & Tlacu730</i>	3.994997	10	0.947572
<i>Tlacu530 & Tlacu575</i>	5.141515	8	0.742349	<i>Tlacu530 & Tlacu730</i>	6.857979	8	0.552031
<i>Tlacu119 & Tlacu670</i>	0.265349	8	0.999988	<i>Tlacu575 & Tlacu730</i>	9.179657	10	0.515143
<i>Tlacu151 & Tlacu670</i>	5.064111	6	0.535617	<i>Tlacu670 & Tlacu730</i>	8.542909	8	0.382309

APÉNDICE VI

Frecuencias alélicas de cada locus para cinco clados filogenéticos del género *Tlacuatzin*. Los valores en negritas corresponden a los alelos privados, mientras que los alelos raros (frecuencia <0.10) están marcados con un asterisco (*).

Locus/Alelo	Planicie costera del Pacífico	Cuenca del Río Balsas	Istmo de Tehuantepec	Península de Yucatán	Islas Tres Marias
<i>Tlacu119</i>					
80	0.083*	0	0	0	0
84	0.056*	0	0	0	0
88	0.028*	0	0	0	0.313
92	0.167	0	0	0	0.438
96	0.306	0	0	0	0.188
100	0.361	0	0	0	0.063*
104	0	0	0	0.100	0
108	0	0	0	0.200	0
112	0	0	0	0.100	0
116	0	0	0	0.400	0
120	0	0	0.100	0	0
124	0	0	0.300	0.200	0
128	0	0	0.250	0	0
132	0	0.083*	0.350	0	0
140	0	0.250	0	0	0
144	0	0.375	0	0	0
148	0	0.250	0	0	0
152	0	0.042*	0	0	0
<i>Tlacu151</i>					
180	0	0.038*	0	0	0
184	0	0.154	0	0	0
188	0	0.462	0	0	0
192	0	0.115	0	0	0
196	0	0.154	0	0	0
208	0	0	0.300	0	0
212	0	0.077*	0.450	0	0
216	0	0	0.100	0.100	0
220	0	0	0.100	0	0
224	0	0	0.050*	0.100	0

228	0	0	0	0.800	0
232	0.139	0	0	0	0.188
236	0.083*	0	0	0	0.188
240	0.139	0	0	0	0.250
244	0.417	0	0	0	0.375
248	0.194	0	0	0	0
252	0.028*	0	0	0	0
<i>Tlacu169</i>					
112	0	0	0	0.400	0
116	0	0	0	0.500	0
120	0	0	0	0.100	0
128	0	0	0.050*	0	0
132	0	0	0.350	0	0
136	0	0.077*	0.400	0	0
140	0	0	0.200	0	0
152	0	0.115	0	0	0
156	0	0.231	0	0	0
160	0	0.192	0	0	0
164	0	0.192	0	0	0
168	0	0.192	0	0	0
172	0.083*	0	0	0	0.563
176	0.222	0	0	0	0.250
180	0.333	0	0	0	0.188
184	0.083*	0	0	0	0
188	0.056*	0	0	0	0
192	0.139	0	0	0	0
196	0.083*	0	0	0	0
<i>Tlacu193</i>					
208	0	0	0	0.400	0
212	0	0	0	0.200	0
216	0	0	0	0.400	0
220	0	0.038*	0.200	0	0
224	0	0.038*	0.150	0	0
232	0	0	0.300	0	0
236	0	0	0.250	0	0
240	0	0	0.050*	0	0
244	0	0	0.050*	0	0
268	0	0.346	0	0	0
272	0	0.231	0	0	0
276	0	0.269	0	0	0.563
280	0.361	0.077*	0	0	0.125

284	0.250	0	0	0	0.250
288	0.167	0	0	0	0.063*
292	0.167	0	0	0	0
296	0.056*	0	0	0	0
<i>Tlacu227</i>					
112	0	0	0	0.400	0
116	0	0	0	0.400	0
120	0	0	0	0.200	0
132	0	0	0.350	0	0
136	0	0.077*	0.450	0	0
140	0	0	0.050*	0	0
144	0	0	0.150	0	0
152	0	0.308	0	0	0
156	0	0.308	0	0	0.250
160	0	0.269	0	0	0.375
164	0.194	0.038*	0	0	0.375
168	0.528	0	0	0	0
172	0.250	0	0	0	0
176	0.028*	0	0	0	0
<i>Tlacu311</i>					
228	0	0	0	0.300	0
232	0	0	0	0.300	0
236	0	0	0	0.300	0
240	0	0	0	0.100	0
244	0	0	0.200	0	0
248	0	0	0.500	0	0
252	0	0.346	0.300	0	0
256	0	0.385	0	0	0.063*
260	0	0.269	0	0	0.313
264	0.250	0	0	0	0.375
268	0.306	0	0	0	0.250
272	0.222	0	0	0	0
284	0.083*	0	0	0	0
288	0.111	0	0	0	0
292	0.028*	0	0	0	0
<i>Tlacu413</i>					
132	0	0	0	0.500	0
136	0	0	0	0.500	0
140	0	0.038*	0	0	0
144	0	0.038*	0.250	0	0
148	0	0	0.350	0	0

152	0	0.154	0.300	0	0
156	0	0.423	0.100	0	0
160	0.222	0.346	0	0	0.375
164	0.278	0	0	0	0.375
168	0.306	0	0	0	0.250
176	0.139	0	0	0	0
180	0.056*	0	0	0	0
<i>Tlacu506</i>					
292	0	0	0	0.100	0
296	0	0	0	0.600	0
300	0	0	0.300	0.300	0
304	0	0.385	0.400	0	0
308	0	0.154	0.300	0	0
312	0	0.462	0	0	0
316	0.389	0	0	0	0.313
320	0.444	0	0	0	0.313
324	0.083*	0	0	0	0.375
328	0.056*	0	0	0	0
332	0.028*	0	0	0	0
<i>Tlacu530</i>					
228	0	0	0	0.300	0
232	0	0	0	0.100	0
236	0	0	0	0.500	0
240	0	0	0	0.100	0
244	0	0.038*	0.350	0	0
248	0	0.038*	0.450	0	0
252	0	0.231	0.100	0	0
256	0.250	0.308	0.100	0	0
260	0.250	0.308	0	0	0
264	0.278	0.072	0	0	0.563
268	0	0	0	0	0.375
272	0.056*	0	0	0	0.063*
276	0.028*	0	0	0	0
280	0.111	0	0	0	0
288	0.028*	0	0	0	0
<i>Tlacu575</i>					
192	0	0	0	0.300	0
196	0	0	0	0.500	0
200	0	0	0.050	0.200	0
204	0	0	0.350	0.	0
208	0	0	0.400	0	0

212	0	0.167	0.050*	0	0.250
216	0.167	0.154	0	0	0.500
220	0.250	0.231	0	0	0.250
224	0.389	0.115	0	0	0
228	0.056*	0.077*	0	0	0
232	0.056*	0.231	0	0	0
236	0.083*	0.077*	0	0	0
<i>Tlacu670</i>					
148	0	0	0	0.200	0
152	0	0	0	0.300	0
156	0	0	0	0.300	0
160	0	0	0.100	0.100	0
164	0	0	0.200	0	0
168	0	0	0.400	0.100	0
172	0	0.038*	0.050*	0	0
176	0.278	0.346	0.200	0	0.250
180	0.083*	0.346	0.050*	0	0.500
184	0.194	0.192	0	0	0.188
188	0.306	0.077*	0	0	0.063*
192	0.056*	0	0	0	0
196	0.028*	0	0	0	0
212	0.056*	0	0	0	0
<i>Tlacu730</i>					
312	0	0	0	0.100	0
316	0	0	0	0.600	0
320	0	0	0	0.100	0
324	0	0	0.250	0.200	0
328	0	0	0.250	0	0
332	0	0.077*	0.400	0	0
336	0	0	0.100	0	0.375
340	0.056*	0.077*	0	0	0.375
344	0.333	0.269	0	0	0.188
348	0.278	0.231	0	0	0.063*
352	0.167	0.192	0	0	0
356	0.028*	0.154	0	0	0
360	0.083*	0	0	0	0
372	0.056*	0	0	0	0

APÉNDICE VII

Probabilidad de que las muestras de los ratones tlacuache del género *Tlacuatzin* pertenezcan a un grupo. Los valores en negritas representan la probabilidad más alta.

Muestras	Grupo <i>a priori</i>	Grupo <i>a posteriori</i>				
		1	2	3	4	5
1	1	0.995	0.001	0.001	0.001	0.001
2	1	0.994	0.002	0.002	0.001	0.001
3	1	0.994	0.002	0.002	0.001	0.001
4	1	0.994	0.002	0.002	0.001	0.001
5	1	0.994	0.002	0.002	0.001	0.001
6	1	0.994	0.001	0.002	0.001	0.001
7	1	0.992	0.002	0.002	0.003	0.001
8	1	0.994	0.002	0.002	0.001	0.001
9	1	0.009	0.988	0.001	0.001	0.001
10	1	0.005	0.989	0.003	0.001	0.001
11	1	0.072	0.924	0.002	0.001	0.001
12	1	0.970	0.025	0.002	0.001	0.001
13	1	0.994	0.002	0.002	0.001	0.001
14	1	0.993	0.002	0.002	0.001	0.001
15	1	0.994	0.002	0.002	0.001	0.001
16	1	0.995	0.002	0.002	0.001	0.001
17	1	0.001	0.995	0.001	0.001	0.001
18	1	0.994	0.002	0.002	0.001	0.001
19	2	0.003	0.002	0.992	0.002	0.001
20	2	0.007	0.027	0.963	0.001	0.001
21	2	0.002	0.001	0.994	0.002	0.001
22	2	0.002	0.002	0.994	0.001	0.001
23	2	0.002	0.001	0.994	0.001	0.001
24	2	0.002	0.001	0.995	0.001	0.001

25	2	0.002	0.001	0.994	0.001	0.001
26	2	0.004	0.002	0.029	0.964	0.001
27	2	0.020	0.003	0.975	0.001	0.001
28	2	0.002	0.001	0.994	0.001	0.001
29	2	0.002	0.001	0.994	0.001	0.001
30	2	0.003	0.002	0.992	0.002	0.001
31	2	0.002	0.001	0.994	0.002	0.001
32	3	0.001	0.001	0.001	0.995	0.001
33	3	0.001	0.001	0.002	0.995	0.001
34	3	0.002	0.002	0.150	0.845	0.002
35	3	0.004	0.001	0.002	0.992	0.001
36	3	0.001	0.001	0.001	0.994	0.002
37	3	0.001	0.001	0.001	0.995	0.001
38	3	0.001	0.001	0.001	0.995	0.001
38	3	0.001	0.001	0.001	0.995	0.001
40	3	0.001	0.001	0.001	0.995	0.001
41	3	0.001	0.001	0.001	0.995	0.002
42	4	0.001	0.001	0.001	0.002	0.995
43	4	0.001	0.001	0.001	0.303	0.694
44	4	0.001	0.001	0.001	0.002	0.995
45	4	0.001	0.001	0.001	0.001	0.995
46	4	0.001	0.001	0.001	0.001	0.996
47	5	0.994	0.001	0.002	0.001	0.001
48	5	0.994	0.001	0.003	0.001	0.001
49	5	0.993	0.002	0.003	0.001	0.001
50	5	0.929	0.009	0.058	0.002	0.002
51	5	0.994	0.002	0.002	0.001	0.001
52	5	0.992	0.001	0.003	0.002	0.001
53	5	0.994	0.002	0.002	0.001	0.001
54	5	0.994	0.001	0.003	0.001	0.001

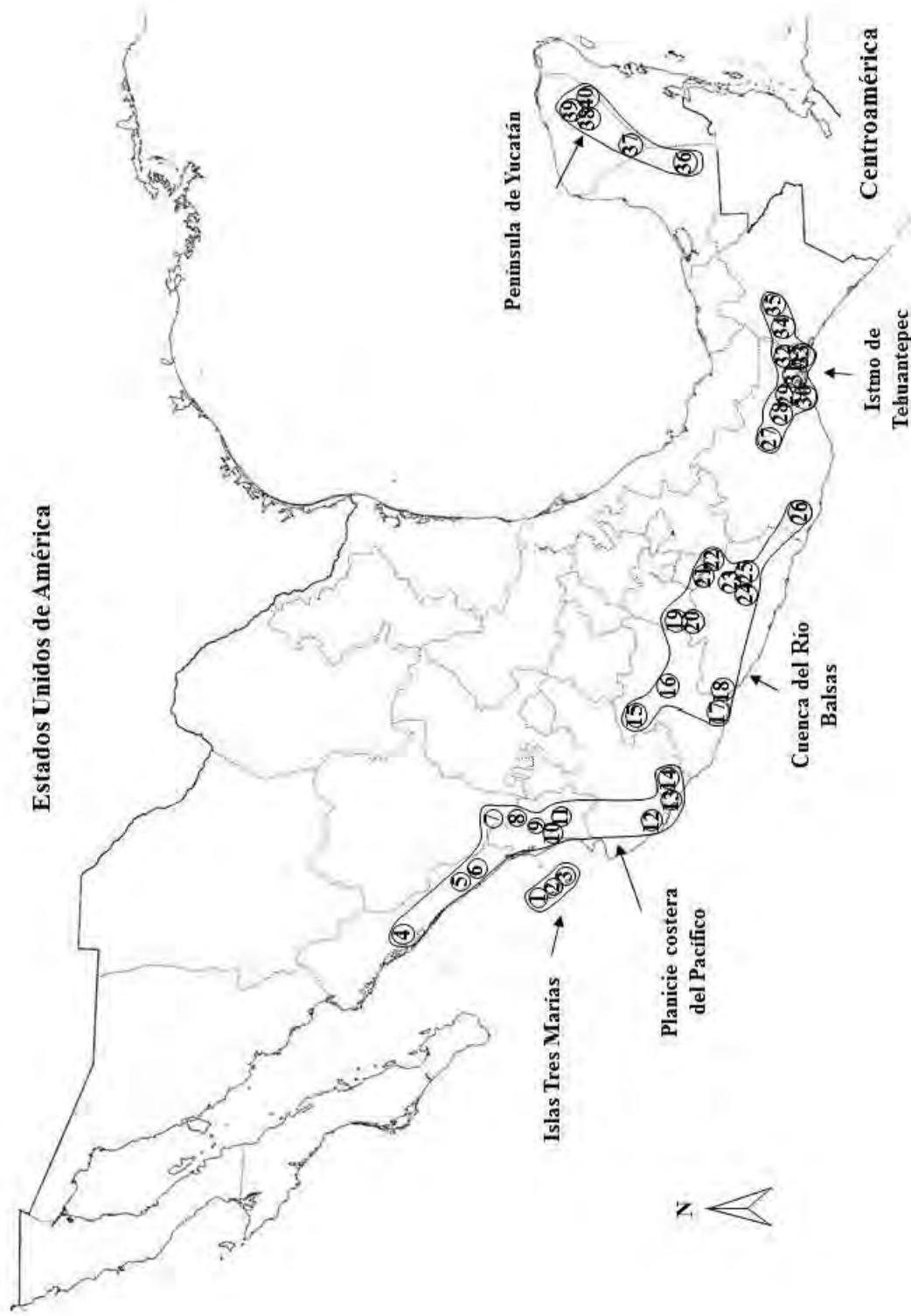


Figura 1.—Distribución geográfica de los cinco clados del género *Tlacuatzin* y de las poblaciones muestreadas en este estudio. Los números corresponden a las localidades descritas en el Apéndice I.

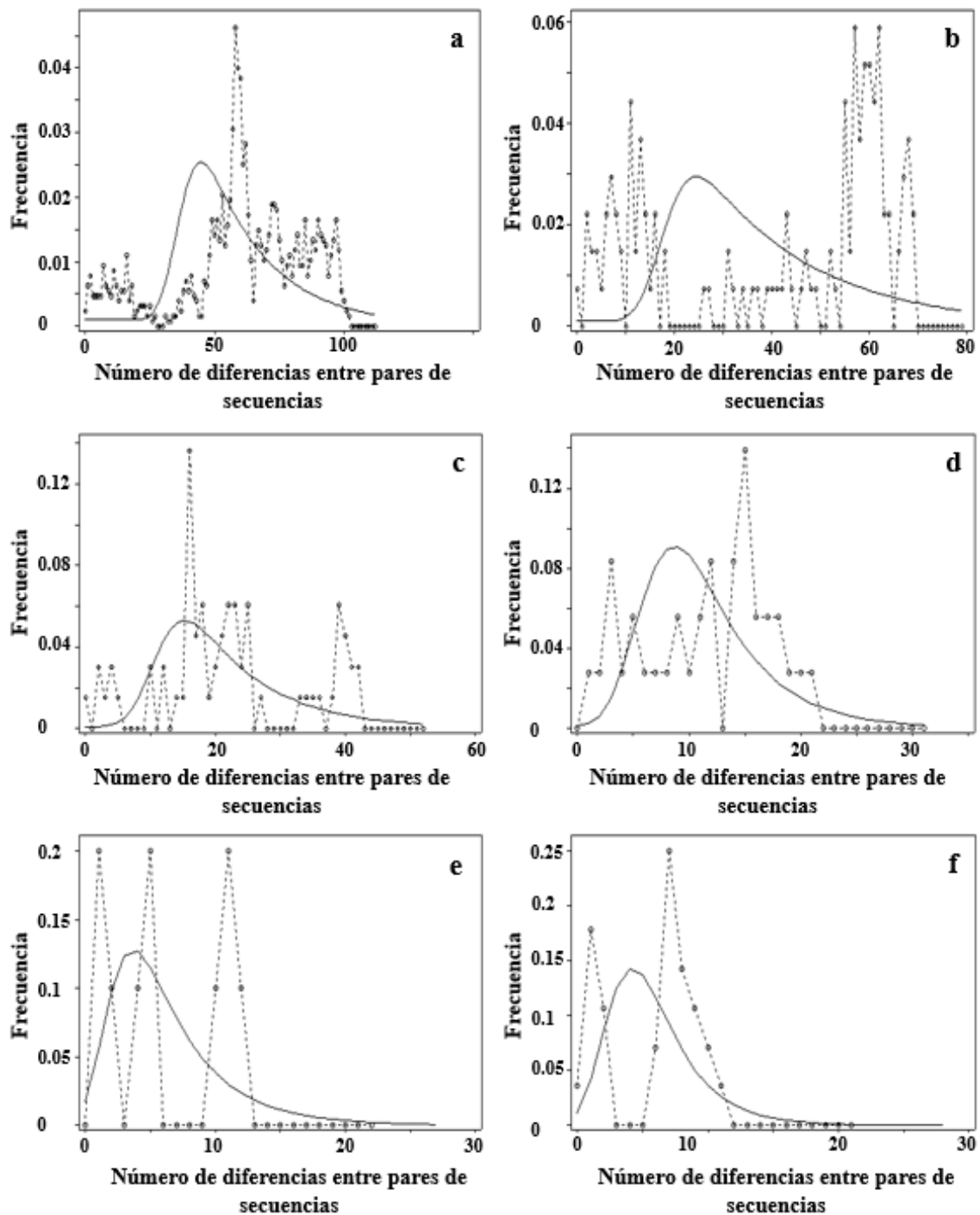


Figura 2.—Distribuciones Mismatch para el género *Tlacuatzin* y los cinco clados filogenéticos que lo conforman. a) Muestra total; b) Planicie costera del Pacífico; c) Cuenca del Río Balsas; d) Istmo de Tehuantepec; e) Península de Yucatán; f) islas Tres Marias. La línea punteada corresponde a la distribución observada y la línea sólida la esperada.

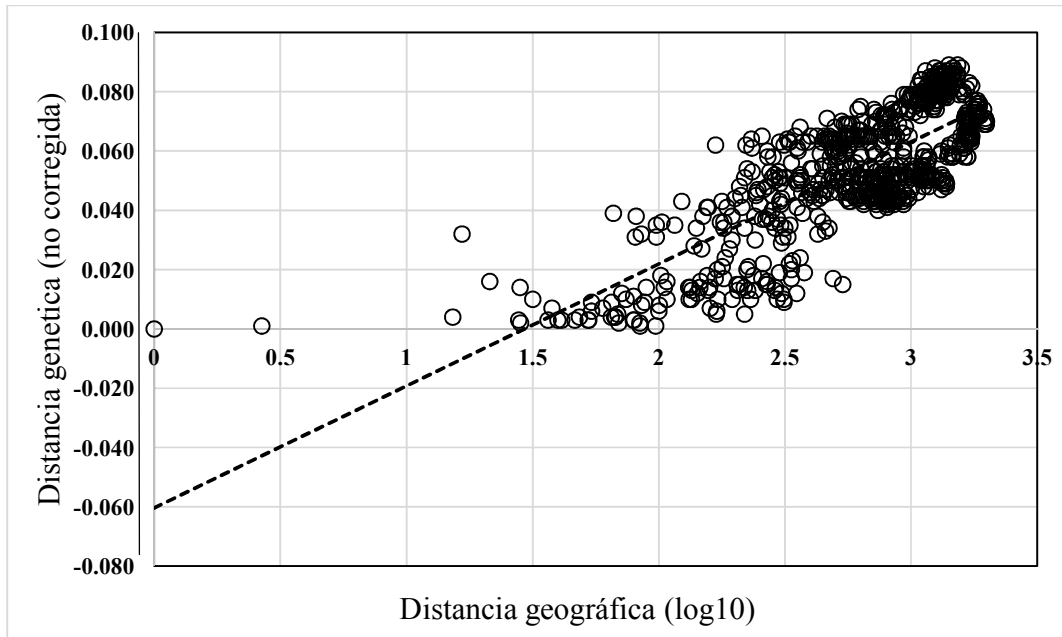


Figura 3.—Correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de 51 ejemplares del género *Tlacuatzin*. La línea punteada representa la tendencia en la dispersión de las muestras ($r = 0.797$, $p = 0.000$).

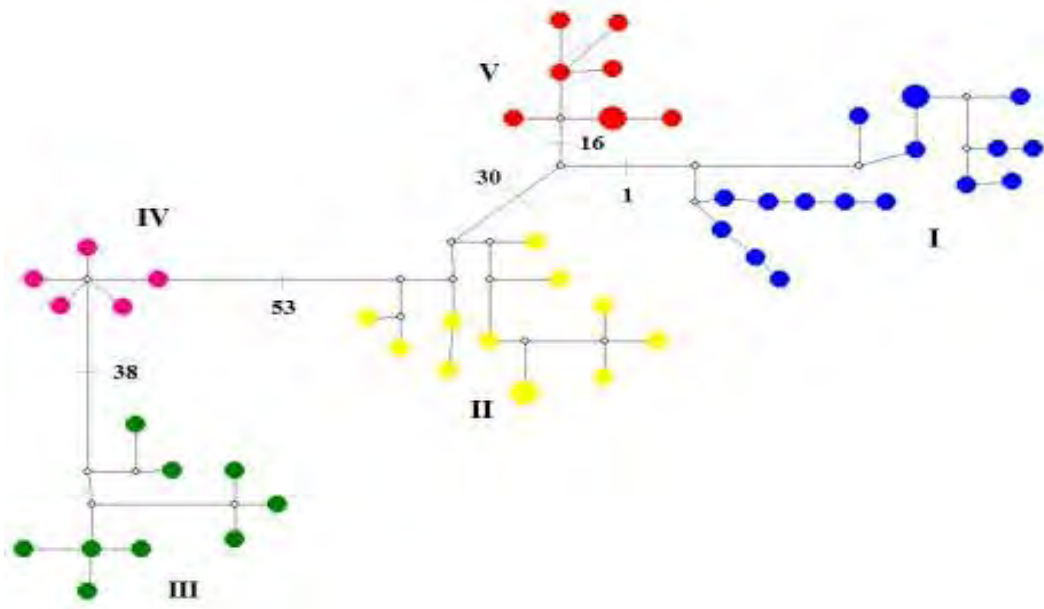


Figura 4.—Red de haplotipos del género *Tlacuatzin* conformada por 5 grupos: I, Planicie costera del Pacífico (azul); II, Cuenca del Río Balsas (amarillo); III, Istmo de Tehuantepec (verde); IV, Península de Yucatán (morado); V, islas Tres Marias (rojo). Las líneas conectan a cada haplotipo y los números sobre estas muestran el número de cambios. Los círculos blancos representan los haplotipos no muestreados.

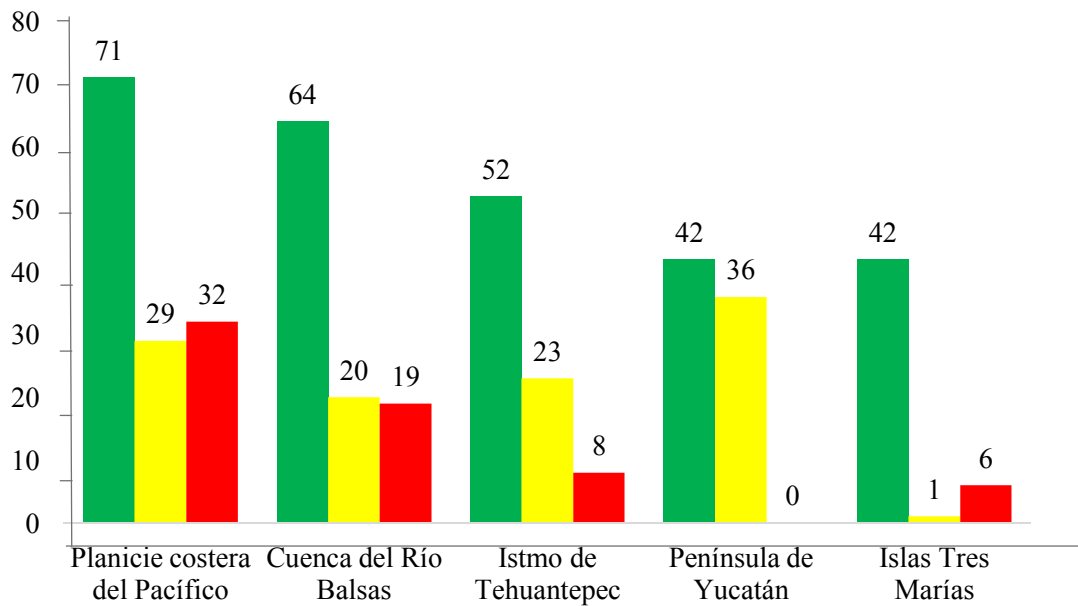


Figura 5.—Número de alelos encontrados en cinco clados filogenéticos del género *Tlacuatzin*. Total de alelos (verde); Alelos privados (amarillo); Alelos raros (rojo).

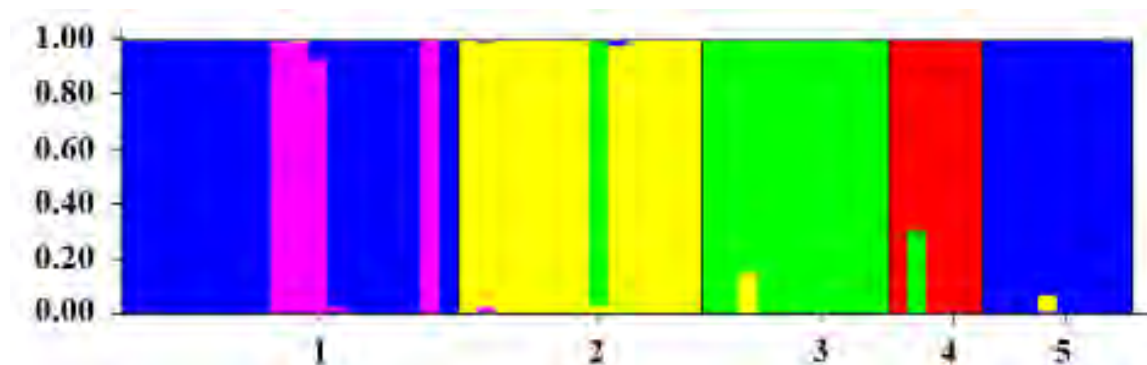


Figura 6.—Análisis bayesiano de la estructura genética de los cinco clados filogenéticos del género *Tlacuatzin* con una probabilidad del 90% de pertenecer a cada grupo. 1, Planicie costera del Pacífico; 2, Cuenca del Río Balsas; 3, Istmo de Tehuantepec; 4, Península de Yucatán; 5, Islas Tres Marías.

CAPÍTULO IV

DNA barcoding of Mexican marsupials (Mammalia: Didelphimorphia)

Manuscrito en extenso para ser sometido a la Revista de Biología Tropical

DNA barcoding of Mexican marsupials (Mammalia: Didelphimorphia)

Jésica Arcangeli^{1,2*} & Fernando A. Cervantes¹

1. Colección Nacional del Mamíferos, Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. A. P. 70-153, C. P. 04510, Ciudad de México, México; jeaa@st.ib.unam.mx, fac@st.ib.unam.mx

2. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Ciudad Universitaria 3000, C. P. 04360, Coyoacán, Ciudad de México, México

* Correspondence

Abstract: DNA barcoding of Mexican marsupials (Mammalia: Didelphimorphia).

There are nine species of marsupials distributed in México whose biology has been scarcely studied. They are morphologically well differentiated from each other, except for the species pairs *Didelphis virginiana* – *D. marsupialis* and *Marmosa mexicana* – *Tlacuatzin canescens*, which are difficult to distinguish from each other. On the other hand, *Caluromys derbianus*, *Chironectes minimus* and *Metachirus nudicaudatus* are barely known. It is necessary, then, to generate evidence to document correctly their taxonomic identity, their occurrence in México, and provide information to conserve this species. A recent alternative for species identification is the use of DNA barcodes such as the cytochrome oxidase subunit I (*CoxI*) gene, which has been widely used to document genetic differences along animal species. Therefore, this study aimed to characterize Mexican opossums through their barcodes. Sequences of the *CoxI* gene were obtained from 36 Mexican opossums and were compared through the neighbor-joining (NJ) algorithm with Kimura's two-parameter (K2P) model of nucleotide substitution. Other ten didelphid marsupials were included in the analyses for constructing a reference library and two placentals were used to root the tree. The NJ tree grouped the haplotypes of *C. minimus*, *D. virginiana*, *D. marsupialis*, *M. mayensis*, *M. nudicaudatus*, and *T. canescens* in well differentiated clusters, while the haplotypes of *P. opossum* and *M. mexicana* were clustered with the haplotypes of *P. andersoni* and *M. mayensis*, respectively. Intraspecific divergence was >2% in almost all species, except in *D. virginiana* and *M. mayensis*, in

which the genetic distances varied from 0.0 to 1.3% and from 0.6 to 1.4%, respectively. In contrast, interspecific K2P divergences were higher and varied from 2.5 to 21.9%. These results demonstrate that DNA barcodes are a useful tool to document genetic differences among the nine species of Mexican marsupials, and therefore, they can be used to characterize them molecularly for their taxonomic identification. This information will be valuable for conservation purposes.

Key words: *CoxI*, Didelphidae, genetic distance, mammals, opossums, taxonomic identification.

Total number of words: 6 859

Most Neotropical marsupials are classified in the order Didelphimorphia, which includes approximately 100 species grouped in 19 genera and it is the third most diverse group within the Neotropical mammalian fauna after chiropters and rodents (Voss, Lunde & Simmons, 2001; Jansa, Barker & Voss, 2013). These marsupials are small or middle-size mammals characterized by a long snout, five digits on each foot, opposable and clawless thumb on the hindfeet, a naked and prehensile tail, and a well-developed marsupium in most species (Villa & Cervantes, 2003; Vaughan, Ryan & Czaplewski, 2010). They are distributed in the New World, from southern Canada to the Patagonia and mostly confined to tropical environments where they are abundant (Vaughan et al., 2010).

Nine species and seven genera represent the order Didelphimorphia in México: *Caluromys derbianus* Waterhouse 1841 (woolly opossum), *Chironectes minimus* Zimmermann 1780 (water opossum), *Didelphis marsupialis* Linnaeus 1758 (common opossum), *Didelphis virginiana* Kerr 1792 (Virginia opossum), *Marmosa mexicana* Merriam 1897 (Mexican mouse opossum), *Marmosa mayensis* Osgood 1913 (Mayan mouse opossum), *Metachirus nudicaudatus* Geoffroy 1803 (Brown four-eyed opossum), *Philander opossum* Linnaeus 1758 (Four-eyed opossum), and *Tlacuatzin canescens* Allen 1893 (Gray mouse opossum; Ramírez-Pulido, González-Ruiz, Gardner & Arroyo-Cabrales, 2014). These marsupials are commonly named “opossums” and occupy almost the entire country, except the Península of Baja California and the Central Plateau (Villa & Cervantes, 2003). The knowledge of these opossums in México is scarce because they are uncharismatic and some species such as *C. minimus* or *C. derbianus* are difficult to find.

The morphology of these opossum differentiates them from each other, except for the pairs of species *D. virginiana* – *D. marsupialis* and *M. mexicana* – *T. canescens*, which are difficult to tell apart as to external morphology (Cervantes, Arcangeli, Hortelano-Moncada & Borisenko, 2010; Vázquez, 2011). The accurate identification of these opossums is important because their highly similar morphology may lead them to have similar ecological niches (Gardner, 1973). For instance, *D. virginiana* and *D. marsupialis* are the most important reservoirs of the protozoan *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909 that causes Chagas disease in Mexican tropics (Ruiz-Piña & Cruz-Reyes, 2002). Likewise, a recent study documented the presence of the same species of fleas and mites in *M. mexicana* and

T. canescens (Guzmán-Cornejo, García-Prieto, Acosta-Gutiérrez, Falcón-Ordaz & León-Paniagua, 2012). On the other hand, *C. derbianus* and *M. nudicaudatus* are threatened species, while *C. minimus* is in risk of extinction because of the destruction of their habitat (Ceballos, 2014; Ramírez-Pulido et al., 2014). In addition, scanty and scarce specimens in Mexican biological collections does not help understand their biological attributes and their conservation status is not well determined (Ceballos, 2014). Therefore, it is important to document correctly the taxonomic identity of Mexican opossums and validate with collection records their presence in the country. Likewise, an accurate taxonomic identification allows planning actions for the conservation of these marsupials.

Recently, DNA barcodes have demonstrated to be a rapid and accurate tool for species identification as well as to document their occurrence in a certain region or country (Borisenko, Lim, Ivanova, Hanner & Hebert, 2008; Valentini, Pompanon & Taberlet, 2008). This approach involves sequence comparison and similarity search methods to recognize divergent linkages (Ferri et al., 2009). In such a way that, species are identified by tight clusters of similar sequences that shown genetic divergences < 2% among them (Hajibabaei, Janzen, Burns, Hallswachs & Hebert, 2006). The standard DNA barcoding marker used to identify animal species is a fragment of 648 base pair (bp) of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*CoxI*) gene because it shows a very high rate of mutation that reveals with high resolution the differences between closely related species (Hebert, Penton, Burns, Janzen & Hallswachs, 2004).

This molecular marker has been used in other mammalian groups such as chiropterans and rodents to document intraspecific divergence and identify species (Clare, Lim, Engstrom, Egert & Hebert, 2006; Borisenko et al., 2008). Likewise, the *CoxI* gene has also been used in some Neotropical marsupials. For example, this gene was used to identify effectively the two species of the genus *Didelphis* that are distributed in México (Cervantes et al., 2010). Likewise, Dias et al. (2012) used *CoxI* barcodes to delineate geographic boundaries between *Marmosa demerarae* Thomas, 1905 and *Marmosa paraguayanus* Tate, 1931. In addition, Agrizzi et al. (2012) evaluated the genetic divergence that existed within and among eleven South American marsupials using both *CoxI* and cytochrome-b (*Cytb*) sequences. Therefore, the effectiveness of this molecular

marker to document the genetic diversity and molecular identification of Neotropical marsupials has been demonstrated.

At present, there have been no studies focus on species limits of Mexican marsupials and the amplification of the *CoxI* gene has not been assayed in most species. The use of this molecular marker in these mammals may generate additional information to document correctly their taxonomic identity and their presence in México, as well as evaluate the genetic divergence within and among them. This may provide useful information for conservation actions. Therefore, the aim of this contribution was to characterize Mexican marsupials through their DNA barcodes.

MATERIALS AND METHODS

Samples: Tissue samples from Mexican marsupials (*Caluromys derbianus*, *Chironectes minimus*, *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis*, *Marmosa mexicana*, *M. mayensis*, *Metachirus nudicaudatus*, *Philander opossum*, and *Tlacuatzin canescens*) were obtained from specimens trapped in the field under the collecting permit FAUT-2000 issued to Fernando A. Cervantes and through loans from mammalian collections (Appendix I). Trapped specimens were handled and euthanized according guidelines of the American Society of Mammalogists for use of wild mammals in research (Sikes & the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists, 2016). Samples included six frozen tissues, six alcohol-preserved tissues (including one ear biopsy without voucher specimen), and four skin snips from museum specimens. In addition, 18 samples were download from the international Barcode of Life database (BOLD; <http://www.barcodinglife.org>). In total, 36 specimens from Mexican marsupials were examined through DNA barcodes (Appendix I).

Laboratory procedures: Laboratory procedures implemented for skin snips were performed in a separated area used for ancient DNA. Museum specimens were handled with disposable gloves, wearing a lab coat and facemask. Tools used to obtained skin snips were cleaned in 10% hypochlorite before procedures and between samples. In addition,

prior laboratory procedures all materials were sterilized using UV radiation to avoid possible contamination.

DNA from frozen and alcohol-preserved tissues was extracted following the instructions of the Axygen Biosciences protocol (AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit, Cat. No. AP-MN-MS-GDNA-50). DNA from skin snips was extracted using the same protocol with some modifications. Prior to DNA extractions samples were cleaned with STE (NaCl₂ 0.1 M, Tris 0.05 ph 7.5, EDTA 0.001 M) to hydrate and eliminate impurities (Hillis, Moritz & Mable, 1996). After that, samples were sliced in small pieces and the digestion was performed overnight. Subsequent steps were implemented according to the manufacturer's instructions, except elution made in water at 65°C. DNA quality of all samples was evaluated through electrophoresis in 1% agarose gels and its concentration was measured with a spectrophotometer.

A fragment of 657 base pairs (bp) of cytochrome oxidase subunit I (*CoxI*) was amplified through the polymerase chain reaction (PCR). Amplifications were performed in a thermocycler (Maxygene Gradient Thermal Cycler) and carried out in a 25 µl volume containing 50 ng of DNA, 0.4 mM each primer, 0.2 mM each dNTP, 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, and 1.0U of Taq polymerase. For DNA obtained from frozen and alcohol-preserved tissues, amplification of *CoxI* gene was performed using universal primers (VF2_t1 and FR1d_t1) from Ivanova, Zemplak, Hanner & Hebert (2007; Table 1). For degraded skin snips, the *Cox I* gene was amplified using multiple primer pairs following León (2013; Table 1). Primer combination were as follows: VF2_t1/COIR3, COIF3/COIR2, and MneIR2/FR1d_t1. The optimal PCR conditions for *CoxI* gene in frozen and alcohol-preserved tissue were as follows: initial denaturation at 94°C for 3 min; followed by 30 cycles of 94°C for 30s, 55°C for 40s, and 72°C for 60s, and a final extension at 72°C for 3 min (modified from Cervantes et al., 2010). For quality, amplifications in degraded skin snips the thermocycler program included ten additional cycles.

PCR products were visualized with SYBR ® Safe DNA Gel Stain through electrophoresis in 1.5% agarose gels and purified using the AxyPrep PCR Clean-up Kit following manufacturer instructions. DNA was sequenced in both directions using the IB

automated sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer) and the primer pairs used for PCRs.

Data analysis: Sequences were edited and aligned manually using BioEdit 7.0.9 software (Hall, 1999). Afterwards, basic local alignment search tool (BLAST) search was run in GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) to determine what sequences were similar to those of our samples (Altschul, Gish, Miller, Myers & Lipman, 1990). Sequence accession numbers are to be obtained after uploading to GenBank. Kimura's two parameters (K2P) model of nucleotide substitution (Kimura, 1980) was used to calculate genetic distances and a neighbor-joining (NJ) tree was constructed using MEGA 7.0.14 (Kumar, Stecher & Tamura, 2015). Node support was tested with the bootstrap analysis at 1 000 replicates (Felsenstein, 1985). Analyses included other nine Neotropical marsupials (*Caluromys philander* Linnaeus 1758, *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied 1826), *Didelphis imperfecta* Mondolfi & Pérez-Hernández 1984, *Marmosa murina* Linnaeus 1758, *Marmosa waterhousei* Tomes 1860, *Monodelphis americana* (Müller 1776), *Monodelphis brevicaudata* (Erxleben 1777), *Philander andersoni* Osgood 1913, and *Philander frenatus* Olfers 1818) for comparative purposes. Two placental outgroups representing the orders Carnivora (*Procyon lotor* Linnaeus 1758) and Rodentia (*Osgoodomys banderanus*; Allen 1897) were used to root the tree. Sequences from these marsupials were obtained from BOLD (Appendix I). Species delimitation was performed using the genetic species concept, in which a species is delimited as a set of haplotypes between which there is a genetic divergence lower than 2% (Bradley & Baker, 2001).

RESULTS

Sequences: Forty-six *CoxI* sequences were obtained, 35 correspond to Mexican marsupials and 11 to other marsupial and placental outgroup taxa (Appendix I). Sequences length was about 657 bp, of which 228 were variable and informative. No insertions, deletions, or codon stops were observed in any sequence. Nucleotide composition was 34.3% thymine (T), 22.5% cytosine (C), 27.7% adenine (A), and 15.5% guanine (G) across all samples. A BLAST search showed that our *CoxI* sequences displayed high similarities

with those reported for Mexican marsupials (between 92-100% similarity), which confirmed the amplification of the fragment of interest. Additional results within Didelphimorphia included taxa consistent with outgroups such as *C. philander*, *D. aurita*, and *P. frenatus*.

Distance analyses: Thirty-one haplotypes were recorded for Mexican marsupials (Appendix I), which were clustered in several haplogroups, except for *C. derbianus* that was represented by a single individual. In addition, eleven haplotypes belonging to outgroup taxa were also documented. The NJ tree revealed that the haplotypes of *C. minimus*, *D. virginiana*, *D. marsupialis*, *M. mayensis*, *M. nudicaudatus*, and *T. canescens* are monophyletic. The samples of *C. minimus* formed two clades, one for México and other for Guyana and Brazil. The sequences of *D. virginiana* also were clustered in two geographically segregated haplogroups, one for the U. S. A. and Canada and another one for the distribution of this opossum in Mexico. Similarly, the NJ analysis grouped the samples of *D. marsupialis* into three clades. The first clade included one sequence from México (Veracruz). The second clade resulting from two barcodes from México (Campeche) and Costa Rica. The third clade contained samples from Guyana and Suriname. For *M. mayensis*, we found that the sequences were arrayed in a single haplogroup that included barcodes from México and Central America. Similarly, the samples of *M. nudicaudatus* formed four clusters, one for the geographical range of this opossum in México (Chiapas) and Panamá, two more for its distribution in Brazil and Ecuador, and another one for Suriname. The haplotypes of *T. canescens* were grouped in a single haplogroup, which included five divergent sequences that represent the entire distribution of this marsupial in México. On the other hand, the samples of *M. mexicana* and *P. opossum* were clustered into two paraphyletic haplogroups. For *M. mexicana* both haplogroups were distributed in México (Chiapas and Veracruz, respectively), while for *P. opossum* one haplogroup resulting from two haplotypes from México (Veracruz and Quintana Roo) and Panamá, and the other was formed with sequences from South America.

Intraspecific distance was >2% in almost all species, except in *D. virginiana* and *M. mayensis*, in which the genetic divergence varied from 0.0 to 1.4% and from 0.6 to 1.4%,

respectively. In contrast, interspecific K2P divergences were higher and varied from 2.5 to 21.9% (Table 2).

DISCUSSION

The nucleotide composition of the analyzed barcodes is similar to that reported for *D. virginiana*, *D. marsupialis*, and *P. opossum* by Cervantes et al. (2010) where the average of nucleotide frequencies was 33.1% T, 23.7% C, 27.6% A, and 15.3% G. This statement demonstrates that the nucleotide composition shown by the barcodes of Mexican marsupials is within the expected range for the mitochondrial genome, in which the GC percentage varies from 33.2 to 39.2% ($\bar{x} = 36.2 \pm 4.2$; Saccone, de Giorgi, Gissi, Pesole & Reyes, 1999).

Several haplotypes per species were recorded (between two and six), which may represent geographic variants produced by the isolation and genetic divergence of their populations (Amman & Bradley, 2004). In addition, past studies have documented that it is common to record several haplotypes per species due to due high mutation rate in mtDNA (Nabholz, Glémin & Galtier, 2009). For example, Sousa et al. (2012) documented three different haplotypes in *Didelphis albiventris* Lund 1890 from Brazil. These results are consistent with those reported in other mammalian groups such as bats where Clare et al. (2006) recorded three haplotypes in *Platyrrhinus helleri* Peters 1866 and *Trachops cirrhosus* (Spix 1823) from Guyana.

Regarding the haplotype of *Caluromys derbianus* our record represents the first *CoxI* sequence reported for this taxon; for his reason intraspecific comparisons were not possible. However, K2P distance between *Caluromys derbianus* and *C. philander* is 5%, which is similar to those recorded between *D. albiventris* and *D. aurita* (5.3%; Sousa et al., 2012). This is consistent with the average distances within genera (7.8%) reported in Neotropical bats (Clare et al., 2006), indicating that *C. derbianus* may be genetically well differentiated from its congeners. On the other hand, the intraspecific divergence recorded within *Chironectes minimus* was 2.2 %, which supports the notion that the two haplogroups may represent two different populations from the DNA barcode point of view (Hajibabaei et al., 2004). However, our analyses only included samples from México and South America and not from its complete distribution, which may be underestimating the genetic divergence of

its populations. Therefore, future studies should include samples from the entire distribution of *C. minimus*.

Regarding the two species of the genus *Didelphis* that co-occur in México, intraspecific genetic distances were low, from 0.0 to 1.4% in *D. virginiana* and from 0.3 to 2.6 in *D. marsupialis*, while the interspecific K2P divergence was higher (8.3 to 9.2%). These results are consistent with those reported by Cervantes et al. (2010) for these species. However, intraspecific K2P distances reported in this study are higher than those documented in *D. aurita* (0.3%; Agrizzi et al., 2012). Likewise, interspecific genetic divergence was also higher to those recorded between other species of the genus *Didelphis*, 5.3% between *D. aurita* and *D. albiventris* (Sousa et al., 2012), and 2.8% between *D. imperfecta* and *Didelphis pernigra* Allen 1900 (Lim, 2012). These results suggest that *D. virginiana* and *D. marsupialis* may be well differentiated relative to each other. On the other hand, the NJ algorithm revealed that both species are monophyletic as Cervantes et al (2010) showed. However, a previous study had documented that *D. marsupialis* was a poorly supported (<53%) paraphyletic taxon, which probably was a methodological artifact of the tree-building algorithm (Lim 2012).

Similarly, the sequences of *Marmosa mexicana* were grouped in two paraphyletic clusters (bootstrap support 100%), which exhibited high genetic divergence between them (9.3%). This is similar to that reported by Gutiérrez, Jansa & Voss (2010) using sequences of the *Cytb* gene where the phylogenetic analyses included two divergent haplogroups between which K2P distances were greater than 13%. The first haplogroup was consistent with the distribution of *M. m. mayensis* in the Península de Yucatán and Central America, while the second haplogroup was consistent with the area occupied by *M. m. mexicana* in Chiapas. In addition to these data, morphological evidence provided by Rossi, Voss & Lunde (2010) supported the recognition of *M. mayensis* as a valid taxon (Ramírez-Pulido et al., 2014). Likewise, the interspecific genetic divergence reported in this paper (2.5 to 8.5%) supported that two cryptic species may be involved; in contrast the K2P distance recorded within *M. mayensis* (0.6–1.4%) suggests that this taxon may not include cryptic species. On the other hand, Lim (2012) recovered three haplogroups of *M. mexicana* between which there was almost 10% intraspecific divergence. The first two haplogroups

were consistent with those reported by Gutierrez et al. (2010), while the third cluster is consistent with the samples of *M. mexicana* from Veracruz included in our analyses. This suggests that *M. mexicana* as currently is recognized may be split into two cryptic species. However, additional information is needed to formally describe this group.

The genetic distances among samples of *Metachirus nudicaudatus* varied from 3.4 to 11.4%. This is consistent with K2P distances reported for this species using *Cytb* sequences (4.8–13.9%; Patton, da Silva & Malcolm, 2000). High intraspecific divergence among the four haplogroups of *M. nudicaudatus* suggests the presence of several cryptic taxa from a DNA barcode perspective (Lim 2012). Names referable to these haplogroups are *M. n. colombianus*, *M. n. myosuros*, *M. n. nudicaudatus*, and *M. n. tschdii* (Gardner & Dagosto, 2008; Lim, 2012). In addition, morphological and morphometric studies of museum specimens support that this opossum is a composite and should be split into several species (Agrizzi et al., 2012).

On the other hand, *Philander opossum* displayed K2P distances between 0 and 5.9% and a poorly supported (42%) paraphyly. This is similar to that reported by Lim (2012) that documented a bootstrap support of 53% for the paraphyly of *P. opossum* and K2P distances up to 6% among clades. In addition, the two geographically segregated haplogroups of *P. opossum* support a previous study using *Cytb* data that assigned the cluster from the Guianas region to *P. o. opossum* and the cluster from Central America to *P. o. fuscogriseus* (Patton & da Silva, 1997). These results suggest that these two haplogroups may represent valid species as Lim (2012) pointed out. However, additional information could be required to split *P. opossum* into several species.

Likewise, the genetic divergence among the five haplogroups of *T. canescens* was from 1.2 to 5.3%. These values are similar to those reported for this opossum using *Cytb* sequences where the genetic distance among clades varied from 3.1 to 8.9% (Arcangeli, Light & Cervantes, 2017). Likewise, these authors reported that this opossum included five strongly supported clades segregated by landscape discontinuities associated to the presence of geographical barriers. This pattern is consistent with those documented in other Mexican taxa that co-occur with this marsupial such as other mammals, reptiles, and birds (Devitt, 2006; González, Ornelas & Gutierrez-Rodríguez, 2011; Light, Ostroff &

Hafner, 2016). In addition, the three out of five haplogroups are consistent with the current recognized subspecies of this mouse opossum: *T. c. canescens*, *T. c. gaumeri* and *T. c. insularis* (Ramírez-Pulido et al., 2014). The fourth haplogroup is consistent with *sinaloae*, a synonym of *T. c. canescens*, from Sonora to Colima, while the fifth cluster is consistent with *T. balsasensis*, a new species described for the Balsas basin (Arcangeli et al., 2017). Therefore, our results support that the five haplogroups of *T. canescens* are representing different species from DNA barcode perspective.

In summary, K2P distances we recorded among different species were much greater than those registered within them. The genetic divergences registered between congeners, the pairs of species *D. virginiana* – *D. marsupialis* (7.8 to 8.7%) and *M. mexicana* – *M. mayensis* (2.5 to 8.5%) were smaller than those reported among species belonging to different genus. K2P interspecific divergence among didelphid genera varied from 2.5 to 21.9%, which are consistent with those found by Lim (2012) for didelphids (10.4 to 25.7%), chiropterans (17.0 to 30.9%), and rodents (8.4 to 18.7%). Likewise, our results are also similar to those reported by Patton, Dos Reis & da Silva (1996), which recorded an extensive range of intergeneric divergence among didelphids, ranging from 13.7 to 52.7%, using Cyt-b sequences.

Of our particular interest is the accurate identification of the mouse opossums of the genera *Marmosa* and *Tlacuatzin*, two different phylogenetic linkages that are converged morphologically, and the two species of the genus *Didelphis* that are distributed in México (Voss & Jansa, 2009; Cervantes et al. 2010). This is important because their highly similar morphology may lead them to have similar ecological niches and to erroneous taxonomic identifications (Gardner, 1973). In fact, *D. virginiana* shares metazoan parasites with *D. marsupialis*, while *M. mexicana* shares them with *T. canescens* (Guzmán-Cornejo et al. 2012; Acosta-Virgen, López-Caballero, García-Prieto & Mata-López, 2015). The interspecific divergence we recorded between *D. virginiana* and *D. marsupialis* varied from 7.8 to 8.7%, while between *Marmosa* and *Tlacuatzin* was 18.0 to 20.9%, which demonstrates that these species are well differentiated genetically.

On the other hand, *C. derbianus* and *M. nudicaudatus* are threatened species, while *C. minimus* is an endangered taxon (Ramírez-Pulido et al., 2014). Therefore, it is important

to document correctly its taxonomic identity and presence in México. Otherwise, if it is not known exactly which taxon you are dealing with, you cannot implement precise conservation actions. Our data support the presence of the three species in our country since the NJ analysis clustered the sequences of these species generated in this study with the barcodes obtained from BOLD, confirming their taxonomic identity. Likewise, the intraspecific distances recorded within these species are smaller than those obtained among them, indicating that they are well differentiated from each other (Table 1).

From the use of the tool BLAST, which showed that our *CoxI* sequences displayed high similarities with those reported previously (92—%), until the distance analyses implemented with sequences of the marsupials of the Order Didelphimorphia, we correctly identified the sequences of the marsupials that are distributed in México with the sole exception of *M. mexicana*. Consequently, our data support that the *CoxI* sequences generated in this study can be used as DNA barcodes to identify Mexican marsupials since they provide characters for their molecular diagnosis. This is important due to an accurate identification is needed for any conservation practice. Our data also document the presence of the nine species of opossum distributed in México. Therefore, DNA barcodes could be additional evidence for species identification from the integrative taxonomy context since their use does not replace the full taxonomic analyses of morphological data but complements it.

ACKNOWLEDGMENTS

Julieta Vargas, Yolanda Hortelano, and several students helped collect field samples and curate museum specimens at Colección Nacional de Mamíferos (CNMA). Comments of Virginia León improved the manuscript. Consuelo Lorenzo (ECO-SC-M), Robert C. Dowler (ASNHC) and Oscar Retana (CMUAC) graciously loaned opossum tissue samples. Financial support was partly provided to Fernando A. Cervantes by Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) through its program “Generación de Códigos de Barras de ADN de Especies Mexicanas”. Jésica Arcangeli is grateful to Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for grants and fellowships provided.

RESUMEN

Código de barras de DNA de los marsupiales mexicanos (Mammalia: Didelphimorphia): En México se distribuyen ocho especies de marsupiales las cuales han sido escasamente estudiadas. Su morfología las distingue, excepto por los pares de especies *Didelphis virginiana* – *Didelphis marsupialis* y *Marmosa mexicana* – *Tlacuatzin canescens* que se confunden con facilidad. Por otro lado, *Caluromys derbianus*, *Chironectes minimus* y *Metachirus nudicaudatus* apenas se conocen. Por tal motivo, es necesario, entonces, generar evidencia para documentar correctamente su identidad taxonómica y su ocurrencia en México y para proporcionar información para conservar estas especies. Una alternativa reciente para la identificación de especies es el uso de los códigos de barras de DNA como el gen citocromo oxidasa subunidad I (*CoxI*), el cual ha sido ampliamente utilizado para documentar diferencias genéticas a lo largo de las especies animales. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar a los marsupiales mexicanos a través de sus códigos de barras. Se obtuvieron 36 secuencias del gen *CoxI* de tlacuaches mexicanos, las cuales se compararon a través del algoritmo del vecino más cercano (NJ) utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura. Este análisis incluyó secuencias de otros diez marsupiales didélfidos con fines comparativos y dos secuencias de mamíferos placentados para enraizar el árbol. El árbol de NJ agrupó los haplotipos de *C. minimus*, *D. virginiana*, *D. marsupialis*, *M. mayensis*, *M. nudicaudatus* y *T. canescens* en haplogrupos bien diferenciados, mientras que los haplotipos de *P. opossum* y *M. mexicana* se agruparon con los haplotipos de *P. andersoni* y *M. mayensis*, respectivamente. La divergencia intraespecífica fue >2% en casi todas las especies, excepto en *D. virginiana* y *M. mayensis*, en donde las distancias genéticas variaron de 0.0 a 1.4 y de 0.6 a 1.4%, respectivamente. En contraste, la divergencia interespecífica fue mayor y varió de 2.5 a 21.9%. Estos resultados demuestran que los códigos de barras de DNA son herramientas útiles para documentar las diferencias genéticas entre las nueve especies de marsupiales mexicanos y por lo tanto, pueden ser utilizadas para caracterizarlos molecularmente para su identificación taxonómica. Esta información será valiosa para fines de conservación.

Palabras clave: CoxI, Didelphidae, distancia genética, identificación taxonómica, mamíferos, tlacuaches.

REFERENCES

- Acosta-Virgen, K., López-Caballero, J., García-Prieto, L., & Mata-López, R. (2015). Helminths of three species of opossums (Mammalia, Didelphidae) from México. *ZooKeys*, *511*, 131–152.
- Aguzzi, J., Loss, A. C., Farro, A. P. C., Duda, R., Costa, L. P., & Leite, Y. L. R. (2012). Molecular diagnosis of Atlantic forest mammals using mitochondrial DNA sequences: didelphid marsupials. *The Open Zoology Journal*, *5*(S1-M2), 2–9.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*, 403–410.
- Amman, B. R., & Bradley, R. D. (2004). Molecular evolution in *Baiomys* (Rodentia: Sigmodontinae): evidence for genetic subdivision in *Baiomys musculus*. *Journal of Mammalogy*, *85*, 162–166.
- Arcangeli, J., Cervantes, F. A., & Light, J. E. (2018). Molecular and morphological evidences of diversification in the Grayish mouse opossum *Tlacuatzin canescens* (Didelphimorphia). *Journal of Mammalogy*, *99*, 138–158.
- Borisenko, A. V., Lim, B. K., Ivanova, N. V., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. N. (2008). DNA barcoding in survey of small communities of small mammal: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources*, *8*, 471–479.
- Bradley, R. D. & Baker, R. J. (2001). A test of genetic species concept: cytochrome b sequences and mammal. *Journal of Mammalogy*, *82*, 960–626
- Ceballos, G. 2014. Order Didelphimorphia. In G. Ceballos (Ed.), *Mammals of México* (pp. 71–85). Baltimore, MD: John Hopkins University Press.
- Cervantes, F. A., Arcangeli, J., Hortelano-Moncada, Y., & Borisenko, A. V. (2010). DNA barcodes effectively identified the morphologically similar Common opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. *Mitochondrial DNA*, *21*(S1), 44–50.
- Clare, E. L., Lim, B. K., Engstrom, M. D., Egert, J. L., & Hebert, P. D. N. (2006). DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*, *7*, 184–190.
- Dias, I. M. G., Francisca, E., Almeida, C., Amato, E. G., DeSalle, E. R., & Fonseca, G. (2010). Delineating geographic boundaries of the woolly mouse opossums, *Micoureus demerarae* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Conservation Genetics*, *11*, 1579–1585.
- Devitt, T. J. (2006). Phylogeography of the Western lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*): testing aridland biogeographical hypotheses across the Nearctic–Neotropical transition. *Molecular Ecology*, *15*, 4387–4407.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, *39*, 783–791.

- Ferri, G., Alu, M., Corradini, B., Licata, M., & Beduschi, G. (2009). Species Identification through DNA “barcodes”. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, *13*, 421–426.
- Gardner, A. L. (1973). The Systematics of the Genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. *Special Publication of the Texas Tech University*, *4*, 1–81.
- Gardner, A. L. & Dagosto, M. (2008). Tribe Metachirini. In A. L. Gardner (Ed.), *Mammals of South America. Vol. 1. Marsupials, xenarthrans, shrews and bats* (pp. 35–39). Chicago, IL: Chicago University Press.
- González, C., Ornelas, J. F., & Gutiérrez-Rodríguez, C. (2011). Selection and geographic isolation influence hummingbirds speciation: genetic, acoustic and morphological diverge in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*), *BMC Evolutionary Biology*, *11*, 38.
- Gutiérrez, E. E., Jansa, S. A., & Voss, R. S. (2010). Molecular systematics of mouse opossum (Didelphidae: *Marmosa*): assessing species limits using mitochondrial DNA sequences, with comments on phylogenetic relationships and biogeography. *American Museum Novitates*, *3692*, 1–22.
- Guzmán-Cornejo, C., García-Prieto, L., Acosta-Gutiérrez, R., Falcón-Ordaz, J., & León-Paniagua, L. (2012). Metazoarios parásito de *Tlacuatzin canescens* y *Marmosa mexicana* (Mammalia: Didelphimorphia) de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *83*, 557–581.
- Hajibabaei, M., Janzen, Burns, J. M., D. H., Hallswachs, W., & Hebert, P. D. N. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the Natural Academy of Science of the United States of America*, *103*, 968–971.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Resources*, *41*, 95–98.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallswachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in Neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*, *101*, 14812–14817.
- Hillis, D. M., Moritz, C., & Mable, C. B. (1996). *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. S., & Hebert, P. D. N. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, *7*, 544–548.
- Jansa, S. A., Barker, F. K., & Voss, R. S. (2013). The early diversification history of didelphid marsupials: a window into South America’s “Splendid isolation”. *Evolution*, *68*, 684–695.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*, 111–120.

- Kumar, S., Stecher, & Tamura, K. (2015). MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Light, J. E., Ostroff, M. O., & Hafner, D. J. (2016). Phylogeographic assessment of the northern pygmy mouse, *Baiomys taylori*. *Journal of Mammalogy*, *97*, 1081–1094
- Lim, B. K. (2012). Preliminary assessment of Neotropical mammal DNA barcodes: an underestimation of diversity. *Open Zoology Journal*, *5*(S1-M2), 10–17.
- León, M. A. (2013). *Ubicación filogenética con caracteres moleculares de la rata de monte (Nelsonia goldmani), endémica del Eje Neovolcánico Transversal* (Unpublished Master's thesis). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Nabholz, B., Glémin, S., & N. Galtier. (2009). The erratic mitochondrial clock: variation size affects mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC Evolutionary Biology*, *9*, 54–67.
- Patton, J. L., dos Reis, S. F., & da Silva, M. N. F. (1996). Relationships among didelphid marsupials based on sequence variation in mitochondrial cytochrome *b* gene. *Journal of Mammalian Evolution*, *3*, 3–29.
- Patton, J. L. & da Silva, M. N. F. (1997). Definition of species of pouched four-eyed opossum (Didelphidae, *Philander*). *Journal of Mammalogy*, *78*, 90–102.
- Patton J. L., da Silva, M. N. F., & Malcolm, J. R. (2000). Mammals of the Rio Jarúa and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, *244*, 306.
- Ramírez-Pulido, J., González-Ruiz, N., Gardner, A. L., & Arroyo-Cabrales, J. (2014). List of recent land mammals of Mexico, 2014. *Special Publications, Museum of Texas Tech University*, *63*, 1–69.
- Rossi, R. V., Voss, R. S., & Lunde, D. P. (2010). A revision of the didelphid marsupial *Marmosa*. Part 1. The species in Tate's "mexicana" and "mitis" sections and other closely related forms. *Bulletin of the American Museum of American History*, *334*, 83.
- Ruiz-Piña, H. & Cruz-Reyes, A. (2002). The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *97*, 613–620.
- Saccone, C., de Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G., & Reyes, A. (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, *238*, 195–209.
- Sikes, R. S. & the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. 2016. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammal in research and education. *Journal of Mammalogy*, *97*, 663–688.
- Sousa, L. C. C., Gontijo, C. M. F., Lacorte, G. A., Meireles, S. N., Silva, A. P., & Fonseca, C. G. (2012). Molecular characterization of an opossum *Didelphis albiventris*

- (Marsupialia: Didelphidae) population in an urban fragment of the Brazilian Atlantic rainforest and support to species barcode identification. *Genetics and Molecular Research*, *11*, 2487—2496.
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). DNA barcoding for ecologist. Trends in *Ecology and Evolution*, *24*, 110—117.
- Vaughan, T. A., Ryan, J. M., & Czaplewski, N. J. (2010). *Mammalogy*. Sudbury, MA: Jones and Bartlett Publishers.
- Vázquez, R. (2011). *Comparación del cráneo y dentario de los ratones tlacuache Tlacuatzin canescens y Marmosa mexicana (Didelphimorphia: Didelphidae) de México, aplicando morfometría geométrica* (Unpublished Bachelor's thesis). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Villa, B. & Cervantes, F. A. (2003). *Los mamíferos de México*. Ciudad de México: Grupo Editorial Iberoamericana S. A. de C. V. y el Instituto de Biología, UNAM.
- Voss, R. S., Lunde, D. P., & Simmons, N. B. (2011). The mammals of Paracou, French Guyana: a Neotropical lowland rainforest fauna. Part 2. Nonvolant species. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, *263*, 236.
- Voss, R. S. & Jansa, S. A. (2009). Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of New World metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, *322*, 177.

TABLE 1.

Primers used to amplify the cytochrome oxidase subunit I (*CoxI*) gene in Mexican marsupials. For DNA obtained from fresh tissues, amplification of *CoxI* gene was performed using the universal primers from Ivanova et al. (2007), while for degraded skin snips, the *CoxI* gene was amplified using multiple primer pairs from León (2013).

Primer	Sequence 5'→3'
VF2_t1	TGTAAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA
COIF3	AATAAATAATATAAGYTTYTGACTYC
MNeF1	ATTACYACYATCATCAATATAAAACC
COIR2	GTGGTTTTATATTGATGATRGTRGT
COIR3	GTAGRAGTCARAARCTTATATTATT

TABLE 2.

Genetic distances within and among Mexican opossums estimated according to Kimura's two parameters model of nucleotide substitution. Intraspecific distances are arrayed along the diagonal (in bold) and interspecific distances are below the diagonal.

Records represent the observed range and the mean (in parentheses) within and among clades.

Taxon	<i>Didelphis virginiana</i>	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>Philander opossum</i>	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	<i>Marmosa mayensis</i>	<i>Marmosa mexicana</i>	<i>Tlacuatzin canescens</i>	<i>Chironectes minimus</i>	<i>Caluromys derbianus</i>
<i>Didelphis virginiana</i>	0.0–1.4 (0.9)								
<i>Didelphis marsupialis</i>	7.8–8.7 (8.2)	0.3–2.5 (1.2)							
<i>Philander opossum</i>	11.3–12.5 (12.0)	11.2–12.9 (12.0)	0.0–5.9 (4.1)						
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	19.9–20.6 (19.7)	15.6–19.3 (17.1)	17.1–20.2 (18.9)	3.4–11.4 (7.1)					
<i>Marmosa mayensis</i>	21.0–21.8 (21.2)	21.3–22.3 (21.9)	18.1–19.8 (19.0)	17.0–19.6 (18.2)	0.6–1.4 (1.1)				
<i>Marmosa mexicana</i>	20.4–21.8 (19.6)	17.9–21.7 (19.8)	17.5–20.5 (19.2)	17.3–18.8 (18.2)	2.5–8.5 (5.4)	9.3			
<i>Tlacuatzin canescens</i>	18.2–20.5 (19.2)	18.8–21.9 (20.3)	17.2–20.0 (19.6)	17.8–20.9 (18.6)	18.0–19.9 (18.9)	18.2–20.9 (19.2)	1.2–5.3 (3.5)		
<i>Chironectes minimus</i>	15.5–16.1 (15.8)	15.6–16.6 (16.1)	15.1–17.3 (16.4)	17.5–20.7 (19.2)	17.4–17.7 (17.5)	9.3–18.3 (16.8)	16.2–18.3 (16.9)	2.2	
<i>Caluromys derbianus</i>	13.2 (13.2)	12.1–13.3 (12.6)	12.1–15.8 (14.3)	10.9–12.1 (11.4)	15.7–16.6 (16.2)	14.5–17.3 (15.9)	13.2–16.3 (14.5)	13.1–15.7 (13.9)	-

APPENDIX

Species and Barcode of Life Database accession numbers of cytochrome oxidase subunit I sequences used for distance analyses.

Taxon	Country	Geographic coordinates	Voucher specimen	Accession number
<i>Caluromys derbianus</i>	México	18°6' 35.4" N, 94°21'35.2" W	CNMA (FAC4522)	
<i>Caluromys philander</i>	Suriname	3°47'27.6" N, 56°8'56.4" W	ROM 119714	ABSRA767-08
<i>Chironectes minimus</i>	Brazil	16°3'0" S, 47°17'60" W	UFMG 2539	BATFM005-09
	Guyana	7°31'1.2" N, 59°22'58.8" W	ROM 98855	ABGYA446-06
	México	17°26'48.8" N, 93°5'13.9" W	CNMA 24623	
<i>Didelphis aurita</i>	Brazil	20°16'48" S, 40°31'12" W	UFES (LPC1035)	BATFM006-09
<i>Didelphis imperfecta</i>	Guyana	5°9'0" N, 58°42'0" W	ROM 103922	ABGYB813-06
<i>Didelphis marsupialis</i>	Costa Rica	10°16'1.2" N, 84°49'1.2" W	ROM 97295	ABSMS535-06
	Guyana	7°31'1.2" N, 59°22'58.8" W	ROM 98893	ABGYA483-06
	México	18°26'16.8" N, 94°57'54" W	CNMA 43475	FCMUN052-09
	México	18°52'2.6" N, 90°44'11.7" W	ASNHC 6416	FCMUN338-13
	Panamá	8°52'1.2" N, 82°45'0" W	ROM (F38186)	ABSCA102-06
	Suriname	1°56'38.4" N, 56°3'46.8" W	ROM 12124	ABSRA892-10
	Canadá	43°32'6" N, 80°12'50.4" W	ROM 116749	ABMC255-05
<i>Didelphis virginiana</i>	U. S. A	42°11' 9.60" N, 124°8'13.2" W	ASNHC (ASK6475)	FCMUN331-13
	México	19°6'3.6" N, 98°41'46" W	CNMA 45115	FCMUN041-09
	México	20°10'58.8" N, 89°34'58.8" W	ROM 96483	ABMXC313-06
<i>Marmosa mexicana</i>	El Salvador	13°48'0" N, 90°0'0" W	ROM 101344	ABCSA748-06
	Guatemala	17°0'0" N, 89°43'58.8" W	ROM 99607	ABCS456-06
	México	18°35'7.08" N, 95°4'30" W	CNMA 45107	FCMUN129-09
	México	15°7' 36" N, 92°17'57"	ECO-SC-M 2475	
	México	19°56'36" N, 90°22'26" W	CMUAC 609	
<i>Marmosa murina</i>	Brazil	19°43'12" S, 42°38'60" W	UFES (SLF280)	BATFM021-09

<i>Marmosa waterhousei</i>	Ecuador	0°41'9.6" S, 76°25'55.2" W	ROM 118843	ABECB165-08
<i>Metachirus nudicaudatus</i>	Brazil	9°35'24" S, 55°55'48" W	UFMG 2657	BATFM039-09
	Ecuador	0°40'58.8" S, 76°25'58.8" W	ROM 105345	ABSMS564-06
	México	16°7'22.08" N, 90°55'50.8" W	CNMA 34759	
	Panamá	8°40'58.8" N, 79°55'58.8" W	ROM 104229	ABSCA048-05
	Suriname	4°28'8.4" N, 56°54' 21.60" W	ROM 117525	ABSMS363-06
<i>Monodelphis americana</i>	Brazil	20°4'48" S, 43°30'0" W	UFMG 1930	BATFM053-09
<i>Monodelphis brevicaudata</i>	Guyana	7°31'1.2" N, 59°22'58.8" W	ROM 98904	ABGYA493-06
<i>Philander andersoni</i>	Ecuador	0°37'58.8" N, 76°27'0" W	ROM105646	ABECA609-06
<i>Philander frenatus</i>	Brazil	20°16'48" S, 40°25'12" W	UFES (LPC1127)	BATFM064-09
<i>Philander opossum</i>	Guyana	7°40'1.2" N, 7°40 1.2" W	ROM 98839	ABGYA431-06
	México	18°35'2.4" N, 95°4'12" W	CNMA 45130	FCMUN050-09
	México	20°51'0" N, 86°54'0" W	ROM 97377	ABSMS540-06
	Panamá	8°40'58.80" N, 79°55'58.8" W	ROM 104260	ABSCA065-06
	Suriname	1°56'38.4" N, 56°3'46.8" W	ROM 120146	ABSRA914-10
<i>Tlacuatzin canescens</i>	México	19°29'51.3" N, 105°2'38.4" W	CNMA 45134	FCMUN123-09
	México	16°22'58" N, 94°39'42.1" W	ECO-SC-M 1876	
	México	20°0'57.9" N, 89°1'12" W	ECO-SC-M 2240	
	México	21°36'1.08" N, 106°35'0.9" W	CNMA 27512	
	México	18°33'33.84"N, 99°16'14.88"	CNMA 27414	
<i>Procyon lotor</i>	Canada	43°32'6" N, 80°12'50.4" W	ROM 101864	ABRCM189-06
<i>Osgoodomys banderanus</i>	México	19°29'20.4" N, 105°2'16.8" W	CNMA 42976	FCMUN155-09

Colección Nacional de Mamíferos (CNMA); Field collection number of Fernando A. Cervantes (FAC); Universidade Federal do Espírito Santo (UFES); Field collection number of Leonora P. Costa (LPC); Royal Ontario Museum (ROM); Angelo State University Natural History Collection (ASNHC); Colección Mastozoológica del Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal de las Casas (ECO-SC-M); Colección de Mamíferos de la Universidad Autónoma de Campeche (CMUAC); Field collection number of Simone Loss (SLF); Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

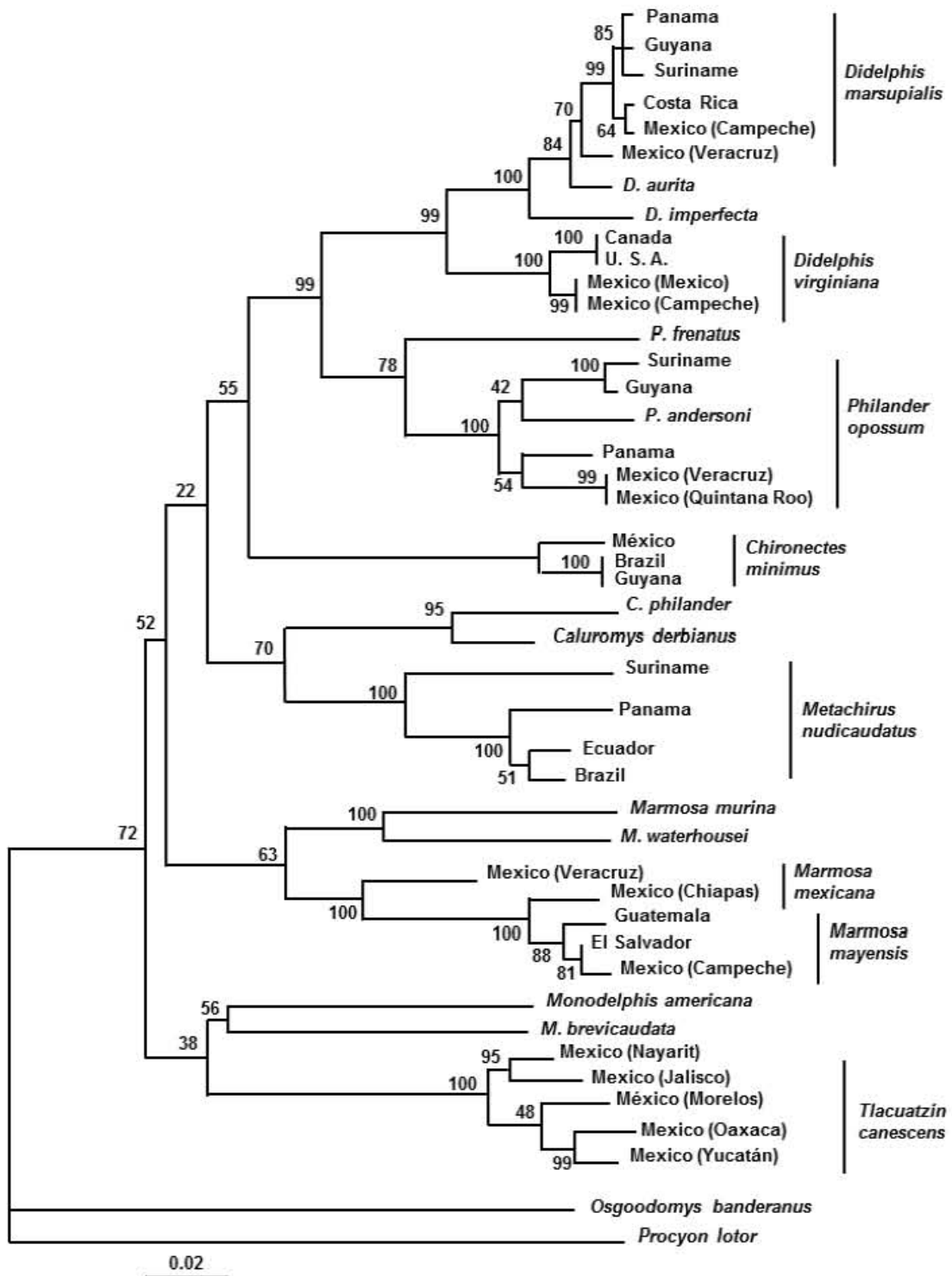


Fig. 1. Neighbor-joining tree constructed with sequences of the cytochrome oxidase subunit I gene of Mexican opossum and others South American marsupials using Kimuras's two parameters model of nucleotide evolution. Numbers closed nodes are bootstrap support (1 000 replicates).

DISCUSIÓN GENERAL

El Orden Didelphimorphia agrupa a la mayor parte de los marsupiales del continente americano, aproximadamente 100 especies en 19 géneros (Jansa et al. 2013); por lo que ocupa el tercer lugar en riqueza de especies dentro de la fauna mastozoológica Neotropical después de roedores y quirópteros (Catzeflis et al. 1997). Frente a tal diversidad, la ausencia de estudios sobre límites sistemáticos y diagnosis apropiadas ha dificultado el entendimiento de las relaciones filogenéticas de los didelfimorfios (Voss y Jansa 2003). Sin embargo, la taxonomía de este grupo ha sido muy dinámica en los últimos años debido a la descripción de nuevas especies y a la separación de taxones politípicos (Agrizzi et al. 2012). Asimismo, revisiones sistemáticas relativamente recientes han traído como resultado la descripción de nuevos géneros, como *Tlacuatzin*, *Chacodelphys* y *Cryptonanus* (Voss y Jansa 2003; Voss et al. 2004; Voss et al. 2005).

Tlacuatzin es un género monotípico endémico de México cuya biología ha sido escasamente estudiada (Zarza et al. 2003). Este marsupial se caracteriza por un pelaje dorsal de color gris con una máscara de color negro alrededor de los ojos y la ausencia de un marsupio en las hembras (Zarza et al. 2003; Arcangeli et al. 2013). Particularmente, antes de este trabajo se desconocían la diversidad que pudieran tener las poblaciones de este ratón tlacuache gris (*T. canescens*) y, por lo tanto, las implicaciones que esta información pudiera tener en relación a su taxonomía y conservación. Este trabajo aportó información relevante en este sentido ya que se evaluó la variación morfológica y genética de este marsupial, a lo largo de su distribución geográfica empleando análisis filogenéticos, morfométricos y de genética de poblaciones. La información obtenida por estos tres enfoques reveló que este taxón presenta una amplia variación, la cual es consistente con un patrón biogeográfico típico de especies con poca vagilidad, amplia distribución y en donde, existe la formación de haplogrupos y la presencia de alopatía (Hernández-Romero 2016).

Nuestros datos indican que ese patrón no es concordante con la taxonomía actual del género (sensu Ramírez-Pulido et al. 2014); en donde *Tlacuatzin* está representado por una sola especie, *T. canescens* con tres subespecies reconocidas: *T. c. canescens*, *T. c. gaumeri* y *T. c. insularis*; y por lo tanto, se propusieron cambios taxonómicos. Un caso similar lo representa el ratón tlacuache mexicano (*Marmosa mexicana*) que recientemente fue

dividido en dos especies con base en evidencia molecular y morfológica (Rossi et al. 2010; Ramírez-Pulido et al. 2014; Voss et al. 2014).

Siguiendo el concepto filogenético de especie, el cual considera que las especies son linajes que presentan un patrón de ancestría-descendencia y tienen una historia evolutiva en común (Agapow et al. 2004), el género *Tlacuatzin* está conformado por cinco clados bien diferenciados, tanto molecular como morfológicamente; dichos clados son consistentes con áreas geográficas discretas: 1) Islas Tres Marías, 2) Planicie costera del Pacífico, 3) Cuenca del Río Balsas, 4) Istmo de Tehuantepec y 5) Península de Yucatán. Estos grupos están delimitados por la presencia de barreras geográficas como la Faja Volcánica Transmexicana o el Istmo de Tehuantepec, las cuales han fungido como una barrera al flujo genético propiciando eventos vicariantes, similares a los que han ocurrido en otros mamíferos pequeños (Sullivan et al. 1997; León-Paniagua et al. 2007). De tal manera, estos clados presentan historias evolutivas diferentes ya que habitan en regiones geográficas aisladas y por lo tanto están sujetas a condiciones ambientales distintas, lo que se ve reflejado tanto en la morfología como en su variación genética (Campos 2005; Espinoza et al. 2011).

La evidencia molecular generada reveló que existía una divergencia genética alta entre los clados, tanto para el gen citocromo-b (*Cytb*) como para el gen citocromo oxidasa subunidad I (*CoxI*; 3.1—8.9% y 1.2—5.3%, respectivamente), lo que implica que éstos han divergido considerablemente y por lo tanto, bajo el concepto genético de especie y desde el enfoque del código de barras de DNA, cada clado podría representar un taxón diferente (Bradley y Baker 2001; Hebert et al. 2004). Asimismo, el hecho de que no se hayan encontrado haplotipos compartidos entre los clados y de que los microsatélites presentaran diferentes alelos en cada uno apoya la hipótesis de que el género *Tlacuatzin* incluye varios taxones (Knowles y Cartens 2007; Frankham et al. 2010). En contraste, la diferenciación morfológica de estos clados no es tan clara ya que los análisis morfométricos no lograron separarlos por completo. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el arco cigomático, los molares y las bullas timpánicas que pueden ayudar a distinguirlos.

Por lo tanto, la evidencia molecular y morfológica examinada contribuye al reconocimiento de *T. gaumeri*, *T. insularis* y *T. sinaloae* como especies válidas. Además,

estos análisis ponen de manifiesto el descubrimiento de un nuevo taxón, *T. balsasensis* o ratón tlacuache del Balsas (Fig. 6), cuya descripción se caracteriza por identificar a la especie más grande dentro del género (LT = 248.4 ± 28.9 mm). Asimismo, este taxón se distingue por tener un cráneo largo y ancho (CBL = 31.7 ± 2.8 mm and ZB = 18.3 ± 2.2 mm) y una coloración café que no muestra el patrón gris distintivo del género (Arcangeli et al. 2018). Con estos cambios taxonómicos se incrementó de 1 a 5 el número de especies formalmente reconocidas dentro del género, y en consecuencia el número de taxones clasificados dentro del Orden Didelphimorphia que se distribuyen en México también aumentó de 9 a 13.



Figura 6. Ratón tlacuache del Balsas (*Tlacuatzin balsasensis*) colectado en Iguala, Guerrero, México (fotografía: Lázaro Guevara).

Con respecto a las relaciones filogenéticas entre *Tlacuatzin* y los géneros *Marmosa* y *Monodelphis*, los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis de que *Tlacuatzin* es el grupo hermano del clado conformado por *Marmosa* y *Monodelphis* (Voss y Jansa 2009). En contraste, el análisis morfológico muestra que *Tlacuatzin* y *Marmosa* son muy similares, aunque se pueden diferenciar por el tamaño ya que *Tlacuatzin* es más pequeño (Zarza et al. 2003). Asimismo, estudios citogenéticos previos soportan la hipótesis de que los tres géneros están bien diferenciados ya que muestran diferencias en el número de

cromosomas; mientras que *Marmosa* presenta 14, *Monodelphis* presenta 18 y *Tlacuatzin* 22 (Svartman 2009).

Por otro lado, el análisis de la variación genética del gen *Cytb* permite inferir como fue el proceso de diversificación del género *Tlacuatzin* en México. Los análisis demográficos sugirieron que la variación genética presente en este taxón se originó como consecuencia de crecimiento poblacional rápido a partir de un tamaño efectivo de población pequeño (Avice 2000; Ashfaq et al. 2014). Asimismo, el análisis de tiempos de divergencia sugirió que este cuello de botella es consecuencia de los ciclos de contracción y de expansión de la distribución de este taxón durante los cambios climáticos que ocurrieron durante el Pleistoceno, similar a lo encontrado en otros vertebrados terrestres (Barber y Klicka 2010; Kerhoulas y Arbogast 2010; Fernández et al. 2013)

Similarmente, el análisis de la diversidad expresada por los microsatélites permitió identificar las poblaciones que podrían encontrarse en alguna categoría de riesgo de extinción, lo cual favorecerá al establecimiento de estrategias para su conservación. Los análisis revelaron que a nivel de género *Tlacuatzin* presenta una diversidad genética alta (11—19 alelos por microsatélite y una $H_E = 0.67—0.76$), mayor a la observada en la mayoría de los marsupiales australianos (Eldridge 2010). Dicha diversidad se encuentra estructurada en cinco grupos genéticos bien diferenciados ($F_{ST} = 0.107—0.299$), los cuales coinciden con los clados obtenidos en el análisis filogenético. Asimismo, se identificaron como poblaciones en riesgo las que se distribuyen tanto en la Península de Yucatán como en las Islas Tres María ya que presentaron los niveles de diversidad más bajos (3.5 alelos por microsatélite y $H_E = 0.672$ y 0.688 , respectivamente). Sin embargo, las poblaciones presentes en las Islas Tres Marías podrían ser las que se encuentran en mayor riesgo ya que al presentar una distribución muy restringida los efectos de la destrucción de su hábitat por actividades antropogénicas podrían ser mayores. De hecho, Wilson (1991) observó que las poblaciones de este marsupial habían mermado como consecuencia de la introducción de fauna exótica (perros y gatos) a las islas.

Un complemento importante que ayuda a delimitar y reconocer la presencia de más de una especie en el género *Tlacuatzin* es el uso del código de barras de DNA. Este marcador molecular es de mucha ayuda ya que permite: 1) caracterizar molecularmente los

marsupiales que se distribuyen en México; 2) identificar correctamente especies morfológicamente similares, como *D. virginiana* y *D. marsupialis* y 3) identificar especies cripticas, como *T. balsasensis*.

Por último, los resultados de esta investigación incrementan el número de especies de mamíferos terrestres registradas para México de 496 a 499, agregando 4 taxones endémicos (Ramírez-Pulido et al. 2014). Asimismo, el hecho de que este estudio haya incluido tanto muestras colectadas en el campo como muestras de tejidos albergados en colecciones mastozoológicas de México y Estados Unidos de América pone de manifiesto la importancia de las colecciones biológicas en el estudio de la biología evolutiva de los organismos, ya que en muchos casos será difícil regresar a las localidades originales de donde se extrajeron los ejemplados colectados (Esteva 2011).

De igual forma, este trabajo tiene implicaciones importantes en la conservación de *Tlacuatzin*, que aunque éste no se considera como en peligro de extinción, se distribuye en la selva baja caducifolia cuya cobertura en el territorio es menor al 4% y es uno de los ecosistemas más perturbados por actividades antropogénicas (Ortega et al. 2009). Finalmente, este estudio abre las puertas para futuros trabajos enfocados en la historia evolutiva y la genética poblacional de los mamíferos de nuestro país, especialmente los miembros del Orden Didelphimorphia cuya biología ha sido escasamente estudiada.

CONCLUSIONES

La evidencia presentada en este trabajo aportó información relevante sobre la variación morfológica y molecular de género *Tlacuatzin*, la cual repercutió directamente en la taxonomía del mismo. Asimismo, el análisis de esta variación con diferentes herramientas permitió conocer el proceso de diversificación de este marsupial e identificar las poblaciones que podrían estar en riesgo de extinción. Por lo tanto, se logró el objetivo general de este trabajo, el cual fue documentar la historia evolutiva del ratón tlacuache.

LITERATURA CITADA

- ABELLO, M. A. 2013. Analysis of dental homologies and phylogeny of Paucituberculata (Mammalia: Marsupialia). *Biological Journal of the Linnean Society* 109:441—465.
- AGAPOW, P. M., O. R. P. BINNINDA-EMONDS, K. A. CRANDALL, J. L. GITTLEMAN, G. M. MACE, J. C. MARSHALL Y A. PURVIS. 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *The Quarterly Review of Biology* 79:161—179.
- AGRIZZI, J., A. C. LOSS, A. P. C. FARRO, R. DUDA, L. P. COSTA Y Y. L. R. LEITE. 2012. Molecular diagnosis of Atlantic forest mammals using mitochondrial DNA sequences: didelphid marsupials. *The Open Zoology Journal* 5(S1-M2):2—9.
- AMMAN, B. R. Y R. D. BRADLEY. 2004. Molecular evolution in *Baiomys* (Rodentia: Sigmodontinae): evidence for genetic subdivision in *B. musculus*. *Journal of Mammalogy* 85:162—166.
- ARCANGELI, J. Y F. A. CERVANTES. 2009. Identificación molecular de dos especies de tlacuache: *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*, utilizando enzimas de restricción. Pp. 251—262 en 60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM. Aportaciones al conocimiento y conservación de los mamíferos de México (F. A. Cervantes, Y. Hortelano, y J. Vargas, eds.). Instituto de Biología, UNAM, México, D. F., México.
- ARCANGELI, J., F. A. CERVANTES, S. L. LANCE, M. I. SALAZAR Y J. ORTEGA. 2013. Twenty-four microsatellite markers for the gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*): development from illumina paired-end sequences. *Conservation Genetics Resources* 5:367—370.
- ARCANGELI, J., L. E. LIGHT Y F. A. CERVANTES. 2018. Molecular and morphological evidences of diversification in the gray mouse opossum, *Tlacuatzin canescens* (Didelphimorphia), with description of a new species. *Journal of Mammalogy* 99:138—158.
- ASHFAQ, M., P. D. N. HEBERT, M. S. MIRZA, A. M. KHAN, S. MANSOOR, G. S. SHAH Y Y. ZAFAR. 2014. DNA barcoding of *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae) reveals southerly expansion of the dominant whitefly Species on cotton in Pakistan. *PLOS One* 9:1—14.
- AVISE, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge. Pp. 447.
- BALLOUX, F. Y N. LUGON-MOULIN. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155—165.
- BARBER, B. R. Y KLICKA, J. 2010. Two pulses of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican bird fauna. *Proceedings of the Biological Society* 277:2675—2681.
- BIGGERS, J. D., H. I. FRITZ, W. C. HARE Y R. A. MCFEELY. 1985. Chromosomes of American marsupials. *Science* 148:1602—1603.

- BORISENKO, R. D., B. K. LIM, N. V. IVANOVA, R. H. HANNER Y P. D. N. HEBERT. 2008. DNA barcoding in survey of small mammals communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology* 8:471—479.
- BRADLEY, R. D. Y R. J. BAKER. 2001. A test of genetic species concept: cytochrome b sequences and mammal. *Journal of Mammalogy* 82:960—970.
- CAMPOS, A. P. 2005. Comparación genética entre poblaciones aisladas del conejo zacatuche *Romerolagus diazi* (Mammalia: Lagomorpha). Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. 81 pp.
- CATZEFLIS, F., C. RICHARD-HANSEN, C. FOURNIER-CHAMBRILLON, A. LAVERGNE Y J. VIE. 1997. Biométrie, reproduction et sympatrie chez *Didelphis marsupialis* et *D. albiventris* en Guyane Française (Didelphidae: Marsupialia). *Mammalia* 61:231—243.
- CEBALLOS, G. Y A. MIRANDA. 2000. Guía de los Mamíferos de la Costa de Jalisco, México. Fundación Cuixmala, A. C., Instituto de Biología, UNAM., México, D. F., México, 502 pp.
- CEBALLOS, G. 2014. Gray mouse opossum (*Tlacuatzin canescens*). Pp. 8—83 en *Mammals of Mexico* (G. Ceballos, ed.). John Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, U. S. A.
- CERVANTES, F. A., J. ARCANGELI, Y. HORTELANO-MONCADA Y A. V. BORISENKO. 2010. DNA barcodes effectively identify the morphologically similar Common opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. *Mitochondrial DNA* 21(S1):4—50.
- DEVITT, T. J. 2006. Phylogeography of the western lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*): biogeographical hypotheses across the Neartic-Neotropical transition. *Molecular Ecology* 15:4387—4407.
- DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O. Y E. VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32:59—70.
- ELDRIDGE, M. D. B. 2010. Marsupial population and conservation genetics. Pp. 461—497, en *Marsupial genetics and genomics*. (J. E. Deakin, P. D. Waters y J. A. Marshall-Graves, eds). Australian Museum, Sydney, Australia.
- ENGSTROM, M.D. Y A.L. GARDNER. 1988. Karyotype of *Marmosa canescens* (Marsupialia: Didelphidae): a mouse opossum with 22 chromosomes. *Southwestern Naturalist* 33:231—233.
- ESPINOZA, J., C. LORENZO Y E. RÍOS. 2011. Variación morfológica y morfométrica de *Heteromys desmarestianus* en Chiapas, México. *Therya* 2:139—154.
- ESTEVA, M. A. 2011. Filogeografía de la musaraña *Sorex saussurei* (Insectivora: Soricidae). Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. 97 pp.
- FIKE, J. A., J. C. BEASLEY Y O. E. RHODES JR. 2009. Isolation of 21 polymorphic microsatellite markers for the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Molecular Ecology Resources* 9:1200—1202.

- FERNÁNDEZ, J. A., F. A. CERVANTES Y M. S. HAFNER. 2012. Molecular systematics and biogeography of the Mexican endemic kangaroo rat, *Dipodomys phillipsii* (Rodentia: Heteromyidae). *Journal of Mammalogy* 93:560—571.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU Y D. A. BRISCOE. 2010. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.
- FONSECA, G. A. B., A. PERREIRA, J. SANDERSON Y R. A. MITTERMEIER. 2003. Marsupials of the New World: Status and Conservation. Pp. 399—406 en *Predators with pouches. The biology of carnivorous marsupials.* (M. Jones, C. Dickerman, y M. Archer, eds.). CSIRO, Collingwood, Australia.
- GARDNER, A. L. 1973. The Systematics of the Genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. Special Publication of the Texas Tech University 4:1—81.
- GONZÁLEZ-CHRISTEN, A. Y N. V. RODRÍGUEZ. 2014. Primer registro de *Tlacuatzin canescens*, (Mammalia, Didelphimorphia, Marmosidae) en Veracruz, México. *Therya* 5:845—854.
- GUZMÁN-SORIANO, D., O. RETANA Y J. CÚ-VIZCARRA. 2013. Lista de los mamíferos terrestres del estado de Campeche, México. *Acta Zoológica Mexican (nueva serie)* 29:105—128.
- HEBERT, P. D. N., E. H. PENTON, J. M. BURNS, D. H. JANZEN Y W. HALLSWACHS. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America* 101:14812—14817.
- HERNÁNDEZ-CARDONA, A., L. A. LAGO-TORRES, L. IBARRA-GONZÁLEZ, J. C. FALLER-MENÉNDEZ Y Y. PEREYRA-ARRELLANO. 2007. Registro del tlacuachin (*Tlacuatzin canescens*) en el área de conservación “El Zapotal” en el noreste del estado de Yucatán. *Revista Mexicana de Mastozoología* 11:85—90.
- HERNÁNDEZ-ROMERO, P. C. 2016. Morfometría, filogeografía y nicho ecológico de la nutria neotropical, *Lontra longicaudis* a lo largo de su distribución. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz.
- JANSA, S. A., F. K. BARKER Y R. S. VOSS. 2013. The early diversification history of didelphid marsupials: a window into South American’s “splendid isolation”. *Evolution* 68:684—695.
- KERHOULAS, N. J. Y B. S. ARBOGAST. 2010. Molecular systematics and Pleistocene biogeography of Mesoamerican flying squirrels. *Journal of Mammalogy* 91:654—667.
- KIRSCH, J. A., A. W. DICKERMAN Y O. A. REIG. 1995. DNA/DNA hybridization of carnivorous marsupials IV. Intergeneric relationships of the opossums (Didelphidae). *Marmosiana* 1:57—78.
- KNOWLES, L. L. Y B. C. CARTENS. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology* 56:887—895.

- LEÓN-PANIAGUA, L., A. G. NAVARRO-SIGÜENZA, B. E. HERNÁNDEZ-BAÑOS Y H. C. MORALES. 2007. Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42:653—664.
- LIGHT, J. E., M. O. OSTROFF Y D. J. HAFNER. 2016. Phylogeographic assessment of the northern pygmy mouse, *Baiomys taylori*. *Journal of Mammalogy* 97:1081—1094.
- MEREDITH, R. W., C. KRAJEWSKI, M. WESTERMAN Y M. S. SPRINGER. 2009. Relationships and divergence times among the orders and families of Marsupialia. *Museum of Northern Arizona Bulletin* 65:383—406.
- MONROY-VILCHIS, O., M. M. ZARCO-GONZÁLEZ, J. RAMÍREZ-PULIDO Y U. AGUILERA-REYES. 2011. Diversidad de mamíferos de la Reserva Natural Sierra de Nanchititla, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82:237—248.
- ORTEGA, J., M. TSCHAPKA, T. P. GONZÁLEZ-TERRAZAS, G. SUZÁN Y R. A. MEDELLÍN. 2009. Phylogeography of *Musonycteris harrisoni* along the Pacific coast of Mexico. *Acta Chiropterologica* 11:259—269.
- PATTON, J. L., S. F. DOS REIS Y M. N. F. DA SILVA. 1996. Relationships among didelphid marsupials based on sequence variation in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Journal of Mammalian Evolution* 3:3-29.
- RAMÍREZ-PULIDO, J., N. GONZÁLEZ-RUIZ, A. L. GARDNER Y J. ARROYO-CABRALES. 2014. List of recent land mammals of Mexico, 2014. Special Publications, Museum of Texas Tech University 63:1—69.
- REIG, O. A., J. A. W. KIRSCH Y L. G. MARSHALL. 1987. Systematic relationships of the living and Neocenoic American “Opossum-like” marsupials, with comments on the classification of this and the Cretaceous Paleogene New World and European Metatherians. Pp. 1—89 en *Possums and opossums*. *Studies in Evolution*. (M. Archer, ed.). Surrey Beaty & Son. The Royal Society of New South Wales, Sydney, Australia.
- ROSSI, R. V., R. S. VOSS Y D. P. LUNDE. 2010. A revision of the didelphid marsupial *Marmosa*. Part 1. The species in Tate’s “*mexicana*” and “*mitis*” sections and other closely related forms. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 334:1—83.
- SAMOLLO P. B., C. M. KAMMERER, S. M. MAHANEY, ET AL. 2004. First-generation linkage map of the gray, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*, reveals genome-wide reduction in female recombination rates. *Genetics* 166:307-329.
- SOUSA, L. C. C., C. M. F. GONTIJO, H. A. BOTELHO Y C. G. FONSECA. 2012. Mitochondrial genetic variability of *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia, Didelphidae) in Brazilian localities. *Genetics and Molecular Biology* 35: 522—529.
- SPRINGER, M. S., M. WESTERMAN Y J. A. W. KIRSCH. 1994. Relationship among orders and families of marsupials based on 12S ribosomal DNA sequences and the timing of the marsupial radiation. *Journal of Mammalian Evolution* 2:85—115.

- SULLIVAN, J., J. A. MARKERT Y C. W. KILPATRICK. 1997. Phylogenetic and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic Biology* 46:426—440.
- SUNNUCKS, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199—203.
- SVARTMAN, M. 2009. American marsupial chromosomes: Why study them? *Genetics and Molecular Biology* 32:675—687.
- VAUGHAN, T. A., J. M. RYAN Y N. J. CZAPLEWSKI. 2010. *Mammalogy*. Saunders Company, Toronto, Canadá.
- VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. Pp. 441—466 en *Ecología Molecular*. (L. E. Eguiarte, V. Sousa, y X. Aguirre, eds.). Instituto de Ecología, UNAM, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F., México.
- VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., A. MEJÍA-PUENTE Y R. VEGA. 2009. *Oryzomys couesi* en el sureste de México: estimaciones genéticas y filogeográficas. Pp. 197—211 en 60 años de la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM. Aportaciones al conocimiento y conservación de los mamíferos mexicanos (F. A. Cervantes, Y. Hortelano y J. Vargas, eds.). Instituto de Biología, UNAM. México, D. F., México.
- VÁZQUEZ, R. 2011. Comparación del cráneo y dentario de los ratones tlacuache *Tlacuatzin canescens* y *Marmosa mexicana* (Didelphimorphia: Didelphidae) de México, aplicando morfometría geométrica. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- VILLA, B. Y F. A. CERVANTES. 2003. *Los mamíferos de México*. Grupo Editorial Iberoamericana S. A. de C. V., Instituto de Biología, UNAM., México, D. F., México.
- VOSS, R. S. Y S. A. JANSÁ. 2003. Phylogenetic studies on didelphids II. Nonmolecular data and new *Irbp* sequences: separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxon sampling. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 276:1—82.
- VOSS, R. S., T. TARIFA Y E. YENSEN. 2004. An introduction to *Marmosops* (Marsupialia: Didelphidae), with the description of a new species from Bolivia and notes on the taxonomy and distribution of other Bolivian forms. *American Museum Novitates* 3466:1—40.
- VOSS, R. S., D. P. LUNDE Y S. A. JANSÁ. 2005. On the contents of *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. *American Museum Novitates* 3482:1—4.
- VOSS, R. S. Y S. A. JANSÁ. 2009. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of the New World metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 322:1—177.

- VOSS, R. S., E. E. GUTIÉRREZ, S. SOLARI, R. V. ROSSI Y S. A. JANSA. 2014. Phylogenetic relationships of mouse opossum (Didelphidae, *Marmosa*) with a revised subgeneric classification and notes on sympatric diversity. *American Museum Novitates* 3817:1—27.
- WILSON, D. W. 1991. Mammals of Tres Mariás Islands. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 206:214—250.
- ZARZA, H., G. CEBALLOS Y M. A. STEELE. 2003. *Marmosa canescens*. *Mammalian Species* 725:1—4.