



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

COMPARACIÓN MOLECULAR DE DOS ESPECIES DE
TLACUACHE: *Didelphis virginiana* Y *D. marsupialis*
(MAMMALIA: DIDELPHIMORPHIA)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A

JÉSICA ARCANGELI ÁLVAREZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
DRA. LÍVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE, 2010



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM

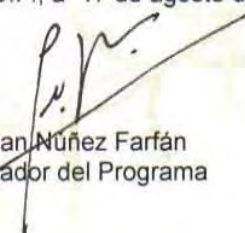
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de junio de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** de la alumna **ARCANGELI ÁLVAREZ JÉSICA** con número de cuenta **98046984** con la tesis titulada "**Comparación molecular de dos especies de tlacuache: *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis* (Mammalia: Didelphimorphia)**", realizada bajo la dirección del **DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA:**

Presidente: DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Vocal: DR. FRANCISCO XAVIER GONZÁLEZ CÓZATL
Secretario: DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA
Suplente: DR. JORGE ORTEGA REYES
Suplente: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de agosto de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

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

AGRADECIMIENTOS

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca para estudios de posgrado. A la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) por el apoyo financiero otorgado al proyecto “Código de Barras de los mamíferos de la Colección Nacional de Mamíferos” del que forma parte este trabajo.

A los miembros del Comité Tutorial y Jurado: Dr. Fernando A. Cervantes Reza, Dr. José Martín García Varela, Dra. Livia Socorro León Paniagua, Dr. Francisco Xavier González Cozátl y Dr. Jorge Ortega Reyes por el tiempo invertido en la corrección y enriquecimiento de este trabajo y por sus valiosas aportaciones a mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres Teresa y Adolfo por el apoyo incondicional, comprensión y amor que me dan, por cuidarme y querer siempre lo mejor para mi.

A mi hermana Erika por todo su cariño y por todas las noches que me acompaño hasta que terminara la tarea

A Dios por la vida y la familia que me dio, por acompañarme en todo momento, por permitirme llegar hasta aquí y cumplir este sueño.

A la máxima casa de estudios de este país y a la de mayor reconocimiento de Iberoamérica, la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

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

Al Dr. Moisés Martínez por compartir conmigo sus conocimientos de biología a molecular, por siempre contestar mis dudas y darme consejos.

A la M en C. Laura Marquéz y al M. en C. Jorge Yáñez por la secuenciación en el Laboratorio de Biología Molecular de este Posgrado y en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Al Dr. Robert C. Dowler (ASUNHC), Dra. Loren K. Ammerman (ASUNHC), M. en C. Silvia Hernández (FMVZ-UADY) y Dra. Consuelo Lorenzo (ECO-SC-M) por el préstamo de tejidos congelados.

A la M. en C. Karina Ramos por tomar muestras de oreja y la donación de un ejemplar de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), Distrito Federal. Al M. en C. Luis Juárez por la oreja que trajo de Monterrey, Nuevo León.

A la familia Sánchez por todo su apoyo durante mi estancia en Escuinapa, Sinaloa y por poner a todo el pueblo a buscar tlacuaches.

A la familia Pérez-Morga por todas las facilidades otorgadas para la colecta de tlacuaches en Tapachula, Chiapas.

A Raúl Martínez por la gran aventura que vivió en Tlacotalpan, Veracruz para conseguir ejemplares de ese lugar.

Al M. en C. Jorge López por la donación de ejemplares del tlacuache cuatro ojos de la región de Tuxtlas, Veracruz.

Al M. en C. Francisco Botello y a su equipo de trabajo por dejarme acompañarlos a Yetla, Guerrero y por todas las atenciones que tuvieron con Alejandra y conmigo durante el viaje.

Al Biól. Alfredo Bárcenas por preparar y traer un ejemplar de Peñuela, Veracruz,

Al personal de las Estaciones Biológicas "Chamela" en Jalisco y "Los Tuxtlas" en Veracruz por todo el apoyo brindado durante mi estancia.

A Lázaro Guevara, Luis Reyes, Omar Villegas, Alfredo Bárcenas, Anaid Mora, Alejandro Rosas, Berenice Brito, Laura Ruíz, Antonio Ruíz, Miguel Blanco, Rodrigo Arce, Cecilia Arana, Jonathan Romero, Valeria Cruz, Berenice García, Alejandra Breña y Romano Vázquez por su ayuda en el trabajo de campo para la colecta de tlacuaches en Chiapas, Jalisco, Veracruz, Michoacán y Guerrero.

A Eduardo Solano por ayudarme a Yolanda a catalogar todo el material colectado y por ayudarme a incorporarlo a la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA).

A los integrantes del laboratorio de Mastozoología por todos los momentos que siempre recordaré como miembro de este grupo.

A Karina y Jonathan por compartir conmigo la maravillosa experiencia de cuidar tlacuachitos. Muchas gracias.

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


















DEDICATORIA


























A todos los tlacuachitos s que cayeron en mis manos, especialmente a Tequila y Ron por orientar mi carrera hacia el estudio de los marsupiales.



ÍNDICE

Agradecimientos	I
Agradecimientos a título personal	II
Dedicatoria	IV
Índice	V
Lista de Figuras	VIII
Lista de Cuadros	X
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
 Género <i>Didelphis</i>	4
 Distribución geográfica de <i>D. virginiana</i> y <i>D. marsupialis</i> en México	6
 Marcadores moleculares	10
 Inferencias filogenéticas	11
Hipótesis	13
Objetivos	13
 Objetivo general	13
 Objetivos particulares	13
Materiales y métodos	14
 Acopio de muestras	14
 Identificación de especies	15
 Extracción de ADN	16
 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16
 Purificación y Secuenciación	19
 Análisis Filogenético	19
 Análisis de Máxima Parsimonia	20
 Análisis de Máxima Verosimilitud	21
 Análisis de Distancias	21
 Análisis del Polimorfismo de Fragmentos de Restricción	21
Resultados	22
 Colecta y acopio de muestras	22

Sección I. Identificación morfológica	23
 Determinación a nivel específico	23
 Características externas y craneales de <i>Didelphis marsupialis</i>	24
 Características externas y craneales de <i>Didelphis virginiana</i>	28
Sección II. Análisis de restricción	32
 Digestión con la enzima <i>HaeIII</i> en <i>Didelphis virginiana</i> y <i>D. marsupialis</i>	33
 Digestión con la enzima <i>HaeIII</i> en <i>Philander opossum</i>	35
 Digestión con la enzima <i>TaqI</i> en <i>Didelphis virginiana</i> y <i>D. marsupialis</i>	37
 Digestión con la enzima <i>TaqI</i> en <i>Philander opossum</i>	38
Sección III. Análisis Filogenético	39
 Citocromo <i>b</i>	39
 Análisis de Parsimonia	40
 Análisis de Máxima Verosimilitud	42
 Análisis de Distancia Genética	42
 Citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad I	50
 Análisis de Parsimonia	50
 Análisis de Máxima Verosimilitud	52
 Análisis de Distancia Genética	52
Discusión	60
 Sección I. Identificación morfológica	61
 Sección II. Análisis de restricción	65
 Sección III. Análisis Filogenético	68
 Citocromo <i>b</i>	68
 Citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad I	71
 Comparación de los genes citocromo <i>b</i> y citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad I	74
 Integración de los criterios morfológico y molecular	77
 Concepto Filogenético de especie	79
Conclusiones	80
Recomendaciones	81
Literatura citada	81

Apéndice I. Ejemplares de tlacuache (Mammalia: Didelphimorphia) colectados en México que fueron utilizados en la identificación molecular de dos especies del género <i>Didelphis</i> .	89
Apéndice II. Muestras de tejidos congelados de tlacuaches del género <i>Didelphis</i> en préstamo permanente provenientes de colecciones mastozoológicas nacionales y extranjeras.	94
Apéndice III. Huesos de un cráneo de tlacuache de la especie <i>Didelphis virginiana</i> colectado en el Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl, Estado de México.	97
Apéndice IV. Preparación de geles de agarosa para visualizar ADN	98
Apéndice V. Secuencias de los genes citocromo <i>b</i> y citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad tomadas de la base de datos Genbank y sus ejemplares de referencia	100
Apéndice VI. Características morfológicas, externas y craneales, de los 17 ejemplares del género <i>Didelphis</i> examinados	101
Apéndice VII. Secuencias del gen citocromo <i>b</i> de los tlacuaches <i>Didelphis virginiana</i> , <i>D. marsupialis</i> y <i>Philander oposum</i> y sus sitios de corte para las enzimas <i>HaeIII</i> y <i>TaqI</i>	109
Apéndice VIII. Lista de sinapomorfías que definen los clados principales de l género <i>Didelphis</i> utilizando secuencias de 1139 pb del gen citocromo <i>b</i>	113
Apéndice IX. Lista de sinapomorfías que definen los clados principales del género <i>Didelphis</i> utilizando secuencias de 657 pb del gen citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad I	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tlacuache de la especie <i>Didelphis virginiana</i> en el Campus de Ciudad Universitaria, UNAM, Ciudad de México	4
Figura 2. Distribución geográfica del género <i>Didelphis</i>	5
Figura 3. Distribución de las especies de tlacuache <i>D. virginiana</i> y <i>D. marsupialis</i> en México	6
Figura 4. Coloración típica de los cachetes en tlacuaches del género <i>Didelphis</i>	7
Figura 5. Variación intraespecífica de la coloración de los cachetes en tlacuaches del género <i>Didelphis</i>	8
Figura 6. Variación intraespecífica de la distribución del pelo de guardia en tlacuaches del género <i>Didelphis</i>	8
Figura 7. Extensión posterior del hueso lacrimonasal en <i>Didelphis virginiana</i> y <i>D. marsupialis</i>	9
Figura 8. Filogenia de la Familia Didelphidae	12
Figura 9. Tlacuaches colectados en trampas tipo Tomahawk	14
Figura 10. Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio que muestra el ADN extraído de 5 muestras de la especie <i>Didelphis marsupialis</i>	16
Figura 11. Geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio que muestran la amplificación de los genes citocromo <i>b</i> y citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad I	19
Figura 12. Tlacuache cuatro ojos (<i>Philander opossum</i>) colectado en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz	20
Figura 13. Localidades de colecta para muestras y ejemplares de las especies de tlacuache <i>Didelphis virginiana</i> y <i>D. marsupialis</i>	22
Figura 14. Coloración del cachete en <i>Didelphis marsupialis</i>	25
Figura 15. Distribución del pelo de guardia en <i>Didelphis marsupialis</i>	25
Figura 16. Posición de la sutura maxilo-frontal en <i>Didelphis marsupialis</i>	26
Figura 17. Huesos nasales en <i>Didelphis marsupialis</i>	26

Figura 18. Forma de la extensión posterior del hueso lacrimal en <i>Didelphis marsupialis</i>	27
Figura 19. Extensión dorsal del hueso palatino en <i>Didelphis marsupialis</i>	27
Figura 20. Coloración del cachete en <i>Didelphis virginiana</i>	28
Figura 21. Distribución del pelo de guardia en <i>Didelphis virginiana</i>	29
Figura 22. Posición de la sutura maxilo-frontal en <i>Didelphis virginiana</i>	30
Figura 23. Huesos nasales en <i>Didelphis marsupialis</i>	30
Figura 24. Variación intraespecífica de la forma de los huesos nasales en <i>Didelphis virginiana</i>	31
Figura 25. Forma de la extensión posterior del hueso lacrimal en <i>Didelphis virginiana</i>	31
Figura 26. Extensión dorsal del hueso palatino en <i>Didelphis virginiana</i>	32
Figura 27. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra la digestión del gen citocromo <i>b</i> con la enzima <i>HaeIII</i> en ejemplares del género <i>Didelphis</i>	34
Figura 28. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra la digestión del gen citocromo <i>b</i> con la enzima <i>HaeIII</i> en 3 ejemplares de la especie <i>Philander opossum</i> .	35
Figura 29. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra la digestión del gen citocromo <i>b</i> con la enzima <i>TaqI</i> en ejemplares del género <i>Didelphis</i>	37
Figura 30. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra la digestión del gen citocromo <i>b</i> con la enzima <i>TaqI</i> en 3 ejemplares de la especie <i>Philander opossum</i> .	38
Figura 31. Árbol de consenso estricto generado a partir de los 4 árboles más parsimoniosos para muestras del género <i>Didelphis</i> utilizando secuencias del gen citocromo <i>b</i>	44
Figura 32. Árbol de máxima verosimilitud construido con el modelo Tamura + Nei (TrN + G) para muestras de tlacuache del género <i>Didelphis</i> utilizando secuencias del gen citocromo <i>b</i>	45
Figura 33. Árbol de distancias construido con el algoritmo del vecino más cercano para muestras del género <i>Didelphis</i> con el modelo de evolución molecular dos parámetros de Kimura utilizando secuencias del gen citocromo <i>b</i>	49

Figura 34. Árbol de consenso estricto generado a partir de los 2 árboles más parsimoniosos para muestras del género <i>Didelphis</i> utilizando secuencias del gen citocromo oxidasa c subunidad I	54
Figura 35. Árbol de máxima verosimilitud construido con el modelo de Tamura + Nei (TrN + G) para muestras de tlacuache del género <i>Didelphis</i> utilizando secuencias del gen citocromo oxidasa c subunidad I	55
Figura 36. Árbol de distancias construido con el algoritmo del vecino más cercano para muestras del género <i>Didelphis</i> con el modelo de evolución molecular dos parámetros de Kimura utilizando secuencias del gen citocromo oxidasa c subunidad I	55
Figura 36. Árboles de consenso estricto generados para muestras del género <i>Didelphis</i> utilizando secuencias de los genes citocromo <i>b</i> y citocromo oxidasa c subunidad I	59

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Caracteres de morfología externa y craneal utilizados en la identificación de las especies del género <i>Didelphis</i> presentes en México	15
Cuadro 2. Iniciadores específicos utilizados en la amplificación de los genes citocromo <i>b</i> y citocromo oxidasa c subunidad I en los tlacuaches <i>Didelphis virginiana</i> , <i>D. marsupialis</i> y <i>Philander opossum</i>	17
Cuadro 3. Programa del termociclador para la amplificación del gen citocromo <i>b</i> (1149 pb) en los tlacuaches <i>Didelphis virginiana</i> , <i>D. marsupialis</i> y <i>Philander opossum</i> por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	17
Cuadro 4. Programa del termociclador para la amplificación de un fragmento de 450 pb del gen citocromo <i>b</i> en los tlacuaches <i>Didelphis virginiana</i> , <i>D. marsupialis</i> y <i>Philander opossum</i> por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	18
Cuadro 5. Programa del termociclador para la amplificación de un fragmento de 750 pb del gen citocromo oxidasa c subunidad I en tres especies de tlacuache (<i>Didelphis virginiana</i> , <i>D. marsupialis</i> y <i>Philander opossum</i>) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	18
Cuadro 6. Identidad taxonómica de los ejemplares colectados utilizando las características convencionales por separado	23
Cuadro 7. Predicción del patrón de digestión del gen citocromo <i>b</i> con el software NEBcutter V2.0 utilizando las enzimas <i>HaeIII</i> y <i>TaqI</i> en tres especies de tlacuache	33

Cuadro 8. Sitios de colecta y patrones de digestión con la enzima <i>HaeIII</i> de 41 muestras del género <i>Didelphis</i>	36
Cuadro 9. Sitios de colecta y patrones de digestión con la enzima <i>TaqI</i> de 41 muestras del género <i>Didelphis</i>	39
Cuadro 10. Matriz de distancias construida con secuencias del gen citocromo <i>b</i> para los tlacuaches <i>Metachirus nudicaudatus</i> , <i>Philander opossum</i> , <i>Didelphis virginiana</i> , <i>D. marsupialis</i> y <i>D. albiventris</i> , bajo el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura	46
Cuadro 11. Matriz de distancias construida con secuencias del gen citocromo oxidasa <i>c</i> subunidad I para los tlacuaches <i>Metachirus nudicaudatus</i> , <i>Philander opossum</i> , <i>Didelphis virginiana</i> , <i>D. marsupialis</i> y <i>D. albiventris</i> , bajo el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura	56

COMPARACIÓN MOLECULAR DE DOS ESPECIES DE TLACUACHE: *Didelphis virginiana* Y *D. marsupialis* (MAMMALIA: DIDELPHIMORPHIA).

JÉSICA ARCANGELI ÁLVAREZ

Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. A. P. 70-153. Coyoacán, C. P. 04510, México, D. F.

RESUMEN

Los tlacuaches del género *Didelphis* son mamíferos de talla mediana que se caracterizan por tener un marsupio bien desarrollado, pelaje denso y pelo de guardia largo. En México se distribuyen simpátricamente dos especies morfológicamente muy similares. Este hecho ocasiona imprecisiones en la correcta identificación de cada especie debido a que es difícil distinguirlas a simple vista. Una alternativa confiable y reciente para identificar especies son los marcadores moleculares, como el ADN mitocondrial. Entre las herramientas usadas para reconocer especies se encuentran: el análisis de la longitud de fragmentos de restricción y la evaluación de hipótesis filogenéticas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue distinguir dos especies de tlacuache, *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*, utilizando diferentes marcadores moleculares. El análisis de fragmentos de restricción implicó la amplificación del gen citocromo *b* y su digestión con dos enzimas, *HaeIII* y *TaqI*. El análisis filogenético se hizo utilizando secuencias de los genes citocromo *b* y citocromo oxidasa *c* subunidad I generadas en este estudio, bajo diferentes criterios: máxima parsimonia, máxima verosimilitud y distancias. El análisis de fragmentos de restricción con las dos enzimas produjo patrones de digestión diferentes para cada especie. Asimismo, el análisis filogenético de las secuencias agrupa las muestras de *D. virginiana* y *D. marsupialis* en clados diferentes. Las distancias genéticas entre estas especies de tlacuache variaron del 10.3 a 11.8 % con citocromo *b* y de 7.8 a 9.3 % con citocromo oxidasa *c* subunidad I. Por lo tanto, se puede identificar exitosamente estas dos especies de tlacuache utilizando marcadores moleculares.

Palabras clave: análisis filogenéticos, *Didelphis*, enzima de restricción, identificación de especies, tlacuache.

MOLECULAR COMPARISON BETWEEN TWO SPECIES OF OPOSSUM: *Didelphis virginiana* and *D. marsupialis* (MAMMALIA DIDELPHIMORPHIA)

JÉSICA ARCANGELI ÁLVAREZ

Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. A. P. 70-53. Coyoacán, C. P. 04510, México, D. F.

ABSTRACT

Opossums of the genus *Didelphis* are medium-sized mammals characterized by a well developed pouch, dense underfur and a long guard hair. There are two morphologically similar species in México. This situation complicates their identification at the specific level because it is so difficult to discriminate between both species using morphology. A safe and recent alternative for species identification is the use of molecular markers such as mitochondrial DNA. Some common approaches for species delimitation are: the analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and the assessment of phylogenetic hypothesis. The objective of this study then was to distinguish two opossum species, *Didelphis virginiana* and *D. marsupialis* using molecular markers. RFLPs utilized cytochrome *b* PCR products and two restriction enzymes, *HaeIII* y *TaqI*. Phylogenetic analyses were performed using sequences of two mitochondrial genes, cytochrome *b* and cytochrome oxidase *c* subunit I generated in this study. DNA sequence analyses included maximum parsimony, maximum likelihood and distance criteria. Both *HaeIII* and *TaqI* produced different digestion patterns in both species. Likewise, phylogenetic analyses separated samples from *D. virginiana* and *D. marsupialis* in two clades. Genetic distances between both species varied from 10.3 to 11.8 % for cytochrome *b* and from 7.8 to 9.3 % for cytochrome oxidase *c* subunit I. Therefore, we could discriminate among *D. virginiana* and *D. marsupialis* using molecular markers.

Key words: phylogenetic analyses, *Didelphis*, restriction enzymes, species identification, opossum

INTRODUCCIÓN

Los marsupiales (Infraclasse Metatheria) son mamíferos que se caracterizan por tener un desarrollo intrauterino muy corto que es completado en el exterior de la madre (Vaughan et al., 2000). Tradicionalmente los marsupiales se han dividido en dos grupos, los australianos (Australidelphia) con cinco órdenes Microbiotheria, Notoryctemorphia, Peramelemorphia, Dasyuromorpha y Diprodontia; y los americanos (Ameridelphia) con dos órdenes Didelphimorphia y Paucituberculata (Springer et al., 1994).

Los marsupiales americanos son un componente importante en la fauna neotropical, ocupan el tercer lugar en riqueza de especies en el Nuevo Mundo después de los roedores y los quirópteros (Catzeflis et al., 1997). La familia Didelphidae, única representante del Orden Didelphimorphia, agrupa a la mayor parte de los marsupiales del nuevo mundo (Villa y Cervantes, 2003), incluye 80 especies arregladas en 17 géneros y 2 subfamilias (Voss y Jansa, 2003). Este Orden es, de los conocidos, el más antiguo de la Infraclasse Metatheria apareciendo en el registro fósil del Cretácico tardío. Sus integrantes son los marsupiales más primitivos y generalistas por lo que se consideran la base de la radiación de los marsupiales actuales (Patton et al., 1996).

Estos marsupiales se caracterizan por tener un hocico largo y puntiagudo. Sus cuatro patas presentan 5 dedos y el pulgar de las patas traseras es oponible y carece de uña (Villa y Cervantes, 2003). Su cola y las orejas están desnudas excepto en la base. La mayoría tienen cola prensil que utilizan para asirse cuando trepan o se alimentan en los árboles (Macdonald, 1991). El marsupio puede tener diferentes grados de desarrollo, puede estar completamente ausente, aparecer como pliegues en la piel de la región ventral ó encontrarse bien desarrollado (Vaughan et al., 2000).

Geográficamente el Orden Didelphimorphia se distribuye desde el sureste de Canadá hasta la Patagonia (Macdonald, 1991). Estos marsupiales se pueden encontrar en casi todos los hábitats desde el desierto hasta el bosque tropical y a elevaciones que van desde el nivel del mar

hasta más de 3 400 m (Eisenberg, 1989; Feldhamer et al., 2007). Son mamíferos nocturnos y solitarios y la mayoría son de hábitos escasoriales y omnívoros (Vaughan et al., 2000). Entre los marsupiales de este Orden que destacan por sus características biológicas, ecológicas y evolutivas se encuentran los tlacuaches o zarigüeyas del género *Didelphis*.

Género *Didelphis*

Los tlacuaches del género *Didelphis* son mamíferos de talla mediana que se caracterizan por tener un marsupio bien desarrollado en las hembras, cola larga, bicolor, desnuda y prensil, pelaje denso, pelo de guardia largo y de color blanco y un número cromosómico $2n = 22$ (Gardner, 1973; Patton et al., 1996; Fig. 1). Su fósil más antiguo, *Paradidelphis* (= *Hyperdidelphis*) tiene una edad estimada de 6 millones de años (Simpson, 1974) y se conoce de depósitos del Pleistoceno de América del Sur (McManus, 1974).



Figura 1. Tlacuache de la especie *Didelphis virginiana* en el Campus de Ciudad Universitaria, UNAM, Ciudad de México (fotografía: J. Arcangeli).

La distribución actual del género se extiende desde el sureste de Canadá hasta el centro de Argentina a elevaciones que van desde el nivel del mar, tanto en la costa del Atlántico como en

la de Pacífico, hasta más de 3 000 metros en las montañas de México y América del Sur (Ventura et al., 2002; Fig. 2). Estos tlacuaches se pueden encontrar en una gran variedad de hábitats: matorral xerófilo, bosque tropical perennifolio y caducifolio, bosque de coníferas, bosque de pino-encino y selva (Cerqueira y Lemos, 2000). Son mamíferos muy tímidos que cuando se sienten en peligro fingen estar muertos (tanatosis) para poder escapar (Villa y Cervantes, 2003).



Figura 2. Distribución geográfica del género *Didelphis* (modificada de McManus, 1974; Cerqueira, 1985; Patton y Costa, 2003).

Actualmente se reconocen seis especies nominales: *D. albiventris* que se distribuye desde Venezuela y Guyana hasta el norte de Argentina; *D. aurita* que se encuentra en Brasil, Paraguay y Argentina; *D. imperfecta* que ocurre en Venezuela, sureste de Surinam, Guyana Francesa y el norte de Brasil; *D. pernigra* que se ubica en los Andes de Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia; *D. marsupialis* que ocurre desde México a Perú, Bolivia y Brasil; y *D. virginiana* que se extiende desde el sureste de Canadá hasta el norte de Costa Rica (Ventura et al., 2002; Gardner, 2005).

Distribución geográfica de *D. virginiana* y *D. marsupialis* en México

En México se distribuyen dos especies morfológicamente muy similares (Gardner, 1973). *Didelphis virginiana* se encuentra en casi todo el país excepto en la península de Baja California y la meseta central. *Didelphis marsupialis* habita desde el centro de Tamaulipas, a través de la vertiente del Golfo de México hasta el norte y este de Oaxaca, Chiapas y la península de Yucatán (Aranda, 2000). En nuestro país, *D. marsupialis* es simpátrica en toda su distribución con *D. virginiana* (Fig. 3).

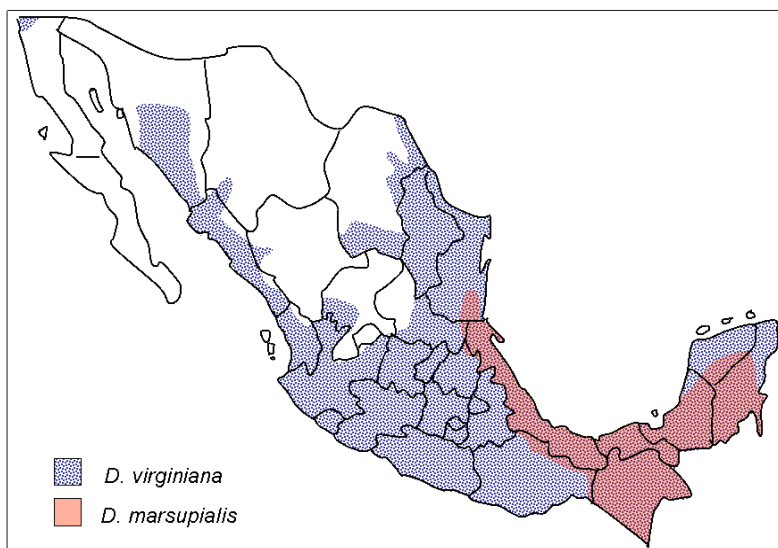


Figura 3. Distribución de las especies de tlacuache *D. virginiana* y *D. marsupialis* en México (modificada de Gardner, 1973).

La presencia de ambas especies de tlacuache en esta área ocasiona imprecisiones en la identificación a nivel específico debido a que a simple vista es difícil distinguir las características diagnósticas de cada especie. Este problema es muy común a lo largo de toda la distribución del género, se trate de especies simpáticas o alopátricas. Por ejemplo, Lavergne et al. (1997) reportan que en Guyana es difícil distinguir entre *D. marsupialis* y *D. albiventris* en los lugares donde su distribución es simpática debido al polimorfismo que presentan los caracteres externos usados para su identificación. Asimismo, Cerqueira y Lemos (2000) señalan que entre *D. aurita* y *D. marsupialis* no se han identificado caracteres morfológicos externos que ayuden a

distinguir las. Existen, algunos trabajos que en los que se ha intentado diferenciar a las especies de este género a partir de caracteres de morfología externa y craneal, cromosómicos y moleculares (Gardner, 1973; Catzefflis et al., 1997; Lavergne et al., 1997; Lemos y Cerqueira, 2002; Ventura et al., 2002). Sin embargo, no todos caracteres documentados se pueden utilizar para distinguir a *D. virginiana* de *D. marsupialis*.

No obstante, algunos de los rasgos morfológicos que se han reportado para diferenciar externamente a *D. virginiana* de *D. marsupialis* son: el color del pelo de los cachetes, blanco en *D. virginiana* y amarillo en *D. marsupialis* (Aranda, 2000; Fig. 4); la distribución del pelo de guardia, en *D. virginiana* está distribuido en todo el dorso, mientras que en *D. marsupialis* se concentra sobre la línea media (Gardner, 1973); el porcentaje de color negro en la cola, 25-50 % en *D. virginiana* y 20-30 % en *D. marsupialis*; y la longitud de la cola con respecto a la longitud cabeza y el cuerpo, 73-93 % en *D. virginiana*, mientras que en *D. marsupialis* siempre es mayor al 100 % (Allen, 1901). Sin embargo, la identificación de estas especies con base en la morfología externa es incierta debido a la amplia variación intraespecífica y geográfica que presentan estos caracteres (Figs. 5 y 6) y a que las diferencias se minimizan en la zona de simpatria (Emmons, 1990).

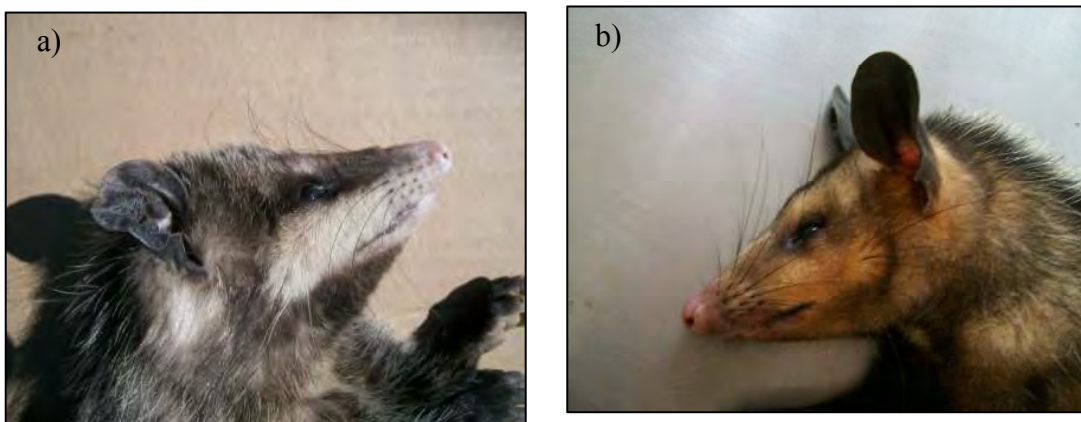


Figura 4. Coloración típica de los cachetes en tlacuaches del género *Didelphis*: a) Hembra de la especie *D. virginiana* colectada en el Parque Nacional Izta-Popo, Estado de México con cachete de color blanco (CNMA 45119); b) Hembra de la especie *D. marsupialis* colectada en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz con cachete de color amarillo (CNMA 45109; fotografías: J. Arcangeli).



Figura 5. Variación intraespecífica de la coloración del cachete en tlacuaches del género *Didelphis*: a) Macho de la especie *D. virginiana* colectado en Coyuca de Benítez, Guerrero con cachete de color amarillo pálido (CNMA 45117); b) Macho de la especie *D. marsupialis* colectado en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz con cachete de color amarillo pálido (CNMA 45110; fotografías: J. Arcangeli).



Figura 6. Variación intraespecífica de la distribución del pelo de guardia en tlacuaches del género *Didelphis*: a) Hembra de la especie *Didelphis virginiana* colectada en el Parque Nacional Izta-Popo, Estado de México mostrando el pelo de guardia distribuido en todo el dorso (CNMA 45119); b) Macho de la especie *D. virginiana* colectado en Coyuca de Benítez, Guerrero exhibiendo el pelo de guardia concentrado sobre la línea media (CNMA 45117); c) Macho de la especie *D. marsupialis* colectado en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz con el pelo de guardia sobre la línea media (CNMA 45110; fotografías: J. Arcangeli).

Por otro lado, el estudio de la morfología craneal de ambos tlacuaches indica que existen algunas diferencias en la morfología de los huesos nasal, palatino y lacrimal. El carácter más utilizado para diferenciar estas dos especies es la forma de la extensión posterior del hueso lacrimal, una línea curva en *D. virginiana* y una línea recta en *D. marsupialis* (Fig. 7; Villa y Cervantes, 2003). Otro carácter de relevancia taxonómica es la intercepción de la sutura maxilo-frontal con los huesos nasal y lacrimal, en *D. virginiana* esta intercepción de esta sutura esta alineada con los dos huesos o es anterior al lacrimal, mientras que en *D. marsupialis* siempre es anterior. Otro rasgo morfológico para distinguir estas especies es la anchura de los huesos nasales, los cuales son más angostos y terminan en un ángulo agudo en *D. marsupialis*, mientras que en *D. virginiana* terminan formando un ángulo redondeado. Por último se puede utilizar la anchura de la extensión orbital del palatino que en *D. virginiana* es usualmente ancha mientras que el *D. marsupialis* siempre es angosta (Gardner, 1973).

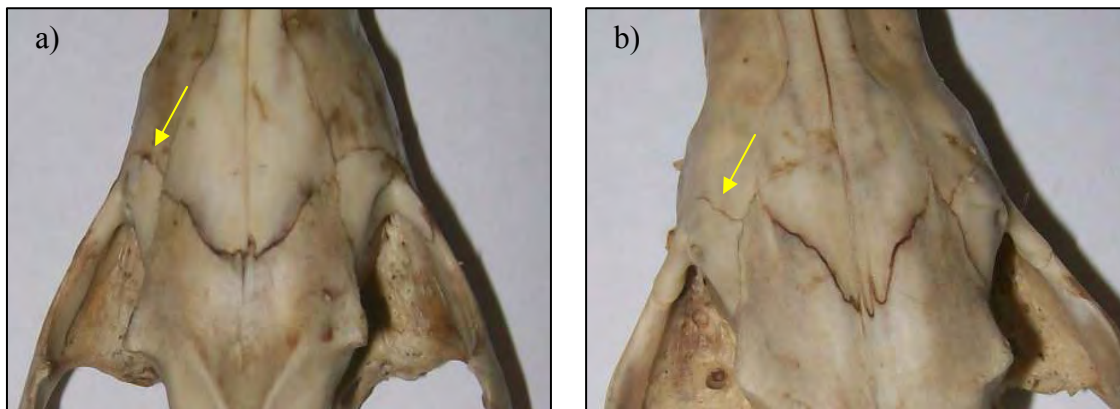


Figura 7. Extensión posterior de hueso lacrimal (señalada con una flecha amarilla): a) Vista dorsal del cráneo de un tlacuache de la especie *D. virginiana* (CNMA 45119) donde la extensión posterior del hueso lacrimal forma una línea curva; b) Vista dorsal del cráneo de un tlacuache de la especie *D. marsupialis* (CNMA 45109) donde se observa la extensión posterior del hueso lacrimal como una línea recta (fotografías: J. Arcangeli).

Aunque Gardner (1973) examinó los caracteres morfológicos de estas dos especies de tlacuache y aportó información valiosa para la distinguirlas, no ha sido suficiente debido a la gran variación que existe en los caracteres que él uso. De hecho, Ruiz-Piña y Cruz-Reyes (2002) después de examinar un gran número de ejemplares afirman que no hay caracteres

morfológicos que las distinguan. Por otro lado, es muy importante distinguir estas dos especies de tlacuache debido a que al ser muy parecidas morfológicamente pueden ocupar nichos ecológicos muy similares en la zona de simpatría (Gardner, 1973). Además estas especies son consideradas en México como los reservorios silvestres más importantes del protozoario *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas (Colchero et al., 2005; Zarza y Medellín, 2005), la cual es considerada un problema de salud pública en nuestro país ya que afecta a un gran número de personas (CHAGMEX, 2010). Por lo tanto, se necesitan métodos que ayuden a los especialistas a identificar de manera rápida y sencilla las dos especies de tlacuache.

Marcadores moleculares

Una alternativa confiable y moderna para distinguir especies es el uso de los marcadores moleculares. Entre ellos se encuentra el ADN mitocondrial que es ampliamente utilizado para resolver inconsistencias taxonómicas debido a que tiene altas tasas de mutación lo que permite revelar con mayor resolución las diferencias evolutivas entre especies cercanamente relacionadas (Ortega, 2006). Entre las herramientas que utilizan el ADN mitocondrial para identificar especies, se encuentran: el análisis de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, siglas en inglés; St-Pierre et al., 2006) y la evaluación de patrones filogenéticos (Arellano et al., 2006).

Los RFLPs utilizan el producto amplificado por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por siglas en inglés) para identificar con una ó más enzimas de restricción secuencias de ADN específicas que están presentes en una especie y no en la otra, produciendo fragmentos de diferente tamaño con lo que se puede distinguir fácilmente entre especies (Rentería, 2006). De tal manera que al digerir con enzimas de restricción el producto de un PCR, éstas cortan el ADN en lugares diferentes en cada especie. Así, los fragmentos obtenidos de la digestión son de diferente tamaño, lo que demuestra que son especies diferentes. Desafortunadamente, no existen trabajos que muestren la aplicación de esta técnica para

identificar marsupiales. Sin embargo, si hay estudios donde se han podido distinguir especies en otros grupos de mamíferos como: cánidos (Krausman et al., 2006), felinos (Mills et al., 2000), mustélidos (Riddle et al., 2002), murciélagos (Machado et al., 2005), conejos (Litvaitis y Litvaitis, 1996), roedores (Kuehn et al., 2000; Fagundes y Nogueira, 2007) e invertebrados (España et al., 2008).

Asimismo, la identificación de especies con árboles filogenéticos se basa en la formulación de hipótesis de ancestría-descendencia hechas a partir de un conjunto de secuencias de nucleótidos (Arellano et al., 2006). Estos árboles definen los límites entre especies, en base a dos criterios: la definición de grupos monofiléticos (un ancestro y todos sus descendientes) ó el grado de aislamiento genético (Knowles y Cartens, 2007). Uno de los genes mitocontriales más utilizados con este fin en estudios de mamíferos es el citocromo *b* (Bladley y Baker, 2001). Este gen ha sido de gran utilidad en estudios filogeográficos realizados en marsupiales de la familia Didelphidae (Meynard et al., 2007); ha ayudado a establecer los límites entre las especies del género *Philander* (Patton y da Silva, 1997; Nunes et al., 2006) y a identificar especies crípticas en el género *Monodelphis* (Solari, 2007; Lim et al., 2009). Por otro lado, trabajos recientes sugieren que una región de 648 pares de bases (pb) cerca del extremo 5' del gen citocromo oxidasa *c* subunidad I (*COI*) puede servir como un código de barras de ADN para la identificación de las especies animales (Hebert et al., 2004a). Desafortunadamente no hay datos en la literatura que muestren la aplicación de este marcador molecular para reconocer especies de tlacuache. Sin embargo, algunos trabajos hechos en murciélagos y roedores han mostrado que el gen *COI* puede distinguir especies con alta precisión e inferir sus relaciones filogenéticas (Savolainen et al., 2005; Clare et al., 2007; Borisenko et al., 2008).

Inferencias filogenéticas del género *Didelphis*

Gardner (1973) al analizar los cromosomas y la anatomía de *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *D. albiventris* propuso que *D. virginiana* y *D. marsupialis* eran especies hermanas y colocó a *D. albiventris* como la más lejana. Sin embargo, estudios moleculares basados en secuencias de genes mitocondriales (Patton et al., 1996) y nucleares (Voss y Jansa, 2003) han

demostrado que dentro del género monofilético *Didelphis*, *D. virginiana* es el grupo hermano del clado conformado por *D. albiventris* y *D. marsupialis*, lo que implica que *D. virginiana* se originó antes de la divergencia de estas dos especies (Fig. 8; Kirsch et al., 1993; Patton y Costa, 2003). Por lo tanto, en un árbol filogenético *D. virginiana* y *D. marsupialis* no deben aparecer juntas (Jansa y Voss, 2000), lo que sugiere que las distancias genéticas entre éstas no serán pequeñas.

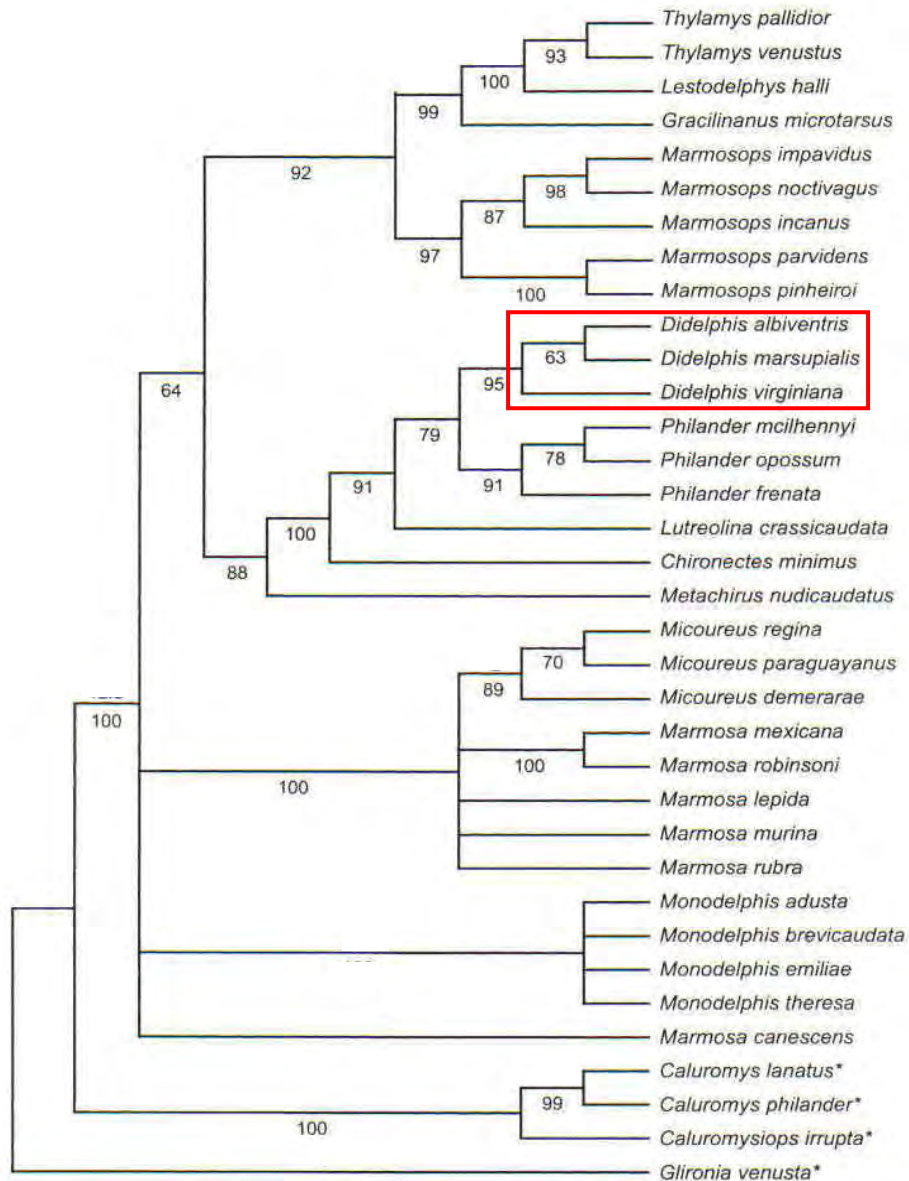


Figura 8. Filogenia de la familia Didelphidae utilizando un fragmento de 1158 pares de bases (pb) del gen nuclear Interfotoreceptor retinoide (*IRBP*; modificado de Voss y Jansa, 2003). En el recuadro rojo se muestra la ubicación del género *Didelphis*.

HIPOTESIS



De acuerdo con lo anterior, se propone que a partir del producto amplificado de un PCR y con enzimas de restricción se pueden encontrar diferencias en la secuencia de ADN de las especies de tlacuache del género *Didelphis* manifestadas como un patrón de restricción para cada especie. Asimismo, el análisis de las secuencias de dos genes mitocondriales, citocromo *b* y citocromo oxidasa *c* subunidad I, bajo diferentes criterios producirá dos clados uno para *D. virginiana* y otro para *D. marsupialis*. Por lo tanto los objetivos del presente trabajo son:

OBJETIVOS

Objetivo general

Distinguir dos especies de tlacuache, *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*, utilizando marcadores moleculares.

Objetivos particulares

-  Distinguir dos especies de tlacuache a partir de las diferencias en sus secuencias de nucleótidos utilizando enzimas de restricción.
-  Generar hipótesis filogenéticas a partir de las secuencias de nucleótidos de los genes mitocondriales citocromo *b* y citocromo oxidasa *c* subunidad I con el fin de determinar si las dos especies constituyen linajes distintos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Acopio de Muestras

Se colectaron ejemplares de las especies de tlacuache *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander oposum* bajo el amparo del permiso de colector científico FAUT-0002 expedido por la Dirección General de Vida Silvestre, SEMARNAT, a Fernando A. Cervantes. Los ejemplares se colectaron en trampas tipo Tomahawk (Fig. 9), en el Distrito Federal y en los estados Guerrero, México, Sinaloa y Veracruz.

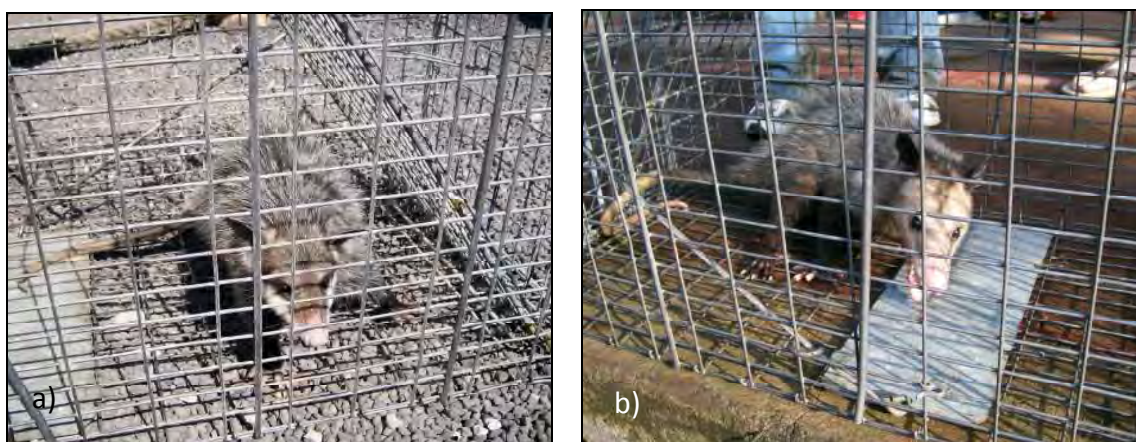


Figura 9. Tlacuaches colectados en trampas tipo Tomahawk. a) Hembra de la especie *Didelphis virginiana* colectada en el Parque Nacional Izta-Popo, Estado de México (CNMA 45119); b) Macho de la especie *D. marsupialis* colectado en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz (CNMA 45110; fotografía: J. Arcangeli).

Todos los individuos colectados fueron preparados como ejemplares de museo, preservando piel y esqueleto, tomando las medidas convencionales: longitud total, longitud de la cola, longitud de la pata y longitud de la oreja. Asimismo, se tomaron muestras de tejido (hígado, corazón, riñón y músculo), los cuales fueron almacenados en un ultracongelador a -75 °C. Todo el material colectado fue depositado en la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) del Instituto de Biología, UNAM (Apéndice I). Adicionalmente, se pidieron en calidad de préstamo permanente tejidos congelados a la CNMA, el Colegio de la Frontera Sur Unidad San

Cristóbal de las Casas en Chiapas, la Universidad Autónoma de Yucatán en Mérida y Angelo State University en Texas, E. U. A. (Apéndice II).

Identificación de especies

Los ejemplares colectados fueron identificados hasta el nivel de especie utilizando los trabajos de Gardner (1973), Hall (1981) y Villa y Cervantes (2003) como guía, ocupando los ocho caracteres de morfología externa y craneal que se ha reportado en la literatura pueden ayudar a distinguir a *Didelphis virginiana* de *D. marsupialis* (Cuadro 1; Apéndice III).

Cuadro 1. Caracteres de morfología externa y craneal utilizados en la identificación de las especies del género *Didelphis* presentes en México (Allen, 1901; Davis, 1944; Gardner, 1973).

Carácter	<i>Didelphis virginiana</i>	<i>Didelphis marsupialis</i>
Coloración del cachete	Blanco	Amarillo pálido a naranja
Distribución del pelo de guardia	El pelo se encuentra repartido en todo el dorso	El pelo se concentra sobre la línea media
Longitud de la cola con respecto a la longitud de la cabeza y el cuerpo	73-93 %	103 %
Porcentaje de color negro en la cola	25-50 %	20-30 %
Posición de la sutura máxilo-frontal con respecto a los huesos nasal y lacrimal	Alineada con los dos huesos ó anterior al hueso lacrimal	Anterior al hueso lacrimal
Forma de los huesos nasales	Anchos y terminan formando un ángulo redondeado	Delgados y terminan formando un ángulo agudo
Forma de la extensión posterior del hueso lacrimal	Semejante a una línea curva	Semejante a una línea recta
Extensión dorsal del palatino	Gruesa	Delgada

Extracción de ADN

El ADN se extrajo a partir de muestras de hígado congelado con un kit comercial (DNeasy Blood and Tissue Kit, *Qiagen* Cat^{MR} No. 69504), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN extraído se evaluó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1 % (Sanbrook y Rusell, 2001; Apéndice IV). El ADN se visualizó con bromuro de etidio en un transiluminador de rayos ultra violeta. Posteriormente se tomó una fotografía del gel con una cámara digital (Fig. 10). Las concentraciones del ADN se midieron por espectrofotometría.

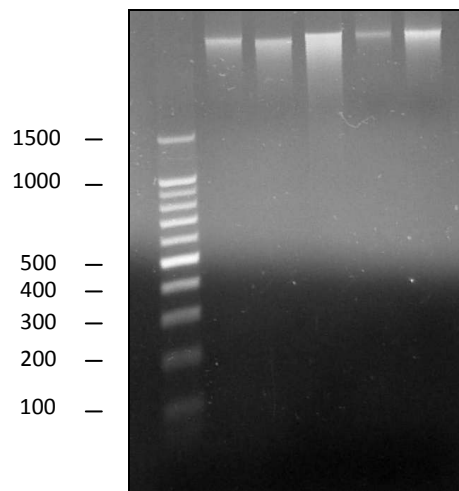


Figura 10. Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio que muestra el ADN extraído de 5 muestras de la especie *Didelphis marsupialis*. M = Marcador de ADN de referencia de tamaño en incrementos de 100 pb.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Por medio de PCR, se amplificaron el gen citocromo *b* (*Cit b*) completo (1149 pb) y un fragmento de 750 pb del gen citocromo oxidasa c subunidad I (*COI*) utilizando iniciadores específicos (Cuadro 2). En algunas muestras el ADN estaba muy degradado y no se pudo obtener el gen *Cit b* completo, por lo que se amplificó en tres fragmentos de 450 pb. Las concentraciones finales de los reactivos en un volumen de reacción de 25 μ l fueron: Buffer 1 X, $MgCl_2$ 2.5 mM, *Taq* Polimerasa 1 unidad, dNTPs 200 μ M, primer F 0.4 μ M, primer R 0.4 μ l y ADN

100 ng. El programa del termociclador se ajusto de acuerdo a las características de los iniciadores específicos (Cuadros 3 al 5). Los productos del PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (Fig. 11).

Cuadro 2. Iniciadores específicos utilizados en la amplificación de los genes citocromo *b* y citocromo oxidasa *c* subunidad I en los tlacuaches *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander opossum*.

Gen	Secuencia de nucleótidos	Referencia
Cit <i>b</i>	MVZ-05 5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'	Patton et al., 1996; Smith y Patton, 1993;Smith y Patton, 1999
	MVZ-14 5'-GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC-3'	
	MVZ-04 5'-GCAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'	
	MVZ-45 5'-GTHATAGCHACAGCATTYATAGG-3'	
	MVZ-16 5'-TAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT-3'	
	MVZ-17 5'-ACCTCCTAGGAGAYCCAGAHAAAYT-3'	
COI	LepF1_t1 5'-TGTAACGACGGCCAGTATTCAACCAATC ATTCATAAAGATATGG-3'	Ivanova et al., 2007
	LepR1_t1 5'-AGGAAACAGCTATGACTAGACTTCGGATGT CCAAAAATCA-3'	

Cuadro 3. Programa del termociclador para la amplificación del gen citocromo *b* (1149 pb) en los tlacuaches *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander opossum* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (modificado de Patton et al., 1996).

Evento	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	No. de ciclos
Desnaturalización Inicial	94	180	1
Desnaturalización	94	60	27
Alineación	47	45	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	300	1

Cuadro 4. Programa del termociclador para la amplificación de un fragmento de 450 pb del gen citocromo *b* en *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander opossum* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (modificado de Smith y Patton, 1993; Smith y Patton, 1999).

Evento	Temperatura (° C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización Inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	30
Alineación	50	1	
Extensión	72	1	
Extensión Final	73	5	1

Cuadro 5. Programa del termociclador para la amplificación de un fragmento de 750 pb del gen citocromo oxidasa *c* subunidad I en tres especies de tlacuache (*Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander opossum*) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (modificado de Ivanova et al., 2007).

Evento	Temperatura (° C)	Tiempo (s)	No. de ciclos
Desnaturalización Inicial	94	180	1
Desnaturalización	94	30	5
Alineación	50	40	
Extensión	72	60	
Desnaturalización	94	30	30
Alineación	55-65	40	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	300	1

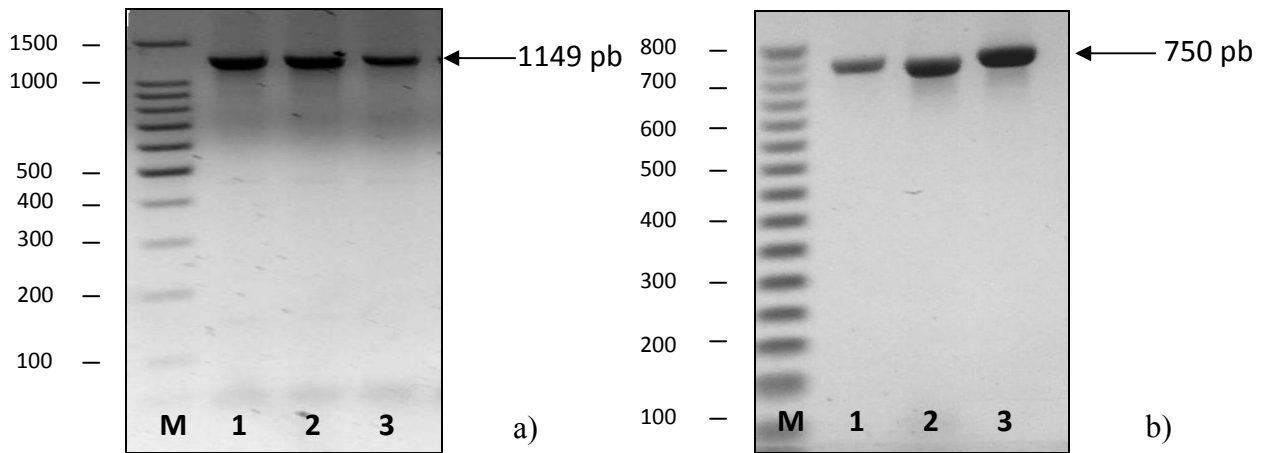


Figura 11. Geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio que muestran la amplificación de los genes: a) citocromo *b* (1149 pb); b) citocromo oxidasa *c* subunidad I (750 pb). *Didelphis virginiana* (carril 1), *D. marsupialis* (carril 2) y *Philander opossum* (carril 3). M = Marcador de ADN de referencia de tamaño en incrementos de 50 y 100 pb; pb = pares de bases.

Purificación y Secuenciación

La purificación del ADN se realizó con los kits comerciales (QIAquick PCR Purification Kit (50) *Qiagen* Cat^{MR} No. 28104 y QIAEX II Gel Extraction Kit (150) *Qiagen* Cat^{MR} No. 20021). El ADN se secuenció en ambas direcciones empleando el juego de iniciadores específicos utilizados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Por último, las muestras fueron enviadas al secuenciador automático del Posgrado en Ciencias Biológicas en el Instituto de Biología, UNAM en el Distrito Federal y a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM en Cuernavaca, Morelos. Las secuencias de ADN se editaron y alinearon manualmente con el software BioEdit Sequence Alignment Editor Versión 7.0.9. (Hall, 1999).

Análisis Filogenético

La estimación filogenética incluyó distintos criterios de análisis: máxima parsimonia, máxima verosimilitud y distancias. Los árboles fueron enraizados siguiendo el criterio de grupo externo utilizando secuencias generadas en este estudio para *Philander opossum* representante

del género hermano de *Didelphis* (Fig. 12; Patton et al., 1996) y secuencias de Genbank (Apéndice V) de *Metachirus nudicaudatus*, Cit *b* (U34671) y *COI* (EU095435). Asimismo, se integraron al análisis las secuencias disponibles para las especies del género *Didelphis*, Cit *b*: *Didelphis virginiana* (Z29573), *D. marsupialis* (U34665) y *D. albiventris* (U34667); *COI*: *Didelphis virginiana* (EU095425), *D. marsupialis* (EU095424) y *D. albiventris* (EU095421).



Figura 12. Tlacuache cuatro ojos (*Philander opossum*) colectado en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz (fotografía: J. Arcangeli).

Análisis de Máxima Parsimonia (MP). El árbol más parsimonioso se obtuvo por medio de una búsqueda heurística utilizando el software PAUP* 4.0d10 (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods; Swofford, 2002). Todos los caracteres fueron analizados como no ordenados, con igual peso y con cuatro posibles estados de carácter (A, C, G, T), excluyendo los caracteres filogenéticamente no informativos. La búsqueda consistió en 1 000 adiciones aleatorias de secuencias con permutación global de ramas (TBR, por sus siglas en inglés). El soporte de los nodos de los árboles se obtuvo por medio de los valores de bootstrap (Felsenstein, 1985) con 1 000 replicas de 100 adiciones aleatorias.

Análisis de Máxima Verosimilitud (MV). Se realizó una búsqueda heurística utilizando el software PAUP* 4.0d10 y el modelo de evolución de evolución molecular que mejor se ajusto a las secuencias de nucleótidos. Este modelo se eligió por medio del software Modeltest 3.7 (Posada y Crandall, 1998). Tanto para el gen *Cit b* como para el *COI* el modelo TrN + G resultó ser el más adecuado. La búsqueda consistió en 100 adiciones aleatorias de secuencias con permutación global de ramas. El soporte de los nodos de los árboles se obtuvo por medio de valores de bootstrap (Felsenstein, 1985) con 100 replicas de 100 adiciones aleatorias.

Análisis de distancias Las distancias genéticas se evaluaron aplicando el modelo de sustitución de nucleótidos 2 parámetros de Kimura (K2P; Kimura, 1980) utilizando el software MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Tamura et al., 2007). Se generó una matriz de distancia a partir de la cual se construyó un árbol utilizando el algoritmo del vecino más cercano (Neighbor-joining; NJ). El soporte de los nodos de los árboles se obtuvo por medio de los valores de bootstrap (1 000 replicas; Felsenstein, 1985).

Análisis del Polimorfismo de la Longitud Fragmentos de Restricción (RFLPs)

Las amplificaciones del gen *Cit b* (1149 pb) se digirieron con dos enzimas de restricción *HaeIII* (Mills et al., 2000) y *TaqI* (Paxinos et al., 1997). La digestión para cada enzima se realizó por separado en un volumen de 20 µl de reacción con los siguientes reactivos: 8 µl producto de PCR, 2 µl del buffer de la enzima de restricción, 0.2 µl de enzima y 9.8 µl de H₂O. Para digestión la reacción se incubó en baño María a 37 °C por una hora para la enzima *HaeIII* y a 65 °C para la enzima *Taq I*. La inactivación de las dos enzimas se hizo a 80 °C por 20 minutos. El producto de la digestión fue observado por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio. Para confirmar que los patrones de restricción obtenidos en este análisis fueran los correctos, se compararon con los predichos por el software NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003). Para efectuar esto, a partir de los productos de PCR además se generaron secuencias que fueron cortadas virtualmente en el software y cuyos fragmentos resultantes fueron comparados con los obtenidos en los RFLPs.

RESULTADOS

Colecta y acopio de muestras

Para este estudio se colectaron un total de 17 ejemplares del género *Didelphis* en el Distrito Federal y en los estados Guerrero, México, Sinaloa y Veracruz. Asimismo, se obtuvieron 2 muestras de oreja en el Distrito Federal y 1 en Nuevo León (Apéndice I). Asimismo, se obtuvieron en préstamo permanente tejidos congelados del Distrito Federal y de los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Yucatán en México y Oregon en E. U. A. (Apéndice II). Finalmente, se obtuvieron 41 muestras de 22 localidades, de las cuales 9 se encuentran distribuidas dentro del área de simpatría y 12 fuera de ésta (Fig. 13).

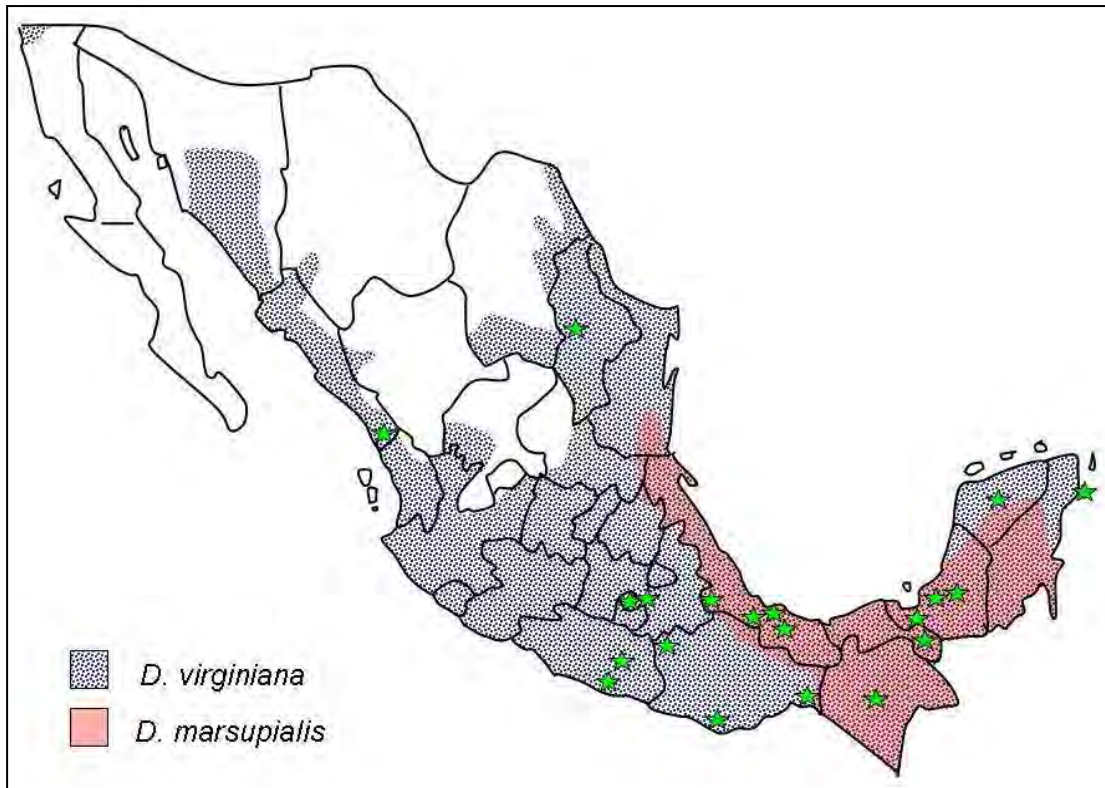


Figura 13. Localidades de colecta para muestras y ejemplares de las especies de tlacuaches *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis* (★).

Las localidades que se encuentran dentro del área de simpatría son: Peñuela, Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Catemaco y Tlacotalpan, Veracruz; Reserva Ecológica Huitepec,

Chiapas; Ruina Acalán, Tabasco; Canderaria, Constitución y Escárcega, Campeche; Mérida, Yucatán; y Cozumel, Quintana Roo. Mientras que las localidades fuera de ésta son: Oregon, E. U. A; Escuinapa, Sinaloa; Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) y Bosque de Tlalpan, Distrito Federal; Parque Nacional Izta-Popo, Estado de México; Yetla y Omiltemi, Guerrero; y Cosoltepec, Mixtepec y Montecillo Santa Cruz, Oaxaca.

Sección I. Identificación morfológica

Determinación a nivel específico

La identificación a nivel específico de los ejemplares colectados en este trabajo se hizo utilizando una combinación de las características externas y craneales convencionales, ya que no se pudo identificar correctamente a todos los ejemplares utilizando esta información por separado debido a que el número de individuos asignados a cada especie variaba de acuerdo al carácter que se estaba utilizando (Cuadro 6; Apéndice VI). Todos los caracteres morfológicos analizados presentaron una gran variación intraespecífica y solapamiento entre *D. virginiana* y *D. marsupialis*, lo que provocó que la detección de las características documentadas en la literatura para cada especie fueran difíciles de distinguir. Además, los cráneos de dos ejemplares estaban dañados, por lo tanto, éstos no se pudieron identificar usando los caracteres craneales.

Cuadro 6. Identidad taxonómica de los ejemplares colectados en este trabajo utilizando las características morfológicas convencionales por separado.

Carácter	<i>Didelphis virginiana</i>	<i>Didelphis marsupialis</i>
1. Coloración del cachete	10	7
2. Distribución del pelo de guardia	6	11
3. Longitud de la cola con respecto a la longitud cabeza y el cuerpo	12	5

4. Porcentaje de color negro en la cola	13	4
5. Posición de la sutura máxilo-frontal con respecto a los huesos nasal y lacrimal	11	4
6. Forma de los huesos nasales	12	3
7. Forma de la extensión posterior del hueso lacrimal	8	7
8. Extensión dorsal del palatino	12	3

Tras examinar cuidadosamente todos los ejemplares colectados, 13 fueron asignados a la especie *Didelphis virginiana* y 4 a la especie *D. marsupialis*. Las localidades con registro para *D. virginiana* fueron: Escuinapa, Sinaloa; Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA), Distrito Federal; Parque Nacional Izta-Popo, Estado de México; Tlacotalpan, Veracruz; y Yetla, Guerrero. Mientras que las localidades para *D. marsupialis* fueron: Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” y Peñuela, Veracruz.

Características externas y craneales de *D. marsupialis*

La coloración del cachete en los ejemplares de la especie *D. marsupialis* varió de amarillo pálido a naranja (Fig. 14); el pelo de guardia se concentró sobre la línea media ó tendió a estar repartido en todo el dorso concentrándose sobre la línea media (Fig. 15); la longitud de la cola con respecto a la longitud de la cabeza y el cuerpo varió de 96.6 al 118.9 %; el porcentaje de la cola de color negro varió de 22.1 a 26.5 %; la sutura máximo-frontal es anterior al hueso lacrimal ó estuvo alineada tanto con el hueso nasal como con el lacrimal (Fig. 16); los huesos nasales eran: delgados y terminaban en un ángulo agudo ó anchos y terminaban en un ángulo agudo (Fig. 17); la extensión posterior del hueso lacrimal tuvo la forma de una línea recta (Fig. 18); y la extensión dorsal del hueso palatino varió de delgada a gruesa (Fig. 19).



Figura 14. Coloración del cachete en *Didelphis marsupialis*: a) Hembra colectada en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz mostrando con el cachete en color naranja (CNMA 45109); b) Macho colectado en la misma localidad mostrando el cachete de color amarillo pálido (CNMA 45110; fotografías: J. Arcangeli).



Figura 15. Distribución del pelo de guardia en *Didelphis marsupialis*: a) Hembra colectada en Peñuela, Veracruz mostrando el pelo de guardia concentrado sobre la línea media (CNMA 45112); b) Hembra colectada en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz con pelo de guardia repartido en todo el dorso con una tendencia a concentrarse sobre la línea media (CNMA 45109; fotografías: J. Arcangeli).

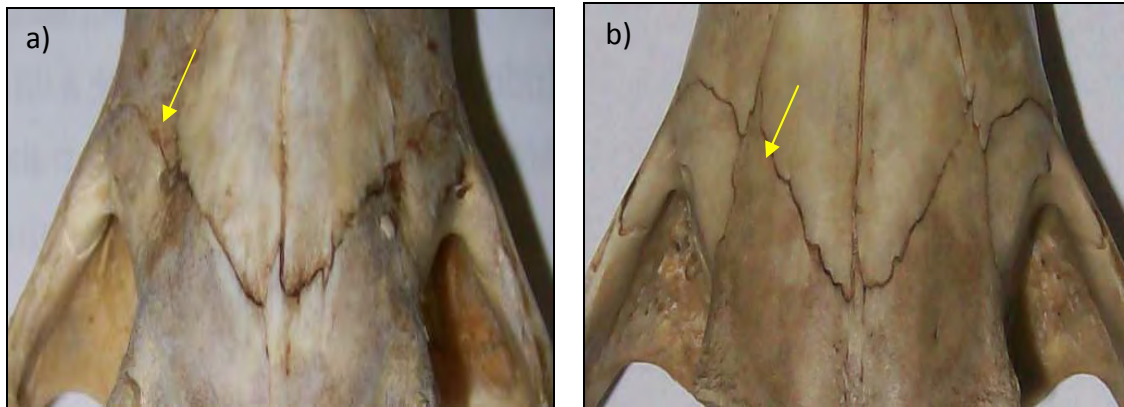


Figura 16. Posición de la sutura maxilo-frontal en *Didelphis marsupialis*: a) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en Peñuela, Veracruz con la sutura máxilo-frontal anterior al hueso lacrimal (señalado con una flecha amarilla; CNMA 45112); b) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz con la sutura maxilo-frontal alineada con los huesos nasal y lacrimal (CNMA 45110; señalado con una flecha amarilla; fotografías: J. Arcangeli).

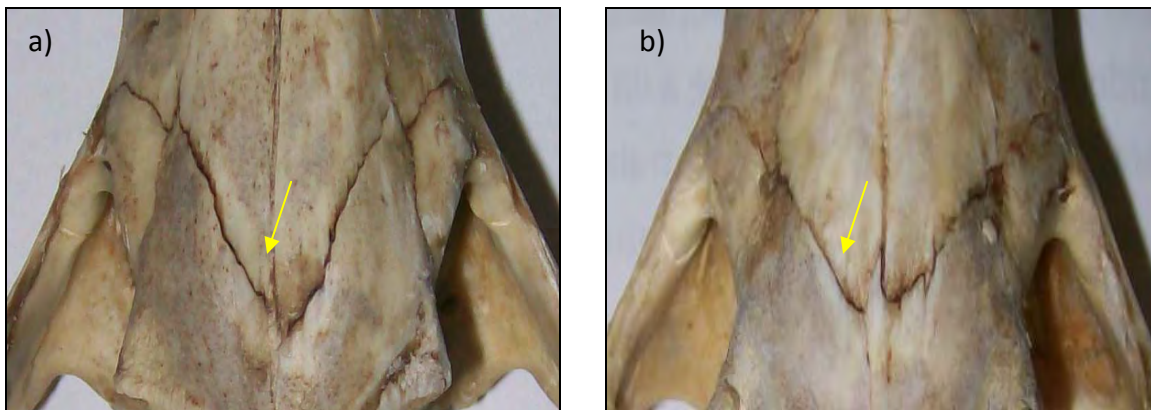


Figura 17. Huesos nasales en *Didelphis marsupialis*: a) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz, mostrando los huesos nasales delgados y terminando en un ángulo agudo (señalado con una flecha amarilla; CNMA 45109); b) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en la misma localidad mostrando los huesos nasales anchos y terminando en un ángulo agudo (señalado con una flecha amarilla; CNMA 45110; fotografías: J. Arcangeli).

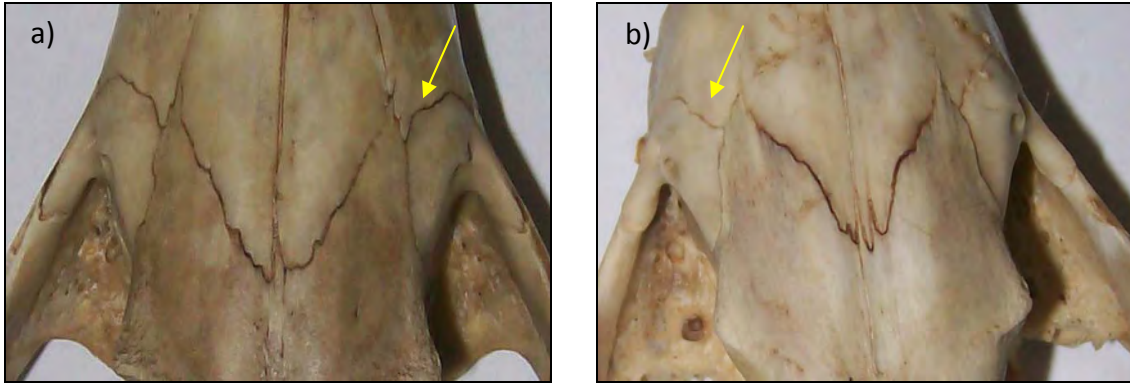


Figura 18. Forma de la extensión posterior del hueso lacrimal en *Didelphis marsupialis*: a) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en Peñuela, Veracruz (CNMA 45112); b) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz; los dos ejemplares muestran la extensión posterior del hueso lacrimal en forma de una línea recta (señalado con una flecha amarilla; CNMA 45109; fotografías: J. Arcangeli).

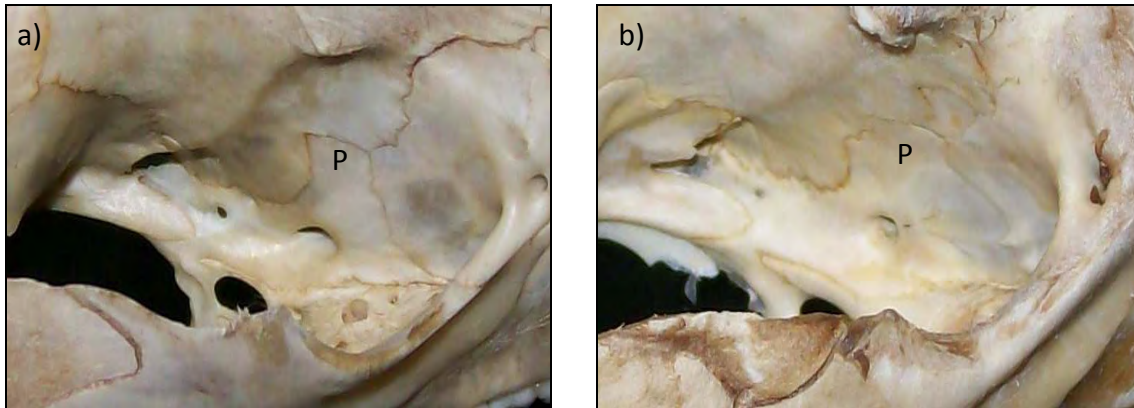


Figura 19. Extensión dorsal del hueso palatino en *Didelphis marsupialis*: a) Vista lateral de la región orbital de un cráneo de tlacuache colectado en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz donde se muestra la extensión dorsal del hueso palatino delgada (CNMA 45109); b) Vista lateral de la región orbital de un cráneo de tlacuache colectado en la misma localidad mostrando la extensión dorsal del palatino gruesa (CNMA 45110; fotografías: J. Arcangeli). P = palatino.

Características externas y craneales de *Didelphis virginiana*

La coloración del cachete en los ejemplares de la especie *D. virginiana* varió de blanco a amarillo pálido (Fig. 20); el pelo de guardia se encontró distribuido en todo el dorso, sobre la línea ó en todo el dorso con una tendencia a estar concentrarlo sobre ésta (Fig. 21); la longitud de la cola con respecto a la longitud de la cabeza y el cuerpo varió del 64.6 al 93.3 %; el porcentaje de color negro en la cola varió del 23 al 58 %; la sutura maxilo-frontal estuvo alineada con los huesos nasal y lacrimal ó fue anterior al hueso lacrimal (Fig. 22); los huesos nasales fueron: anchos terminando en un ángulo redondeado, anchos terminando en un ángulo agudo ó delgados terminando en un ángulo agudo (Figs. 23 y 24); la forma de la extensión posterior del hueso lacrimal varió de una línea curva a una línea recta (Fig. 25); y la extensión dorsal del hueso palatino fue gruesa (Fig. 26).

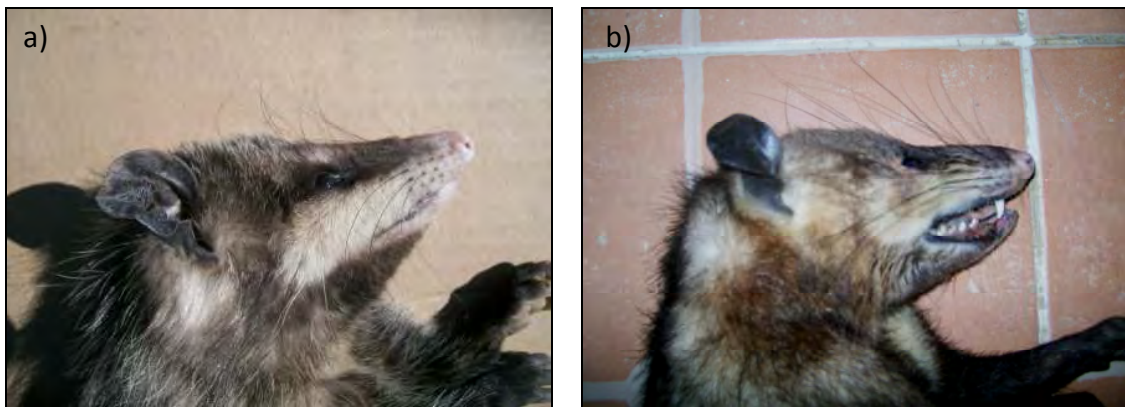


Figura 20. Coloración del cachete en *Didelphis virginiana*: a) Hembra colectada en el Parque Nacional Izta-Popo, Estado de México mostrando el cachete en color blanco (CNMA 45119); b) Macho colectado en Coyuca de Benítez, Guerrero mostrando el cachete en color amarillo pálido (CNMA 45117; fotografías: J. Arcangeli).



Figura 21. Distribución del pelo de guardia en *Didelphis virginiana*: a) Hembra colectada en el Parque Nacional Izta-Popo, Estado de México mostrando el pelo de guardia repartido en todo el dorso (CNMA 45119); b) Macho colectado en Tlacotalpan, Veracruz con el pelo de guardia en todo el dorso con una tendencia a concentrarse sobre la línea media (CNMA 45123); c) Macho colectado en Coyuca de Benítez, Guerrero con el pelo de guardia sobre la línea media (CNMA 45117; fotografías: J. Arcangeli).

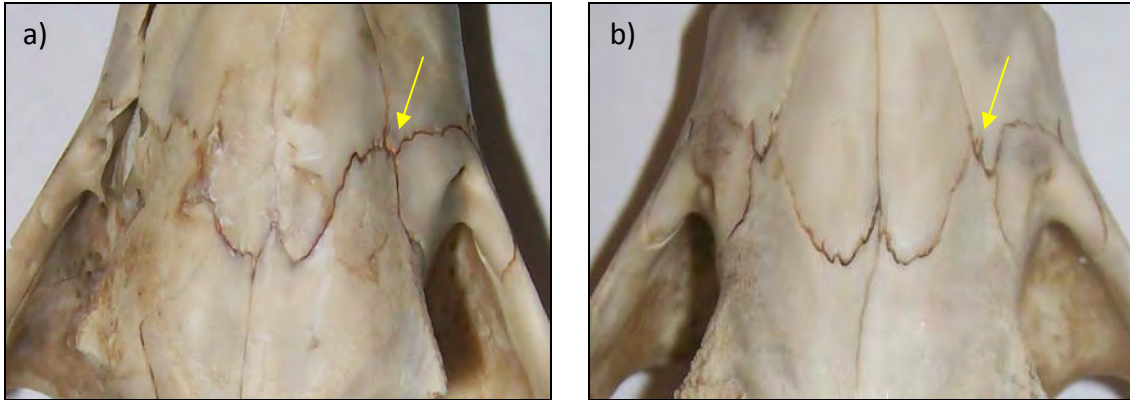


Figura 22. Posición de la sutura maxilo-frontal en *Didelphis virginiana*: a) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en la Reserva del Pedregal de San Ángel, Distrito Federal con la sutura maxilo-frontal alineada con los huesos nasal y lacrimal (señalado con flecha amarilla; CNMA 45116); b) Vista dorsal otro cráneo de la misma localidad con la sutura maxilo-frontal anterior al hueso lacrimal (señalado con flecha amarilla; CNMA 45114; fotografías: J. Arcangeli).

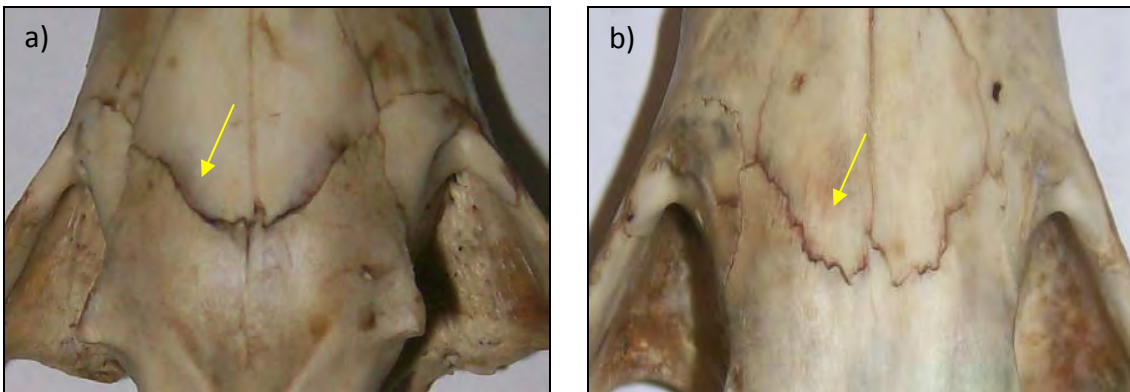


Figura 23. Huesos nasales en *Didelphis virginiana*: a) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en el Parque Nacional Izta-Popo, Estado de México mostrando los huesos nasales anchos y terminando en un ángulo redondeado (señalado con una flecha amarilla; CNMA 45119); b) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en Tlacotalpan, Veracruz mostrando los huesos nasales anchos con el extremo posterior semiredondeado (señalado con una flecha amarilla; CNMA 45123; fotografías: J. Arcangeli).

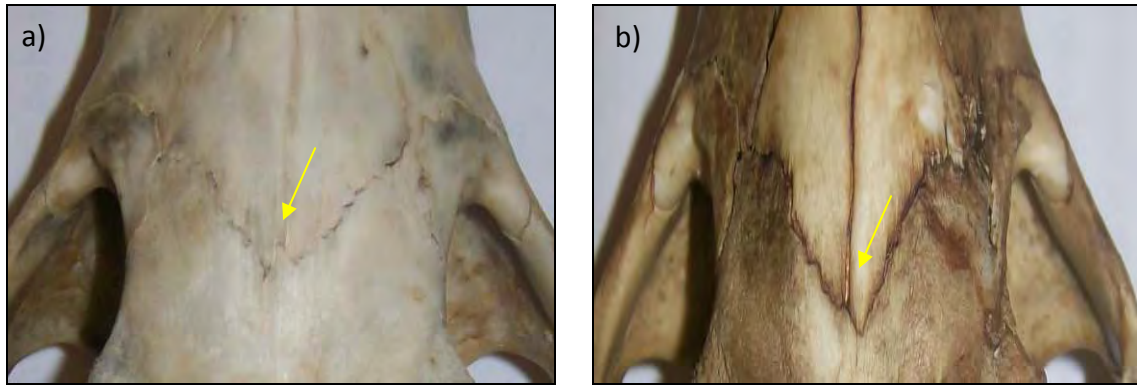


Figura 24. Variación intraespecífica de la forma de los huesos nasales en *Didelphis virginiana*: a) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en Tlacotalpan, Veracruz mostrando los huesos nasales anchos y terminando en un ángulo agudo (señalado con una flecha amarilla; CNMA 45125); b) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en la misma localidad mostrando los huesos nasales delgados y terminando en un ángulo agudo (señalado con una flecha amarilla; CNMA 45127; fotografías: J. Arcangeli).

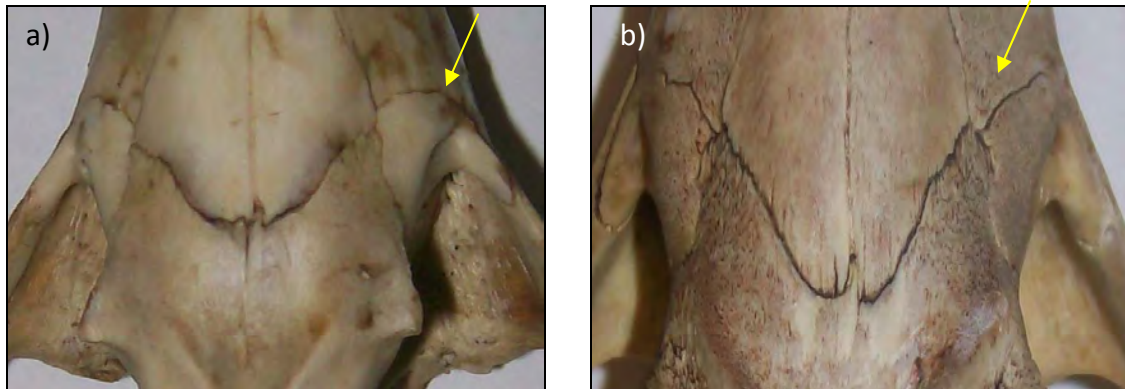


Figura 25. Forma de la extensión posterior del hueso lacrimal en *Didelphis virginiana*: a) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en el Parque Nacional Izta-Popo, Estado de México, mostrando la extensión posterior del hueso lacrimal en forma de una línea curva (señalado con una flecha amarilla; CNMA 45119); b) Vista dorsal de un cráneo de tlacuache colectado en Coyuca de Benitez, Guerrero que muestra la extensión posterior del hueso lacrimal como una línea recta (señalado con una flecha amarilla; CNMA 45117; fotografías: J. Arcangeli).

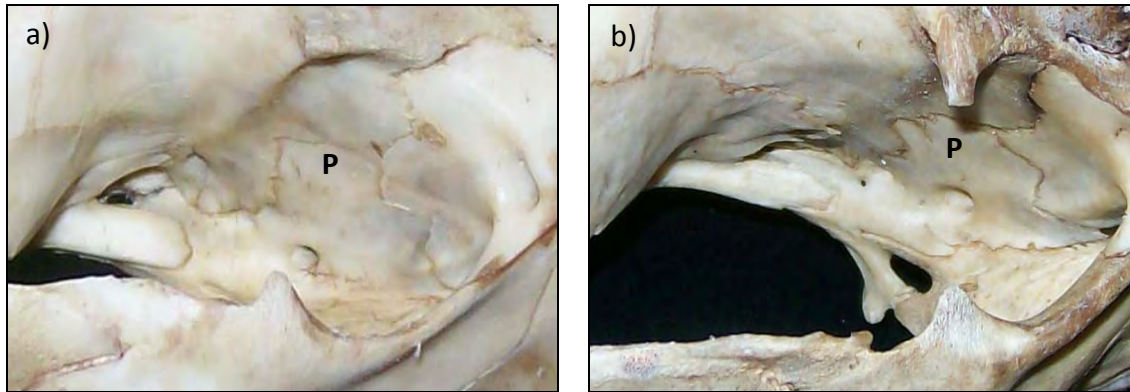


Figura 26. Extensión dorsal del hueso palatino en *Didelphis virginiana*: a) Vista lateral de la región orbital de un cráneo de tlacuache colectado en el Parque Nacional Izta-Popo, Estado de México donde se muestra la extensión dorsal del hueso palatino gruesa (CNMA 45119); b) Vista lateral de la región orbital de un cráneo de tlacuache colectado en Tlacotalpan, Veracruz mostrando la misma extensión un poco más gruesa (CNMA 45124; fotografías: J. Arcangeli). P = palatino.

Sección II. Análisis de restricción

El análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción se hizo utilizando un total de 44 muestras, 41 del género *Didelphis* que de acuerdo con criterios morfológicos 16 correspondían a *D. marsupialis* y 25 a *D. virginiana*; y 3 del tlacuache cuatro ojos (*Philander oposum*) integrante del grupo hermano del género *Didelphis*. El análisis consistió en la digestión de productos de PCR de una longitud de 1149 pb del gen *Cit b* con dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *TaqI*, New England Labs).

De acuerdo con el software NEBcutter V2.0, la enzima *HaeIII* debía reconocer la secuencia blanco GGCC y cortarla simétricamente en las dos hebras de la cadena de ADN, entre la guanina y citosina (GG $\overline{\text{C}}$ CC), mientras que la enzima *TaqI* debía reconocer la secuencia TCGA y cortarla asimétricamente, en una hebra entre la timina y la citosina y en la otra entre la guanina y la adenina (T $\overline{\text{C}}$ GA). Por otro lado, la enzima *HaeIII* debía cortar la secuencia del gen *Cit b* dos veces en *D. virginiana* y tres en *D. marsupialis*, mientras que la enzima *TaqI* debía reconocer su secuencia blanco una vez en cada especie pero en diferentes sitios del gen. Asimismo, la enzima

HaeIII debía cortar una vez en *Philander opossum*, mientras que la *TaqI* no debía reconocer su secuencia blanco en el gen (Cuadro 7).

Cuadro 7. Predicción del patrón de digestión del gen citocromo *b* con el software NEBcutter V2.0 utilizando las enzimas *HaeIII* y *TaqI* en tres especies de tlacuache; pb = pares de bases.

Enzima	Tamaño del fragmento (pb)		
	<i>Didelphis virginiana</i>	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>Philander opossum</i>
<i>HaeIII</i> (GG↓CC)	629 (1-69)	629 (1-69)	113 (1-113)
	423 (629-1052)	63 (630-692)	486 (114-629)
	97 (1053-1149)	360 (693-1052)	520 (630-1149)
		97 (1053-1149)	
<i>TaqI</i> (T↓CG.A)	528 (1-528)	951 (1-951)	1149 (1-1149)
	621 (529-1149)	198 (952-1149)	

Digestión con la enzima *HaeIII* en *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*

En *Didelphis virginiana*, la enzima *HaeIII* produjo un solo patrón de digestión para todas las muestras. Esta enzima reconoció la secuencia GG↓CC en dos sitios. De modo que al cortar en dichos sitios produjo un patrón de tres fragmentos que en el gel de agarosa se visualizó como tres bandas de diferente tamaño: 629, 423 y 97 pb. En contraste, en *D. marsupialis* se obtuvieron dos patrones, uno para las muestras de Tabasco y Campeche donde la enzima *HaeIII* produjo un patrón de dos fragmentos (629 y 520 pb); y otro para las de Veracruz y Chiapas de cuatro fragmentos (629, 360, 97 y 63 pb; Fig.27; Cuadro 8). En este último patrón, el fragmento más pequeño no se observa en el gel, sin embargo, la digestión de estas secuencias con el

software NEBcutter V2.0 confirma su existencia. Por otro lado, la muestra de Catemaco presenta un fragmento extra de 520 pb que no forma parte del patrón de digestión de *D. marsupialis* según el software. Todos los patrones de restricción obtenidos resultado de la digestión con la enzima *HaeIII* fueron verificados con sus secuencias correspondientes (Apéndice VII).

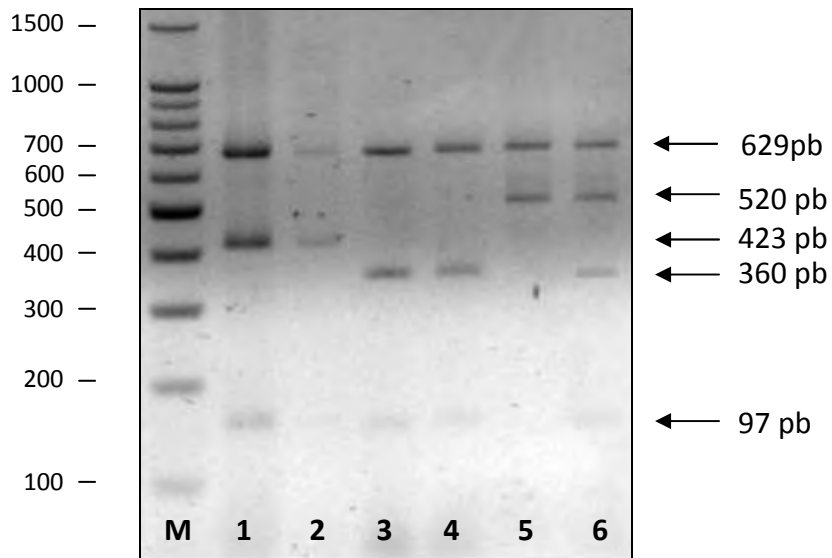


Figura 27. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio que muestra la digestión del gen citocromo *b* con la enzima *HaeIII* en ejemplares de *Didelphis virginiana*: Tlacotalpan (carril 1) y Constitución (carril 2) con tres bandas (628, 423 y 98 pb); y de *D. marsupialis*: Peñuela (carril 3), Huitepec (carril 4) y Catemaco (carril 6) con cuatro bandas (629, 360, 97 y 63 pb); Constitución (carril 5) con dos bandas (629, 520 pb). En los carriles 3, 4 y 6 el fragmento más pequeño no se observa en el gel y la muestra de Catemaco presenta una banda extra de 520 pb que no forma parte del patrón de digestión de la especie. M = Marcador de ADN de referencia de tamaño en incrementos de 100 pb.

En total 35 de las 41 muestras analizadas presentaron el patrón de digestión que predijo el software NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003), 29 el patrón de *D. virginiana* de tres fragmentos (629, 423 y 97 pb) y 6 el de *D. marsupialis* con cuatro fragmentos (629, 360, 97 y 63 pb); 6 muestras de *D. marsupialis* presentaron un patrón diferente al esperado (629 y 520 pb). Entre las muestras que presentaron el patrón de *D. virginiana* se encuentran: las dos muestras de Montecillo Santa Cruz, Oaxaca (ECO-SC-M 1847 y 1862; Apéndice II), una muestra Constitución,

Campeche (ASNHC Tejido 2589) y la muestra de Mérida, Yucatán (FMVZ-UADY, sin número) que habían sido identificadas morfológicamente como *D. marsupialis* en esas colecciones mastozoológicas.

Digestión con la enzima *HaeIII* en *Philander opossum*

En el tlacuache cuatro ojos (*Philander opossum*) la enzima *HaeIII* reconoció la secuencia blanco dos veces. El patrón de digestión resultante fue de tres fragmentos (530, 486 y 113 pb; Fig. 28). Este patrón coincide con el que predijo el software NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003).

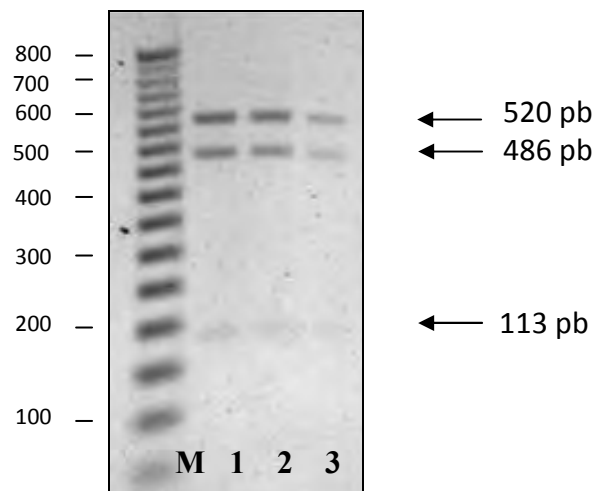


Figura 28. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra la digestión del gen citocromo *b* con la enzima *HaeIII* en 3 ejemplares de la especie *Philander opossum* colectados en San Andrés Tuxtla, Veracruz. M = Marcador de ADN de referencia de tamaño en incrementos de 50 pb.

Cuadro 8. Sitios de colecta y patrones de digestión con la enzima *Haelll* de 41 muestras del género *Didelphis*. Los patrones de digestión están dados en pares de bases.

Especie	País	Estado	Localidad	No. ejemplares	Patrón de digestión
<i>Didelphis virginiana</i>	E. U. A	Oregon		1	629, 423, 97
	México	Sinaloa	Escuinapa	3	629, 423, 97
		Distrito Federal	REPSA	5	
			Tlalpan	1	
		Estado de México	Izta-Popo	1	
		Guerrero	Omiltemi	1	
			Yetla	1	
		Oaxaca	Mixtepec	2	
			Cosoltepec	1	
			Montecillo Santa Cruz	2	
		Nuevo León	Monterrey	1	
		Campeche	Constitución	3	
		Yucatán	Mérida	1	
Quintana Roo	Cozumel	1			
Veracruz	Tlacotalpan	5			
<i>Didelphis marsupialis</i>	México	Chiapas	Huitepec	1	629, 360, 97, 63
		Veracruz	Tuxtlas	3	
			Peñuela	1	
			Catemaco	1	
		Tabasco	Ruinas Acalán	1	629, 520
		Campeche	Candelaria	2	
			Escárcega	2	
			Constitución	1	
Total				41	

Digestión con la enzima *TaqI* en *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*

En *Didelphis virginiana*, la enzima *TaqI* produjo dos patrones diferentes, uno para la muestra de Oregon, E. U. A. donde la enzima no reconoció la secuencia T[↓]CGA, por lo tanto el gen *Cit b* no es cortado y aparece completo (1149 pb); y otro para todas las muestras de México donde la enzima reconoció la secuencia blanco una vez produciendo dos fragmentos (621 y 528 pb); mientras que en *D. marsupialis* esta enzima produjo un solo patrón en todas las muestras; el patrón de digestión fue de dos fragmentos (951 y 198 pb; Fig. 29; Cuadro 9). Todos los patrones de restricción obtenidos resultado de la digestión con la enzima *TaqI* fueron verificados con sus secuencias correspondientes (Apéndice VII).

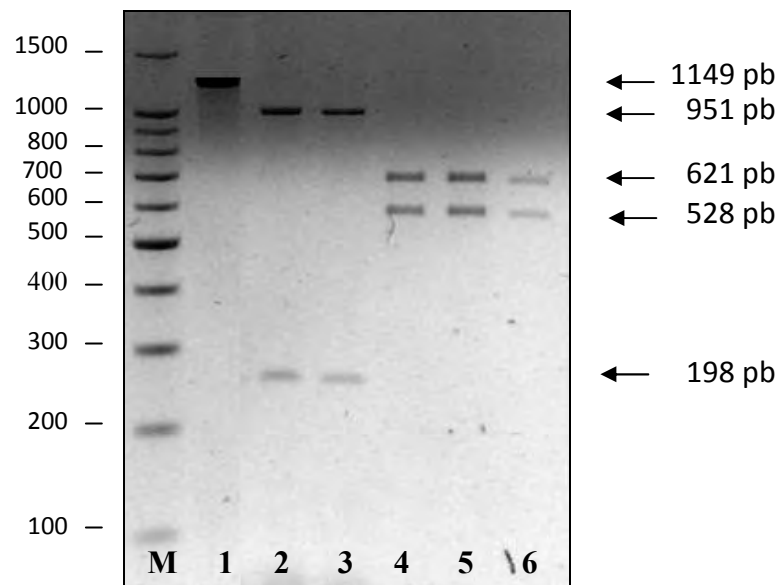


Figura 29. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio que muestra la digestión del gen citocromo *b* con la enzima *TaqI* en ejemplares de *Didelphis virginiana*: Oregon (carril 1) gen completo sin digerir, Tlacotalpan (carril 4), REPSA (carril 5) y Constitución (carril 6) con dos fragmentos (621 y 528 pb); y de *D. marsupialis*: Peñuela (carril 2) y Escárcega (carril 3) con dos fragmentos (951 y 198 pb). M = Marcador de ADN de referencia de tamaño en incrementos de 100 pb.

En total, 40 de las 41 muestra analizadas presentaron el patrón de digestión enzimático predicho por el software NEBcutter (Vincze et al., 2003), 28 el patrón de *D. virginiana* de dos fragmentos (621 y 528 pb), incluyendo las muestras de Montecillo Santa Cruz, Oaxaca; Constitución, Campeche; y Mérida, Yucatán (muestras en préstamo permanente de otras colecciones mastozoológicas). El resto de las muestras (12) presentaron el patrón esperado para *D. marsupialis* con dos fragmentos (951 y 198 pb). Sólo la muestra de Oregon presentó un patrón diferente al esperado con el gen completo (1149 pb).

Digestión con la enzima *TaqI* en *Philander opossum*

En el tlacuaches cuatro ojos (*Philander opossum*) la enzima *TaqI* no reconoció la secuencia blanco, por lo que el gen *Cit b* aparece completo (1149 pb; Fig. 30). Esto coincide con lo predicho por el software NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003).

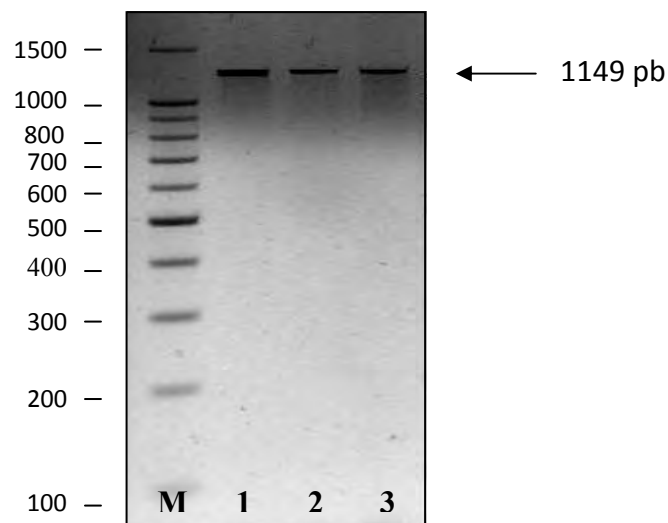


Figura 30. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra la digestión del gen citocromo *b* con la enzima *TaqI* en 3 ejemplares de la especie *Philander opossum* colectados en San Andrés Tuxtla, Veracruz. M = Marcador de ADN de referencia de tamaño en incrementos de 100 pb.

Cuadro 9. Sitios de colecta y patrones de digestión con la enzima *TaqI* de 41 muestras del género *Didelphis*. Los patrones de digestión están dados en pares de bases.

Especie	País	Estado	Localidad	No. Ejemplares	Patrón de digestión
<i>Didelphis virginiana</i>	E. U. A	Oregon		1	1149
	México	Sinaloa	Escuinapa	3	621, 528
		Distrito Federal	REPSA	5	
			Tlalpan	1	
		Estado de México	Izta-Popo	1	
		Guerrero	Omiltemi	1	
			Yetla	1	
		Oaxaca	Mixtepec	2	
			Cosoltepec	1	
			Montecillo Santa Cruz	2	
		Nuevo León	Monterrey	1	
		Campeche	Constitución	3	
		Yucatán	Mérida	1	
Quintana Roo	Cozumel	1			
Veracruz	Tlacotalpan	5			
<i>Didelphis marsupialis</i>	México	Chiapas	Huitepec	1	951, 198
		Veracruz	Tuxtlas	3	
			Peñuela	1	
			Catemaco	1	
	Tabasco	Ruinas Acalán	1		
	Campeche	Candelaria	2		
		Escárcega	2		
		Constitución	1		
Total				41	

Sección III. Análisis Filogenético

Citocromo *b* (Cit *b*)

El gen Cit *b* fue secuenciado para 44 muestras, 41 del género *Didelphis* (tentativamente 25 pertenecían a la especie *Didelphis virginiana* y 16 a la especie *D. marsupialis*) y 3 del género *Philander*. El análisis filogenético incluyó un total de 48 secuencias, 44 generadas en este estudio y 4 tomadas de la base de datos Genbank (Apéndice V).

Se identificaron seis haplotipos para *D. virginiana*, cinco para *D. marsupialis* y 2 para *P. opossum*. Ningún haplotipo se encontró repetido en más de una especie. El primer haplotipo para *D. virginiana* se registró para Oregon y California, E. U. A., mientras que los otros cinco se encontraron en localidades de México: el primero en Escuinapa, Sinaloa; el segundo en Tlacotalpan, Veracruz; el tercero se encuentra en: Izta-Popo, Estado de México, REPSA y Pedregal de Tlalpan, Distrito Federal, Yetla y Omiltemi, Guerrero y Cosoltepec, Montecillo Santa Cruz y Mixtepec, Oaxaca; el cuarto en Mérida, Yucatán y Cozumel, Quintana Roo; el quinto en Constitución, Campeche; y el sexto en Monterrey, Nuevo León. Por otro lado, un haplotipo de *D. marsupialis* se encuentra en Acre, Brasil y el resto (tres) en México: el primero en los Tuxtlas, Veracruz; el segundo en Peñuela y Catemaco, Veracruz; el tercero en Huitepec, Chiapas; y el cuarto en Ruinas Acalán, Tabasco y Constitución, Candelaria y Escárcega en Campeche. Finalmente, los dos haplotipos registrados para *P. opossum* son de la región de los Tuxtlas, Veracruz.

Análisis de Máxima Parsimonia

El análisis incluyó 1139 pb debido a que el gen Cit *b* no fue secuenciado en su totalidad para todas las muestras. De este total 802 fueron sitios constantes, 111 fueron sitios variables no informativos y 226 fueron sitios filogenéticamente informativos. El promedio de las frecuencias de los nucleótidos para este grupo de secuencias fue: 32.1 %

adenina, 25.1 % citosina, 12.1 % guanina y 30.5 % timina. En ninguna secuencia se encontraron inserciones, deleciones o codones de paro.

Se realizó una búsqueda heurística que arrojó 4 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 545 pasos, índice de consistencia de 0.6442, índice de retención de 0.9279, índice reescalado 0.6674 e índice de homoplasia de 0.3558. El árbol consenso de estos 4 árboles mostró que *D. virginiana* es el grupo hermano del clado constituido por *D. marsupialis* y *D. albiventris*. De los 226 sitios filogenéticamente informativos incluidos en este análisis, 40 constituyeron sinapomorfías que diferenciaron el clado de *D. virginiana*, 31 transiciones y 9 transversiones; 36 fueron sinapomorfías para el clado formado por *D. albiventris* y *D. marsupialis*, 29 transiciones y 7 transversiones; y 20 para el clado de *D. marsupialis*, 17 transiciones y 3 transversiones (Fig. 31; Apéndice VIII). Las sinapomorfías que diferenciaron estos clados se encontraron distribuidas de la siguiente manera: para el clado de *D. virginiana*, 20 en la primera mitad del gen y 20 en la segunda; para el clado conformado por *D. marsupialis* y *D. albiventris*, 20 en la primera mitad y 16 en la segunda; mientras que para el clado de *D. marsupialis*, 7 en la primera mitad y 13 en la segunda.

El clado de *D. virginiana* esta formado por la muestras de Escuinapa, Tlacotalpan, Izta-Popo, REPSA, Yetla, Cosoltepec, Montecillo Santa Cruz, Omiltemi, Mixtepec, Tlalpan, Monterrey, Mérida, Cozumel, Constitución, California y Oregon, mientras que el clado de *D. marsupialis* incluye las muestras de Tuxtlas, Peñuela, Catemaco, Huitepec, Ruinas Acalán, Escárcega, Candelaria, Constitución y Acre. En este árbol, los grupos externos *Philander opossum* y *Metachirus nudicaudatus* se encuentran ubicados fuera del clado del género *Didelphis*. La prueba de bootstrap arrojó el mismo árbol con valores altos en los dos clados principales, 100 para las muestras de *D. virginiana* y 98 para las de *D. marsupialis* (Fig. 31).

El clado de *D. virginiana* está conformado por cuatro subclados, el primero agrupa las muestras de Oregon y California; el segundo agrupa las muestras de Cozumel, Mérida y Constitución (2-4); el tercero esta formado por la muestra de Monterrey; el cuarto grupo está dividido en tres subclados: el primero agrupa las muestras de Escuinapa (1-3); el

segundo las de Tlacotalpan (1-5); y el tercero las muestras de Izta-Popo, REPSA (1-5), Yetla, Cosoltepec, Montecillo Santa Cruz (1-2), Omiltemi, Mixtepec (1-2) y Tlalpan. Este clado incluye 4 muestras (Mérida, Constitución 2 y Montecillo San Cruz (1-2) que fueron identificadas originalmente como *D. marsupialis*. Asimismo, el clado de *D. marsupialis* esta dividido en dos subclados, el primer subclado incluye dos subgrupos más la muestra de Huitepec; el primer subgrupo esta formado por las muestras de los Tuxtlas (1-3) y el segundo por las de Catemaco y Peñuela. El segundo subclado agrupa las muestras de Candelaria (1-2), Ruinas Acalan y Constitución 1. Externamente aparecen la muestra de Acre y la de *D. albiventris*.

Análisis de Máxima Verosimilitud

El modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustó a los datos de secuencias fue el de Tamura-Nei + gama (TrN + G) basado en el modelo propuesto por Tamura y Nei (1993), que toma en cuenta: exceso de transiciones, frecuencias desiguales de los nucleótidos y diferentes tasas de substitución entre éstos. El análisis de MV generó un árbol idéntico al de MP (Fig. 32). Este árbol agrupa en un clado a todas las muestras de *D. virginiana*, incluyendo las muestras de Mérida, Constitución 2 y Montecillo San Cruz (1-2), y en otro las muestras de *D. marsupialis* más una secuencia de *D. albiventris*. El largo de las ramas presente entre las muestras de cada especie demuestra que hay pocas diferencias en las secuencias. Sin embargo, el largo de las ramas presente entre el clado de *D. virginiana* y el de *D. marsupialis* es muy grande lo que indica que existe que existe una alta tasa de mutación. Por lo tanto, las muestras al interior de cada especie están más relacionadas entre sí que cada una de ellas con las de la otra especie. La prueba de bootstrap mantiene la misma topología con valores altos, 100 para *D. virginiana* y 99 para *D. marsupialis* (Fig. 32).

Análisis de Distancias

Se obtuvieron los porcentajes de divergencia genética entre las muestras del género *Didelphis*, entre las muestras de una misma especie y con respecto a *Philander opossum* y *Metachirus nudicaudatus* bajo el modelo de sustitución de nucleótidos K2P (Kimura, 1980; Cuadro 10). Los valores de divergencia genética fueron de 10.3-11.8 % entre *D. virginiana* y *D. marsupialis*; de 11.2 a 11.6 % entre *D. virginiana* y *D. albiventris*; de 6.1 a 7.4 % entre *D. marsupialis* y *D. albiventris*; de 14.2 a 14.9 % entre *D. marsupialis* y *P. opossum*; de 14.3 a 14.7 % entre *D. virginiana* y *P. opossum*; de 23.5 a 23.9 % entre *D. marsupialis* y *M. nudicaudatus*; de 22.3 a 22.8 % entre *D. virginiana* y *M. nudicaudatus*; de 0.0 a 4.2 % entre muestras de *D. marsupialis*; y de 0.0 a 4.0 % entre muestras de *D. virginiana*.

A partir de los valores de divergencia genética se generó un árbol de NJ. Este árbol mantiene los dos clados principales, sin embargo, presenta dos cambios con respecto a los árboles de MP y MV: 1) la muestra de Huitepec es expulsada del clado conformado por las muestras de Tuxtlas, Catemaco y Peñuela; y 2) la muestra de Acre se integra al clado formado por las muestras Ruinas Acalán, Escárcega, Candelaria y Constitución. El largo de las ramas presente entre las muestras al interior de cada especie es muy corto, lo que demuestra que las secuencias son muy similares. Mientras que el largo de las ramas encontrado entre las muestras de *D. virginiana* y *D. marsupialis* es muy grande lo que indica un grado de divergencia significativa entre estos grupos (Fig. 33). La prueba de bootstrap arrojó el mismo árbol con un soporte de 99 para el clado de *D. virginiana* y 97 para el de *D. marsupialis* (Fig. 33).

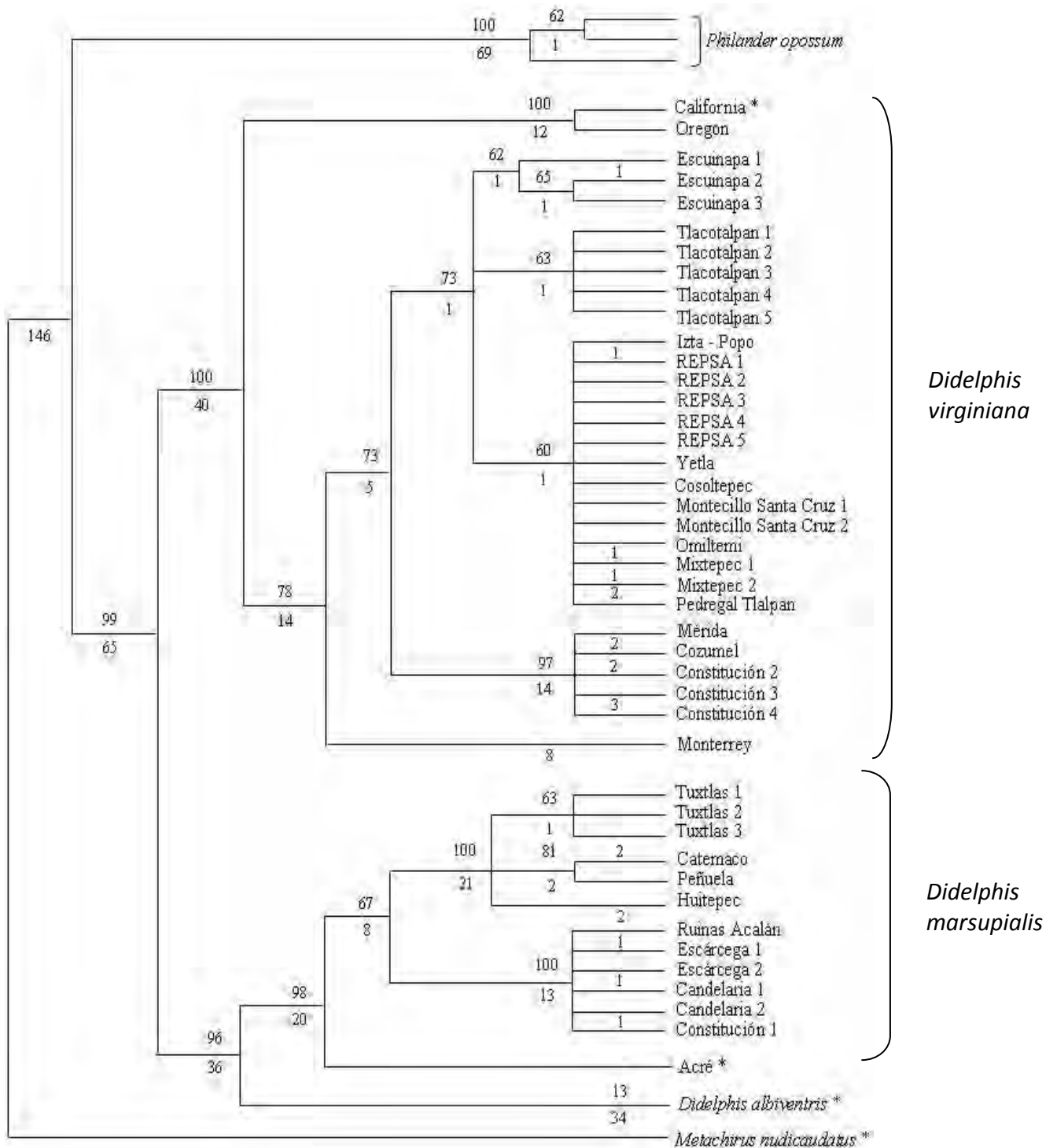


Figura 31. Árbol de consenso estricto generado a partir de los 4 árboles más parsimoniosos para muestras del género *Didelphis* utilizando secuencias de 1139 pb del gen citocromo *b*. Longitud = 545 pasos, índice de consistencia = 0.6442, índice de retención = 0.9279, índice reescalado = 0.6674 e índice de homoplasia = 0.3558. Los números arriba y abajo de las ramas corresponden a los valores de bootstrap y al número de cambios respectivamente. *Secuencias tomadas de Genbank.

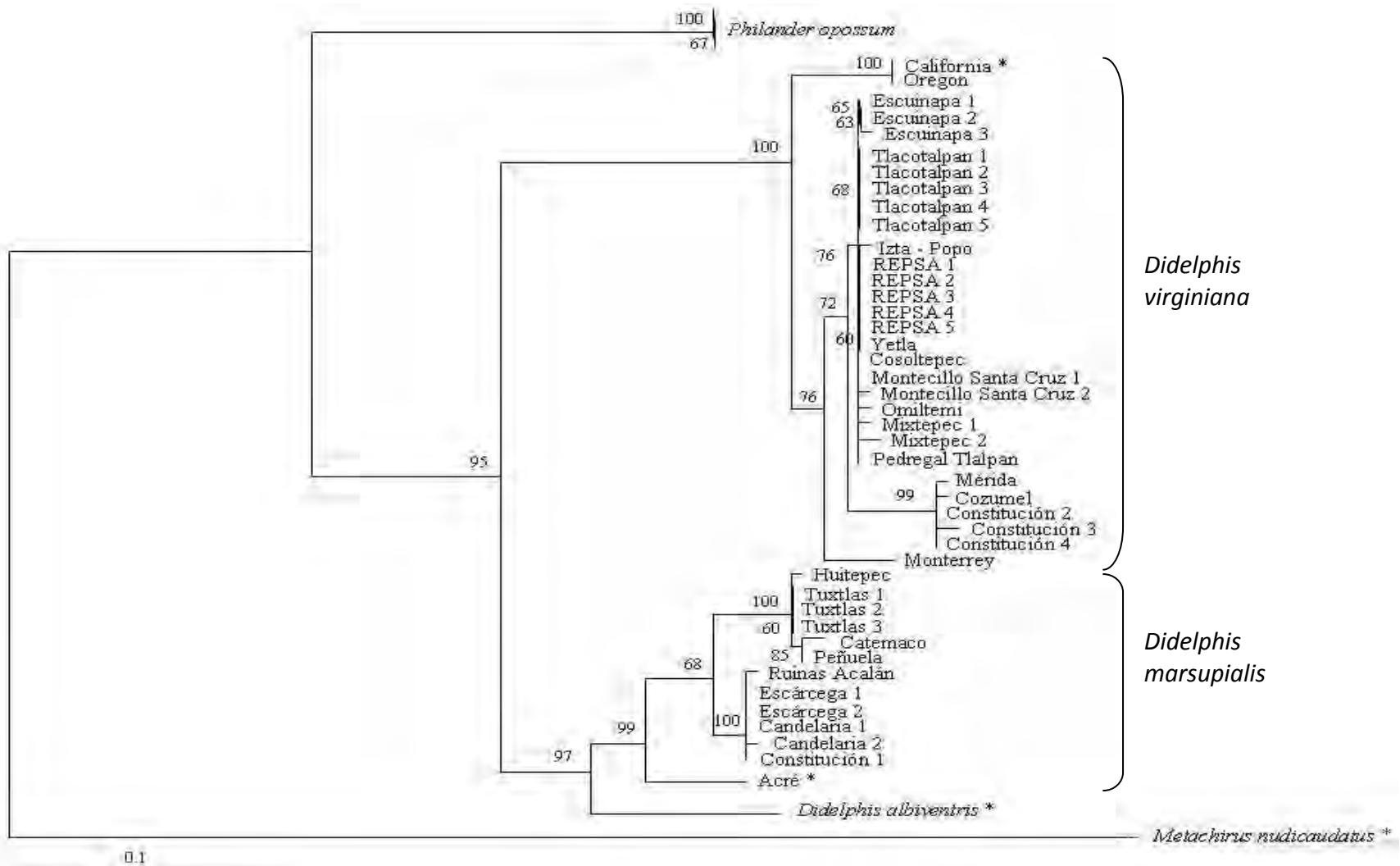


Figura 32. Árbol de máxima verosimilitud ($-\ln = 4209.59580$) construido con el modelo Tamura + Nei (TrN + G) para muestras del género *Didelphis* utilizando secuencias de 1139 pb del gen citocromo *b*. Los números cercanos a los nodos corresponden a los valores de bootstrap. * Secuencias tomadas de Genbank.

Cuadro 10. Matriz de distancias construida con secuencias del gen citocromo *b* (1139 pb) para los tlacuaches *Metachirus nudicaudatus*, *Philander opossum*, *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *D. albiventris*, bajo el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>M. nudicaudatus</i>	-														
2 <i>P. opossum</i>	0.213	-													
3 California	0.228	0.146	-												
4 Oregon	0.228	0.146	0.000	-											
5 Escuinapa	0.227	0.144	0.029	0.029	-										
6 Tlacotalpan	0.226	0.146	0.027	0.027	0.002	-									
7 Izta-Popo	0.226	0.143	0.030	0.030	0.003	0.003	-								
8 REPSA	0.227	0.144	0.029	0.029	0.002	0.002	0.001	-							
9 Yetla	0.227	0.144	0.029	0.029	0.002	0.002	0.001	0.000	-						
10 Cosoltepec	0.227	0.144	0.029	0.029	0.002	0.002	0.001	0.000	0.000	-					
11 Montecillo	0.227	0.144	0.029	0.029	0.002	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	-				
12 Mixtepec	0.228	0.145	0.030	0.030	0.003	0.003	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	-			
13 Omiltemi	0.228	0.145	0.030	0.030	0.003	0.003	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	-		
14 Tlalpan	0.227	0.144	0.029	0.029	0.002	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	-	
15 Monterrey	0.228	0.147	0.030	0.030	0.013	0.013	0.014	0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014	0.013	-

Cuadro 10. (Continuación). Matriz de distancias construida con secuencias del gen citocromo *b* (1139 pb) para los tlacuaches *Metachirus nudicaudatus*, *Philander opossum*, *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *D. albiventris*, bajo el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
16 Cozumel	0.223	0.146	0.040	0.040	0.016	0.016	0.017	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017	0.017	0.016	0.026
17 Constitución (<i>D. virginiana</i>)	0.223	0.146	0.038	0.038	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.015	0.015	0.014	0.024
18 Mérida	0.226	0.146	0.038	0.038	0.016	0.016	0.017	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017	0.017	0.016	0.026
19 Tuxtlas	0.238	0.145	0.104	0.104	0.111	0.111	0.112	0.111	0.111	0.111	0.111	0.112	0.112	0.111	0.108
20 Catemaco	0.239	0.149	0.107	0.107	0.115	0.115	0.116	0.115	0.115	0.115	0.115	0.116	0.116	0.115	0.111
21 Peñuela	0.236	0.146	0.105	0.105	0.112	0.112	0.114	0.112	0.112	0.112	0.112	0.114	0.114	0.112	0.109
22 Huitepec	0.236	0.142	0.103	0.103	0.110	0.110	0.111	0.110	0.110	0.110	0.110	0.111	0.111	0.110	0.107
23 Acre	0.235	0.147	0.106	0.106	0.112	0.112	0.111	0.110	0.110	0.110	0.110	0.111	0.111	0.110	0.111
24 Ruinas Acalán	0.236	0.148	0.110	0.110	0.118	0.118	0.117	0.116	0.116	0.116	0.116	0.117	0.117	0.116	0.114
25 Escárcega	0.235	0.147	0.109	0.109	0.117	0.117	0.116	0.115	0.115	0.115	0.115	0.116	0.116	0.115	0.113
26 Candelaria	0.235	0.147	0.109	0.109	0.117	0.117	0.116	0.115	0.115	0.115	0.115	0.116	0.116	0.115	0.113
27 Constitución (<i>D. marsupialis</i>)	0.235	0.147	0.109	0.109	0.117	0.117	0.116	0.115	0.115	0.115	0.115	0.116	0.116	0.115	0.113
28 <i>D. albiventris</i>	0.241	0.142	0.115	0.115	0.116	0.116	0.115	0.114	0.114	0.114	0.114	0.115	0.115	0.114	0.114

Cuadro 10 (Continuación). Matriz de distancias construida con secuencias del gen citocromo *b* (1139 pb) para los tlacuaches *Metachirus nudicaudatus*, *Philander opossum*, *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *D. albiventris*, bajo el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980).

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
16 Cozumel	-												
17 Constitución (<i>D. virginiana</i>)	0.002	-											
18 Mérida	0.004	0.002	-										
19 Tuxtlas	0.109	0.107	0.107	-									
20 Catemaco	0.112	0.110	0.110	0.004	-								
21 Peñuela	0.110	0.108	0.108	0.003	0.002	-							
22 Huitepec	0.108	0.106	0.106	0.003	0.005	0.004	-						
23 Acre	0.109	0.109	0.109	0.039	0.042	0.040	0.040	-					
24 Ruinas Acalán	0.107	0.107	0.107	0.032	0.033	0.031	0.033	0.031	-				
25 Escárcega	0.106	0.106	0.106	0.031	0.032	0.030	0.032	0.031	0.001	-			
26 Candelaria	0.106	0.106	0.106	0.031	0.032	0.030	0.032	0.031	0.001	0.000	-		
27 Constitución (<i>D. marsupialis</i>)	0.106	0.106	0.106	0.031	0.032	0.030	0.032	0.031	0.001	0.000	0.000	-	
28 <i>D. albiventris</i>	0.114	0.112	0.114	0.071	0.074	0.072	0.072	0.061	0.064	0.063	0.063	0.063	-

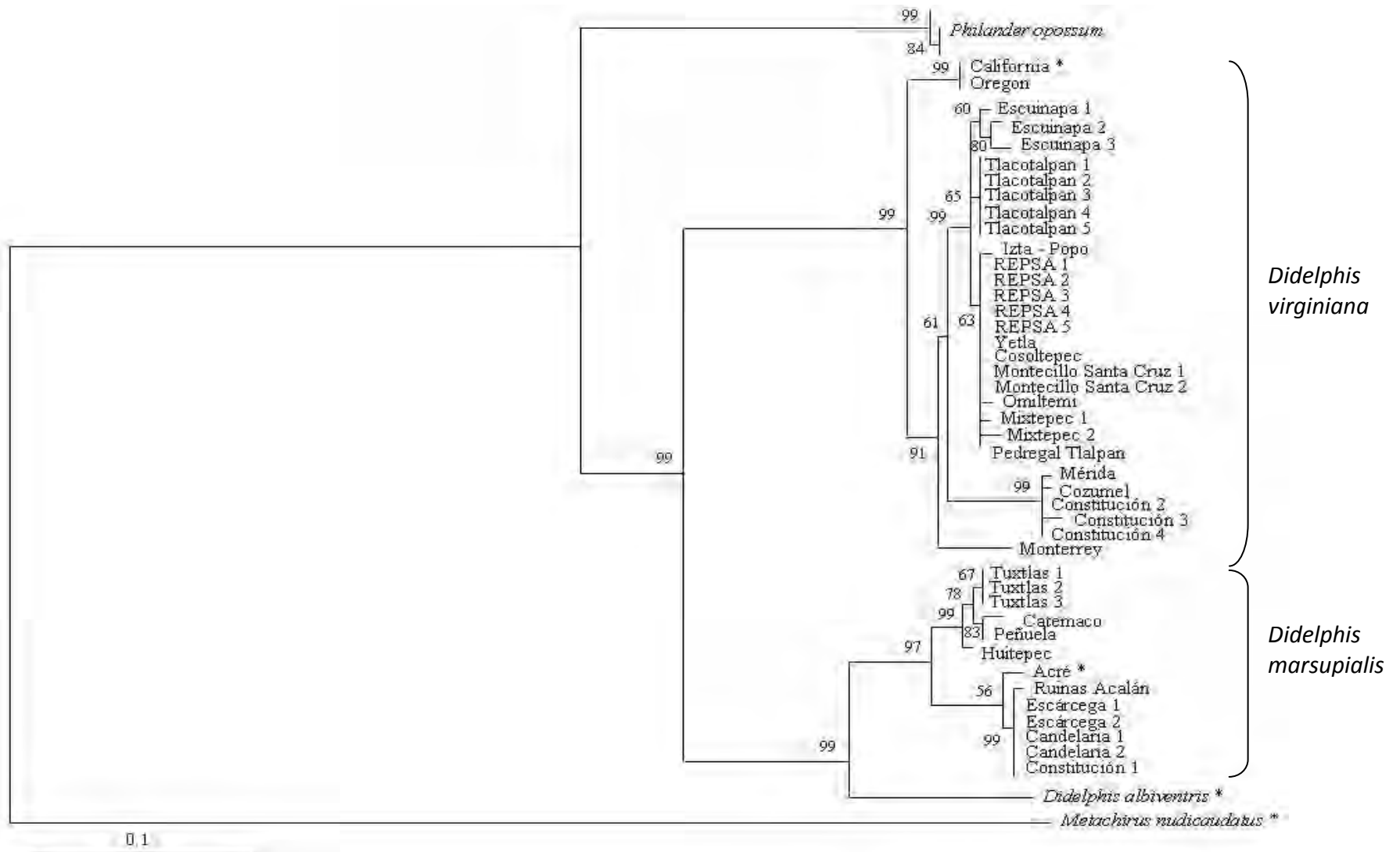


Figura 33. Árbol de distancias construido con el algoritmo del vecino más cercano para muestras del género *Didelphis* con el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) utilizando secuencias de 1139 pb del gen citocromo *b*. Los valores cercanos a los nodos corresponden a los valores de bootstrap. * Secuencias tomadas de Genbank.

Citocromo oxidasa c subunidad I (COI)

El gen *COI* fue secuenciado en 44 muestras, 41 del género *Didelphis* (tentativamente 25 pertenecían a la especie *Didelphis virginiana* y 16 a la especie *D. marsupialis*) y 3 del género *Philander*. Las secuencias obtenidas tuvieron una longitud de 657 pb. En estas secuencias se identificaron tres haplotipos diferentes para la especie *D. virginiana*, cuatro para *D. marsupialis* y dos para *P. oposum*; todos ellos son diferentes entre si y no se comparten entre especies. El primer haplotipo de *D. virginiana* se encuentra en las localidades de Oregon y California en E. U. A., mientras que los dos restantes se registran para México: uno en Escuinapa, Sinaloa; Tlacotalpan, Veracruz; Yetla y Omiltemi, Guerrero; REPSA y Pedregal de Tlalpan, Distrito Federal; Montecillo Santa Cruz, Mixtepec y Cosoltepec, Oaxaca; y el otro en Constitución, Campeche; Mérida, Yucatán y Cozumel, Quintana Roo. Por otro lado, los haplotipos de *D. marsupialis* están registrados de la siguiente manera: uno en Demerara-Mahaica, Guyana y tres en México: el primero en los Tuxtlas, Veracruz; el segundo en Catemaco y Peñuela, Veracruz y Huitepec, Chiapas; y el tercero en Escárcega, Constitución y Candelaria, Campeche. Finalmente, los dos haplotipos de *P. oposum* se registraron para el estado de Veracruz, uno para la localidad de los Tuxtlas y otro para Playa Escondida.

Análisis de Máxima Parsimonia

De los 657 pares de bases, 498 fueron sitios constantes, 56 fueron sitios variables no informativos y 104 fueron sitios filogenéticamente informativos. El promedio de las frecuencias de los nucleótidos para este alineamiento fue 27.68 % adenina, 23.77 % citosina, 15.38 % guanina y 33.15 % timina. En ninguna secuencia se encontraron inserciones, deleciones o codones de paro. Este análisis incluyó un total de 48 secuencias, 44 generadas en este estudio y 4 tomadas de la base de datos Genbank (Apéndice V).

Se realizó una búsqueda heurística que arrojó 2 árboles con una longitud de 228 pasos, índice de consistencia de 0.8084, índice de retención 0.9644, índice reescalado

0.8290 e índice de homoplasia 0.1916. En estos árboles se puede observar que *D. virginiana* es el grupo hermano del clado formado por *D. albiventris* y *D. marsupialis*. Además, se identificaron dos ramas al interior del género *Didelphis*: la primera agrupa las secuencias de *D. virginiana* (Escuinapa, Tlacotalpan, Izta-Popo, REPSA, Yetla, Cosoltepec, Montecillo Santa Cruz, Omiltemi, Mixtepec, Tlalpan, Monterrey, Mérida, Cozumel, Constitución, California y Oregon); y la segunda incluye las muestras de *D. marsupialis* (Tuxtlas, Peñuela, Catemaco, Huitepec, Ruinas Acalán, Escárcega, Candelaria, Constitución y Demerara-Mahaica) más una secuencia de *D. albiventris*. Los grupos externos *Philander opossum* y *Metachirus nudicaudatus* aparecen fuera del clado del género. De los 106 sitios filogenéticamente informativos incluidos en este análisis, 22 (16 transiciones y 6 transversiones) fueron sinapomorfías para el clado de *D. virginiana*, 14 (10 transiciones y 4 transversiones) para el clado conformado por *D. albiventris* y *D. marsupialis* y 8 (6 transiciones y 2 transversiones) para el clado de *D. marsupialis* (Apéndice IX; Fig. 34). Las sinapomorfías que diferenciaron estos clados se encontraron distribuidas de la siguiente manera: para el clado de *D. virginiana*, 12 en la primera mitad de este fragmento y 10 en la segunda; para clado conformado por *D. marsupialis* y *D. albiventris*, 6 en la primera mitad y 7 en la segunda; y para el clado de *D. marsupialis*, 5 en la primera mitad y 3 en la segunda.

El clado que agrupa las muestras de *D. virginiana* esta dividido en dos subclados: el primero agrupa las muestras de California y Oregon; y el segundo agrupa a todas las muestras de México. Este subclado esta formado por una rama que agrupa las muestras de Escuinapa, Tlacotalpan, Izta-Popo, REPSA, Yetla, Cosoltepec, Montecillo Santa Cruz, Omiltemi, Mixtepec, Tlalpan y Monterrey; las muestras de Cozumel, Mérida y Constitución (2-4) pueden o no estar agrupadas en otro subclado. Por su parte, el clado de *D. marsupialis* esta dividido en dos subclados, el primero esta formado las muestras de Peñuela, Catemaco, Huitepec y el conjunto de los Tuxtlas; mientras que el segundo subclado incluye la muestras de Ruinas Acalán, Escárcega, Constitución, Candelaria y Demerara-Mahaica. Externamente aparece la muestra de *D. albiventris*. La prueba de

bootstrap arrojó el mismo árbol con un valor de 100 para el clado de *D. virginiana* y de 91 para el de *D. marsupialis* (Fig. 34).

Análisis de Máxima Verosimilitud

Para conocer el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustaba a los datos se utilizó el software Modeltest 3.7 (Posada y Crandall, 1998), que dió como resultado el modelo de Tamura-Nei + gama (TrN + G) basado en el modelo propuesto por Tamura y Nei (1993). El análisis de MV generó un solo árbol (Fig. 35) que tiene una topología idéntica a uno de los dos árboles encontrados en el análisis de MP. En este árbol se identificaron dos clados dentro del género *Didelphis*: el primer agrupa 29 secuencias de *Didelphis virginiana*, incluyendo las muestras de Montecillo Santa Cruz (1-2), Mérida y Constitución 2; el segundo esta formado por 12 secuencias de *D. marsupialis* y una de *D. albiventris*. Las muestras de Cozumel, Mérida y Constitución (2-4) se encuentran agrupadas en un subclado de *D. virginiana*. La prueba de bootstrap mantiene la misma topología con valores altos 99 para *D. virginiana* y 89 para *D. marsupialis* (Fig. 35). El largo de las ramas indica que las secuencias de cada especie son más parecidas entre sí que con cualquiera de las secuencias de la otra especie. Asimismo, el largo de la rama de *Metachirus nudicaudatus* es muy grande en comparación con las de los géneros *Philander* y *Didelphis*.

Análisis de Distancias

Se obtuvieron los porcentajes de divergencia genética entre las especies del género *Didelphis*, entre las muestras de la misma especie y con respecto a los grupos externos (*Philander opossum* y *Metachirus nudicaudatus*) bajo el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980; Cuadro 11). Los valores de divergencia fueron de 7.8 a 9.3 % entre *D. virginiana* y *D. marsupialis*; de 8.7 a 10.0 % entre *D. virginiana* y *D. albiventris*; de 4.3 a 5.6 % entre *D. marsupialis* y *D. albiventris*; de

11.1 a 12.6 % entre *D. marsupialis* y *P. opossum*; de 12.1 a 13.2 % entre *D. virginiana* y *P. opossum*; de 18.1 a 19.5 % entre *D. marsupialis* y *M. nudicaudatus*; de 20.3 a 21.8 % entre *D. virginiana* y *M. nudicaudatus*; de 0.0 a 2.7 % entre las muestras de *D. marsupialis*; y de 0.0 a 2.2 % entre muestras de *D. virginiana*.

A partir de los valores de divergencia se generó un árbol de NJ (Fig. 36). Este árbol mantiene los dos grupos al interior del género *Didelphis*. Este árbol es idéntico al de MV. En la mayoría de los casos, el largo de las ramas presente entre las muestras de cada especie demuestra que las secuencias son muy similares, con excepción de las muestras de California y Oregon de *D. virginiana* y la muestra de Demerara-Mahaica de *D. marsupialis*. El largo de las ramas encontrado entre el clado de *D. virginiana* y el conformado por *D. marsupialis* y *D. albiventris* es muy grande lo que indica que la divergencia genética que existe entre estos grupos explica las diferencias en sus secuencias. Asimismo, el largo de la rama encontrado entre *D. marsupialis* y *D. albiventris* es pequeño lo que muestra que son especies cercanamente relacionadas. La prueba de bootstrap mantiene la misma topología con valores altos, 99 para *D. virginiana* y 81 para *D. marsupialis* (Fig. 36).

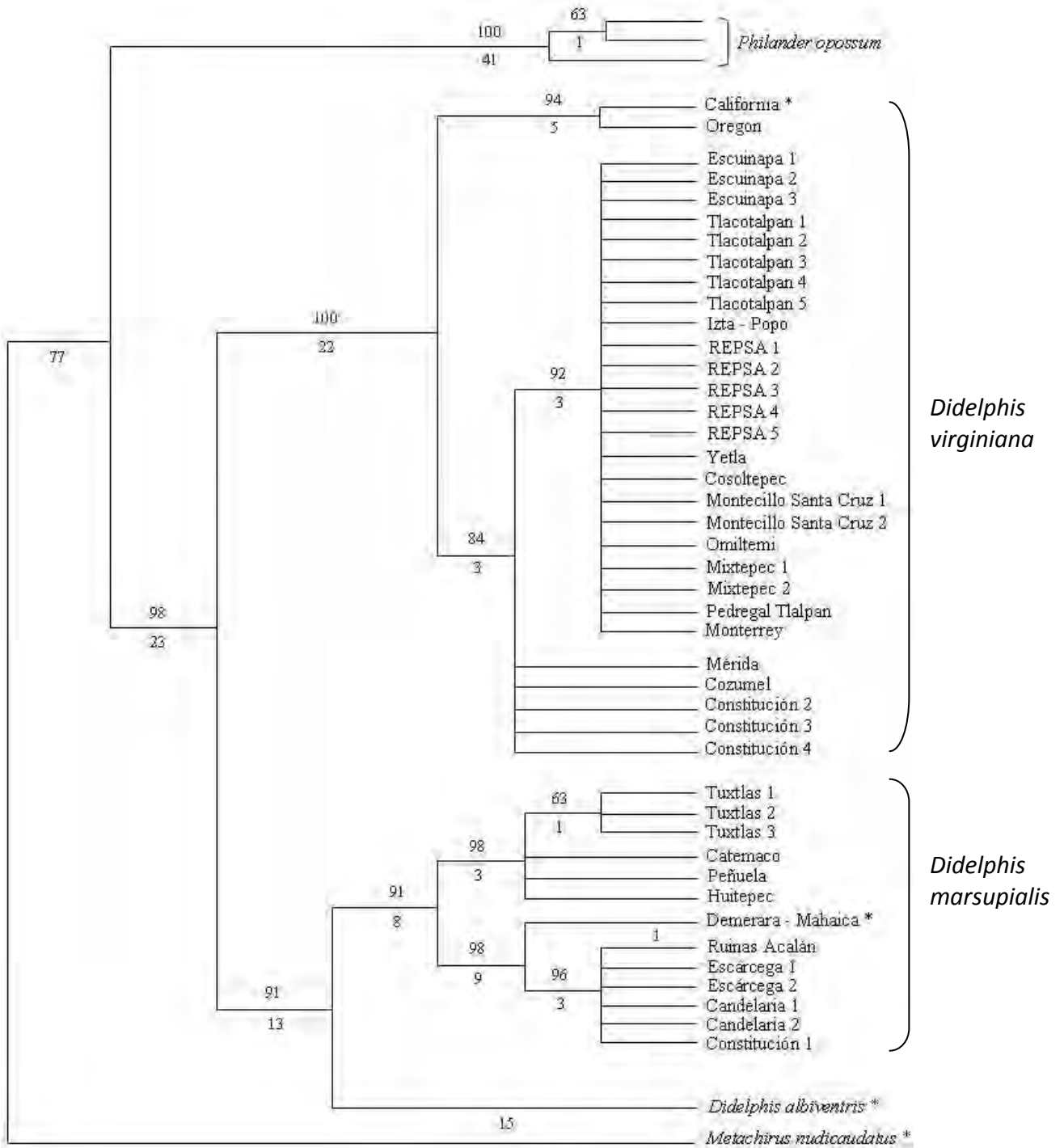


Figura 34. Árbol de consenso estricto generado a partir de los 2 árboles más parsimoniosos para muestras del género *Didelphis* utilizando secuencias de 657 pb del gen citocromo oxidasa *c* subunidad I. Longitud = 228 pasos, índice de consistencia = 0.8084, índice de retención = 0.9644, índice reescalado = 0.8290 e índice de homoplasia = 0.1916. Los números arriba y debajo de las ramas corresponden a los valores de bootstrap y al número de cambios respectivamente. * Secuencias tomadas de Genbank.

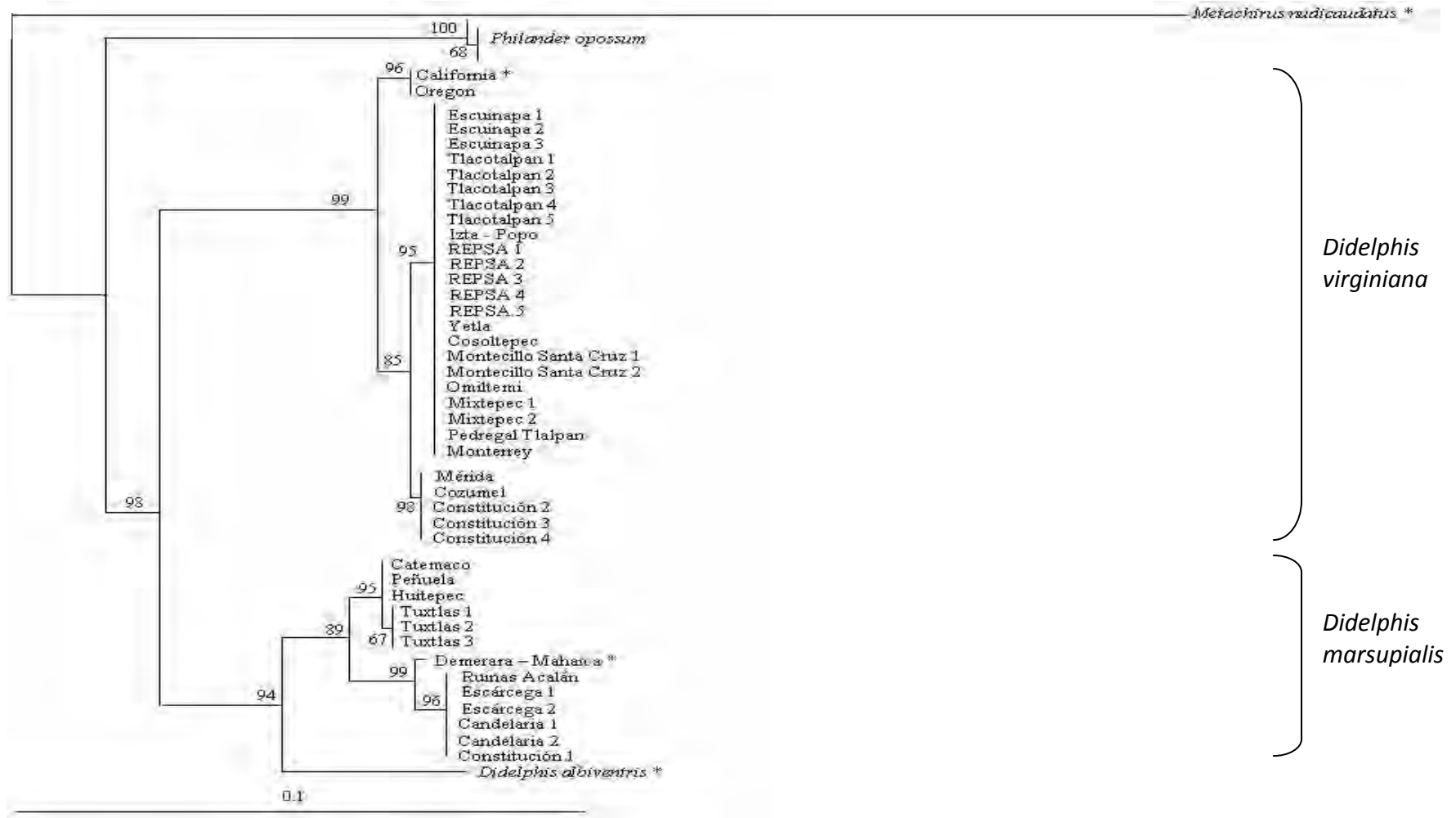


Figura 35. Árbol de máxima verosimilitud (-ln = 1919.10184) construido con el modelo Tamura-Nei (TrN + G) para muestras del género *Didelphis* utilizando secuencias de 657 pb del gen citocromo oxidasa c subunidad I. Los números cercanos a los nodos corresponden a los valores de bootstrap. * Secuencias tomadas de Genbank.

Cuadro 11. Matriz de distancias construida con secuencias del gen citocromo oxidasa c subunidad I (657 pb) para los tlacuaches *Metachirus nudicaudatus*, *Philander opossum*, *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *D. albiventris*, bajo el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>M. nudicaudatus</i>	-														
2 Tuxtlas (<i>P. opossum</i>)	0.195	-													
3 Playa (<i>P. opossum</i>)	0.193	0.002	-												
4 California	0.203	0.123	0.121	-											
5 Oregon	0.203	0.123	0.121	0.000	-										
6 Escuinapa	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	-									
7 Tlacotalpan	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	0.000	-								
8 Izta-Popo	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	0.000	0.000	-							
9 REPSA	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	-						
10 Yetla	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	-					
11 Cosoltepec	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-				
12 Montecillo	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-			
13 Omiltemi	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-		
14 Mixtepec	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	
15 Monterrey	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-

Cuadro 11 (Continuación). Matriz de distancias construida con secuencias del gen citocromo oxidasa *c* subunidad I (657 pb) para los tlacuaches *Metachirus nudicaudatus*, *Philander opossum*, *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis* y *D. albiventris*, bajo el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
16	Tlalpan	0.218	0.132	0.130	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
17	Cozumel	0.216	0.130	0.128	0.020	0.020	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
18	Mérida	0.216	0.130	0.128	0.020	0.020	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
19	Constitución (<i>D. virginiana</i>)	0.216	0.130	0.128	0.020	0.020	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
20	Tuxtlas	0.195	0.125	0.126	0.080	0.080	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093
21	Catemaco	0.193	0.126	0.125	0.078	0.078	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091
22	Peñuela	0.193	0.126	0.125	0.078	0.078	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091
23	Huitepec	0.193	0.126	0.125	0.078	0.078	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091
24	Demerara-Mahaica	0.181	0.113	0.111	0.080	0.080	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089
25	Ruinas Acalán	0.181	0.117	0.115	0.084	0.084	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093
26	Escárcega	0.181	0.117	0.115	0.084	0.084	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093
27	Candelaria	0.181	0.117	0.115	0.084	0.084	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093
28	Constitución (<i>D. marsupialis</i>)	0.181	0.117	0.115	0.084	0.084	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093
29	<i>D. albiventris</i>	0.193	0.115	0.113	0.087	0.087	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100

Cuadro 11. (Continuación). Matriz de distancias construida con secuencias del gen citocromo oxidasa c subunidad I (657pb) para los tlacuaches *Metachirus nudicaudatus*, *Philander opossum*, *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *D. albiventris*, bajo el modelo de sustitución de nucleótidos dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980).

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
16 Tlalpan	-													
17 Cozumel	0.005	-												
18 Mérida	0.005	0.000	-											
19 Constitución (<i>D. virginiana</i>)	0.005	0.000	0.000	-										
20 Tuxtlas	0.093	0.087	0.087	0.087	-									
21 Catemaco	0.091	0.086	0.086	0.086	0.002	-								
22 Peñuela	0.091	0.086	0.086	0.086	0.002	0.000	-							
23 Huitepec	0.091	0.086	0.086	0.086	0.002	0.000	0.000	-						
24 Demerara-Mahaica	0.089	0.084	0.084	0.084	0.024	0.022	0.022	0.022	-					
25 Ruinas Acalán	0.093	0.087	0.087	0.087	0.027	0.025	0.025	0.025	0.006	-				
26 Escárcega	0.093	0.087	0.087	0.087	0.027	0.025	0.025	0.025	0.006	0.000	-			
27 Candelaria	0.093	0.087	0.087	0.087	0.027	0.025	0.025	0.025	0.006	0.000	0.000	-		
28 Constitución (<i>D. marsupialis</i>)	0.093	0.087	0.087	0.087	0.027	0.025	0.025	0.025	0.006	0.000	0.000	0.000	-	
29 <i>D. albiventris</i>	0.100	0.095	0.095	0.095	0.045	0.043	0.043	0.043	0.053	0.056	0.056	0.056	0.056	-

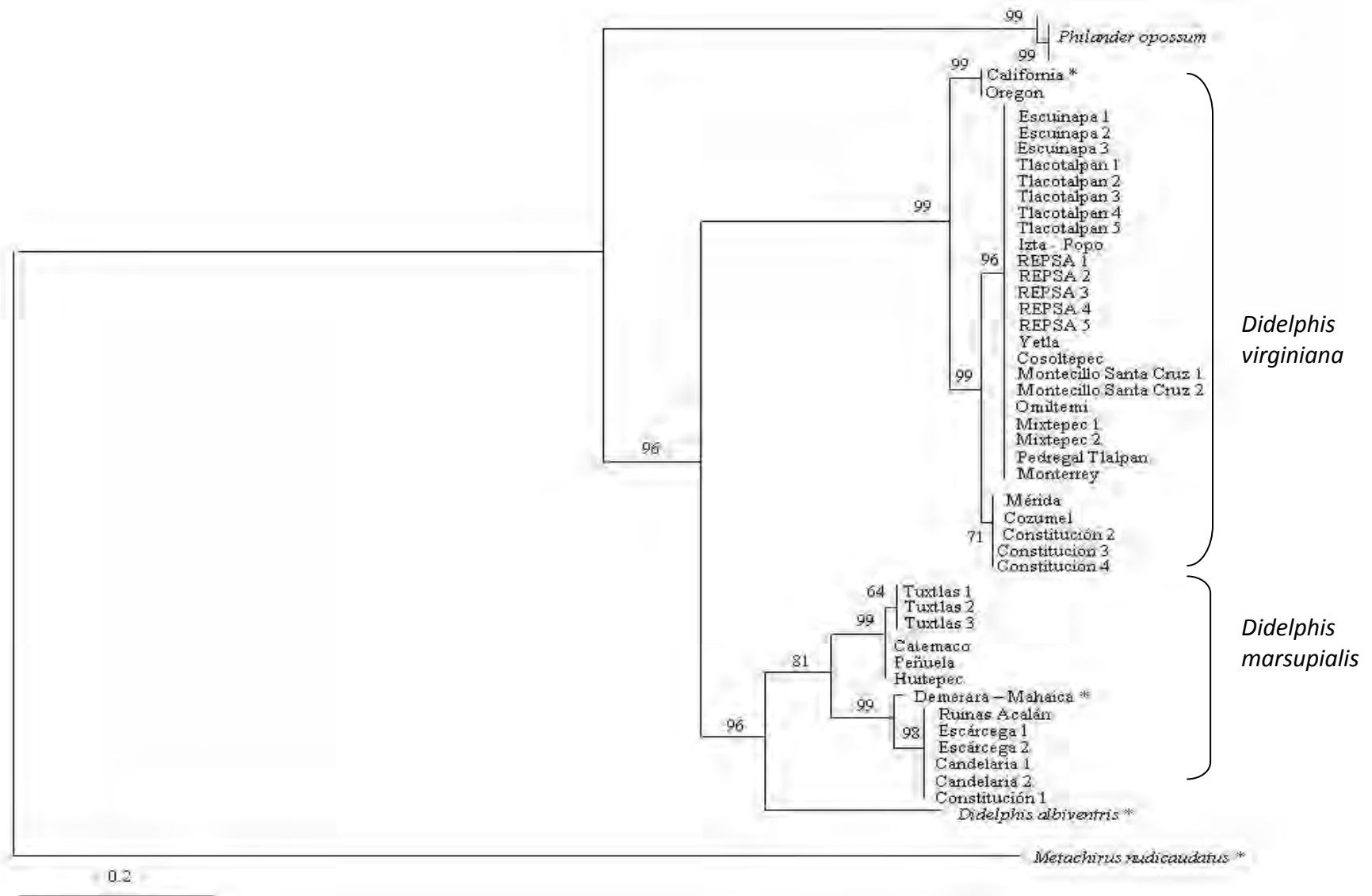


Figura 36. Árbol de distancias construido con el algoritmo del vecino más cercano para muestras del género *Didelphis* con el modelo de evolución molecular dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) utilizando secuencias de 657 pb del gen citocromo oxidasa c subunidad I. Los valores cercanos a los nodos corresponden a los valores de bootstrap. * Secuencias tomadas de Genbank.

DISCUSIÓN

La delimitación de especies, proceso mediante el cual se trazan los límites entre una especie y otra, es un componente básico en el estudio y conocimiento de la biodiversidad ya que las especies son la unidad fundamental en disciplinas como: sistemática, ecología, evolución y conservación (Wiens y Servedio, 2000). Asimismo, es importante saber con que especie se está trabajando para poder tomar decisiones adecuadas sobre su manejo y aprovechamiento (Shaw et al., 2003). La delimitación de especies se ha convertido en años recientes, en una de las metas principales de la sistemática moderna debido a la creciente preocupación que existe en la comunidad científica por las amenazas que enfrenta la biodiversidad y al deseo de describir rápidamente tantas especies como se pueda antes de que éstas desaparezcan (Wiens, 2007).

Durante mucho tiempo, la delimitación de especies se ha hecho utilizando las diferencias morfológicas que existen entre una especie y otra. La mayor parte de las especies reconocidas actualmente fueron delimitadas utilizando uno o más caracteres morfológicos, cualitativos o cuantitativos, que no comparten con otras especies, asumiendo que esto es consecuencia de que no existe flujo genético entre ellas (Wiens, 2007). Sin embargo, la delimitación de especies basada en características morfológicas puede ser muy superficial ya que existen muchas especies similares en tamaño y forma que se distribuyen simpátricamente. En estas especies, las características “exclusivas” (autoapomorfías) son muy difíciles de distinguir debido a que los caracteres pueden estar sobrelapando o ser muy parecidos entre ellas. Además, se debe considerar que existen factores como la edad del ejemplar y la experiencia para identificar de la persona que lo manipule, que pueden afectar directamente la delimitación específica (St-Pierre et al., 2006). Este es el caso de las dos especies de tlacuache del género *Didelphis* que se distribuyen en México, *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis*. Ambas son especies morfológicamente muy similares (Gardner, 1973) que se distribuyen simpátricamente en Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Oaxaca, Chiapas, Yucatán y Quintana Roo (Colchero et al., 2005; Zarza y Medellín, 2005). Esta situación ocasiona imprecisiones en la

identificación a nivel específico debido a que a simple vista es difícil distinguirlas con certeza.

Sección I. Identificación morfológica

Algunos estudios han reportado que estas dos especies de tlacuache se podrían distinguir externamente usando la coloración del cachete, el patrón de distribución del pelo de guardia, el porcentaje de color negro en la cola y la longitud de la cola con respecto a la longitud de la cabeza y el cuerpo (Allen, 1901; Davis, 1944; Gardner, 1973; Aranda, 2002). Sin embargo, la identificación de estas dos especies en base a la morfología externa es incierta debido a que estos caracteres tienen una amplia variación intraespecífica y geográfica, por lo que en ocasiones las diferencias pueden ser mínimas y difíciles de distinguir, particularmente dentro del área de simpatría (Emmons, 1990). Por ejemplo, Ruiz-Piña y Cruz-Reyes (2002) no pudieron distinguir entre *D. virginiana* y *D. marsupialis* mientras realizaban un estudio sobre los reservorios naturales del protozoario *Trypanosoma cruzi* en Yucatán, utilizando la coloración del cachete, blanco en *D. virginiana* y amarillo en *D. marsupialis*, debido a que varios individuos presentaron estas coloraciones mezcladas. Por lo tanto, concluyeron que esta característica no era suficiente para distinguir estas dos especies. Asimismo, después de examinar un gran número de individuos afirmaron que ninguna de las características externas reportadas por Gardner (1973) puede diferenciar con éxito estas dos especies de tlacuache.

Lavergne et al. (1997) documentaron un problema muy parecido en Guyana Francesa donde *Didelphis marsupialis* y *D. albiventris* están presentes de manera alopatrica en la mayor parte de su distribución. Sin embargo, existen algunos casos reportados de simpatría, en donde los caracteres que permiten su identificación: color del pelaje (negro o gris), color de las orejas (completamente negras o con la base blanca) y la presencia o ausencia de líneas negras en la cabeza y el hocico, pueden presentar un número alto de polimorfismos y ser muy similares entre las dos especies, lo que provoca

que usualmente existan dudas sobre la identificación a nivel específico de algunos individuos colectados en simpatria.

Por otra parte, las diferencias craneales que existen entre *D. virginiana* y *D. marsupialis* en la morfología de los huesos palatino, nasal y lacrimal tienen poco valor taxonómico si se utilizan de forma independiente debido a que presentan mucha variación al interior de estas dos especies, particularmente en *D. virginiana* donde algunos individuos pueden presentar características craneales que se sobrelapan ó son muy parecidas a las de *D. marsupialis*. Por ejemplo, la intercepción de la sutura maxilo-frontal con los huesos nasal y lacrimal en *D. virginiana* está alineada con los dos huesos ó es anterior al hueso lacrimal, mientras que en *D. marsupialis* siempre es anterior. Por lo tanto, no se puede usar esta característica de forma aislada para distinguirlas ya que muestra un claro sobrelapamiento. Además, es importante recordar que todas las características craneales pueden variar dependiendo de la edad y el sexo de los ejemplares (Gardner, 1973). Asimismo, se debe tomar en cuenta que mientras las características externas se pueden observar o medir en el campo con herramientas sencillas, las características craneales requieren del sacrificio de los ejemplares para que puedan ser observadas (St-Pierre et al., 2006).

La identificación a nivel específico de los ejemplares colectados en este trabajo se hizo utilizando una combinación de las características morfológicas (externas y craneales) comúnmente utilizadas para diferenciar a *D. virginiana* de *D. marsupialis* ya que no se pudo identificar correctamente a todos los ejemplares utilizando esta información por separado, ya que el número de ejemplares asignados a cada especie variaba dependiendo del carácter que se estuviera utilizando. Todos los caracteres presentaron una amplia variación intraespecífica y sobrelapamiento entre las dos especies, provocando que fuera complicado identificar las características exclusivas de cada una. Catzefflis et al. (1997) reportan un caso similar entre *D. marsupialis* y *D. albiventris*, donde los valores obtenidos de las medidas corporales convencionales (longitud total, longitud de la cola, longitud de la pata trasera y peso) tienden a sobrelaparse considerablemente entre las dos especies.

Sin embargo, una combinación de dos medidas (longitud de la pata trasera y la distancia que hay entre el ojo y el hocico) pueden distinguir a la mayoría de los individuos examinados.

Por otro lado, fue necesario incorporar la información sobre la localidad de colecta (de Queiroz, 2007) cuando las características morfológicas indicaban que el ejemplar pertenecía a una especie y según la distribución geográfica pertenecía a la otra. Por ejemplo, el ejemplar colectado cerca del poblado de Yetla en la costa del estado de Guerrero (CNMA 45117) presenta los cachetes de color amarillo pálido, el pelo de guardia sobre la línea media y la extensión posterior del hueso lacrimal en forma de una línea recta, características todas de la especie *D. marsupialis*. Sin embargo, esta especie no se distribuye en este estado por lo que el ejemplar solo podía pertenecer a la especie *D. virginiana* aunque las características morfológicas no correspondían a las reportadas por Gardner (1973) para esta especie.

Finalmente, tras examinar con cuidado todos los ejemplares colectados, 13 fueron identificados como *D. virginiana* y 4 como *D. marsupialis*. Sin embargo, sólo los ejemplares REPSA 3 y 4 fueron los únicos que presentaron todas las características morfológicas reportadas por Gardner (1973) para la especie *D. virginiana*: externamente presentaron el cachete de color blanco, pelo de guardia distribuido en todo el dorso, cola larga (73-93 % de la longitud de la cabeza y el cuerpo) y bicolor (25-50 % de color negro), mientras que las características craneales fueron: sutura maxilo-frontal alineada con los huesos nasal y lacrimal (REPSA 4) ó anterior al hueso lacrimal (REPSA 3), huesos nasales anchos terminando en un ángulo redondeado, extensión posterior del hueso lacrimal como una línea curva y la extensión dorsal del palatino gruesa. En el resto de los ejemplares asignados a esta especie una o varias de las características fueron diferentes a las reportadas por Gardner (1973). Es estos casos, las características morfológicas fueron similares a las esperadas para *D. marsupialis* o intermedias entre las dos especies. Por ejemplo, el ejemplar colectado en Yetla (CNMA 45117) descrito anteriormente.

Por otra parte, ninguno de los ejemplares asignados a la especie *D. marsupialis* presentó todas las características que según Gardner (1973) la pueden distinguir de *D. virginiana*. Todos los ejemplares presentaron una mezcla de las características reportadas tanto para *D. marsupialis* como para *D. virginiana*. Por ejemplo, el ejemplar CNMA 45110 colectado en la Estación del Biología Tropical “Los Tuxtlas” presentó: el cachete de color amarillo pálido, pelo de guardia concentrado sobre la línea media, cola larga (118.9 % de la longitud de la cabeza y el cuerpo) y bicolor (26.5 % de color negro), sutura maxilo-frontal alineada con los huesos nasal y lacrimal, huesos nasales anchos terminando en un ángulo agudo, extensión posterior de hueso lacrimal en forma de una línea recta y la extensión dorsal del palatino gruesa.

Los resultados de este estudio fortalecen la idea de que los criterios morfológicos reportados en la literatura pueden resultar ambiguos para la identificación de estas especies de tlacuache, apoyando las conclusiones de Ruiz-Piña y Cruz-Reyes (2002) sobre el valor taxonómico limitado que en ocasiones tienen los caracteres morfológicos que se utilizan para distinguir estas dos especies, y confirmando así la necesidad de utilizar nuevos métodos para su delimitación. Por ejemplo, Ruiz-Piña y Cruz-Reyes (2002) recomendaron hacer la distinción entre *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis* en las áreas donde se pueden encontrar simpátricamente, utilizando la morfología de los cromosomas. Ambas especies tienen un número cromosómico $2n = 22$ (Patton et al., 1996). Sin embargo, se pueden diferenciar porque *D. virginiana* tiene seis pares de autosomas subtelocéntricos y cuatro acrocéntricos, el cromosoma X es submetacéntrico mientras que el Y es acrocéntrico. Por su parte, en *D. marsupialis* todos los cromosomas, incluyendo los sexuales son acrocéntricos. Asimismo, la única diferencia que existe en la morfología de los cromosomas entre *D. marsupialis* y *D. albiventris* es el tamaño del cromosoma Y, diminuto en *D. albiventris* (Gardner, 1973).

Un método reciente que se utiliza ampliamente para la identificación de especies morfológicamente similares es el análisis de la longitud de fragmentos de restricción (siglas en inglés, RFLP) empleando ADN mitocondrial, como el gen citocromo *b* (St-Pierre

et al., 2006; Parson et al., 2000) que tiene gran resolución para revelar diferencias en las secuencia de nucleótidos en especies cercanas (Ortega, 2006), las cuales pueden ser fácilmente detectadas con una o varias enzimas de restricción (Rentería, 2006).

Sección II. Análisis de restricción

En este trabajo el análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción consistió en la digestión de 44 productos de PCR de una longitud de 1149 pb del gen mitocondrial *Cit b* con dos endonucleasas, *Hae III* que reconoce la secuencia (GG↓CC) y *TaqI* cuya secuencia blanco es (T↓CGA). Las dos enzimas fueron consideradas informativas ya que produjeron patrones de digestión distintos para cada especie, con lo que se pudo distinguir molecularmente las muestras de *D. virginiana* de las de *D. marsupialis*.

Ambas enzimas produjeron más de un patrón de digestión por especie (polimorfismos). En las muestras de *D. virginiana* la enzima *HaeIII* produjo un patrón para todas las muestras (629, 423, 97 pb); mientras que en las muestras de *D. marsupialis* produjo dos patrones, uno para las muestras de Peñuela, Tuxtlas, Catemaco y Huitepec (629, 360, 97, 63 pb) y otro para las muestras de Ruinas Acalán, Candelaria, Escárcega y Constitución (629, 520 pb). Asimismo, la enzima *TaqI* produjo dos patrones de digestión en las muestras de *D. virginiana*, uno para la muestra Oregon (1149 pb) y otro para todas las muestras de México (621, 528 pb); mientras que en *D. marsupialis* todas las muestras presentaron el mismo patrón (951, 198 pb).

La presencia de varios patrones de digestión en *D. virginiana* y *D. marsupialis* se puede explicar como el resultado de la alta tasa de mutación que tiene el ADN mitocondrial (Nabholz et al., 2009). Por lo tanto, estos patrones son el reflejo de la variabilidad intraespecífica presente en las secuencias de gen *Cit b* de estas dos especies de tlacuache. Algunas especies donde se han reportado más de un patrón de digestión son los roedores *Akodon cursor* y *A. montensis* en los que se documentaron 16 y 11 patrones diferentes respectivamente (Fagundes y Nogueira, 2007). Otro ejemplo, es el

murciélago *Platyrrhinus lineatus* en el que encontraron dos patrones distintos (Machado et al., 2005). Por otra parte, el hecho de que los patrones de digestión encontrados para *D. marsupialis* sean diferentes a los de *D. virginiana* indica que estas dos especies han divergido genéticamente aunque el tiempo desde su especiación no ha sido suficiente para permitir la acumulación de diferencias notables en su morfología o bien pueden estar hibridizando (Fagundes y Nogueira, 2007).

En las secuencias del gen *Cit b* la enzima *HaeIII* reconoce dos veces la secuencia blanco en *Didelphis virginiana*, mientras que en *D. marsupialis* lo hace de una a tres veces. Una ventaja de que existan varios sitios de restricción en estas secuencias es que se reducen la probabilidad de cometer errores en la identificación (Riddle et al., 2003). Asimismo, el hecho de que compartan un sitio de corte en la posición 629 puede estar reflejando que existe una gran similitud en las secuencias de estos tlacuaches, lo que implica que la especiación de estas especies de tlacuache es relativamente reciente (Machado et al., 2005). Por otra parte, *D. marsupialis* tiene un número mayor de sitios de restricción que *D. virginiana*, lo que puede representar la pérdida de un sitio de restricción en *D. virginiana* o la ganancia de un nuevo sitio de restricción para *D. marsupialis*. Kuehn et al. (2000) describen un caso similar entre *Castor fiber* y *C. canadensis* donde la substitución de nucleótidos en dos posiciones originó el reconocimiento de la enzima *RsaI* en *C. fiber*.

La mayoría de las muestras analizadas presentaron el patrón de digestión que predijo el software NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003) para cada especie. En el análisis con la enzima *HaeIII*, el 96.5 % de las muestras de *D. virginiana* presentaron el patrón de digestión esperado para esta especie, mientras que en *D. marsupialis* fue el 41.7 %. Asimismo, con la enzima *TaqI* en el 96.5% de las muestras de *D. virginiana* se obtuvieron los fragmentos esperados para esta especie, mientras que en *D. marsupialis* se obtuvo en el 100 % de las muestras.

Se encontraron cuatro individuos que habían sido identificados como *D. marsupialis*, pero en todas las digestiones se obtuvieron los patrones de digestión esperados para *D. virginiana*. Estas muestras se obtuvieron de otras colecciones mastozoológicas donde fueron identificadas utilizando los criterios morfológicos, externos y craneales, que Gardner (1973) propuso que podían diferenciar estas especies de tlacuache. Similarmente, Machado et al. (2005) al trabajar con murciélagos del género *Platyrrhinus* encontraron dos individuos que habían sido identificados originalmente como *Platyrrhinus lineatus* utilizando la clave de Vizotto y Taddei (1973) basada en el tamaño de los murciélagos, tras el análisis con tres enzimas obtuvieron los patrones de digestión de *P. recifinus*. Otro ejemplo lo documentan St-Pierre et al. (2006) con mustélidos, donde evaluaron los caracteres propuestos por Hall (1951) para distinguir individuos de *Mustela frenata* de *M. erminea*. La morfología y el análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción mostraron que los caracteres morfológicos fallaban en distinguir seis ejemplares de *M. erminea* como *M. frenata*, mientras todos los ejemplares fueron identificados correctamente con los RFLPs.

Por otra parte, esta técnica logró discriminar efectivamente a individuos de *D. virginiana* y *D. marsupialis* colectados en la misma localidad, Constitución, Campeche. En este lugar, el patrón de digestión de *D. virginiana* fue de tres fragmentos (629, 423, 97 pb); mientras que en *D. marsupialis* fue de dos fragmentos (629, 520 pb). Similarmente, Paxinos et al. (1997) lograron distinguir las zorritas *Vulpes macrotis* y *Vulpes vulpes* en dos localidades de California al obtener patrones de restricción completamente diferentes en cada especie.

Estos resultados apoyan la idea de que el análisis de restricción puede resolver la limitaciones que existen en la identificación morfológica (España et al., 2008), permitiendo eliminar la subjetividad asociada a las claves de identificación dicotómica. Por otro lado, la técnica de RFLPs es relativamente sencilla, rápida y no requiere de grandes cantidades de tejido (St-Pierre et al., 2006). Por lo tanto, se pueden usar métodos no invasivos, como la toma de muestras de pelo o excremento para obtener el ADN del animal de

interés (Mills et al., 2000; Krausman et al., 2006). Es importante señalar que los métodos moleculares no reemplazan a los métodos de identificación tradicionales basados en la morfología, sino que son herramientas que complementan la información obtenida por otros métodos (España et al., 2008). Particularmente, el análisis de la longitud de fragmentos de restricción es una herramienta concluyente para distinguir especies simpátricas y morfológicamente muy similares como *D. virginiana* y *D. marsupialis*. Aunque los RFLPs fueron exitosos para identificar estas dos especies de tlacuache existen otras técnicas para delimitar especies como el análisis de patrones filogenéticos utilizando datos de secuencias de ADN de genes mitocondriales (Arellano et al., 2006).

Sección III. Análisis Filogenético

Citocromo b (Cit b)

De las 44 secuencias del gen Cit *b*, 41 correspondieron al género *Didelphis* y tres al género *Philander*. En estas secuencias se identificaron seis haplotipos para *D. virginiana*, cinco para *D. marsupialis* y dos para *Philander oposum*. Ninguno de los haplotipos se encontró repetido en más de una especie. Similarmente, otros trabajos han reportado más de un haplotipo por especie en otros marsupiales: 12 para *Philander frenata*, 7 para *P. oposum*, 5 para *P. andersoni*, 7 para *P. mcilhennyi* y 14 para *Marmosa murina* (Patton y da Silva, 1997; Steiner y Catzeflis, 2003), lo que muestra que existe una gran variabilidad genética en este grupo de mamíferos, consecuencia de las altas tasas de mutación del ADN mitocondrial (Nabholz et al., 2009). Un haplotipo de *D. virginiana* se registró en Oregón y California, Estados Unidos, mientras que los otros seis se encontraron en México: el primero en Sinaloa; el segundo en Veracruz; el tercero en el Distrito Federal y los estados de México, Guerrero y Oaxaca; el cuarto en Yucatán y Quintana Roo; el quinto en Campeche; y el sexto en Nuevo León. Mientras que los haplotipos de *D. marsupialis* fueron registrados: uno en Acre, Brasil y cuatro en México, dos en Veracruz, uno en Chiapas y otro en Campeche y Tabasco. Finalmente, los dos haplotipos de *P. oposum* son de Veracruz.

Los diferentes haplotipos de *D. virginiana* y *D. marsupialis* se agruparon en clados separados en todos los análisis filogenéticos (MP, MV y NJ), reflejando que la divergencia genética es mayor entre especies que dentro de ellas (Bradley y Baker, 2001). Las muestras de *D. virginiana* se agruparon en cuatro subclados, uno para las muestras de Estados Unidos; otro para las de Veracruz, Sinaloa, Oaxaca, Distrito Federal, Guerrero y el Estado de México; otro para la de Nuevo León; y uno para Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Las muestras de *D. marsupialis* formaron dos grupos, uno para las muestras de Veracruz y Chiapas y otro para las de Campeche y Tabasco. La muestra de Brasil aparece externamente a estos dos clados en los árboles de MP y ML, mientras que en el árbol de NJ se integra al clado de Campeche. Los valores de bootstrap para el clado de *D. virginiana* fueron: MP 100 %, ML 100 % y NJ 99 % mientras que para el de *D. marsupialis* fueron: MP 98 %, ML 99 % y NJ 97 %. Estos valores dan un soporte contundente a los nodos que agrupan a estas especies (Dragoo et al., 2004).

Gracias a estos análisis se pudieron distinguir las muestras de cada especie dentro del área de simpatria: las muestras de Peñuela, Tuxtla, Catemaco, Huitepec, Ruinas Acalán, Escárcega, Candelaria y Constitución corresponden a *D. marsupialis*, mientras que las de Tlacotalpan, Constitución, Mérida y Cozumel son de *D. virginiana*. Asimismo, colocaron las muestras de Constitución, Campeche en los dos clados, lo que indica que las dos especies fueron colectadas en esta localidad. Por otra parte, se pudo rectificar la identidad taxonómica de cuatro muestras: dos de la localidad Montecillo Santa Cruz, Oaxaca, una de Mérida, Yucatán y una de Constitución, Campeche que habían sido identificadas originalmente como *D. marsupialis*, sin embargo en todos los análisis filogenéticos (MP, ML y NJ) realizados en este estudio forman parte del clado de *D. virginiana*.

La distancia genética entre los diferentes haplotipos de *D. virginiana* varió de 0.1 a 4.0 % con un promedio de 1.94 %, mientras que en *D. marsupialis* varió entre 0.1 % y 4.2 % con un promedio de 1.81 %. Estos valores son similares a los reportados para especies de tlacuache cuatro ojos: *P. oposum* (1.34 %), *P. andersoni* (1.12 %), *P. mcilhennyi* (1.49 %;

Patton y da Silva, 1997); y mayores a los documentados para raposas colicortas: *Monodelphis adusta* (0.03 %), *M. kungsi* (0.05 %) *M. reigi* (0.2 %) y *M. brevicaudata* (0.06 %; Lim et al., 2009). Los porcentajes de divergencia genética encontrados al interior de *D. marsupialis* y *D. virginiana* pueden ser indicativos de variación genética intraespecífica, poblaciones conespecíficas, variantes geográficas (subespecies) o la retención de polimorfismos ancestrales (Bradley y Baker, 2001).

Por otro lado, las distancias genéticas entre *D. virginiana* y *D. marsupialis* variaron de 10.3 a 11.8 %. Patton et al. (1996) reportaron un valor promedio del 10 % de divergencia genética entre tres especies del género *Didelphis* (*D. virginiana*, *D. marsupialis* y *D. albiventris*). Meynard et al. (2002) encontraron porcentajes similares entre las llacas chilenas *Thylamys elegans* y *T. pallidor*, donde el promedio de las distancias genéticas fue de 12.9 %. Otras comparaciones interespecíficas en marsupiales de la familia Didelphidae documentan valores muy bajos o muy altos. Por ejemplo, entre *P. oposum* y *P. mcilhennyi* la divergencia genética promedio es del 3.1 % (Nunes et al., 2006), mientras que entre *Monodelphis domestica* y *M. handleyi* la divergencia genética promedio es del 22.9 % (Lim et al., 2009). Según Bradley y Baker (2001) valores > 11 % entre dos taxones indican que deben ser reconocidos como especies diferentes. Por lo tanto, la divergencia genética encontrada entre *D. virginiana* y *D. marsupialis* soporta la idea de que son especies diferentes. Asimismo, el porcentaje de divergencia encontrado entre *D. marsupialis* y *D. albiventris* (6.1-7.4 %) indica que son especies hermanas (Bradley y Baker, 2001) corroborando los resultados obtenidos en base a hibridación de ADN (Kirsch et al., 1993) y secuencias de genes mitocondriales (Patton et al., 1996) y nucleares (Jansa y Voss, 2000).

Por último, los valores de divergencia genética encontrados entre las especies del género *Didelphis* y otros géneros de la misma familia son mayores a los reportados entre *D. virginiana* y *D. marsupialis*. La distancia genética entre *D. marsupialis* y *P. oposum* fue de 14.2 % a 14.9 %; entre *D. virginiana* y *P. oposum* de 14.3 a 14.7 %; entre *D. marsupialis* y *M. nudicaudatus* de 23.5 a 23.9 %; entre *D. virginiana* y *M. nudicaudatus* de 22.3 a 22.8 %. Por su parte, Nunes et al. (2006) reportaron valores de divergencia genética mayores

entre las especies del género *Didelphis* y *P. opossum* (36.3 %), *P. andersoni* (34.7 %), *P. mcilhennyi* (32.7 %) y *P. frenata* (28.6 %).

Estos resultados confirman que las secuencias del gen *Cit b* pueden ser utilizadas como una herramienta en la identificación a nivel específico de *D. virginiana* y *D. marsupialis*. Adicionalmente, se analizó un grupo de secuencias del gen citocromo oxidasa *c* subunidad I (Savolainen et al., 2005) para complementar la información obtenida del análisis de las secuencias del gen *Cit b*.

Citocromo oxidasa *c* subunidad I (*COI*)

Se obtuvieron 44 secuencias del gen *COI* de una longitud de 657 pares de bases (pb), 41 del género *Didelphis* y tres del género *Philander*. En estas secuencias se identificaron tres haplotipos diferentes para *Didelphis virginiana*, cuatro para *D. marsupialis* y dos para *Philander opossum*; todos ellos son diferentes entre sí y no se comparten entre especies. Un haplotipo de *D. virginiana* se registra en Oregón y California, E. U. A. y los dos restantes en México: el primero en los estados de Sinaloa, Veracruz, Guerrero, Distrito Federal, México y Nuevo León; y el segundo en Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Por su parte, los haplotipos de *D. marsupialis* se registran de la siguiente manera: uno para Demarara-Mahaica, Guyana en América del Sur y tres en México: uno para Veracruz; uno para Veracruz y Chiapas; y uno más para Campeche y Tabasco. Finalmente, los dos haplotipos de *P. opossum* se registraron para el estado de Veracruz. Estos resultados indican que en esta muestra las tres especies de tlacuache despliegan una variabilidad genética considerable como lo revelan las secuencias examinadas. Además, no es raro encontrar varios haplotipos por especie ya que la variación genética del ADN mitocondrial es consecuencia de sus altas tasa de mutación (Nabholz et al., 2009). Por ejemplo, Hajibabael et al. (2006) reportan un promedio de ocho haplotipos diferentes por especie en mariposas tropicales.

La distancia genética entre los diferentes haplotipos de *D. virginiana* varió del 0.5 a 2.2 % con un promedio de 1.56 %, mientras que en *D. marsupialis* osciló de 0.2 % a 2.7 % con un promedio de 1.65 %. Estos valores son mayores a los reportados para especies de murciélagos neotropicales, peces y aves, donde los promedios de las distancias genéticas fueron 0.6 %, 0.39 % y 0.43 %, respectivamente (Clare et al., 2007; Ward et al., 2005; Hebert et al., 2004b). Sin embargo, los valores encontrados aquí son similares a los reportados para la pika norteña (*Ochotona hyperborea*; Lisovsky et al., 2007) donde la distancia genética varió de 2.44 a 2.90 % (promedio = 2.78 %) entre las poblaciones del norte y del sur. Asimismo, Hebert et al. (2004b) mencionan que en aves hay casos excepcionales donde la variación intraespecífica es de 9 a 17 veces mayor al promedio. Las distancias genéticas reportadas aquí sugieren que estas dos especies de tlacuache no incluyen especies crípticas, lo que hace más sencilla la comparación entre ellas a nivel específico. Por lo tanto, la variación intraespecífica dentro de *D. virginiana* y *D. marsupialis* puede estar reflejando variantes biogeográficas o la retención de polimorfismos ancestrales, como los reportados para otros taxones (Hajibabael et al., 2006).

La distancia genética entre *D. virginiana* y *D. marsupialis* osciló entre 7.8 y 9.3 %. Clare et al. (2007) encontraron porcentajes similares en algunas especies de murciélagos neotropicales, donde el promedio de las distancias genéticas fue de 7.8 % entre especies del mismo género. Asimismo, ellos muestran que existen algunos géneros con porcentajes de divergencia muy altos o muy bajos. Por ejemplo, entre *Molossus ater* y *M. molossus* la divergencia genética es del 2.18 %, mientras que entre *Peropteryx leucoptera* y *P. kappleri* son casi del 20 %. En comparación con otros grupos de vertebrados estos resultados son similares. Por ejemplo, Ward et al. (2005) y Hebert et al. (2004b) reportan porcentajes de divergencia genética para especies dentro del mismo género en aves y peces del 7.93 % y 9.93 %, respectivamente. Por otro lado, la distancia genética entre *D. virginiana* y *D. marsupialis* fue mayor al 2.0 %, lo que soporta la noción de que ellas son dos especies diferentes.

Estos resultados también están apoyados por el hecho de que los porcentajes de divergencia genética entre las especies del género *Didelphis* y otros géneros son incluso mayores: 11.1-12.6 % entre *D. marsupialis* y *Philander oposum*, 17.7-19.5 % entre *D. marsupialis* y *Metachirus nudicaudatus*; 12.1 a 13.2 % entre *D. virginiana* y *P. oposum*, y 20.3-21.8% entre *D. virginiana* y *M. nudicaudatus*. Asimismo, Ward et al. (2005) reportaron valores de divergencia genética del 15.5 % entre especies de la misma familia en peces.

Además, se encontró que *D. marsupialis* y *D. virginiana* pueden ser fácilmente identificadas porque sus secuencias se agrupan en clados separados en los árboles filogenéticos (máxima parsimonia, máxima verosimilitud y distancias), reflejando que la divergencia genética de estas secuencias es mayor entre especies que dentro de ellas (Hajibabael et al., 2006). Las muestras de *D. virginiana* formaron dos grupos, uno para las de Estados Unidos, y otro para las de México; mientras que las muestras de *D. marsupialis* se agruparon en dos clados, uno formado por la muestras de Veracruz y Chiapas, México y otro con las de Campeche, México y Demerara-Mahaica, Guyana. Estos clados mostraron valores de bootstrap muy altos: 100 % para *D. virginiana* y 91 % para *D. marsupialis* en el análisis de máxima parsimonia; 99 % para *D. virginiana* y 89 % para *D. marsupialis* en el de máxima verosimilitud; y 99 % para *D. virginiana* y 81 % para *D. marsupialis* en el de distancias.

Asímismo, el análisis filogenético pudo distinguir las muestras de ambas especies colectadas dentro del área de simpatría. Estas fueron: Peñuela, Tuxtlas, Tlacotalpan y Catemaco, Veracruz; Huitepec, Chiapas; Candelaria, Constitución y Escárcega, Campeche; Ruinas Acalán, Tabasco; Mérida, Yucatán; y Cozumel, Quintana Roo. El análisis filogenético asignó las muestras de Peñuela, Tuxtlas, Catemaco, Huitepec, Ruinas Acalán, Escárcega, Candelaria y Constitución a *D. marsupialis* y las muestras de Tlacotalpan, Constitución, Mérida y Cozumel a *D. virginiana*. La única localidad donde las dos especies fueron colectadas fue Constitución, Campeche. De tal manera, que las muestras de esta localidad a parecen en los dos clados. De igual manera, se pudo corroborar que las

muestras de Montecillo Santa Cruz, Oaxaca; Mérida, Yucatán; y Constitución, Campeche pertenecían a la especie *D. virginiana*.

Actualmente, *COI* se ha utilizado como un marcador molecular que es efectivo para la identificación de especies porque permite el reconocimiento rápido de la divergencia genética interespecífica (Hebert et al., 2004a; Hajibabael et al., 2006). Esto ha ayudado a resolver incertidumbres taxonómicas en una amplia variedad de grupos animales y al descubrimiento de nuevas especies. Estudios anteriores han establecido que más del 95 % de las especies poseen grupos de secuencias diagnósticas para este gen (Clare et al., 2007) y mencionan que existen pocos casos en los que esta herramienta ha fallado para separar especies. Estos incluyen, taxones alopátricos cuyo estatus como especies diferentes es incierto ó especies hermanas que hibridizan (Kerr et al., 2007); como en el caso de los mosquitos *Aedes fitchii* y *A. grossbecki* que muestran evidencia morfológica de hibridación. En escenarios como este, es recomendable un análisis con genes mitocondriales que evolucionen más rápido (región control, ó NADH4) para complementar la información obtenida con el gen *COI* (Cywinska et al., 2006). Asimismo, Vences *et al.* (2005) encontraron que en los anfibios este gen no era fácil de amplificar por lo que no se podía utilizar como único marcador en la identificación específica en este grupo. Aunque en este estudio el gen *COI* mostró gran resolución para diferenciar a *D. marsupialis* de *D. virginiana* existen diferencias importantes en comparación con el gen *Cit b* que se deben mencionar.

Comparación de los genes citocromo *b* y citocromo oxidasa *c* subunidad I

De las 1139 pares de bases (pb) del gen *Cit b*, 792 (68.92 %) estuvieron invariables en todas las muestras, mientras que del fragmento de 657 pb del gen *COI* lo estuvieron 498 (75.79 %). Asimismo, 235 (20.45 %) sitios del gen *Cit b* fueron filogenéticamente informativos, mientras que en el *COI* lo fueron 104 (15.82%). Estos resultados son similares a los reportados por Tobe et al. (2009) que al comparar las secuencias de estos

dos genes completos en 236 especies de mamíferos encontraron que el gen *Cit b* es más variable, lo que demuestra que el uso de este gen en mamíferos puede brindar más información.

Por otro lado, los estadísticos de MP, número de pasos del árbol más parsimonioso, el número de árboles obtenidos y los valores de los diferentes índices, indican que el gen *COI* muestra menos homoplasia, esto es, caracteres compartidos sin ancestría común. Por ejemplo, los dos árboles obtenidos con el gen *COI* tienen una longitud de 228 pasos y un índice de homoplasia = 0.1916, mientras que los cuatro árboles del *Cit b* tienen 545 pasos y un índice de homoplasia = 0.3558. Sin embargo, esto se puede deber a que solamente se está ocupando una pequeña parte de la información contenida en el citocromo oxidasa c subunidad I (657 de 1542 pb), mientras que el gen *Cit b* se está utilizando casi todo (1139 pb). Además, es importante recordar que el ADN mitocondrial si se utiliza en análisis filogenéticos suele producir una gran cantidad de homoplasia (Galtier et al., 2006).

Asimismo, el análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos de ambos genes produjo árboles con topologías muy similares (Fig. 37), donde se separan en clados diferentes las muestras de *D. virginiana* y las *D. marsupialis* con altos valores bootstrap. Sin embargo, el gen *Cit b* completo tiene mayor resolución para detectar diferencias al interior de las dos especies. Por ejemplo, el *COI* agrupa las muestras de Escuinapa, Tlacotalpan, REPSA, Izta-Popo, Tlalpan, Cosoltepec, Montecillo Santa Cruz, Omiltemi, Mixtepec y Monterrey en un solo subclado, mientras que *Cit b* agrupa estas muestras en cuatro subclados. Esto podría ser consecuencia de ocupar sólo una parte de la información del gen *COI* en este análisis ó a que estos genes tienen diferentes tasas de sustitución.

Aunque los resultados de este trabajo demuestran que el análisis de las secuencias de los genes mitocondriales *Cit b* y *COI* bajo diferentes criterios puede identificar exitosamente las muestras de los tlacuaches *D. virginiana* y *D. marsupialis*, la aplicación de

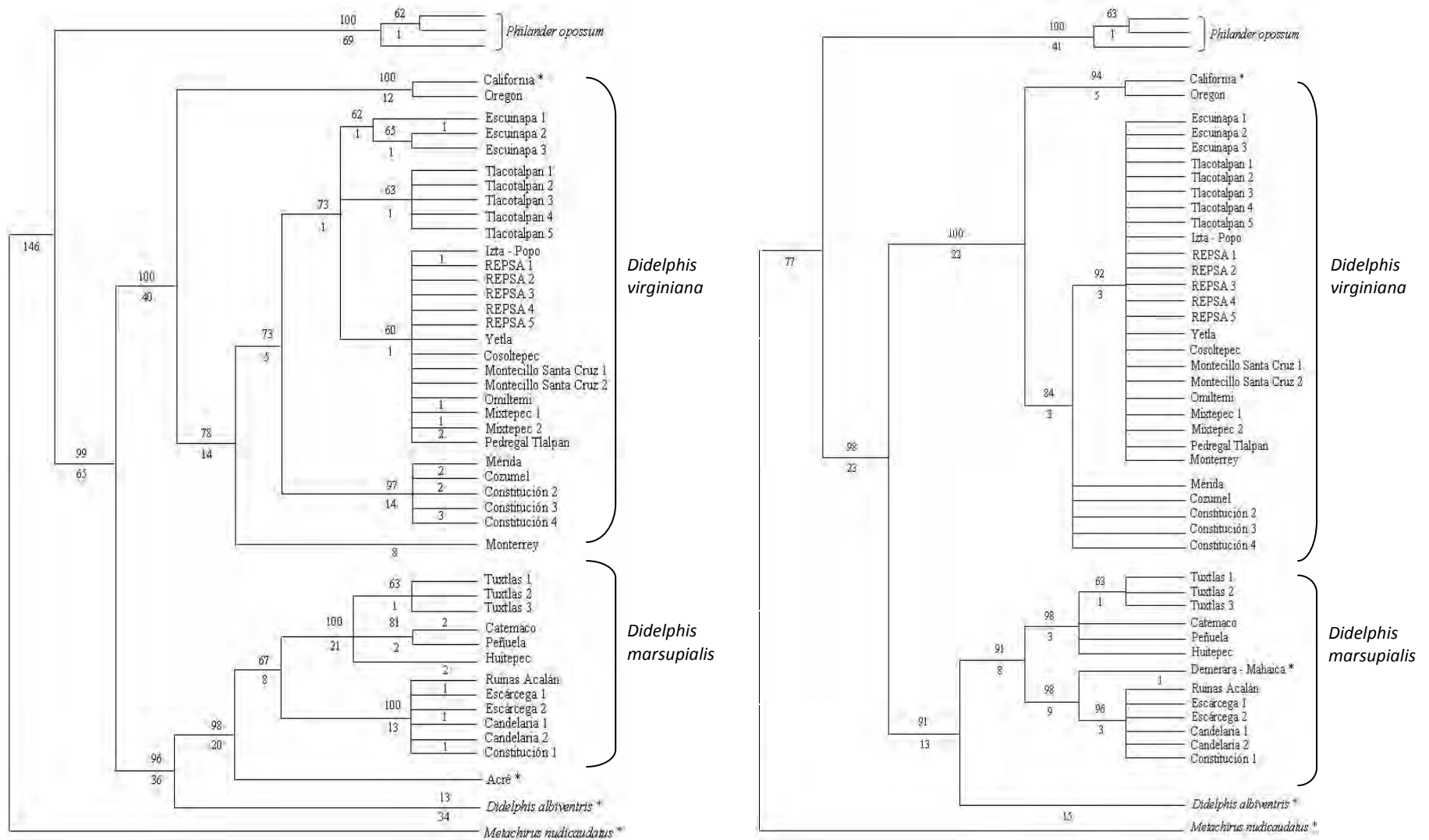


Figura. 37. Árboles de consenso estricto generados para muestras del género *Didelphis* utilizando secuencias de los genes citocromo *b* (izquierda) y citocromo oxidasa *c* subunidad I (derecha). Los números arriba y debajo de las ramas corresponden a los valores de bootstrap y al número de cambios. * Secuencias tomadas de Genbank.

esta herramienta no debe sustituir un análisis morfológico completo, sino que deben ser análisis complementarios (Hebert et al., 2004b).

Integración de los criterios morfológicos y moleculares

De acuerdo, a los criterios morfológicos, externos y craneales, se identificó que 13 de los 17 ejemplares colectados pertenecían a la especie de *Didelphis virginiana* y 4 a *D. marsupialis*. La identificación molecular, de estos individuos coincide con lo encontrado con base en la morfología. En individuos que fueron identificados como *D. virginiana* con base en los criterios morfológicos que Gardner (1973) propuso, se obtuvieron los patrones de digestión esperados, para *D. virginiana* según el software NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003), tres fragmentos (628, 423 y 98 pb) con la enzima *HaeIII* y dos (621, 528 pb) con la enzima *TaqI*. Similarmente, en los individuos identificados como *D. marsupialis* se obtuvieron los patrones de digestión esperados para esta especie, cuatro fragmentos (629, 360, 97 y 63 pb) con la enzima *HaeIII* y dos (951 y 198 pb) con la *TaqI*. Además, los sitios de corte de las enzimas en estos individuos fueron corroborados con las secuencias correspondientes. Por otro lado, el análisis filogenético de las secuencias de los genes mitocondriales *Cyt b* y *COI* separó en clados diferentes las muestras de ambas especies, las que pertenecían a *D. virginiana* en uno y las *D. marsupialis* en otro, y está soportado por valores de bootstrap mayores al 80 %.

La coincidencia entre los dos criterios podría sugerir que los caracteres morfológicos que se documentan en la literatura pueden ser adecuados para la identificación de estas especies. Sin embargo, aquí se reportan varios ejemplos donde los caracteres morfológicos dejan incertidumbre sobre la identificación específica de algunos ejemplares. Por ejemplo, en el ejemplar (CNMA 45117) colectado en Yetla, Guerrero que presentaba características “diagnósticas” de *D. marsupialis*, cachete amarillo pálido, pelo de guardia sobre la línea media y extensión posterior del hueso lacrimonasal en forma de una línea recta

(Gardner, 1973), que por distribución sólo podía pertenecer a la especie *D. virginiana*; presentó un patrón de digestión de tres fragmentos (628, 423 y 98 pb) con la enzima de *HaeIII* y de dos (621, 528 pb) con la *TaqI*, que eran los esperados para *D. virginiana* según las predicciones del software NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003). Asimismo, el análisis filogenético realizado con las secuencias de los genes *Cit b* y *COI* colocó esta muestra en el clado de *D. virginiana*, soportado por valores de 99-100 % de bootstrap. Por otra parte, la distancia genética entre esta muestra y las demás de *D. virginiana* (0.0-2.9 %) era menor la distancia encontrada entre esta muestra y cualquiera de las de *D. marsupialis* (11.1-11.5 %), confirmando que no pertenece a esta especie a pesar de las similitudes morfológicas encontradas.

Similarmente, el ejemplar (CNMA 45110) colectado en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” presentaba externamente características diagnósticas de *D. marsupialis* (Gardner, 1973), cachete amarillo claro y pelo de guardia concentrado sobre la línea media, mientras que en el cráneo presenta características de *D. virginiana*, sutura maxilo-frontal alineada con los huesos nasal y lacrimal, huesos nasales anchos y terminando en un ángulo agudo y la extensión dorsal del hueso palatino ancha. Este ejemplar fue asignado a la especie *D. marsupialis* por presentar la extensión posterior del hueso lacrimal en forma de una línea recta, según Gardner (1973) este es el carácter diagnóstico más importante. Por otra parte, tanto el análisis de restricción como el análisis filogenético confirmaron que pertenecía a esta especie. Las enzimas de restricción produjeron los patrones esperados para *D. marsupialis*, 629, 360, 97 y 63 pb con la enzima *HaeIII* y 951 y 198 pb con la *TaqI*. Asimismo, la secuencia de este individuo se colocó en el clado de *D. marsupialis* en los diferentes análisis (parsimonia, máxima verosimilitud y distancias) con valores altos de bootstrap. Similarmente, los valores de divergencia genética entre esta muestra y las de *D. marsupialis* son muy pequeños en comparación con los valores obtenidos entre esta muestra y las de *D. virginiana*, confirmando que no pertenecía a esta especie.

Por otro lado, hubo 4 ejemplares que habían sido identificados erróneamente como *D. marsupialis* utilizando caracteres morfológicos en otras colecciones biológicas y que en los análisis moleculares resultaron ser muestras de *D. virginiana*. Éstas presentaron un patrón de digestión de tres bandas (628, 423 y 98 pb) con la enzima *HaeIII* y de dos (621, 528 pb) con la *TaqI*. Asimismo, éstas muestras se encuentran en el clado de *D. virginiana* tanto en el análisis con el *Cit b* como con el *COI*, el cual está soportado por valores altos de bootstrap (99-100 %). Similarmente, Catzefflis et al. (1997) al examinar morfológica y molecularmente (a través de una sonda de ADN) 160 ejemplares del género *Didelphis* en Guyana Francesa identificaron con base en la morfología externa 29 ejemplares como *D. albiventris* (donde 3 fueron identificados molecularmente como *D. marsupialis*) y 131 como *D. marsupialis* (donde 5 fueron identificados genéticamente como *D. albiventris*). La concordancia entre los dos métodos en ese estudio fue del 95 % (152 ejemplares) mientras que en el presente fue del 90.2 % (37 ejemplares).

Estos últimos ejemplos son una prueba contundente de que los análisis taxonómicos deben incluir tanto información morfológica como molecular para poder tener la certeza de que la identificación a nivel específico, tanto en el campo como en las colecciones científicas, de estas dos especies de tlacuache es correcta. Asimismo, la elección de un método para distinguir molecularmente entre *D. virginiana* y *D. marsupialis* dependerá en gran medida de la aplicación que se le quiera dar a esta información y del lugar donde se lleve a cabo la investigación. Por último, cabe mencionar que los resultados de este trabajo sugieren que molecularmente estas dos especies de tlacuache se pueden reconocer siguiendo el concepto filogenético de especie.

Concepto Filogenético de Especie

Según este concepto, una especie se define como un grupo de organismos que comparten uno o más caracteres derivados (sinapomorfías) y quizás un patrón de ancestría descendencia (Agapow et al., 2004). En este caso *D. virginiana* se puede definir

con la presencia de 40 y 22 sinapomorfías, cambios en las secuencias de nucleótidos (transiciones y transversiones), en el análisis filogenético de los genes mitocondriales *Cit b* y *COI* respectivamente (Apéndices VIII y IX); y en los RFLPs con un sitio de corte para la enzima *TaqI* en la posición 528. En contraste *D. marsupialis* se define con 20 sinapomorfías con el *Cit b* y 8 con el *COI*. Asimismo, en los RFLPs esta especie tiene un sitio de corte para la enzima *TaqI* en la posición 951 y otro para la enzima *HaeIII* en la posición 691. Por lo tanto, siguiendo el concepto filogenético de especie éstas son dos especies reconocibles.

CONCLUSIONES

Las características morfológicas utilizadas para distinguir a *D. virginiana* y *D. marsupialis* presentan una variación intraespecífica mayor a la reportada en estudios previos lo que dificulta la identificación específica.

Sin embargo, se logró el objetivo de distinguir molecularmente estas dos especies de tlacuache utilizando marcadores moleculares, pues:

Se confirmó la hipótesis de que se pueden encontrar diferencias en la secuencia de nucleótidos de estos tlacuaches ya que los patrones de restricción obtenidos fueron diferentes. Asimismo, se confirmó la hipótesis de que las secuencias de genes mitocondriales analizadas filogenéticamente pueden separar las muestras de *D. virginiana* y *D. marsupialis* en clados diferentes.

Por lo tanto, los linajes evolutivos a los que pertenecen estos tlacuaches confirman que son taxones diferentes de acuerdo con el concepto filogenético de especie, aunque son morfológicamente muy similares.

RECOMENDACIONES

El siguiente paso consistirá en obtener muestras de tejidos de estas dos especies de tlacuache a lo largo de toda su área de distribución geográfica para tenerlos bien representados en estudios posteriores. Es importante que este muestreo incluya localidades en donde las dos especies se encuentren en simpatria.

LITERATURA CITADA

- AGAPOW, P. M., O. R. P. BININDA-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(2): 161-179.
- ALLEN, J. A. 1901. A preliminary study of the North American opossums of the genus *Didelphis*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 14: 149-88.
- ARANDA, M. 2000. Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, México, 212 pp.
- ARELLANO, E., D. S. ROGERS, Y F. X. GONZÁLEZ-CÓZATL. 2006. Sistemática molecular del género *Reithrodontomys* (Rodentia: Muridae). *New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin*, 32: 27-35.
- BRADLEY, R. D., Y R. J. BAKER. 2001. A test of genetic species concept: cytochrome *b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*, 82: 960- 970.
- BORISENKO, A. V., B. K. LIM, N. V. IVANOVA, R. H. HANNER, Y P. D. N. HEBERT. 2008. DNA barcoding in survey of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology*, 8(3): 471-479.
- CATZEFELIS, F., C. RICHARD-HANSEN, C. FOURNIER-CHAMBRILLON, A. LAVERGNE, Y J. VIE. 1997. Biométre, reproduction et sympatrie chez *Didelphis marsupialis* et *D. alviventris* en Guyane Francaise (Didelphidae: Marsupialia). *Mammalia*, 61(2): 231-243.
- CERQUEIRA, R. 1985. The distribution of *Didelphis* in South America (Polyprodonia, Didelphidae). *Journal of Biogeography*, 12: 135-145.

- CERQUEIRA, R., Y B. LEMOS. 2000. Morphometric differentiation between Neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Mammalia*, 64(3): 319-327.
- CHAGMEX, 2010. Base de datos Bibliográfica en línea sobre la Enfermedad de Chagas. Instituto de Biología, UNAM (<http://www.unibio.unam.mx>).
- CLARE, E. L., B. K. LIM, M. D. ENGSTROM, J. L. EGERT, Y P. D. N. HEBERT. 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*, 7: 184-190.
- COLCHERO, F., G. O'FARRIL, Y R. A. MEDELLÍN. 2005. *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758. Pp. 106-108, *in*: Los mamíferos silvestres de México (G. Ceballos y G. Oliva, eds.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica, México D. F.
- CYWINSKA, A., F. F. HUNTER, Y P. D. N. HEBERT. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20: 413-424.
- DAVIS, W. B. 1944. Notes on Mexican Mammals. *Journal of Mammalogy*, 25:370-403.
- DE QUEIROZ, K. 2007. Species concepts and Species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6): 79-886.
- DRAGOO, J. W., D. K. MATTHES, A. ARAGON, C. C. HASS, Y T. L. YATES. 2004. Identification of Skunk Species Submitted for Rabies Testing in the Desert Southwest. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(2): 371-376.
- EISENBERG, J. F. 1989. *Mammals of the Neotropics. Volumen I. The Central Neotropics.* University of Chicago Press, Chicago, U. S. A., 611 pp.
- EMMONS, L. H. 1990. *Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide.* The University of Chicago Press, Chicago, U. S. A., 307 pp.
- ESPAÑA, M. P., GONZÁLEZ, A., O. G. ALVARADO, Y J. LOZANO. 2008. Identificación molecular de especies crípticas de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de importancia agrícola en México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 24(1): 1-14.
- FAGUNDES, V., Y C. NOGUEIRA. 2007. The use of PCR-RFLP as an identification tool for three closely related species of rodents of the genus *Akodon* (Sigmodontinae, Sigmodontini). *Genetic and Molecular Biology*, 30(3): 698-701.

- FELDHAMER, G. A., L. C. DRICKAMER, S. H. VESSEY, J. F. MERRITT, Y C. KRAJEWSKI. 2007. Mammalogy: Adaptation, diversity and ecology. John Hopkins U. P., Baltimore, U. S. A., 643 pp.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- GALTIER, N., D. ENARD, Y. RADONDY, E. BAZIN Y K. BELKHIR. 2006. Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA. *Genome Research*, 16: 215-222.
- 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. 2005. Order Didelphimorphia. Pp. 3-18, *in*: Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference. Volumen I. (D. E. Wilson y D. M. Reeder, eds.). Johns Hopkins University Press, Baltimore, U. S. A.
- HAIJBABAEI, M., D. H. JANZEN, J. M. BURNS, W. HALLWACHS, Y P. N. HEBERT. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 103(4): 968-971.
- HALL, E. R. 1951. American weasels. University of Kansas Museum of Natural History Publications, 4: 1-466.
- HALL, E. R. 1981. The Mammals of North America. Wiley Interscience, New York, U. S. A., 1181 pp.
- 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.
- 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 Natural Academy of Sciences*, 101: 14812-14817.
- HEBERT, P. D. N., M. Y STOECKLE, T. S. ZEMLAK, Y C. F. FRANCIS. 2004. Identification of Bird through DNA Barcodes. *PLOS Biology*, 2(10): 1657-1663.
- IVANOVA, N. V., T. S. ZEMLAK, R. H. HANNER, Y P. D. HEBERT. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7: 544-548.
- JANSA, S. A., Y R. S. VOSS. 2000. Phylogenetic studies on Didelphid marsupials I. Introduction and preliminary results from nuclear IRBP gene sequences. *Journal of Mammalian Evolution*, 7(1):43-77.

- KERR, K. C. R., M. Y. STOECKLE, C. J. DOVE, L. A. WEIGT, C. M. FRANCIS, Y P. D. N. HEBERT. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American Birds. *Molecular Ecology Notes*, 7: 535-543.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- KIRSCH, J. A. W., R. E. BLEIWEISS, A. W. DICKERMAN, Y O. A. REIG. 1993. DNA/DNA Hybridization Studies of Carnivorous Marsupials III. Relationships Among Species of *Didelphis* (Didelphidae). *Journal of Mammalian Evolution*, 1(1): 75-97.
- KNOWLES, L. L., Y B. C. CARTENS. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, 56(6): 887-895.
- KRAUSMAN, P. R., M. I. GRINDER, P. S. GIPSON, G. L. ZUERCHER, Y G. C. STEWART. 2006. Molecular identification of coyote feces in an urban environment. *The Southwestern Naturalist*, 51(1): 122-126.
- KUEHN, R., G. SCHWAB, W. SCHROEDER, Y O. ROTTMANN. 2000. Differentiation of *Castor fiber* y *Castor canadensis* by noninvasive molecular methods. *Zoo Biology*, 19: 511-515.
- LAVERGNE, A., O. VERNEAU, J. L. PATTON, Y F. M. CATZEFLIS. 1997. Molecular discrimination of two sympatric species of opossum (genus *Didelphis*: Didelphidae) in French Guiana. *Molecular Ecology*, 6: 889-891.
- LEMONS, B., Y R. CERQUEIRA. 2002. Morphological differentiation in the white-eared opossum group (Didelphidae: *Didelphis*). *Journal of Mammalogy*, 83(2): 354-369.
- LIM, B. K., M. D. ENGSTROM, J. C. PATTON, Y J. W. BICKHAM. 2009. Molecular phylogenetics of Reig's short-tailed opossum (*Monodelphis reigi*) and its distributional range extension into Guyana. *Mammalian Biology*, en prensa.
- LISSOVSKY, A. A., N. V. IVANOVA, Y A. V. BORISENKO. 2007. Molecular Phylogenetics and taxonomy of the pika (*Ochotona*, Lagomorpha). *Journal of Mammalogy*, 88(5): 1195-1204.
- LITVAITIS, M. K. Y J. A., LITVAITIS. 1996. Using mitochondrial DNA to inventory the distribution of the remnant populations of New England cottontails. *Wildlife Society. Bulletin*, 24: 725-730.
- MACDONALD, D. W. 1991. *Animales del mundo VI. Insectívoros y Marsupiales*. Ediciones Folio/Ediciones Orbis, Madrid.

- MACHADO, J., F. DE MELO, A. DITCHFIELD, Y J. STENGHEL. 2005. The use of PCR-RFLP as an identification tool for two closely related species of bats of genus *Platyrrhinus*. *Genetics and Molecular Biology*, 28(1): 120-122.
- McMANUS, J. J. 1974. *Didelphis virginiana*. *Mammalian Species*, 40: 1- 6.
- MEYNARD, A. P., R. E. PALMA, Y E. RIVERA-MILLA. 2002. Phylogenetic relationships of the Chilean llacas of the genus *Thylamys* (Marsupialia, Didelphidae) based in sequences of the cytochrome b mitochondrial gene. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75: 299-306.
- MILLS, L. S., K. L. PILGRIM., M. K. SCHWARTZ, Y K. MCKELVEY. 2000. Identifying lynx and other North American felids based on MtDNA analysis. *Conservation Genetics*, 1: 285-288.
- 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: 54-67
- NUNES, C., J. M. AYRES, I. SAMPAIO, Y H. SCHNEIDER. 2006. Molecular discrimination of the pouched four – eyed opossum from the Mamirauá Reserve in the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (2): 283-286.
- ORTEGA, J. 2006. Estudios moleculares en murciélagos inferencias basadas en ADN mitocondrial y Microsatélites. *New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin* 32: 1-7.
- PATTON, J. L., S. F. DOS REIS, Y M. N DA SILVA. 1996. Relationships Among Didelphid Marsupials Base on Sequence Variation in the Mitochondrial Cytochrome *b* Gene. *Journal of Mammalian Evolution*, 3(1): 3-29
- PATTON, J. L. Y M. N. F. DA SILVA. 1997. Definition of species of pouched four- eyed opossum (*Didelphidae*, *Philander*). *Journal of Mammalogy*, 78(1): 90-102.
- PATTON, J. L. Y L. P. COSTA. 2003. Molecular Phylogeography and species limits in rainforest Didelphid marsupials of South America. Pp. 63-81, *in*: *Predators with pouches: The Biology of Carnivorous Marsupials*. (M. Jones, C. Dickerman, y M. Archer, eds). CSIRO, Collingwood, Australia.
- PAXINOS, E., C. MCINTOSH, K. RALL, Y R. FLEISCHER. 1997. A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology*, 6: 483-486.
- POSADA, D., Y CRANDALL, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9): 817-818.

- RENTERÍA, M. 2006. Breve revisión de los marcadores moleculares. Pp. 541-566, *in*: Ecología Molecular. (L. E. Eguiarte, V. Sousa, y X. Aguirre, eds.). Instituto Nacional de Ecología/ CONABIO, México.
- RIDDLE, A. E., K. L. PILGRIM, L. S. MILLS, K. S. MCKELVEY, Y L. F. RUGGIERO. 2003. Identification of mustelids using mitochondrial DNA and non-invasive sampling. *Conservation Genetics*, 4: 241-243.
- RUIZ-PIÑA, H., Y A. CRUZ-REYES, 2002. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatan, México. *Memories of the Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 97(5): 613- 620
- SANBROOK, J., Y D. W. RUSSELL. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, U. S. A., 999 p.
- SAVOLAINEN, V., R. S. COWAN, A. P. VOGLER, G. K. RODERICK, Y R. LANE. 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1805-1811.
- SHAW, C. L., P. J. WILSON, Y B. N. WHITE. 2003. A reliable molecular method of gender determination for mammals. *Journal of Mammalogy*, 84(1): 123-128.
- SIMPSON, G. G. 1974. Notes on Didelphidae (Mammalia, Marsupialia) from the Hautyquerian (Pliocene) of Argentina. *American Museum Novitates*, 2259: 1-15.
- SOLARI, S. 2007. New species of *Monodelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae) from Peru, with notes on *M. adusta* (Thomas, 1897). *Journal of Mammalogy*, 88(2): 319-329.
- SPRINGER, M. S., M. WESTERMAN, Y KIRSCH. J. A. W. 1994. Relationship among orders and families of marsupials based 12S ribosomal DNA sequences and the timing of the marsupial radiation. *Journal of Mammalian Evolution*, 2: 85-115.
- STEINER, C., Y F. M. CATZEFLIS. 2003. Mitochondrial diversity and Morphological Variation of *Marmosa murina* (Didelphidae) in French Guiana. *Journal of Mammalogy*, 84(3): 822-831.
- ST-PIERRE, C., J. P. OUELLET, F. DUFRESNE, A. CHAPUT-BARDY, Y F. HUBERTF. 2006. Morphological and molecular discrimination of *Mustela erminea* (ermine) and *M. frenata* (long-tailed weasels) in Eastern Canada. *Northeastern Naturalist*, 13(2):143-152.
- SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Inglaterra, 144 pp.

- TAMURA, K., Y M. NEI. 1993. Model selection in the estimation of the number of nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI, Y S. KUMAR. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.
- VAUGHAN, T. A., J. M. RYAN, Y N. J. CAPZAPLEWSKI. 2000. *Mammalogy*. Saunders Company, Toronto, Canadá, 565 pp.
- VENCES, M., M. THOMAS, R. M. BONETT Y D. R. VIETITES. 2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1859-1868.
- VENTURA, J., M. SALAZAR, R. PÉREZ HERNÁNDEZ, Y M. J. LÓPEZ FUSTER. 2002. Morphometrics of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in Venezuela. *Journal of Mammalogy*, 83(4): 1087-1096.
- VILLA, B., Y F. A. CERVANTES. 2003. *Los mamíferos de México*. Grupo Editorial Iberoamericana S. A. de C. V. /Instituto de Biología, UNAM., México.
- VINCZE, T., J. POSFAI, Y R. J. ROBERTS. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31: 3688-3691.
- VIZOTTO L. D., Y V. A. TADDEL. 1973. Chave para a determinação de quirópteros brasileiros. *Boletim Ciência (São José do Rio Preto)*, 1: 1-72.
- 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
- WARD, R. D., T. S. ZEMLAK, B.H. INNES, P. R. LAST, Y P. D. N. HEBERT. 2005. DNA barcoding Australias's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 360: 1847-1857.
- WIENS, J. J., Y M. R. SERVEDIO. 2000. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proceeding of the Royal Society of London*, 267: 631-636.
- WIENS, J. J. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology*, 56(6): 875-878.

ZARZA, H., Y R. A. MEDELLÍN 2005. *Didelphis virginiana* Kerr 1792. Pp. 108-110, *in*: Los mamíferos silvestres de México. (G. Ceballos. y G. Oliva eds). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Fondo de Cultura Económica, México D. F.

APÉNDICE I

Ejemplares de tlacuache (Mammalia: Didelphimorphia) colectados en México que fueron utilizados en la identificación molecular de dos especies del género *Didelphis*. CATCO = número de catálogo cronológico de la Colección Nacional de Mamíferos (CNMA); FAC = número de catálogo personal de Fernando A. Cervantes; PRE = preservación; P/E = Piel y esqueleto; T = Tejidos; Mpio. = Municipio; ♂ = Macho; ♀ Hembra; ¿ = desconocido.

CATCO	Especie	Sexo	Medidas	Localidad	PRE	Fecha de colecta
CNMA 45109	<i>Didelphis marsupialis</i>	♀	773-380-51-57≡700	VERACRUZ: Sendero Darwin 100 m, Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” 19.2 Km. NE Catemaco, Mpio. San Andrés Tuxtla, 90 m. N 18°35′2.9″, W 95° 04′26.1″.	P/E, T	17 Enero 2008
CNMA 45110	<i>Didelphis marsupialis</i>	♂	810-440-62-68≡1700	VERACRUZ: Sendero Darwin 100 m, Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” 19.2 Km. NE Catemaco, Mpio. San Andrés Tuxtla, 90 m. N 18°35′2.9″, W 95° 04′26.1″.	P/E, T	17 Enero 2008
CNMA 45111	<i>Didelphis marsupialis</i>	♂	828-428-57-66≡1400	VERACRUZ: Sendero Darwin 100 m, Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” 19.2 Km. NE Catemaco, Mpio. San Andrés Tuxtla, 90 m. N 18°35′2.9″, W 95°04′26.1″.	P/E, T	18 Enero 2008

CNMA 45112	<i>Didelphis marsupialis</i>	♀	796-398-69-66≡1300	VERACRUZ: Peñuela. Mpio. Amatlán de los Reyes, 628 m. N 18°51'38.8'', W 96°54'9.7''.	P/E, T	13 Enero 2008
CNMA 45114	<i>Didelphis virginiana</i>	♂	700-310-47-67≡1300	DISTRITO FEDERAL: Espacio Escultórico, Reserva del Pedregal de San Ángel, Ciudad Universitaria. Coyoacán, 2313 m. N 19°19'14.4'', W 99°10'39.8''.	P/E, T	29 Junio 2008
CNMA 45115	<i>Didelphis virginiana</i>	♂	868-373-65-48≡2500	DISTRITO DEFERAL: Estadio de Béisbol, Reserva del Pedregal de San Ángel, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 2308 m. N 19°19'31'', W 99°11'21''.	P/E, T	14 Febrero 2008
CNMA 45116	<i>Didelphis virginiana</i>	♀	770-350-41-61≡1900	DISTRITO FEDERAL: Estadio de Béisbol, Reserva del Pedregal de San Ángel, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 2313 m. N 19°19'14.4'', W 99°10'46.6''.	P/E, T	9 Septiembre 2008
	<i>Didelphis virginiana</i>	♂	Sin medidas	DISTRITO FEDERAL: Espacio Escultórico, Reserva del Pedregal de San Ángel, Ciudad Universitaria, Coyoacán. N 19°19'14.4'', W 99°11'0.4''.	Oreja	16 Agosto 2008
	<i>Didelphis virginiana.</i>	♀	Sin medidas	DISTRITO FEDERAL: Jardín Botánico Exterior, Reserva del Pedregal de San Ángel, Ciudad Universitaria, Coyoacán. N 19°18'53.5.7'', W 99°11'51.9''.	Oreja	12 Septiembre 2008

CNMA 45117	<i>Didelphis virginiana</i>	♂	849-400-73-50≡1710	GUERRERO: Hotel y Villas "Las Flores" carretera federal Acapulco- Zihuatanejo 2.7 Km SW Yetla, Mpio. Coyuca de Benítez, 10 m. N 16°58'20.9'', W 100°00'53.0''.	P/E, T	17 Febrero 2009
CNMA 45119	<i>Didelphis virginiana</i>	♀	675-265-58-50≡1100	MÉXICO: Campamento Ecoturístico "El Vivero", Parque Nacional Izta-Popo 6.6 Km SE Amecameca, Mpio. Amecameca, 2849 m. N 19°06'5.1, W 98° 41'44.1''.	P/E, T	3 Febrero 2008
CNMA (FAC 3826)	<i>Didelphis virginiana</i>		Sin medidas	NUEVO LEÓN: Domicilio Particular, Mpio. Monterrey, 470 m. N 25°37'26.24'', W 100°17'24.59''.	Oreja	10 Agosto 2009
CNMA 45120	<i>Didelphis virginiana</i>	♀	730-350-40-52≡1100	SINALOA: Granja "Joshe" 1.8 Km. S Escuinapa de Hidalgo, Mpio. Escuinapa de Hidalgo, 11 m. N 22°49'16.6'', W 105°47'15.2''.	P/E, T	10 Enero 2008
CNMA 45121	<i>Didelphis virginiana</i>	♂	640-310-30-55≡900	SINALOA: Granja "Joshe" 1.8 Km. S Escuinapa de Hidalgo, Mpio. Escuinapa de Hidalgo, 11 m. N 22°49'16.6'', W 105°47'15.2''.	P/E, T	10 Enero 2008
CNMA 45122	<i>Didelphis virginiana</i>	♂	880-420-50-67≡2500	SINALOA: Rancho "La Papalota" 3.1 Km. SE Teacapan, Mpio. Escuinapa de Hidalgo, 5 m. N 22°32'51.9'', W 105°44'43.5''.	P/E, T	8 Enero 2008

CNMA 45123	<i>Didelphis virginiana.</i>	♂	840-385-66-57	VERACRUZ: Panteón Municipal de Tlacotalpan, Mpio. Tlacotalpan, 3 m. N 18° 37'8.4'', W 95° 39'40.4''.	P/E, T	28 Octubre 2008
CNMA 45124	<i>Didelphis virginiana.</i>	♂	910-415-70-50	VERACRUZ: Panteón Municipal de Tlacotalpan, Mpio. Tlacotalpan, 3 m. N 18° 37'8.4'', W 95° 39'40.4''.	P/E, T	28 Octubre 2008
CNMA 45125	<i>Didelphis virginiana</i>	♀	880-410-65-54	VERACRUZ: Panteón Municipal de Tlacotalpan, Mpio. Tlacotalpan, 3 m. N 18° 37'8.4'', W 95° 39'40.4''.	P/E, T	28 Octubre 2008
CNMA 45126	<i>Didelphis virginiana</i>	♀	860-385-66-55	VERACRUZ: Panteón Municipal de Tlacotalpan, Mpio. Tlacotalpan, 3 m. N 18° 37'8.4'', W 95° 39'40.4''.	P/E, T	28 Octubre 2008
CNMA 45127	<i>Didelphis virginiana</i>	♂	920-426-77-52	VERACRUZ: Panteón Municipal de Tlacotalpan, Mpio. Tlacotalpan, 3 m. N 18° 37'8.4'', W 95° 39'40.4''.	P/E, T	28 Octubre 2008
CNMA 45128	<i>Philander opossum</i>	♂	623-324-31-48=600	VERACRUZ: Sendero Darwin 100 m, Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas" 19.2 Km. NE Catemaco, Mpio. San Andrés Tuxtla, 90 m. N 18°35'2.9'', W 95° 04'26.1''.	P/E, T	16 Enero 2008
CNMA 45129	<i>Philander opossum</i>	♂	685-358-55-46	VERACRUZ: Río Los Pocitos, Laguna Escondida, Mpio. San Andrés Tuxtla, 106 m. N 18°38'29.6'', W 95°05'14.9''.	P/E, T	8 Marzo 2008

CNMA 45130	<i>Philander opossum</i>	♂	596-292-46-33	VERACRUZ: Río Piso, Playa Escondida, carretera Sontecomapan-Montepío, Mpio. San Andrés Tuxtla, 3 m. N 18°34'43.4'', W 95° 03'40.9''.	P/E, T	13 Marzo 2008
---------------	------------------------------	---	---------------	---	--------	---------------

APENDICE II

Muestras de tejidos congelados de tlacuaches del género *Didelphis* en préstamo permanente provenientes de colecciones mastozoológicas nacionales y extranjeras. CATCO = número de catálogo cronológico; FAC = número de catálogo Fernando A. Cervantes; Mpio. = Municipio

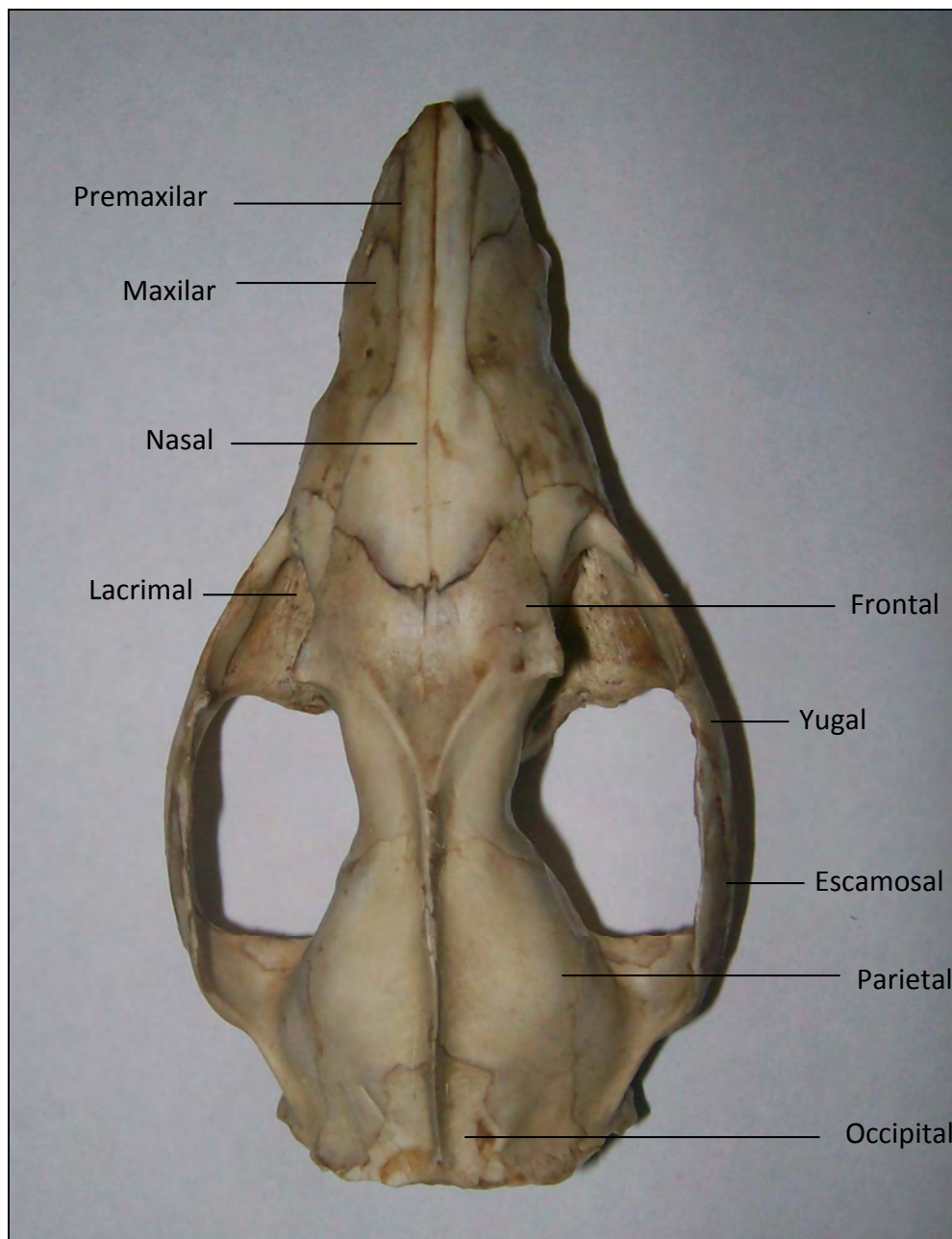
CATCO	Especie	Fecha de colecta	Localidad
Colección Nacional de Mamíferos (CNMA), Instituto de Biología UNAM			
CNMA (FAC 1929)	<i>Didelphis virginiana</i>	10 Septiembre 2002	DISTRITO FEDERAL: Bosque del Pedregal, Tlalpan.
CNMA (FAC 2003)	<i>Didelphis virginiana</i>	22 Octubre 2003	GUERRERO: Cañada de la Perra 0.28 Km. NW Omiltemi, Mpio. Chilpancingo de los Bravo, 2014 m. N 17°33'34.8'', W 99°41'26''.
CNMA 43475	<i>Didelphis marsupialis</i>	29 Octubre 2005	VERACRUZ: Ejido Adolfo López Mateos, Mpio. Catemaco, 181 m. N 18°26'17.3'', W 94°57'54.9''.
CNMA 44179	<i>Didelphis virginiana</i>	23 Noviembre 2005	OAXACA: San Pedro Mixtepec 18 Km. N Puerto Escondido, Mpio. San Pedro Mixtepec-Distrito 22, 222 m. N 15°59'20.4'', W 97°10'06.4''.
CNMA 44180	<i>Didelphis virginiana</i>	04 Mayo 2006	OAXACA: San Pedro Mixtepec 18 Km. N Puerto Escondido, Mpio. San Pedro Mixtepec-Distrito 22, 222 m. N 15°59'20.4'', W 97°10'06.4''.
CNMA 45141	<i>Didelphis virginiana</i>	21 Enero 2007	OAXACA: Barranca Amarilla 1.05 Km S, 3.75 Km W Cosoltepec, Mpio. Cosoltepec, 1650 m. N 18°08'1.0'', 97°49'31.0''.
Colección Mastozoológica de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal de las Casas, Chiapas (ECO-SC-M).			

ECO-SC-M 744	<i>Didelphis marsupialis</i>	19 Junio 1999	CHIAPAS: Reserva Ecológica Huitepec, ladera W, 2 Km NE de la carretera San Cristóbal-San Juan Chamula, Mpio. San Cristóbal de las Casas, 2340 m. N 16°44', W 92°54'.
ECO-SC-M 1862	<i>Didelphis virginiana</i>	14 Agosto 2007	OAXACA: Comunidad Montecillo Santa Cruz, Mpio. San Francisco del Mar, 21 m. N 16°22'05.2'', W 94° 35'15.3''.
ECO-SC-M 1867	<i>Didelphis virginiana</i>	14 Agosto 2007	OAXACA: Comunidad Montecillo Santa Cruz, Mpio. San Francisco del Mar, 6 m. N 16°22'05.2'', W 94° 35'15.3''.
Colección Mastozoológica de la Universidad Autónoma de Yucatán (FMVZ – UADY)			
Docencia	<i>Didelphis virginiana</i>	10 Diciembre 2007	YUCATÁN: Domicilio Particular, Mpio. Mérida.
Angelo State University, Natural History Collections (ASNHC)			
ASNHC 1276	<i>Didelphis marsupialis</i>	18 Agosto 1970	CAMPECHE: 11 Km S de Candelaria.
ASNHC 1280	<i>Didelphis marsupialis</i>	18 Agosto 1970	TABASCO: 3. 8 Km SW de Ruinas Acalan.
ASNHC 1281	<i>Didelphis marsupialis</i>	18 Agosto 1970	CAMPECHE: 7.5 Km W de Escárcega.
ASNHC 6410	<i>Didelphis marsupialis</i>	18 Agosto 1970	CAMPECHE: 11 Km S de Candelaria.
ASNHC 6413	<i>Didelphis marsupialis</i>	18 Agosto 1970	CAMPECHE: 9.5 Km al S de Constitución.
ASNHC 6416	<i>Didelphis marsupialis</i>	19 Agosto 1970	CAMPECHE: 7. 5 Km W de Escárcega.
Tejido 2589	<i>Didelphis virginiana</i>	18 Agosto 1970	CAMPECHE: 9.5 Km al S de Constitución.

ASNHC 1282	<i>Didelphis virginiana</i>	18 Agosto 1970	QUINTANA ROO: Isla Cozumel, 30 Km x carretera SE de San Miguel.
ASNHC 6421	<i>Didelphis virginiana</i>	18 Agosto 1970	CAMPECHE: 9.5 Km al S de Constitución.
ASNHC 6422	<i>Didelphis virginiana</i>	18 Agosto 1970	CAMPECHE: 9.5 Km al S de Constitución.
Tejido 6475	<i>Didelphis virginiana</i>	Desconocido	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA: Siskiyou National Forest, Curry County, Oregon.

APÉNDICE III

Huesos de un cráneo (vista dorsal) de tlacuache de la especie *Didelphis virginiana* colectado en el Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl, Estado de México (fotografía: J. Arcangeli).



APÉNDICE IV

1. Preparación de geles de agarosa para visualizar ADN (Sanbrook y Rusell 2001, con modificaciones).
 - ❖ Pesar la agarosa de acuerdo a la concentración deseada (1% para extracción de ADN; 1.5 % y 2% para PCR)
 - ❖ Agregar buffer TBE ó TAE 1X
 - ❖ Calentar en horno de microondas hasta que la agarosa se disuelva completamente (aproximadamente 1 min)
 - ❖ Agregar 1 gota de bromuro de etidio para una concentración final de 10 µg/ml
 - ❖ Verter la mezcla en el molde del gel y acomodar el peine
 - ❖ Dejar solidificar el gel de 20 a 25 minutos
 - ❖ Colocar el gel en la cámara de electroforesis y llenarla con buffer TAE ó TBE 1X
 - ❖ Colocar las muestras mezcladas con buffer de carga en cada pozo
 - ❖ Conectar los cables a la cámara de electroforesis y a la fuente de poder
 - ❖ Ajustar el voltaje
 - ❖ Correr de 1 a 2 horas

Cantidad de reactivos para preparar geles de agarosa

Agarosa al 1 %		
	Agarosa (g)	Buffer (ml)
35 ml	0.35	35
Agarosa al 1.5 %		
35 ml	0.53	35

2. Preparación de buffers y soluciones stock

❖ EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), 0.5 M (pH 8)

Disolver 18.1 g de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua

Ajustar a pH 8.0 con 10 N NaOH

❖ NaOH 10 N

Disolver 8 g de NaOH en 20 ml de agua

❖ TBE (Tris-borato-EDTA)

Solución stock 10X, 1 litro:

108 g de Tris base (890 mM)

55 g de ácido bórico (890 mM)

40 ml 0.5 M de EDTA, pH 8.0

Aforar con agua a 1000 ml

APÉNDICE V

Secuencias de los genes citocromo *b* (Cit *b*) y citocromo oxidasa *c* subunidad I (*COI*) tomadas de la base de datos Genbank y sus ejemplares de referencia. CATCO = número de catálogo cronológico; INPA = Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Manaus; MNFS = número de catálogo personal de M. N. F. da Silva; USNM = National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington; ROM = Royal Ontario Museum; MVZ = Museum of Vertebrate Zoology, University of California, Berkeley.

Gen	Taxón	Localidad	Colección y CATCO	No. Acceso
Cit <i>b</i>	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	Brasil: Amazonas; alto Río Urucu. S 4°51', W 65°16''.	INPA – MNFS 40	U34672
	<i>Didelphis virginiana</i>	Estados Unidos de América: University of California, Berkeley	MVZ	Z29573
	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brasil: Acre; Igarapé Poronga, Río Juruá. S 8°40', W 72°47'	MVZ 193439	U34665
	<i>Didelphis albiventris</i>	Venezuela: Aragua; Rancho Grande, 1100 m	USNM	U34667
COI	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	Surinam: Sipaliwini; Bakhuis. N 4.469, W 56.906.	ROM 117525	EU096777
	<i>Didelphis virginiana</i>	Estados Unidos de América: University of California, Berkeley	MVZ	Z29573
	<i>Didelphis marsupialis</i>	Guyana: Demerara-Mahaica; Ceiba Biological Center. N 6.50, W 58.217.	ROM 113762	EU095423
	<i>Didelphis albiventris</i>	Ecuador: Pichincha; Parroquia Conocoto. N -3, W -78.5	ROM 104565	EU095421

APÉNDICE VI

Características morfológicas, externas y craneales, de los 17 ejemplares del género *Didelphis* examinados. En paréntesis se indica la edad del ejemplar.

		1.- Coloración del cachete		
Ejemplar	Sexo	Blanco	Amarillo pálido	Naranja
Escuinapa 1	♂ (adulto)	X		
Escuinapa 2	♀ (joven)		X	
Escuinapa 3	♂ (joven)		X	
REPSA 3	♂ (adulto)	X		
REPSA 4	♂ (adulto)	X		
REPSA 5	♀ (adulto)	X		
Izta-Popo	♀ (joven)	X		
Tlacotalpan 1	♂ (adulto)	X		
Tlacotalpan 2	♂ (adulto)	X		
Tlacotalpan 3	♀ (adulto)	X		
Tlacotalpan 4	♀ (adulto)	X		
Tlacotalpan 5	♂ (adulto)	X		
Yetla	♂ (adulto)		X	
Tuxtlas 1	♀ (joven)			X
Tuxtlas 2	♂ (adulto)		X	
Tuxtlas 3	♂ (adulto)		X	
Peñuela	♀ (joven)			X

		2. - Distribución del pelo de guardia		
Ejemplar	Sexo	En todo en dorso	En todo el dorso concentrándose en la línea media	Concentrado en la línea media
Escuinapa 1	♂ (adulto)	X		
Escuinapa 2	♀ (joven)		X	
Escuinapa 3	♂ (joven)	X		
REPSA 3	♂ (adulto)	X		
REPSA 4	♂ (adulto)	X		
REPSA 5	♀ (adulto)	X		
Izta-Popo	♀ (joven)	X		
Tlacotalpan 1	♂ (adulto)		X	
Tlacotalpan 2	♂ (adulto)		X	
Tlacotalpan 3	♀ (adulto)		X	
Tlacotalpan 4	♀ (adulto)		X	
Tlacotalpan 5	♂ (adulto)		X	
Yetla	♂ (adulto)			X
Tuxtlas 1	♀ (joven)		X	
Tuxtlas 2	♂ (adulto)			X
Tuxtlas 3	♂ (adulto)			X
Peñuela	♀ (joven)			X

		3. – Longitud de la cola con respecto a la longitud de la cabeza y el cuerpo (lcu/lco)			
Ejemplar	Sexo	Longitud total (mm)	Longitud (mm) del cuerpo (lcu)	Longitud (mm) de la cola (lco)	lcu/lco
Escuinapa 1	♂ (adulto)	880	460	420	91.3
Escuinapa 2	♀ (joven)	730	380	350	92.1
Escuinapa 3	♂ (joven)	640	330	310	93.9
REPSA 3	♂ (adulto)	868	495	373	75.3
REPSA 4	♂ (adulto)	700	390	310	79.4
REPSA 5	♀ (adulto)	770	420	350	83.3
Izta-Popo	♀ (joven)	675	410	265	64.6
Tlacotalpan 1	♂ (adulto)	840	455	385	84.6
Tlacotalpan 2	♂ (adulto)	910	495	415	83.8
Tlacotalpan 3	♀ (adulto)	880	470	410	87.2
Tlacotalpan 4	♀ (adulto)	860	475	385	81.0
Tlacotalpan 5	♂ (adulto)	920	494	426	86.2
Yetla	♂ (adulto)	849	449	400	89.0
Tuxtlas 1	♀ (joven)	773	393	380	96.6
Tuxtlas 2	♂ (adulto)	810	370	440	118.9
Tuxtlas 3	♂ (adulto)	828	400	428	107.0
Peñuela	♀ (joven)	796	398	398	100.0

		4. – Porcentaje de color negro en la cola		
Ejemplar	Sexo	Longitud de la cola (mm)	Longitud de color negro de la cola (mm)	Porcentaje de color negro en la cola (%)
Escuinapa 1	♂ (adulto)	420	97	23.0
Escuinapa 2	♀ (joven)	350	118	33.7
Escuinapa 3	♂ (joven)	310	136	43.8
REPSA 3	♂ (adulto)	373	154	41.2
REPSA 4	♂ (adulto)	310	180	58.0
REPSA 5	♀ (adulto)	350	162	46.2
Izta-Popo	♀ (joven)	265	115	43.3
Tlacotalpan 1	♂ (adulto)	385	152	39.4
Tlacotalpan 2	♂ (adulto)	415	146	35.1
Tlacotalpan 3	♀ (adulto)	410	145	35.3
Tlacotalpan 4	♀ (adulto)	385	145	37.6
Tlacotalpan 5	♂ (adulto)	426	162	38.0
Yetla	♂ (adulto)	400	186	46.5
Tuxtlas 1	♀ (joven)	380	84	22.1
Tuxtlas 2	♂ (adulto)	440	117	26.5
Tuxtlas 3	♂ (adulto)	428	67	21.6
Peñuela	♀ (joven)	398	90	22.6

		5. – Posición de la sutura maxilo-frontal con los huesos nasal y lacrimal	
Ejemplar	Sexo	Alineada con los dos huesos	Anterior al hueso lacrimal
Escuinapa 1	♂ (adulto)	X	
Escuinapa 2	♀ (joven)	X	
Escuinapa 3	♂ (joven)	-	-
REPSA 3	♂ (adulto)		X
REPSA 4	♂ (adulto)	X	
REPSA 5	♀ (adulto)	-	-
Izta-Popo	♀ (joven)	X	
Tlacotalpan 1	♂ (adulto)	X	
Tlacotalpan 2	♂ (adulto)	X	
Tlacotalpan 3	♀ (adulto)	X	
Tlacotalpan 4	♀ (adulto)	X	
Tlacotalpan 5	♂ (adulto)	X	
Yetla	♂ (adulto)	X	
Tuxtlas 1	♀ (joven)		X
Tuxtlas 2	♂ (adulto)	X	
Tuxtlas 3	♂ (adulto)		X
Peñuela	♀ (joven)		X

		6. – Forma de los huesos nasales		
Ejemplar	Sexo	Anchos y terminan en un ángulo redondeado	Anchos y terminan en un ángulo agudo	Delgados y terminan en un ángulo agudo
Escuinapa 1	♂ (adulto)	X		
Escuinapa 2	♀ (joven)	X		
Escuinapa 3	♂ (joven)	-	-	-
REPSA 3	♂ (adulto)	X		
REPSA 4	♂ (adulto)	X		
REPSA 5	♀ (adulto)	-	-	-
Izta-Popo	♀ (joven)	X		
Tlacotalpan 1	♂ (adulto)	X		
Tlacotalpan 2	♂ (adulto)	X		
Tlacotalpan 3	♀ (adulto)		X	
Tlacotalpan 4	♀ (adulto)	X		
Tlacotalpan 5	♂ (adulto)			X
Yetla	♂ (adulto)	X		
Tuxtlas 1	♀ (joven)			X
Tuxtlas 2	♂ (adulto)		X	
Tuxtlas 3	♂ (adulto)			X
Peñuela	♀ (joven)		X	

		7. – Forma de la extensión posterior del hueso lacrimal	
Ejemplar	Sexo	Semejante a una línea curva	Semejante a una línea recta
Escuinapa 1	♂ (adulto)		X
Escuinapa 2	♀ (joven)		X
Escuinapa 3	♂ (joven)	-	
REPSA 3	♂ (adulto)	X	
REPSA 4	♂ (adulto)	X	
REPSA 5	♀ (adulto)	-	-
Izta-Popo	♀ (joven)	X	
Tlacotalpan 1	♂ (adulto)	X	
Tlacotalpan 2	♂ (adulto)	X	
Tlacotalpan 3	♀ (adulto)	X	
Tlacotalpan 4	♀ (adulto)	X	
Tlacotalpan 5	♂ (adulto)	X	
Yetla	♂ (adulto)		X
Tuxtlas 1	♀ (joven)		X
Tuxtlas 2	♂ (adulto)		X
Tuxtlas 3	♂ (adulto)		X
Peñuela	♀ (joven)		X

		8. – Extensión dorsal del hueso palatino	
Ejemplar	Sexo	Gruesa	Delgada
Escuinapa 1	♂ (adulto)	X	
Escuinapa 2	♀ (joven)	X	
Escuinapa 3	♂ (joven)	-	-
REPSA 3	♂ (adulto)	X	
REPSA 4	♂ (adulto)	X	
REPSA 5	♀ (adulto)	-	-
Izta-Popo	♀ (joven)	X	
Tlacotalpan 1	♂ (adulto)	X	
Tlacotalpan 2	♂ (adulto)	X	
Tlacotalpan 3	♀ (adulto)	X	
Tlacotalpan 4	♀ (adulto)	X	
Tlacotalpan 5	♂ (adulto)	X	
Yetla	♂ (adulto)	X	
Tuxtlas 1	♀ (joven)		X
Tuxtlas 2	♂ (adulto)	X	
Tuxtlas 3	♂ (adulto)		X
Peñuela	♀ (joven)		X

APÉNDICE VII

Secuencias del gen citocromo *b* de los tlacuaches *Didelphis virginia* (CNMA 45119, ASNHC 6475), *D. marsupialis* (CNMA 45109, ASNHC 1280) y *Philander. opossum* (CNMA 45128). Los cuadros indican los sitios de corte encontrados en los RFLPs para las enzimas *HaeIII* (secuencia que reconoce GG↓CC; rojo) y *TaqI* (secuencia que reconoce T↓CG↓A; verde).

	10	20	30	40	50	60	70	80	
CNMA 45119		ATGACCAATA	TTCGCAAAAC	ACATCCACTC	ATAAAAATCA	TTAATGATTC	ATTCATTGAT	CTACCAACAC	CATCTAACAT
ASNHC 6475		ATGACCAATA	TTCGCAAAAC	ACATCCACTC	ATAAAAATCA	TTAATGATTC	ATTCATTGAC	CTACCAACAC	CATCTAACAT
CNMA 45109		ATGACCAATA	TTCGCAAAAC	ACATCCACTC	ATAAAAATTA	TCAATGATTC	ATTCATTGAC	CTGCCAACAC	CCTCCAACAT
ASNHC 1280		ATGACCAATA	TTCGCAAAAC	ACATCCACTC	ATAAAAATTA	TCAATGACTC	ATTCATTGAC	CTACCAACAC	CATCCAACAT
CNMA 45128		ATGACCAACC	TTCGCAAAAC	ACATCCACTC	ATAAAAATTA	TTAATGATTC	ATTTATTGAT	CTACCAACAC	CATCTAACAT
		90	100	110	120	130	140	150	160
CNMA 45119		CTCAGCTTGA	TGGAATTTTG	GTTCACTATT	AGGAGTGTGC	CTAATTATTC	AAATCCTTAC	AGGCTTATTC	TTAGCAATAC
ASNHC 6475		CTCAGCCTGA	TGGAATTTTG	GTTCACTATT	AGGAGTGTGC	CTAATTATTC	AAATCCTCAC	AGGCTTATTC	TTAGCAATAC
CNMA 45109		CTCAGCTTGA	TGAAATTTTCG	GTTCACTATT	AGGAATATGC	CTAATTATCC	AAATCCTAAC	AGGCTTATTC	TTAGCAATAC
ASNHC 1280		CTCAGCTTGA	TGGAATTTTCG	GTTCACTATT	AGGAATATGC	CTAATTATCC	AAATCCTAAC	AGGCTTATTC	TTAGCAATAC
CNMA 45128		CTCAGCCTGA	TGAAATTTTCG	GTTCACTTCT	AGGAATATGC	CTAATTATCC	AAATCCTCAC	AGGCC	TATTTT
		170	180	190	200	210	220	230	240
CNMA 45119		ATTACACATC	TGACACATCA	ACCGCATTTT	CATCAGTAGC	CCATATTTGC	CGAGACGTAA	ATTACGGATG	ACTTATCCGA
ASNHC 6475		ATTATACATC	TGATACATTA	ACCGCATTTT	CATCAGTAGC	CCATATTTGC	CGAGACGTAA	ACTACGGATG	ACTTATCCGA
CNMA 45109		ATTATACATC	AGACACACTA	ACCGCATTCT	CATCAGTAGC	CCATATTTGC	CGAGATGTAA	ACTACGGATG	ACTTATCCGA
ASNHC 1280		ATTATACATC	AGATACACTA	ACCGCATTCT	CATCAGTAGC	CCATATTTGC	CGAGATGTAA	ACTACGGATG	ACTTATCCGA
CNMA 45128		ATTACACATC	AGACACACTA	ACAGCATTTT	CATCAGTAGC	CCATATCTGC	CGAGATGTAA	ATTACGGGTG	GCTTATCCGA
		250	260	270	280	290	300	310	320
CNMA 45119		AATATCCACG	CCAACGGAGC	ATCTATATTC	TTTATATGCC	TCTTCCTTCA	TGTAGGACGA	GGAATCTATT	ACGGATCATA
ASNHC 6475		AATATCCATG	CCAACGGAGC	ATCTATATTC	TTTATATGCC	TTTTTCCTTCA	TGTAGGACGA	GGAATTTACT	ATGGATCATA
CNMA 45109		AACATCCATG	CTAACGGAGC	ATCTATATTC	TTTATATGCC	TTTTTCCTCCA	TGTAGGACGA	GGAATCTACT	ACGGATCATA
ASNHC 1280		AACATCCATG	CCAACGGAGC	ATCTATATTC	TTTATATGCC	TTTTTCTCCA	TGTAGGACGA	GGAATCTACT	ACGGATCATA
CNMA 45128		AATATTCACG	CTAATGGAGC	ATCAATATTC	TTTATATGCC	TTTTTCTTCA	CGTAGGACGA	GGAATTTACT	ACGGATCTTA

	330	340	350	360	370	380	390	400
CNMA 45119	CCTTTACAAA	GAAACATGAA	ATATTGGAGT	TATCCTACTA	TTAACAGTTA	TAGCTACTGC	ATTCGTTGGC	TACGTTCTAC
ASNHC 6475	TCTTTACAAA	GAAACATGAA	ATATTGGAGT	TATCCTACTA	CTAACAGTTA	TAGCTACTGC	ATTCGTTGGC	TACGTACTAC
CNMA 45109	TCTTTACAAA	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	TATTCTACTA	TTAACAGTTA	TAGCCACTGC	ATTCGTAGGA	TACGTACTAC
ASNHC 1280	TCTTTACAAA	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	TATTCTTCTA	TTAACAGTTA	TAGCCACTGC	ATTCGTGGGC	TACGTACTAC
CNMA 45128	TCTTTATAAA	GAAACATGAA	ACATTGGAGT	TATCCTATTA	TTAACAGTTA	TAGCTACCGC	ATTTGTAGGT	TATGTATTAC
	410	420	430	440	450	460	470	480
CNMA 45119	CATGAGGACA	AATATCATT	TGAGGCGCAA	CGTTATTAC	TAACTTATTA	TCTGCCATCC	CATATATCGG	AAGTACACTA
ASNHC 6475	CATGAGGACA	AATATCATT	TGAGGCGCAA	CAGTTATTAC	TAACCTATTA	TCTGCCATCC	CATATATCGG	AAGTACACTA
CNMA 45109	CTTGAGGACA	AATATCATT	TGAGGCGCAA	CAGTTATTAC	TAATCTATTA	TCCGCTATCC	CCTATATCGG	AAATACATTA
ASNHC 1280	CTTGAGGACA	AATATCCTT	TGAGGGGCAA	CAGTTATTAC	TAATCTATTA	TCCGCTATCC	CCTATATCGG	AAATATATTA
CNMA 45128	CTTGAGGACA	AATATCATT	TGAGGTGCAA	CAGTTATTAC	CAATTTATTA	TCCGCCATCC	CCTATATTGG	AAACACATTA
	490	500	510	520	530	540	550	560
CNMA 45119	GTAGAATGAA	TTTGAGGAGG	ATTCTCCGTT	GATAAAGCTA	CACTAAC TCG A	ATTTTTTGCT	TTTCACITTA	TTCTTCCATT
ASNHC 6475	GTAGAATGAA	TTTGAGGAGG	ATTCTCCGTT	GATAAAGCTA	CACTAACCCG	ATTTTTTGCT	TTTCACITTA	TTCTTCCATT
CNMA 45109	GTAGAGTGAA	TTTGAGGAGG	ATTCTCCGTT	GACAAAGCCA	CCCTAACCCG	ATTTTTCGCA	TTCCACTTTA	TTCTTCCATT
ASNHC 1280	GTAGAGTGAA	TTTGAGGAGG	ATTCTCCGTT	GACAAAGCCA	CCCTAACCCG	ATTTTTCGCA	TTCCACTTTA	TTCTTCCATT
CNMA 45128	GTAGAATGAA	TCTGAGGTGG	ATTTTCCGTT	GACAAAGCTA	CATTAACCCG	ATTTTTTGCC	TTTCACITTA	TTCTACCATT
	570	580	590	600	610	620	630	640
CNMA 45119	CATCATTTTA	GCTATAGTAG	TAGTACATCT	CCTATTTCTT	CACGAAACAG	GATCAAGCAA	TCCAACA GGC	CTAGATCCCA
ASNHC 6475	CATCATTTTA	GCTATAGTAG	TAGTACATCT	TCTATTTCTT	CACGAAACAG	GATCAAGCAA	TCCAACA GGC	CTAGATCCAA
CNMA 45109	TATTATTCTA	GCTATAGTAC	TAGTACATCT	TCTATTCCTA	CACGAAACTG	GATCAAACAA	TCCAACA GGC	CTAGATCCCA
ASNHC 1280	TATTATTCTA	GCTATAGTAC	TAGTACATCT	TCTATTCCTC	CACGAAACTG	GATCAAACAA	TCCAACA GGC	CTAGATCCCA
CNMA 45128	TATTATTATA	GCTATAGCAG	TAGTCCATCT	TTTATTTCTC	CACGAAACAG	GATCAAGCAA	TCCAACA GGC	CTAAACCCTG
	650	660	670	680	690	700	710	720
CNMA 45119	ACTCAGATAA	AATTCCATT	CACCCATACT	ATACCATAAA	AGATATCCTA	GGCTTATTTC	TAATAATTAT	TATTCTTCTA
ASNHC 6475	ACTCAGATAA	AATTCCATT	CACCCCTACT	ATACCATAAA	AGATATCCTA	GGCTTATTCC	TAATAATTAT	TATTCTTCTA
CNMA 45109	ACTCAGATAA	AATCCCATT	CATCCCTACT	ATACTATCAA	AGATATCCTA	GGCC TATTCC	TAATGATTAT	TATCCTATTA
ASNHC 1280	ACTCAGATAA	AATCCCATT	CATCCCTACT	ATACTATCAA	AGATATCCTA	GGCTTATTCC	TAATGATTAT	TATCCTATTA
CNMA 45128	ACTCAGATAA	AATTCCATT	CATCCTTATT	ATACTATTAA	AGACATCTTA	GGTTTACTTC	TAATAGTAAT	CATTCTATTA

	730	740	750	760	770	780	790	800		
CNMA 45119	TC	ACTAGCAA	TATTCTCACC	AGATCTTTTA	GGAGACCCAG	ACA	ACTTCAC	CCCAGCTAAT	CCCCTCAACA	CCCCACCTCA
ASNHC 6475	TC	ACTAGCAA	TATTCTCACC	AGATCTTTTA	GGAGACCCCTG	ACA	ACTTCAC	CCCAGCTAAT	CCCCTTAACA	CCCCGCCTCA
CNMA 45109	TC	ATTAGCAA	TACTCTCACC	AGACCTTTTA	GGAGACCCAG	ACA	ACTTTAC	CCCCGCTAAT	CCCCTTAACA	CCCCACCTCA
ASNHC 1280	TC	ATTAGCAA	TATTCTCACC	AGACCTTTTA	GGAGACCCAG	ACA	ACTTTAC	CCCCGCTAAT	CCCCTCAATA	CCCCACCTCA
CNMA 45128	TT	ATTAGCAA	TATTCTCACC	AGACCTCCTA	GGAGACCCCTG	ACA	ATTTTAC	TCCCGCTAAC	CCCCTCAATA	CCCCACCTCA
	810	820	830	840	850	860	870	880		
CNMA 45119	TAT	TAAGCCA	GAATGGTACT	TTCTATTTGC	CTATGCTATC	CTACGATCAA	TCCCAAACAA	ACTAGGAGGA	GTTTTAGCCC	
ASNHC 6475	TAT	CAAGCCA	GAATGGTACT	TTCTATTTGC	CTATGCTATC	TTACGATCAA	TCCCAAACAA	ACTAGGAGGA	GTTTTAGCCC	
CNMA 45109	TAT	CAAGCCA	GAATGGTATT	TTCTATTTGC	TTATGCCATC	CTACGATCAA	TTCCAAACAA	ACTAGGAGGA	GTTTTAGCCC	
ASNHC 1280	TAT	CAAGCCA	GAATGGTATT	TTCTATTTGC	CTATGCCATC	CTACGATCAA	TTCCAAACAA	ATTAGGAGGA	GTTTTAGCCC	
CNMA 45128	CAT	CAAACCA	GAATGATACT	TCCTATTTGC	ATACGCTATC	CTACGATCAA	TCCCAAATAA	ATTAGGAGGA	GTTTTAGCCC	
	890	900	910	920	930	940	950	960		
CNMA 45119	TAT	TAGCATC	CATTTTAGTA	CTCCTAATTA	TCCCTATATT	ACATACATCA	ACCCAACGAA	GCATGGCATT	CCGACCCATC	
ASNHC 6475	TAT	TAGCATC	CATTTTAGTA	CTCCTAATTA	TCCCTATATT	ACATACATCA	ACCCAACGAA	GCATGGCATT	CCGACCCATC	
CNMA 45109	TAT	TAGCATC	CATTTTAATT	CTCCTTATCA	TACCGCTACT	ACACACATCA	ACCCAACGAA	GCATGATATT	TCGA CCCTATC	
ASNHC 1280	TAT	TAGCATC	CATTTTAATT	CTCCTCATTA	TACCTTTATT	ACACACATCA	ACCCAACGAA	GTATAATATT	TCGA CCCTATC	
CNMA 45128	TAC	TAATATC	TATTCTAGTT	CTCCTTATTA	TTCTCTACT	TCATACATCA	ACCCAACGAA	GTATAGCATT	CCGACCAATT	
	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040		
CNMA 45119	TC	CAAACAC	TATTCTGAAT	ATTAACAGCT	AACCTAATTA	TCCTTACCTG	AATTGGAGGA	CAACCAGTAG	AACAACCCTA	
ASNHC 6475	TC	CAAACAC	TATTCTGAAT	ATTAACAGCT	AACCTAATTA	TCCTGACCTG	AATCGGAGGA	CAACCAGTAG	AACAACCCTA	
CNMA 45109	TC	CAAACAC	TATTCTGAAT	ACTAACAGCC	AATCTGATCA	TTCTTACCTG	AATCGGAGGG	CAACCAGTAG	AGCAACCTTA	
ASNHC 1280	TC	CAAACAC	TATTCTGAAT	ACTAACCGCC	AATCTGATCA	TCCTTACCTG	AATCGGGGGG	CAACCAGTAG	AGCAACCTTA	
CNMA 45128	TC	CAAACAC	TATTCTGAAT	ATTAACAGTT	AACCTAATTA	TCCTTACTTG	AATTGGAGGA	CAACCAGTAG	AGCAACCATA	
	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120		
CNMA 45119	TAT	CACCATT	GGCC AAATGAG	CCTCCATTTT	CTACTTTACT	ATTATTATCA	TCCTCATACC	TCTAGCAGGA	ATACTAGAAA	
ASNHC 6475	TAT	TACCATT	GGCC AAATGAG	CCTCCATTTT	CTACTTTACT	ATTATCATCA	TCCTTATACC	TCTAGCAGGA	ATACTAGAAA	
CNMA 45109	TAT	TTCCATT	GGCC AAATGAG	CCTCCATCTC	CTACTTTACC	ATTATTATTA	TTCTTATACC	CCTAGCAGGA	GCACTAGAAA	
ASNHC 1280	CAT	CTCCATT	GGTCAATGAG	CCTCCATCTC	CTACTTTACC	ATTATTATTA	TTCTTATACC	CCTAGCAGGA	ACACTAGAAA	
CNMA 45128	TAT	TATTATT	GGTCAATGAG	CCTCCATCTC	CTACTTTACC	ATTATTATTA	TTCTCATACC	CTTAGCAGGT	ATATTAGAAA	

	1130	1140
CNMA 45119	ACCATATACT	AAAACCAAAA TTTCCATAA
ASNHC 6475	ACTATATACT	AAAACCAAAA TTTCCATAA
CNMA 45109	ACTACATATT	AAAACCAAAA TTCCATAA
ASNHC 1280	ACTACATATT	AAAACCAAAA TTCCATAA
CNMA 45128	ACTACATACT	AAAACCAAAA TTCCATAA

APÉNDICE VIII

Lista de sinapomorfías que definen los clados principales del género *Didelphis* utilizando secuencias de 1139 pb del gen citocromo *b*. ts = transiciones (A ↔ G, C ↔ T); tv = transversiones (A ↔ T, A ↔ C, G ↔ T, G → C).

1) Clado *Didelphis virginiana*

No.	Nucleótido	Substitución	Tipo	No.	Nucleótido	Substitución	Tipo
1	99	C → T	ts	22	678	T → A	tv
2	117	A → G	tv	23	694	C → T	ts
3	171	A → T	tv	24	717	A → T	tv
4	178	C → T	ts	25	786	C → T	ts
5	189	C → T	ts	26	862	T → C	ts
6	342	C → T	ts	27	883	C → T	ts
7	375	C → T	ts	28	900	T → A	tv
8	387	G → T	tv	29	906	T → A	tv
9	444	T → C	ts	30	912	A → C	tv
10	473	A → G	ts	31	916	C → A	tv
11	478	T → C	ts	32	946	A → G	ts
12	513	C → T	ts	33	982	C → T	ts
13	537	C → T	ts	34	990	C → T	ts
14	540	A → T	tv	35	1053	T → C	ts
15	543	C → T	ts	36	1068	C → T	ts
16	561	T → C	ts	37	1080	C → T	ts
17	600	C → T	ts	38	1089	T → C	ts
18	617	A → G	ts	39	1101	C → T	ts
19	654	C → T	ts	40	1143	C → T	ts
20	663	T → C	ts				
21	675	T → C	ts				

2) Clado *Didelphis albiventris*-*D. marsupialis*

No.	Nucleótido	Substitución	Tipo	No.	Nucleótido	Substitución	Tipo
1	39	C → T	ts	22	724	C → T	ts
2	48	T → C	ts	23	774	A → C	tv
3	75	T → C	ts	24	819	C → T	ts
4	138	C → A	tv	25	837	T → C	ts
5	216	C → T	ts	26	852	C → T	ts
6	225	C → T	ts	27	898	G → A	ts
7	243	T → C	ts	28	942	C → T	ts
8	354	C → T	ts	29	947	C → T	ts
9	402	A → T	tv	30	951	C → T	ts
10	435	C → T	ts	31	957	C → T	ts
11	456	C → T	ts	32	993	C → T	ts
12	462	A → C	tv	33	996	A → G	ts
13	486	A → G	ts	34	1032	A → G	ts
14	519	T → C	ts	35	1038	C → T	ts
15	564	C → T	ts	36	1129	C → T	ts
16	568	T → C	ts				
17	597	T → C	ts				
18	609	A → T	tv				
19	639	A → C	tv				
20	660	C → T	ts				
21	714	T → C	ts				

3) Clado *Didelphis marsupialis*

No.	Nucleótido	Substitución	Tipo
1	42	T → C	ts
2	63	A → G	ts
3	115	G → A	ts
4	129	T → C	ts
5	285	T → C	ts
6	288	T → C	ts
7	522	A → C	tv
8	678	T → C	ts
9	718	C → T	ts
10	789	C → T	ts
11	924	T → C	ts
12	987	A → C	tv
13	999	T → C	ts
14	1014	T → C	ts
15	1020	A → G	ts
16	1041	T → C	ts
17	1045	A → T	ts
18	1092	C → T	ts
19	1112	T → C	ts
20	1125	T → C	ts

APÉNDICE IX

Lista de sinapomorfías que definen los clados principales del género *Didelphis* utilizando secuencias de 657 pb del gen citocromo oxidasa c subunidad I. ts = transiciones (A ↔ G, C ↔ T); tv = transversiones (A ↔ T, A ↔ C, G ↔ T, G ↔ C).

1. Clado *Didelphis virginiana*

No.	Nucleótido	Substitución	Tipo	No.	Nucleótido	Substitución	Tipo
1	58	C → T	ts	18	502	A → G	ts
2	60	C → A	tv	19	556	T → G	tv
3	72	A → G	ts	20	616	T → C	ts
4	75	T → C	ts	21	640	T → C	ts
5	147	A → G	ts	22	652	C → T	Ts
6	162	T → A	tv				
7	201	T → C	ts				
8	238	A → C	tv				
9	247	C → T	ts				
10	263	C → T	ts				
11	265	T → A	tv				
12	304	C → A	tv				
13	407	C → T	ts				
14	418	T → C	ts				
15	424	T → C	ts				
16	428	T → C	ts				
17	433	A → G	ts				

2. Clado *Didelphis albiventris*-*D. marsupialis*

No.	Nucleótido	Substitución	Tipo
1	37	G → A	ts
2	38	T → C	ts
3	55	C → A	tv
4	150	T → C	ts
5	183	A → C	tv
6	287	C → T	ts
7	364	C → T	ts
8	391	C → T	ts
9	397	T → C	ts
10	436	T → C	ts
11	472	C → A	tv
12	542	C → T	ts
13	553	A → T	tv
14	577	A → G	Ts

3. Clado *Didelphis marsupialis*

No.	Nucleótido	Substitución	Tipo
1	141	T → C	ts
2	183	C → G	tv
3	274	A → G	ts
4	319	T → C	ts
5	328	T → A	tv
6	385	T → C	ts
7	547	T → C	ts
8	646	T → C	ts