



El Colegio de la Frontera Sur

**Efectos de paisajes modificados en *Didelphis marsupialis* y
Didelphis virginiana en Chiapas, México: un estudio
poblacional y genético**

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar al grado de
Doctora en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable

por

Bárbara Cruz Salazar

2013

Para Vale, Mateo y Poncho.

Agradecimientos.

Agradezco sinceramente a El Colegio de la Frontera Sur por haberme dado la oportunidad de realizar esta meta tan importante para mí, al CONACYT por brindarme la beca de manutención que permitió concentrarme en el desarrollo de la tesis y a los recursos fiscales que ayudaron a financiar parte del trabajo de campo y el análisis de laboratorio. Igualmente agradezco a todo mi comité tutorial: Dr. Luis Bernardo Vázquez Hernández, Dra. Lorena Ruiz Montoya, Dr. Ella Vázquez Hernández, Dr. Darío Navarrete Gutiérrez y Dr. Eduardo E. Espinoza Medinilla, por todo el apoyo, dedicación y conocimiento que brindaron para guiar esta investigación. Particularmente agradezco a Lorena por su paciencia y amistad pues siempre me condujo e impulsó académica y personalmente para continuar y terminar, muchas gracias Lorena. Le doy las gracias a la Dra. Salima C. Machkour M'Rabet, al Dr. Rafael A. Reyna Hurtado y a la Dra. Anna Horváth, que sin duda alguna sus comentarios mejoraron este escrito.

Agradezco a Wenceslao, Eugenia Sántiz, Jorge Bolaños, Alejandro, Alain y todos los jóvenes, guarda parques y dueños de ejidos que me acompañaron a campo pues gracias a su ayuda pudimos muestrear y se logró este objetivo. Asimismo agradezco a Maricela García Bautista, Teresa, Nancy y Quevin por su ayuda en laboratorio, a Claudia Macías por permitirme entrar a muestrear a la Reserva Biológica Cerro Huitepec y a la Reserva Biológica Moxviquil, a Hermilo Cruz y Mario Zúñiga por su ayuda en la investigación bibliográfica.

Agradezco de manera especial a mi familia, a Poncho por ayudarme tanto, no solo personalmente sino en el trabajo de campo, muchas gracias por ayudarme a capturar

tlacuaches y aprender tanto de ellos pues sin tu ayuda simplemente no estaría escribiendo ahora estas líneas, gracias igualmente por tus consejos y amor. Agradezco a mis hijos por su paciencia, compañía y amor, a mi papá por su apoyo en todo momento lo cual me dio seguridad e impulso, a mi mamá por su ayuda, a Tania por su compañía y consejo y a doña Leti y don Beto por tanta, tantísima ayuda y comprensión, muchas gracias.

Gracias además a todos aquellos que no menciono en éstas líneas pero que colaboraron directa o indirectamente en el desarrollo y término de ésta investigación.

Índice.

Introducción general	1
Diversidad genética intraespecífica y dinámica poblacional en el espacio.....	2
Diversidad genética y conservación: genética de la conservación.....	5
Especies comunes: <i>Didelphis marsupialis</i> y <i>D. virginiana</i>	6
Objetivos.....	9
Literatura citada.....	11
Capítulo 1. Diversidad genética y abundancia relativa de <i>Didelphis marsupialis</i> y <i>Didelphis virginiana</i> en Chiapas, México	18
Resumen.....	20
Introducción.....	21
Materiales y métodos.....	22
Resultados.....	25
Discusión.....	27
Agradecimientos.....	32
Literatura citada.....	32
Cuadros.....	40
Figuras.....	46
Capítulo 2. Genetic diversity of <i>Didelphis marsupialis</i> and <i>D. virginiana</i> associated to different levels of perturbation in The Highlands and the Central Depression, Chiapas, México	50
Abstract.....	51
Introduction.....	52
Materials and methods.....	54
Results.....	59
Discussion.....	63
Acknowledgements.....	67
References.....	67

Tables.....	75
Figures.....	79
Capítulo 3. Efectos de la estructura y composición de paisajes con diferentes grados de perturbación sobre la abundancia de <i>Didelphis marsupialis</i> y <i>Didelphis virginiana</i> en Chiapas, México.....	85
Resumen.....	86
Introducción.....	87
Materiales y métodos.....	90
Resultados.....	96
Discusión.....	101
Agradecimientos.....	106
Literatura citada.....	107
Cuadros.....	114
Figuras.....	120
Discusión general.....	127
Literatura citada.....	139

Introducción general

Diversidad genética intraespecífica y dinámica poblacional en el espacio.

La evolución implica cambios fenotípicos y genéticos como resultado de la adaptación progresiva de poblaciones al ambiente (selección natural), de la deriva genética y de la recombinación (flujo genético; Hartl y Jones, 1998; Hedrick 1992). La acción variable de cada proceso y el resultado de la interacción entre los procesos evolutivos y demográficos, que actúan a través del tiempo y espacio, entre y dentro de las poblaciones, generan diferencias en la variación genética y grados de diferenciación entre las poblaciones. Lo anterior determina la estructura genética poblacional y la diversidad genética de una especie o conjunto de poblaciones. Al examinar esta diversidad y como se distribuye dentro y entre poblaciones, es posible describir los procesos demográficos y evolutivos más probables que han determinado la estructura actual de una especie y que eventualmente conducen a la especiación (Hernández-Baños et al., 2007).

Las poblaciones naturales tienen una compleja historia evolutiva y distribución geográfica, son dinámicas en muchas dimensiones: cambian temporalmente en, tamaño, densidad y localización, y espacialmente pueden fragmentarse y unirse a otras poblaciones (Hey y Machado, 2003). La modificación de la composición y estructura del hábitat genera niveles variables de heterogeneidad ambiental y disponibilidad de recursos, y el área de distribución de las especies se pierde, fragmenta o degrada, lo que generalmente determina los cambios poblacionales y la distribución de una especie a lo largo de un área geográfica. Los patrones de distribución están fuertemente relacionados con la abundancia relativa de cada población, dentro de la región geográfica a la que pertenecen sus comunidades locales, además de estar

determinados por procesos e interacciones poblacionales (Maurer, 2000; Spear et al., 2010) como competencia, dispersión, depredación, colonizaciones y extinciones azarosas a escala local. A escala regional los procesos que establecen dichos patrones son la migración, extinción y especiación (Stropp et al., 2009).

La importancia de considerar factores genéticos y ambientales radica en que el estudio de la variación genética provee el entendimiento de procesos evolutivos actuales, los cuales están determinados por el ambiente y que pueden generar o modificar patrones de biodiversidad (distribución de la biodiversidad). En este sentido, la ecología molecular ha contribuido a definir poblaciones, conocer su historia, procesos evolutivos, adecuaciones y flujo genético. Asimismo, ha generado, a nivel evolutivo, información para analizar organismos, poblaciones y comunidades en términos de su genética de poblaciones y evolución molecular (Eguiarte y Souza, 2007). La genética de poblaciones, que entre otros aspectos estudia la diversidad genética poblacional, ha resuelto, junto con la ecología molecular, problemas ecológicos que ocurren a escala de hábitat y que establecen la distribución de la diversidad genética (Centeno-Cuadros, 2009).

En esta investigación la escala de estudio está definida con base en las dimensiones espaciales o temporales en las que los procesos de interés pueden ser observados y cuantificados (Manel et al., 2003; Holderegger y Wagner, 2008). El paisaje, por otro lado, se definió como un área compuesta por la interacción de elementos bióticos, abióticos y antropogénicos que constituyen unidades naturales relacionadas (metapoblaciones, corredores y matriz) y que tienen un reflejo visual en el espacio (Johnstone et al., 2010). Desde una perspectiva de escala de paisaje, la

heterogeneidad ambiental es definida como el grado de discontinuidad de condiciones ambientales de un paisaje para una especie particular. Las condiciones ambientales incluyen la composición y estructura de la vegetación, así como la dinámica de flujos de energía, nutrientes, recursos y fluidos. Las discontinuidades pueden ocurrir naturalmente, por ejemplo cambios en tipo de suelo o presencia de cuerpos de agua, o artificialmente, como cambios de uso de suelo como cultivos, ganadería o asentamientos humanos (Morrison et al., 1998). La fragmentación del hábitat se refiere al cambio de un hábitat continuo a fragmentos pequeños y más disyuntos o fragmentos aislados como resultado de actividades antropogénicas (Morrison et al., 1998).

En este sentido, la ecología del paisaje estudia las especies, comunidades y ecosistemas para entender los efectos de los ambientes alterados por actividades humanas (Morrison et al., 1998). Analiza también cómo la fragmentación y la reducción de hábitats producen la disminución del tamaño poblacional y modifican la estructura de los ecosistemas y comunidades ecológicas, por ejemplo la composición de especies, crecimiento poblacional, dinámica de sucesión y dinámica de cambio evolutivo, así como la limitación o interrupción de intercambios entre poblaciones. También evalúa cómo la conectividad del paisaje, que se define como la interacción entre el movimiento de organismos y la estructura del paisaje (Holderegger y Wagner, 2008), afecta la estructura poblacional y adecuación individual, y a su vez cómo es influida por los atributos conductuales, las tolerancias fisiológicas y la fragmentación del hábitat (Holderegger y Wagner, 2008; Spear et al., 2010). La ecología del paisaje converge con la genética de poblaciones en la exploración de los efectos causados por la pérdida del

hábitat y el aislamiento espacial en el movimiento de especies a través de paisajes (Holderegger y Wagner, 2008).

Diversidad genética y conservación: genética de la conservación

Los cambios en la distribución y tamaño de las poblaciones causados por la fragmentación del hábitat incrementan la ocurrencia de procesos genéticos no deseados como expresiones deletéreas recesivas y deriva genética (Keyghobadi, 2007). Los organismos en poblaciones aisladas y pequeñas tienen mayor probabilidad de que sus descendientes estén emparentados, lo que incrementa la homocigocidad y la expresión de genes deletéreos que reducen la adecuación relativa de la población (Frakhman et al., 2004). La pérdida de diversidad genética incrementa la vulnerabilidad de las poblaciones a cambios y presiones en su ambiente: poblaciones con baja variabilidad genética y tamaños poblacionales pequeños generalmente son más vulnerables a la extinción (Eguiarte y Piñero, 1999; Frakhman et al., 2002).

Los cambios demográficos, generados especialmente por factores ambientales, han sido considerados para determinar la vulnerabilidad en poblaciones naturales, debido a que muchas especies han disminuido en tamaño poblacional y distribución por la transformación de su ambiente (Eguiarte y Piñero, 1999; Frankham et al. 2004). El entendimiento de la interacción entre los factores ambientales y la variación genética es un componente importante para planes de conservación, ya que la permanencia de las poblaciones depende de la preservación de componentes específicos de diversidad genética (heterocigosidad y polimorfismo), los cuales interactúan constante y permanentemente con el ambiente (Mace et al., 1996).

La genética de la conservación se ha enfocado principalmente en estudiar los niveles de variación genética de especies con poblaciones pequeñas y aisladas, las cuales son generalmente especies endémicas o raras (Eguiarte y Piñero, 1999; Gaston, 2010). Sin embargo, las especies comunes y abundantes también se ven afectadas por los efectos de la fragmentación del hábitat. Las poblaciones de dichas especies experimentan cada vez con mayor frecuencia disminución de la abundancia local y modificación de su distribución geográfica (Gaston y Fuller, 2007).

Los efectos de las actividades antropogénicas en las especies comunes pueden alcanzar niveles preocupantes, ya que actualmente son afectadas por la pérdida, fragmentación y degradación del hábitat. Además, son el principal objeto de sobreexplotación a gran escala, sus poblaciones son alteradas por la invasión de especies exóticas (Gaston, 2010) y son afectadas además por las presiones resultado de cambio climático. Todas estas amenazas constantes colocan a las especies comunes en un estado de alta vulnerabilidad (Gaston y Fuller, 2007; 2007^b). Por este motivo, es preciso identificar y monitorear cambios en los tamaños poblacionales, demografía poblacional, distribución y diversidad genética a una escala de paisaje, con el objetivo de reconocer las causas de estos cambios (Lindermayer et al., 2011), para conocer las amenazas que puedan poner en peligro a estas especies.

Especies comunes: *Didelphis marsupialis* y *D. virginiana*

Las especies comunes son aquellas que tienen la capacidad de explotar una gran variedad de recursos y pueden distribuirse en un amplio rango de condiciones ambientales, características que les permiten distribuirse a lo largo de grandes áreas

geográficas y tener poblaciones abundantes dentro de su amplio rango de distribución (Gaston, 2000). También pueden influir profundamente en las condiciones ambientales experimentadas por otras especies con las que coexisten e intervienen en los patrones espaciales de variación de riqueza y recambio de especies, porque participan en un gran número de interacciones poblacionales (herbivoría, competencia, depredación, parasitismo). Las especies comunes proveen de servicios a los ecosistemas y a su vez los ecosistemas benefician directamente a los humanos con la formación de suelo, producción de agua, calidad de aire y clima (Gaston, 2010). Por lo tanto, la extinción de sus poblaciones generalmente repercute en la sobrevivencia de especies relacionadas y en el desequilibrio del ecosistema en el que habitan (Gaston, 2010).

El tlacuache común (*Didelphis marsupialis*) y el tlacuache de Virginia (*D. virginiana*) son dos especies de marsupiales ampliamente distribuidos en México (Ringier, 1961; Gardner, 1973; Sunquist et al., 1987; Ramírez-Pulido et al., 2005). La amplia distribución de *D. marsupialis* y *D. virginiana* se relaciona probablemente con la falta de selectividad en cuanto a su hábitat y sitios reproductivos, con su flexibilidad en patrones de locomoción, hábitos alimenticios y elección del hábitat, todo lo cual les permite utilizar eficazmente grandes áreas, incluso aquellas con perturbaciones antropogénicas (Sunquist et al., 1987; Cabello, 2006). Los individuos de estas especies reducen la competencia intrapoblacional mediante su amplia dispersión (MacManus, 1970). Las hembras no dan atención individual a cada cría, se dedican a tener el mayor número de crías posible, llegando a tener dos camadas por año y hasta 13 crías en cada camada (MacManus, 1970; MacManus, 1974). Su mecanismo de defensa es pasivo, emiten principalmente una secreción por las glándulas anales que les sirve para reducir la

palatabilidad a sus depredadores, además la catatonía en *D. virginiana* es un medio eficaz de disuasión que inhibe el ataque de depredadores (MacManus, 1970). La dieta de *D. marsupialis* y *D. virginiana* es omnívora, se alimentan desde tubérculos, frutas, semillas hasta carne y desechos; ambas especies son consideradas oportunistas y exitosas (Sunquist et al., 1987; Cabello, 2006).

A pesar de que *D. marsupialis* y *D. virginiana* son especies comunes y relativamente fáciles de capturar y estudiar, en México únicamente se han estudiado aspectos generales, como su distribución, características morfológicas y poblacionales y comportamiento (Ceballos y Oliva, 2005). No existe información sobre su demografía ni diversidad genética en México. En otros países se han estudiado aspectos de morfología, número cromosómico para estudios taxonómicos y distribución (McManus, 1974), aspectos reproductivos, relaciones filogenéticas (Jansa y Voss, 2000; Gruber et al., 2007; Voss y Jansa, 2009), hábitos alimenticios (Tyndale-Biscoe y MacKenzie, 1976; Hardy, 1997; Cabello, 2006), comportamiento (MacManus, 1970; Sunquist et al., 1987, Holmes, 1991), aspectos poblacionales (Adler et al., 1997; Gehrt et al., 1997; Cáceres y Monteiro-Filho, 1998; Kelly y Caro, 2003), influencia del paisaje y variables microclimáticas para su supervivencia (McManus, 1971; Fleck y Harder, 1995; Gehrt et al., 1997; Orjulea y Jiménez, 2004; Kanda et al., 2005), así como la relación de la estructura del hábitat, abundancia de recurso y áreas urbanas con la abundancia (Lambert et al., 2005; Markovchick-Nicholls et al., 2007).

La presente investigación pretende identificar la diversidad y estructura genética, así como el tamaño y estructura poblacional en estas especies comunes. La falta de investigaciones previas en *D. marsupialis* y *D. virginiana* relacionadas a estos aspectos

y sus características biológicas, permitieron considerarlas como un sistema modelo para entender qué factores y procesos determinan sus características genéticas y poblacionales, así como reconocer las posibles amenazas que pueden reducir la diversidad genética y abundancia relativa local en estos marsupiales. Por lo tanto, esta investigación se centró en evaluar las relaciones entre la diversidad genética, abundancia relativa y la estructura de dos paisajes de Chiapas, Los Altos y la Depresión Central.

Considerando las características de *D. marsupialis* y *D. virginiana* ya descritas, se esperaba observar abundancia local y diversidad genética alta, con poca estructuración genética entre poblaciones y niveles de endogamia reducidos. Teniendo en cuenta que la abundancia y la diversidad genética de *D. marsupialis* y *D. virginiana* están en parte determinadas por la estructura del paisaje y por procesos evolutivos, se esperaba reconocer una relación entre el nivel de heterogeneidad ambiental del paisaje con la abundancia y diversidad genética y entre éstas: mayor abundancia y diversidad genética a mayor heterogeneidad ambiental y mayor diversidad genética a mayor abundancia.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis fue identificar los procesos evolutivos más relevantes que condicionan la diversidad genética y abundancia local en poblaciones de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en dos paisajes de Chiapas, y reconocer de qué manera se relacionan la diversidad genética, la abundancia local y la estructura del paisaje.

De manera particular los objetivos que guiaron cada una de las fases de la investigación fueron los siguientes:

- Reconocer los niveles de diversidad genética y abundancia local de *D. marsupialis* y *D. virginiana* y si éstos responden a lo esperado para especies comunes y generalistas (Capítulo 1).
- Distinguir los procesos evolutivos (deriva genética, endogamia, flujo genético) que ocurren a escala local y cómo difieren entre paisajes, con base en la distribución de la diversidad genética de *D. marsupialis* y *D. virginiana* (Capítulo 2).
- Explorar los factores del paisaje que determinan la abundancia de *D. marsupialis* y *D. virginiana* (Capítulo 3).
- Reconocer las consecuencias de la perturbación antropogénica en la diversidad genética y en la distribución de la abundancia local de las poblaciones de *D. marsupialis* y *D. virginiana* (Capítulo 2, 3).

La organización de este escrito se presenta en cuatro capítulos. El Capítulo 1 describe la abundancia relativa local y la diversidad genética nuclear de *D. marsupialis* y *D. virginiana*, así como los procesos evolutivos reconocidos en Los Altos y la Depresión Central de Chiapas. El Capítulo 2 muestra la diversidad genética de *D. marsupialis* y *D. virginiana* asociada a un gradiente de perturbación en Los Altos y la Depresión Central de Chiapas, con base en ocho loci microsatélites de individuos capturados en un muestreo de campo en tres niveles de perturbación (baja perturbación, perturbación intermedia y alta perturbación). En el Capítulo 3 se analizan los efectos del paisaje en la

abundancia de estos marsupiales, utilizando una imagen de satélite para determinar la estructura y composición de tres niveles de perturbación en Los Altos y la Depresión Central de Chiapas y la abundancia local de cada especie en estos paisajes. Por último se desarrolla una discusión general en el que se integran los resultados analizados de cada capítulo y se esbozan propuestas de conservación que surgen a partir de lo explorado en la diversidad genética y estructura poblacional en un contexto espacial complejo.

Literatura citada

- Adler, G. H, J. J. Arboledo y B. L. Travi. 1997. Population dynamics of *Didelphis marsupialis* in Northern Colombia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 32:7-11.
- Cabello, D. R. 2006. Reproduction of *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in the Venezuelan Andes. *Acta Therologica* 51: 427-433.
- Cáceres, N. C. y E. L. A. Monteiro-Filho. 1998. Population dynamics of the Common opossum, *Didelphis marsupialis* (Mammalia, Marsupialia), in southern Brazil. *International Journal of Mammalian Biology* 63:169-172.
- Ceballos, G. y Oliva G. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 986 p.
- Centeno-Cuadros, A. 2009. Del individuo a la especie: Filogeografía y Genética del Paisaje de la rata de agua (*Arvicola sapidus*). Tesis doctoral. Consejo superior de

Investigaciones científicas, Estación Biológica de Doñana. Universidad de Granada, Comisión de Doctorado. 194p

Eguiarte, L. E. y D. Piñero. 1999. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *En* La Evolución biológica, J. Núñez-Farfán y L. E. Eguiarte (eds.). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO, México, D. F. p. 371-398.

Fleck, D. W. y J. D. Harder. 1995. Ecology of marsupials in two Amazonian rain forest in northeastern Peru. *Journal of Mammalogy* 76: 809-818.

Frankham, R., J. D. Ballou y D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. 1a. Edición. University of Cambridge publishers, Cambridge.

Frankham, R., J. D. Ballou y K. H. McInnes. 2004. *A Primer of Conservation Genetics*. 1a. Edición. University of Cambridge publishers, Cambridge. 220p.

Gardner, A. L. 1973. The systematics of the genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. *Spec. Publ. Mus., Texas Tech University*. 4:1-81

Gaston, K. J., T. M. Blackburn, J. J. D. Greenwood, R. D. Gregory, R. M. Quinn y J. H. Lawton. 2000. Abundance-Occupancy Relationships. *Journal of Applied Ecology* 37:39-59.

Gaston, K. J. y R. A. Fuller. 2007. Biodiversity and extinction: losing the common and the widespread. *Progress in Physical Geography* 31: 213-225.

- Gaston, K. J. y R. A. Fuller. 2007^b. Commonness, population depletion and conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 14-19.
- Gaston, K. J. 2010. Valuing Common Species. *Science* 327: 154-155.
- Gehrt, S. D., D. E. Clark y E. K. Fritzell. 1997. Dynamics and Ecology of Virginia Opossums in Southern Texas. *The Southwestern Naturalist* 42:170-176.
- Gruber, K. F., R. S. Voss y S. A. Jansa. 2007. Base-Compositional Heterogeneity in the RAG1 Locus among Didelphid Marsupials: Implications for Phylogenetic Inference and the Evolution of GC Content. *Systematic Biology* 56: 83-96.
- Hardy, I. C. W. 1997. Opossum Sex Ratios Revisited: Significant or Nonsignificant? *The American Naturalist* 150:420-424
- Hartl, D. L. E. W. Jones. 1998. *Genetics. Principles and Analysis*. 4a edición. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts. 746 p.
- Hedrick, P. W. y P. S. Miller. 1992. Conservation genetics: Techniques and Fundamentals. *Ecological Applications* 2: 30-46.
- Hernández-Baños, B. E., M. Honey-Escandón, M. N. Cortés-Rodríguez y G. García Deras. 2007. Filogeografía de aves mexicanas. Pp. 470-495. En Eguiarte L. E. V. Souza y X. Aguirre. *Ecología molecular*. Primera edición. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, México, D. F. 592p.
- Hey, J. y C. A. Machado. 2003. The study of structured populations – new hope for a difficult and divided science. *Nature reviews Genetics* 4: 535.

Holderegger, R. y H. Wagner. 2008. Landscape Genetics. *BioScience* 58: 199-207

Holmes, D. J. 1991. Social Behavior in Captive Virginia Opossums, *Didelphis virginiana*.
Journal of Mammalogy 72:402-410.

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* 7:43-77.

Johnstone, C. P., R. D. Reina y A. Lill. 2010. Impact of anthropogenic habitat fragmentation on population health in a small, carnivorous marsupial. *Journal of Mammalogy*, 91(6): 1332-1341.

Kanda, L. L., T. K. Fuller, P. R. Sievert y K. D. Friedland. 2005. Variation in winter microclimate and its potential influence on Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) survival in Amherst, Massachusetts. *Urban Ecosystems* 8: 215-255.

Kelly, M. J. y T. Caro. 2003. Low density of small mammals at Las Cuevas, Belize. *Mammalian Biology* 68:372-386.

Keyghobadi, N. 2007. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Canadian Journal of Zoology* 85: 1049-1064.

Lambert, T. D., J. R. Malcolm y B. L. Zimmerman. 2005. Variation in small mammal species richness by trap height and trap type in southeastern amazonia. *Journal of Mammalogy* 86: 982-990

- Lindenmayer, D. B., J. T. Wood, L. McBurney, C. MacGregor, K. Youngentob, S. C. Banks. 2011. How to make a common species rare: A case against conservation complacency. *Biological Conservation* 144: 1663-1672.
- Mace, G. M., T. B. Smith, M. W. Bruford y R. K. Wayne. 1996. An Overview of the Issues. Pp. 3-21. En Smith T. B. y R. K. Wayne. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Primera edición. Oxford University Press, Inc. Estados Unidos de América. 483 p.
- MacManus, J. J. 1970. Behavior of captive opossums, *Didelphis marsupialis virginiana*, *American Midland Naturalist* 84: 144-169.
- MacManus, J. J. 1971. Activity of Captive *Didelphis marsupialis*. *Journal of Mammalogy* 52:846-848.
- MacManus, J. J. 1974. *Didelphis virginiana*. *Mammalian Species* 40: 1-6.
- Manel, S., M. K. Schwartz, G. Luikart y P. Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution* 4: 189- 197.
- Markovchick-Nicholls, L., H. M. Regan, D. H. Deutschman, A. Widyanata, B. Martin, L. Noreke y T. A. Hunt. 2007. Relationships between human Disturbance and Wildlife Land Use in Urban Habitat Fragments. *Conservation Biology* 22: 99-109.
- Maurer, B. A. 2000. Macroecology and consilience. *Global Ecology and Biogeography* 9: 275-280.

- Morrison, M. L. B. G. Marcot y R. William Mannan. 1998. Wildlife-habitat relationships. Concepts & Applications. 2a. Edición. The University of Wisconsin Press. 435p.
- Pickett, S. T. A. y M. L. Cadenasso. 1995. Spatial Heterogeneity in Ecological Systems. *Science*, 269: 331-334
- Ramírez-Pulido, J., J. Arroyo-Cabrales y A. Castro-Campillo. 2005. Estado actual y relación nomenclatural de los mamíferos terrestres de México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), 21: 21-82
- Ringier, H. J. 1961. Review of Oligocene Didelphid Marsupials. *Journal of Paleontology* 35: 218-228.
- Spear, S. F., N. Balkenhol, M-J. Fortin, B. H. Mcrae y K. Scribner. 2010. Use of resistance surfaces for landscape genetic studies: considerations for parameterization and analysis. *Molecular Ecology*, 19: 3576-3591.
- Storfer, A., M. A. Murphy, J. S. Evans, C. S. Goldberg, S. Robinson, S. F. Spear, R. Dezzani, E. Delmelle, L. Vierling y L. P. Waits. 2007. Putting the "landscape" in landscape genetics. *Heredity* 98: 128-142.
- Stropp, J., H. T. Steege, Y. Malhi, ATDN y RAINFOR. 2009. Disentangling regional and local tree diversity in the Amazon. *Ecography* 32: 46-54.
- Sunquist, M. E., S. N. Austad y F. Sunquist. 1987. Movement patterns and home range in the common oposum (*Didelphis marsupialis*). *Journal of Mammalogy* 68:173-176.

Tyndale-Biscoe, H. y R. B. MacKenzie. 1976. Reproduction in *Didelphis marsupialis* and *D. albiventris* in Colombia. *Journal of Mammalogy* 57:249-265.

Voss, R. S. y S. A. Jansa. 2009. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of new world metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 322:1-177.

Capítulo 1

1 **Aceptado por: Revista Mexicana de Biodiversidad**

2 **Cornisa:** Cruz et al.- Diversidad genética y abundancia de *Didelphis*

3 **Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis***
4 ***virginiana* en Chiapas, México.**

5 **Genetic diversity and relative abundance of *Didelphis marsupialis* and *Didelphis***
6 ***virginiana* in Chiapas, México.**

7 Bárbara Cruz-Salazar*¹, Lorena Ruiz-Montoya¹, Darío Navarrete Gutiérrez¹, Eduardo E. Espinoza
8 Medinilla², Ella Vázquez-Domínguez³ y Luis-Bernardo Vázquez¹

9 ¹El Colegio de La Frontera Sur, Carretera Panamericana s/n. Barrio de María Auxiliadora. San Cristóbal de
10 Las Casas, Chiapas, México, C. P. 29200; xipaktly@yahoo.com.mx*; bcruz@ecosur.edu.mx*;
11 lruiz@ecosur.mx; dnavarre@ecosur.mx; lbvazquez@ecosur.mx

12 ²Investigación y Posgrado, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. 1a. Sur Poniente No. 1460. Tuxtla
13 Gutiérrez Chiapas, México, C. P. 29290; eduardo.espinoza@unicach.mx

14 ³Departamento Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad, Nacional Autónoma de
15 México. Ap. Postal 70-275, Ciudad Universitaria, México D.F., C. P 04510; evazquez@ecologia.unam.mx

16 **Resumen.** En especies de amplia distribución, como *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana*, se
17 predicen tamaños poblacionales grandes, alta diversidad y poca diferenciación genética. En este estudio se
18 estimó la abundancia relativa de *D. marsupialis* y *D. virginiana* mediante la captura de organismos en la
19 región de Los Altos y la Depresión Central de Chiapas. Se estimó también la diversidad y estructura
20 genética a partir de siete loci microsatélites. La abundancia relativa fue baja (entre 0.008-0.06 individuos
21 trampas noches) y la mayor incidencia de tlacuaches se observó en la Depresión Central. La proporción de
22 sexos se ajustó significativamente a la relación 1:1 en ambas especies. La mayor diversidad genética se
23 registró en la Depresión Central en *D. virginiana* ($H_e = 0.58$) con altos niveles de endogamia. Se observó
24 diferenciación genética moderada entre las especies ($F_{it} = 0.13$) y mínima entre poblaciones de cada
25 especie ($F_{sr} = 0.01$). A pesar de que los valores de diversidad genética fueron moderados, *D. marsupialis* y
26 *D. virginiana* tienen abundancias relativas bajas con altos niveles de endogamia, lo que puede tener
27 consecuencias negativas a futuro sobre la variabilidad genética de estas especies en las poblaciones
28 estudiadas.

29 Palabras clave: tlacuaches, estructura poblacional, microsatélites, loci, heterocigosidad, variación genética,
30 estructura genética.

31 **Abstract.** In wide distribution species, as *D. marsupialis* and *D. virginiana*, are predicted large population
32 sizes, high diversity and little genetic differentiation. In this study it was estimated the relative abundance
33 of *D. marsupialis* and *D. virginiana* by capturing organisms in the Highlands and the Central Depression
34 regions, in Chiapas. It was also estimated the diversity and structure genetic from seven microsatellite
35 loci. The relative abundance was low (between 0.008-0.06 individuals traps nights) and the highest
36 incidence of opossums was observed in the Central Depression. The sex ratio was significantly adjusted to
37 the relation 1:1 in both species. The greater genetic diversity was recorded in the Central Depression in *D.*
38 *virginiana* ($H_e = 0.58$), with high levels of inbreeding. Genetic differentiation moderate was observed
39 between species ($F_{it} = 0.13$) and minimum among populations of each species ($F_{sr} = 0.01$). Although the
40 values of genetic diversity were moderate, *D. marsupialis* and *D. virginiana* have low abundances with

41 high levels of inbreeding, which may have negative consequences in the future on the genetic variability
42 of these species in the studied populations.

43 Key words: opossums, population structure, microsatellites, loci, heterozygosity, genetic variation, genetic
44 structure.

45 **Introducción**

46 Las poblaciones presentan variación en tamaño, densidad y distribución en escalas tanto
47 temporales como espaciales (Maurer, 2000; Hey y Machado, 2003). A escala espacial local los patrones
48 de distribución están determinados principalmente por competencia, depredación, disponibilidad de
49 recursos alimenticios y de refugios, mientras que a escala regional también intervienen la migración,
50 dispersión y extinción (Steiner y Catzefflis, 2004; Stropp et al., 2009). Los cambios en tamaño y
51 distribución de las poblaciones influyen, a su vez, en los patrones y niveles de diversidad genética
52 (Vázquez-Domínguez et al., 2012).

53 Los marsupiales son mamíferos considerados ancestrales, ya que en el Cretácico superior y
54 principios del Cenozoico tuvieron una notable radiación adaptativa, sobre todo en cuanto a hábitos
55 alimenticios y características morfológicas en Australia y parte del continente Americano, dando lugar a
56 los mamíferos placentarios (Clemens, 1968). En México se distribuyen ocho especies de marsupiales,
57 dentro del orden Didelphimorphia, distribuidas en siete géneros (*Marmosa*, *Tlacuatzin*, *Caluromys*,
58 *Chironectes*, *Didelphis*, *Metachirus* y *Philander*) (Medina-Romero et al., 2012). De ellos el género
59 *Didelphis* es uno de los más ampliamente distribuidos (Sunquist et al., 1987), con dos especies: *D.*
60 *virginiana* y *D. marsupialis* (Ringier, 1961; Gardner, 1973; Sunquist et al., 1987). Estas especies son
61 consideradas generalistas (Cabello, 2006), oportunistas y exitosas, capaces de habitar distintos ambientes,
62 incluso con incidencia de perturbaciones antropogénicas (Sunquist et al., 1987; Adler et al., 1997). Los
63 individuos son capaces de desplazarse a grandes distancias en poco tiempo, y pueden cambiar de hábitos
64 alimenticios con relativa facilidad, lo que probablemente ha ayudado a que las especies ocupen grandes

65 áreas en su distribución geográfica (Ringier, 1961; Gardner, 1973; Sunquist et al., 1987). Las hembras no
66 dan atención individual a las crías y tienen dos camadas por año hasta con 13 crías por camada
67 (MacManus, 1970, 1974).

68 Los patrones de distribución, hábitos alimenticios, alta capacidad de reproducción y
69 resistencia o flexibilidad a perturbaciones antropogénicas de *D. marsupialis* y *D. virginiana*, permiten
70 suponer que son especies cuyas poblaciones son relativamente grandes y con poca diferenciación genética.
71 Sin embargo, no se ha estudiado su diversidad genética ni su dinámica demográfica en México. Se
72 conocen aspectos generales, su taxonomía, comportamiento y hábitos alimenticios y relaciones
73 filogenéticas (Ceballos y Oliva, 2005; Medina-Romero et al., 2012). En otros países se han estudiado
74 aspectos poblacionales (Tyndale-Biscoe y MacKenzie, 1976; Holmes, 1991; Adler et al., 1997; Gehrt et
75 al., 1997; Cáceres y Monteiro-Filho, 1998; Kelly y Caro, 2003; Cabello, 2006), influencia del paisaje y el
76 efecto de variables microclimáticas en su supervivencia (MacManus, 1971; Fleck y Harder, 1995; Gehrt et
77 al., 1997; Orjulea y Jiménez, 2004; Kanda et al., 2005); la relación de la estructura del hábitat, abundancia
78 de recursos y áreas urbanas con la abundancia (Lambert et al., 2005; Markovchick-Nicholls et al., 2007) y
79 sobre filogeografía de cinco especies de la Región de Guayana (Steiner y Catzeflis, 2004).

80 En el presente estudio se exploró el tamaño poblacional de *D. marsupialis* y *D. virginiana* en
81 México, así como la diversidad y estructura genética. Los objetivos específicos fueron: (i) estimar la
82 abundancia relativa, proporción de sexos, peso y talla de los individuos de las dos especies en las
83 poblaciones de Los Altos y la Depresión Central de Chiapas, (ii) determinar la diversidad genética y el
84 grado de diferenciación genética intra e interespecífica.

85 **Materiales y métodos**

86 *Área de estudio.* El estudio se realizó en dos regiones de Chiapas, en Los Altos y la Depresión Central de
87 Chiapas. Se eligieron estas dos regiones dado que ambas especies son relativamente abundantes (Naranjo
88 et al., 2005). Estas dos regiones son espacialmente contiguas y representan una superficie geográfica

89 amplia (Rangel-Salazar et al., 2005; Rodiles-Hernández, 2005), por lo que permiten incluir un intervalo
90 adecuado de variación en parámetros climáticos (precipitación, temperatura, humedad, suelo), de
91 asociaciones vegetales y áreas de cultivo activas o abandonadas (González-Espinosa et al., 2005;
92 González-Espinosa et al., 2006). Lo anterior es importante porque dichas variaciones ambientales pueden
93 determinar la estructura poblacional o demográfica de *Didelphis* (Adler et al., 1997; Cáceres y Monteiro-
94 Filho, 1998), lo que a su vez influye en la diversidad genética. De esta manera se incrementó la
95 probabilidad de tener poblaciones grandes y con una distribución geográfica amplia de *Didelphis*.

96 En la Depresión Central de Chiapas se ubicó un sitio de muestreo en el Cerro
97 Coquelexquitzán (CC), al sureste del municipio de Tuxtla Gutiérrez (Cuadro 1). La vegetación
98 predominante es selva baja caducifolia, con temperatura media anual de 20 a 29°C, con una estación de
99 secas (noviembre-mayo) y otra de lluvias (junio-octubre), con una precipitación media anual de 922 mm.

100 En Los Altos de Chiapas se ubicaron cinco sitios de muestreo: (i) Reserva Biológica Cerro
101 Huitepec (HU); (ii) Amatenango del Valle (AV); (iii) Villa de las Rosas (VR), Corral de Piedra (CP) y
102 (iv) Reserva Biológica Moxviquil (MO) (Cuadro 1). La vegetación que predomina en los sitios son
103 asociaciones de pino-encino, en diferentes estados sucesionales. El bosque más viejo se encuentra en HU
104 (>40 años) (Ramírez-Marcial et al., 2001). En MO son bosques que desde hace 15 años dejaron de ser
105 explotados intensivamente, desde entonces están en un proceso de regeneración natural, aunque en
106 algunas zonas persiste la extracción de leña (González et al., 2012). VR, CP y AV son sitios con bosques
107 que son perturbados por la extracción de leña y productos no maderables, y también hay áreas que han
108 sido convertidas en cultivos y pequeños asentamientos humanos (B. Cruz-Salazar, observación personal).
109 Se consideró la diferencia en el número de sitios de muestreo en cada región para el análisis e
110 interpretación de resultados obtenidos.

111 *Estimación de características poblacionales.* En cada sitio se ubicaron dos puntos de muestreo y en cada
112 uno de éstos se colocaron 24 trampas Tomahawk cebadas con sardina, dispuestas de manera radial y

113 separadas por 20 m; durante cuatro noches consecutivas, ocho noches por sitio (Lambert et al., 2005). El
114 resultado fue un esfuerzo de muestreo por sitio de 192 trampas noches. Cada punto de muestreo tuvo un
115 área de 4.5 ha y por sitio de muestreo un área total de 9 ha. La determinación taxonómica a nivel de
116 especie de cada individuo se basó en la coloración de las mejillas, el largo de la zona oscura de la cola y
117 el color del almizcle. Las mejillas en *D. marsupialis* son de color crema a amarillas y en *D. virginiana* son
118 blancas; el largo de zona oscura de la cola alcanza más de la mitad en *D. marsupialis* mientras que en *D.*
119 *virginiana* es menor y el almizcle es café ocre en *D. marsupialis* y verde en *D. virginiana* (Aranda, 2000;
120 Ceballos y Oliva, 2005). Se tomaron las siguientes medidas de cada individuo capturado: peso, longitud
121 total (cabeza-cola), sexo, así como una muestra de tejido de la oreja.

122 Debido a la baja captura en los sitios de Los Altos de Chiapas y a que sólo se tuvo un sitio de
123 muestreo en la Depresión Central de Chiapas, se agruparon los datos de Los Altos y entonces se hicieron
124 las estimaciones de abundancia relativa, proporción de sexos, talla y peso por región. La abundancia
125 relativa se obtuvo como el número de individuos capturados por trampas noches (Adler et al., 1997), que
126 corresponden 192 trampas noches para la Depresión Central y 960 para Los Altos de Chiapas.

127 Se realizó un análisis de independencia mediante la prueba de G (Sokal y Rohlf, 2003) para
128 evaluar si la abundancia relativa es independiente de la región y de la especie. Mediante un Ji-cuadrada
129 (χ^2), por especie, se comparó si la proporción de sexos se ajusta a una relación de 1:1. También se realizó
130 una prueba de U Mann-Whitney para probar si había diferencias en el peso y la longitud de los individuos
131 entre regiones para cada especie.

132 *Diversidad y estructura genética.* Las muestras de tejido de oreja se conservaron en alcohol y
133 posteriormente en refrigeración a -4°C hasta su procesamiento. De cada muestra se extrajo ADN nuclear
134 siguiendo el protocolo de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Hamilton et al., 1999). Se probaron once
135 microsatélites, cinco de los cuales fueron diseñados para *D. marsupialis* (Dm1, Dm 2, Dm 3, Dm 4 y Dm
136 5) (Lavergne et al., 1998), mientras que los seis restantes fueron diseñados para *Caluromys philander*,

137 *Didelphis aurita* y *Metachirus nudicaudatus* (Dias et al., 2009) (Cuadro 2). Sólo con siete marcadores se
138 pudieron obtener resultados claramente legibles, reproducibles en el 96% de las muestras y por lo tanto
139 interpretables (Mnud 20, Mnud 41, Dm 1, Dm 2, Dm 3, Dm 5 y Daur 08).

140 La amplificación de los microsatélites se hizo a través de la Reacción en Cadena de la
141 Polimerasa (PCR) con la mezcla maestra (mastermix; PROMEGA), utilizando un termociclador de
142 gradiente MJ mini, Personal thermal cycler de BIO-RAD. Las condiciones de la amplificación se basaron
143 según Lavergne et al. (1999) y Dias et al. (2009), con modificación de la temperatura de alineamiento
144 (TA) para cinco de los siete marcadores analizados (Dm 1 = 54 °C; Dm 2 = 49 °C; Dm 3 = 52 °C; Mnud
145 20 = 51 °C y Daur 08 = 52 °C). El producto de la PCR se visualizó en geles de poliacrilamida al 10 %,
146 teñidos con bromuro de etidio y observados con luz ultravioleta.

147 Se estimaron las medidas de diversidad genética de heterocigosidad observada y esperada en
148 equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), número de alelos promedio y porcentaje de alelos polimórficos por
149 especie y región. Se realizó una combinación de probabilidades de pruebas independientes para obtener un
150 análisis de EHW por población (Sokal y Rholf, 2003). La diferenciación entre especies y regiones se
151 determinó con base en los estadísticos F_{st} , F_{is} y F_{it} mediante un análisis de varianza molecular (con 999
152 iteraciones) (Peakall y Smouse, 2006). Todos los parámetros genéticos se obtuvieron con el programa
153 GenAlEx v. 6.4. También se evaluó la presencia de alelos nulos con el programa Micro-Checker v. 2.2.3
154 (Van Oosterhout et al., 2004), con el cual se hizo una corrección de las frecuencias alélicas y genotípicas,
155 usando el 95 % de confianza y 1000 repeticiones (ver Chakraborty et al., 1992). Con el programa Free-NA
156 (Chapuis y Estoup, 2007) se estimó la F_{st} corregida por presencia de alelos nulos. Asimismo, se estimó la
157 distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) con el método ENA (D_{c-ENA}) e INA (D_{c-INA}), con el
158 mismo programa, y se obtuvieron los respectivos dendrogramas con el programa PHYLIP v. 3.69
159 (Felsenstein, 2009).

160 **Resultados**

161 Se capturó un total de 35 individuos, 16 de *D. marsupialis* y 19 de *D. virginiana*; no se
162 capturó ninguna otra especie de marsupial (Cuadro 3). A pesar del menor esfuerzo de muestreo en la
163 Depresión Central, para ambas especies hubo una mayor captura en esta región (16 individuos *D.*
164 *marsupialis*: 10 machos y seis hembras; y 19 individuos *D. virginiana*: 10 machos y nueve hembras), que
165 en los Altos de Chiapas (Cuadro 3). La abundancia relativa estimada fue entre 0.008-0.05 individuos
166 trampas noches para *D. marsupialis* y 0.01-0.06 individuos trampas noche para *D. virginiana* (Figura 1).
167 Sin embargo, el análisis de independencia de G mostró que la abundancia relativa (número de individuos
168 capturados por trampas noches) es independiente de la especie y región ($G = 0.35$, $P = 0.55$). En las dos
169 regiones y para las dos especies se encontró una proporción de sexos acorde con una relación de 1:1. En
170 Los Altos para las dos especies el valor observado fue igual al esperado; y en la Depresión Central para *D.*
171 *marsupialis* un valor de $\chi^2 = 2.7$, $P = 0.10$; y para *D. virginiana* $\chi^2 = 0.1$, $P = 0.73$.

172 Los organismos de la Depresión Central tuvieron en promedio, mayor peso (2371.43 g) y
173 longitud (80.86 cm) que en Los Altos (1472.73 g y 78.45 cm) (Cuadro 4). La prueba de U Mann-Whitney
174 no mostró diferencias significativas entre regiones en el peso y el tamaño de *D. virginiana* (tamaño: $U =$
175 8.00 , $P = 0.09$; peso: $U = 14.0$, $P = 0.14$), mientras que para *D. marsupialis* no hubo diferencias en el
176 tamaño entre regiones ($U = 17.00$, $P = 0.63$), pero sí en el peso ($U = 1.00$, $P = 0.002$).

177 *Diversidad y estructura genética.* En *D. marsupialis* dos loci estuvieron fuera EHW en Los Altos de
178 Chiapas (Mnud 41: $\chi^2 = 3.938$; $P = 0.05$; $g.l. = 1$; y Dm 1: $\chi^2 = 7.00$; $P = 0.008$; $g.l. = 1$); la combinación de
179 probabilidades indicó que no hay EHW en esta población (Cuadro 5). En la Depresión Central, para esta
180 misma especie, se encontraron dos marcadores fuera de equilibrio: Dm 1 y Dm 2 ($\chi^2 = 8.00$, $P = 0.005$,
181 $g.l. = 1$; $\chi^2 = 8.89$, $P = 0.03$, $g.l. = 3$, respectivamente) y nuevamente la prueba combinada detectó que no
182 hay EHW (Cuadro 5).

183 En cuanto a *D. virginiana* cuatro loci estuvieron fuera de EHW en Los Altos de Chiapas:
184 Mnud 20 ($\chi^2 = 4.15$, $P = 0.04$, $g.l. = 1$); Dm1 ($\chi^2 = 22$, $P = 0.00$, $g.l. = 3$); Dm3 ($\chi^2 = 22$; $P = 0.00$; $g.l. = 3$);

185 y Dm5 ($\chi^2 = 16.75$; $P = 0.001$; $g.l. = 3$). En la Depresión Central seis loci estuvieron fuera de EHW, con
186 excepción de Daur 08 ($\chi^2 = 5.90$, $P = 0.43$, $g.l. = 10$). En ambas poblaciones la prueba combinada mostró
187 que las poblaciones no están en EHW.

188 El análisis de varianza molecular mostró una diferenciación genética significativa entre
189 especies ($F_{it} = 0.13$, $P = 0.001$) y entre las poblaciones (cuatro en total, dos poblaciones de *D. marsupialis*
190 y dos de *D. virginiana*; $F_{st} = 0.14$, $P = 0.001$). Entre poblaciones de cada especie no hubo diferencia
191 genética significativa ($F_{sr} = 0.01$, $P = 0.26$). Los coeficientes de endogamia F_{it} y F_{is} fueron
192 significativamente distintos de cero ($F_{it} = 0.58$, $P = 0.001$; $F_{is} = 0.51$, $P = 0.001$).

193 La mayor diferenciación genética se encontró entre poblaciones de distintas regiones y
194 especies, y la menor se observó entre poblaciones de una misma especie. Dicho patrón se mantiene con y
195 sin la consideración de alelos nulos (Cuadro 6).

196 El análisis de alelos nulos con el algoritmo EM (Dempster et al., 1977), indicó una frecuencia
197 de alelos nulos entre 0.00-0.40. Mediante el método de Chakraborty et al. (1992) en *D. virginiana* se
198 detectaron alelos nulos en cuatro loci (Dm 1, Dm 2, Dm 3 y Dm 5) en Los Altos, con frecuencia promedio
199 de 0.52; en la Depresión Central se obtuvo una frecuencia promedio de 0.49. En *D. marsupialis* se detectó
200 presencia de alelos nulos en Dm 1, en Los Altos, con frecuencia promedio de 0.13. En la Depresión
201 Central, los loci Dm 2 y Dm 5 presentaron alelos nulos, y la frecuencia promedio para esta población fue
202 de 0.21. La heterocigosidad esperada considerando la presencia de alelos nulos (H_{cINA}) fue de 0.503 en
203 Los Altos y 0.478 en la Depresión Central en *D. marsupialis* y en *D. virginiana* de 0.641 y 0.350 en las
204 mismas poblaciones, respectivamente (Cuadro 5). Finalmente los valores de distancia genética de Cavalli-
205 Sforza y Edwards (1967) excluyendo alelos nulos (D_{cENA}) mostraron mayor distancia entre poblaciones de
206 diferentes especies y la menor entre poblaciones de una misma especie (Figura 3 A). Al considerar los
207 alelos nulos (D_{cINA}), se mantiene la misma tendencia (Figura 3 B).

208 **Discusión**

209 Las especies capaces de explotar una alta variedad de recursos suelen colonizar una amplia
210 gama de hábitats y presentan intervalos de distribución (Krabbe y Rahbek, 2010) y tamaños poblacionales
211 localmente grandes (Gaston et al., 2000). Los tlacuaches, *D. marsupialis* y *D. virginiana*, son
212 considerados organismos comunes, flexibles a las perturbaciones y con tasas de reproducción altas
213 (Sunquist et al., 1987; Adler et al., 1997; Cabello, 2006). Los resultados del presente estudio sugieren que
214 *D. marsupialis* y *D. virginiana* en Chiapas pueden desarrollarse en hábitats con ambientes como los que se
215 observan en Los Altos (frescos) y en la Depresión Central (cálidos) (ver González-Espinosa et al., 2005),
216 sin embargo en ambas regiones sus poblaciones fueron relativamente pequeñas (*D. marsupialis*: 0.008-
217 0.05 individuos trampas noches, *D. virginiana*: 0.01-0.06 individuos trampas noches). No obstante, es
218 importante mencionar la posibilidad de sesgo en los resultados debido a la diferencia de esfuerzo de
219 muestreo entre regiones. La abundancia relativa, un indicador del tamaño poblacional (Lambert et al.,
220 2005), observada en el presente estudio fue independiente de la región, con valores que se encuentran
221 dentro de los registrados en investigaciones previas. Por ejemplo un estudio demográfico con *D.*
222 *marsupialis* en el norte de Colombia reporta una abundancia relativa de 0.010 individuos trampas noches
223 (Adler et al., 1997). Asimismo, en el sur de Brasil y en Las Cuevas, Belice, se registró una densidad
224 poblacional entre 1.4 y 2.26 individuos/ ha, respectivamente (Cáceres y Monteiro-Filho, 1998; Kelly y
225 Caro, 2003). Para *D. virginiana* se ha observado una densidad de 0.23 individuos/ ha en Las Cuevas,
226 Belice (Kelly y Caro, 2003). La abundancia relativa de estos didélfidos es comparativamente baja con
227 respecto a otras especies de animales que también se consideran generalistas, de amplia distribución,
228 tolerantes a la perturbación y con alta capacidad reproductiva, como los mapaches (*Procyon lotor*), cuyas
229 poblaciones se favorecieron con las actividades humanas (Bozek et al., 2007). *Procyon lotor* presenta una
230 densidad poblacional entre 3.4 y 13.6 individuos/ km² en Ontario, Canadá (Rosatte et al., 2010). Es
231 importante considerar que, como sucede cuando se tienen tamaños poblacionales pequeños, sobre todo de
232 animales de talla mediana, los cambios de uso de suelo pueden impactar negativamente las poblaciones de
233 estas especies.

234 La abundancia relativa está determinada por las tasas de natalidad y mortalidad, las cuales
235 dependen de los recursos disponibles, del grado de competencia intra e inter-específica y de la
236 depredación (Gaston et al., 2000). No es posible determinar con nuestro estudio los factores específicos
237 que pueden causar una abundancia relativa baja en *D. marsupialis* y *D. virginiana*. Para conocer los
238 factores es necesario realizar un análisis de la fluctuación temporal de la abundancia relativa, así como la
239 evaluación directa de factores potenciales de afectación, tanto aquellos asociados a actividades humanas
240 como ambientales y demográficos

241 La proporción de sexos observada, de 1:1, puede considerarse una condición idónea para el
242 crecimiento poblacional, en particular para especies en las que la aptitud no difiere entre sexos (Ehrlich y
243 Roughgarden, 1987). Sin embargo, en especies polígamas, como *D. marsupialis* y *D. virginiana*, se espera
244 un mayor número de machos, especialmente en áreas con mayor disponibilidad de recursos y menor
245 competencia (Dickman, 1988; Hardy, 1997), por lo que la proporción de sexos observada podría estar
246 asociada al tamaño poblacional bajo. Por otro lado se observó mayor talla y peso en organismos
247 capturados en la Depresión Central, no obstante sólo se detectaron diferencias significativas en cuanto al
248 peso entre regiones y únicamente para *D. marsupialis*. Dicha diferencia podría ser atribuida a la mayor
249 disponibilidad en cuanto a cantidad y calidad de recursos alimenticios y de refugio (Rocha-Loredo et al.,
250 2010), aspecto que debería evaluarse en estudios futuros.

251 *Diversidad y estructura genética.* Los alelos nulos son aquellos que no se detectan porque hay
252 modificaciones en las secuencias de alineación del ADN blanco y por lo tanto no se obtiene producto
253 durante la PCR (Pompanon et al., 2005). Los alelos nulos pueden resultar en una estimación sesgada de la
254 diferenciación poblacional debido a la reducción de la diversidad genética dentro de las poblaciones
255 (Chapuis y Estoup, 2007). En este estudio se detectó la presencia de alelos nulos, sin embargo los valores
256 de heterocigosidad y distancias genéticas no se modificaron al considerarlos, y las tendencias de
257 diversidad y agrupación fueron las mismas.

258 Las especies *D. marsupialis* y *D. virginiana* son consideradas comunes, generalistas, con
259 altas tasas de reproducción y con cierta resistencia a la perturbación (Kasparian et al., 2004), por lo que se
260 esperaba que las poblaciones estudiadas presentaran niveles altos de diversidad genética y poca
261 diferenciación entre sus poblaciones. No se conocen estudios de diversidad genética nuclear para *D.*
262 *marsupialis* y *D. virginiana*, además de los dos trabajos enfocados al diseño de microsatélites (Lavergne y
263 Catzefflis, 1998; Fike et al., 2009). Para *D. virginiana* se diseñaron 21 microsatélites para un población del
264 norte de Indiana, EUA, donde se encontró un valor promedio de H_e de 0.768 (Fike et al., 2009), mientras
265 que para *D. marsupialis* se diseñaron cinco microsatélites para una población de la Guayana Francesa
266 (Brasil), donde la diversidad promedio fue de $H_e = 0.93$ (Lavergne y Catzefflis, 1998). En estos dos casos
267 los valores son mayores que los encontrados en este trabajo (0.548).

268 Se observaron también valores positivos del coeficiente de endogamia para todas las
269 poblaciones, donde resaltan los valores de las poblaciones de *D. virginiana*: valores positivos indican que
270 los organismos están estrechamente emparentados (Hartl y Clark, 1997). La endogamia puede darse porque
271 los apareamientos no ocurren al azar y/o por un aislamiento de las poblaciones por la presencia de barreras
272 físicas o ecológicas (Smith y Wayne, 1996; Sexton et al., 2009). En este caso, existe una diferencia de
273 altitud de 2000 m entre las poblaciones de Los Altos y la Depresión Central de Chiapas, asociado a un
274 cambio radical en las condiciones ambientales, distintos usos de suelo (agrícola, ganadero, forestal y
275 asentamientos humanos), todo lo cual puede representar barreras físicas y ecológicas para el movimiento de
276 los tlacuaches entre las regiones, y potencialmente disminuir o anular el flujo genético. Asimismo, bajo
277 condiciones de aislamiento y tamaño poblacional pequeño, la población puede ser forzada a un
278 apareamiento entre organismos emparentados.

279 La distribución heterogénea de las frecuencias alélicas entre regiones puede deberse al efecto
280 de la deriva genética, que tiene un efecto más significativo que la selección natural cuando las poblaciones
281 son pequeñas (Castillo, 2007), como en el caso de *D. marsupialis* y *D. virginiana* en Chiapas. La acción
282 de la deriva genética y la endogamia puede promover la fijación y pérdida de alelos en las poblaciones, y

283 causar una diferenciación genética entre ellas (Vázquez-Domínguez et al., 2012). En este estudio, sin
284 embargo, los niveles de F_{st} observados entre poblaciones de la misma especie sugieren una diferenciación
285 reducida, y moderada entre especies. Estudios filogenéticos con marsupiales sugieren poca diferenciación
286 entre las especies, por ejemplo Jansa y Voss (2000) en un estudio con marsupiales de América mostraron
287 que la divergencia entre especies del género *Didelphis* oscila entre 0.95 % y 1.3 % con el gen IRBP; y de
288 5.7 % a 12.6 % con el citocromo b. Cervantes et al. (2010) encontraron una diferenciación genética de 7.8
289 % a 9.3 % entre *D. marsupialis* y *D. virginiana* con el citocromo c oxidasa subunidad I (Cox1). La
290 diferenciación observada entre *D. marsupialis* y *D. virginiana* en este estudio también puede considerarse
291 baja (13.4 %), en tanto que los microsatélites tienen tasas de mutación mayores que el citocromo b, el gen
292 IRBP y el Cox1 (Rentarías, 2007). La baja diferenciación entre estas especies puede deberse a que son
293 especies cercanamente relacionadas (Voss y Jansa, 2009; Medina-Romero et al., 2012) y a que sus
294 atributos ecológicos les han permitido sobrevivir a los cambios ambientales y con pocas modificaciones
295 genéticas a lo largo de su evolución. El análisis de distancia genética también mostró mayor
296 diferenciación entre especies que entre poblaciones, mientras que dentro de las poblaciones fue *D.*
297 *marsupialis* la que presentó valores más altos. Ello puede estar asociado, entre otras posibilidades, al
298 hecho de que *D. virginiana* es más generalista que *D. marsupialis* y que se encuentra más frecuentemente
299 asociada a zonas con actividades humanas (Bozek et al., 2007).

300 Las condiciones geográficas de Los Altos y la Depresión Central de Chiapas sugieren un
301 limitado flujo genético entre las poblaciones, que junto con los niveles de endogamia y la heterogeneidad
302 de las frecuencias alélicas se esperaría una diferenciación entre las poblaciones de cada especie.
303 Inesperadamente, el valor de F_{st} entre poblaciones indica mínima diferenciación genética (1%). Esto puede
304 ser debido a que las poblaciones se originaron de una misma población y las diferencias en las frecuencias
305 alélicas y niveles de endogamia sean resultado de deriva genética. Es importante hacer notar que no se
306 descarta que la diferenciación observada sea resultado de un sesgo en las frecuencias alélicas asociado a
307 un tamaño de muestra pequeño para cada especie por población.

308 La tasa de evolución moderada de los marsupiales (Jansa y Voss, 2000; Steiner y Catzefflis,
309 2004) probablemente ha contribuido al mantenimiento de la diversidad genética y a la escasa
310 diferenciación entre poblaciones y especies. No obstante, si se confirman tamaños poblacionales pequeños
311 de *D. marsupialis* y *D. virginiana* se anticipa que estas especies pueden requerir un cambio de estatus
312 hacia algún grado de vulnerabilidad en Los Altos y la Depresión Central (Frankham et al., 2004). Así, la
313 conservación de *D. marsupialis* y *D. virginiana* es de alta prioridad por pertenecer a un grupo de
314 mamíferos poco representado taxonómicamente en México, por la relación que guardan con radiaciones
315 adaptativas en Australia (Medina-Romero et al., 2012) y por su papel ecológico en diversos ecosistemas.

316 **Agradecimientos**

317 Expresamos nuestro agradecimiento a Jorge Luis Cruz Burguete, Jorge Bolaños Citalán,
318 Eugenia Sántiz López, Alfonso Ortiz Moreno, Wenceslao Bonifaz y Trinidad Alejandro Guillén Díaz por
319 su apoyo en campo. A Maricela García Bautista y Claudia Macías por su ayuda en el trabajo de
320 laboratorio. Este trabajo es parte de la tesis de doctorado de BCS (Beca CONACyT-número 175336).

321 **Literatura citada**

322 Adler, G. H, J. J. Arboledo y B. L. Travi. 1997. Population dynamics of *Didelphis marsupialis* in Northern
323 Colombia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 32:7-11.

324 Aranda, M. 2000. Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. Comisión
325 Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa,
326 Veracruz, México. 212 p.

327 Bozek, C. K., S. Prange y S. D. Gehrt. 2007. The influence of anthropogenic resources on multi-scale
328 habitat selection by raccons. *Urban Ecosystems* 10:413-425.

329 Cabello, D. R. 2006. Reproduction of *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in the
330 Venezuelan Andes. *Acta Therologica* 51(4):427-433.

- 331 Ceballos, G. y Oliva G. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el
332 Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 986 p.
- 333 Cervantes, F. A., J. Arcangeli, Y. Hortelano-Moncada y A. V. Borisenko. 2010. DNA barcodes effectively
334 identify the morphologically similar Common Opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia
335 Opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. Mitochondrial DNA
336 21(S1):44-50.
- 337 Cáceres, N. C. y E. L. A. Monteiro-Filho. 1998. Population dynamics of the Common opossum, *Didelphis*
338 *marsupialis* (Mammalia, Marsupialia), in southern Brazil. International Journal of Mammalian
339 Biology 63:169-172.
- 340 Castillo, C. A. 2007. La selección natural a nivel molecular. In Ecología molecular, L. E. Eguiarte, V.
341 Souza y X. Aguirre (eds.). Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, México, D. F. p. 11-48.
- 342 Cavalli-Sforza, L. L. y A. W. F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures.
343 American Journal of Human Genetics 19(3):233-257.
- 344 Chakraborty, R., M. De Andrade, S. P. Daiger y B. Budowle. 1992. Apparent heterozygote deficiencies
345 observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. Annals of Human
346 Genetics 56:45-57.
- 347 Chapuis, M-P. y A. Estoup. 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population
348 Differentiation. Molecular Biology and Evolution 24:621-631.
- 349 Clemens, W. A. 1968. Origin and Early Evolution of Marsupials. Evolution 22:1-18.
- 350 Dempster, A. P., N. M. Laird y D. R. Rubin. 1977. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the
351 EM Algorithm. Journal of the royal Statistical Society 39:1-38.

- 352 Dias, I. M. G., G. Amato., H. M. Cunha, R. DeSalle, A. P. Paglia, J. K. Peterson y C. G. Fonseca. 2009.
353 Isolation, characterization and cross-species amplification of new microsatellite markers for three
354 oposum species of the Didelphidae family. Conservation Genetics Resources 1:405-410.
- 355 Dickman, C. R. 1988. Variation in Response to Interspecific Competition. American Society of
356 Naturalists 132:289-297.
- 357 Ehrlich, P. R. y J. Roughgarden. 1987. The Science of Ecology. Macmillan Publishing Company y Collier
358 Macmillan Canada, Inc. Estados Unidos de América. 710 p.
- 359 Frankham, R., J. D Ballou y K. H. McInnes. 2004. A Primer of Conservation Genetics. University of
360 Cambridge, Cambridge. 220 p.
- 361 Felsenstein, J. 2009. PHYLIP: Phylogeny Inference Package. Department of Genome Sciences and
362 Department of Biology, University of Washington.
363 <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>: 20.II.2013.
- 364 Fike, J. A., J. C. Beasley y O. E. Rhodes Jr. 2009. Isolation of 21 polymorphic microsatellite markers for
365 the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). Molecular Ecology Resources 9:1200-1202.
- 366 Fleck, D. W. y J. D. Harder. 1995. Ecology of marsupials in two Amazonian rain forest in northeastern
367 Peru. Journal of Mammalogy 76:809-818.
- 368 García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen (para adaptarlo a las
369 condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma
370 de México, D. F. 246 p.
- 371 Gardner, A. L. 1973. The systematics of the genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and
372 Middle America. Special Publications of the Museum Texas Tech University 4:1-81.

- 373 Gaston, K. J., T. M. Blackburn, J. J. D. Greenwood, R. D. Gregory, R. M. Quinn y J. H. Lawton. 2000.
374 Abundance-Occupancy Relationships. *Journal of Applied Ecology* 37:39-59.
- 375 Gehrt, S. D., D. E. Clark y E. K. Fritzell. 1997. Dynamics and Ecology of Virginia Opossums in Southern
376 Texas. *The Southwestern Naturalist* 42:170-176.
- 377 González, D. P., E. d. J. Martínez O., M. P. A. López y S. Gómez U. 2012. Estrategia para la Restauración
378 de la Cuenca del Valle de Jovel. Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza, A. C. y
379 Fundación Gonzalo Río Arronte, I. A. P., México, 55 p.
- 380 González-Espinosa, M., N. Ramírez-Marcial, G. Méndez-Dewar, L. Galindo-Jaimes y D. Golicher. 2005.
381 Riqueza de especies de árboles en Chiapas: variación espacial y dimensiones ambientales
382 asociadas al nivel regional. *En Diversidad Biológica en Chiapas*, M González-Espinosa, N.
383 Ramírez-Marcial y L. Ruiz-Montoya (eds.). ECOSUR, COCyTECH, Plaza y Valdez Editores,
384 México. p. 81-125.
- 385 González-Espinosa, M., Ramírez-Marcial N. y L. Galindo-Jaimes. 2006. Secondary Succession in Montane
386 Pine-Oak Forests of Chiapas, México. *En Ecology and Conservation of Neotropical Montane Oak*
387 *Forests*, M. Kappelle (eds.). *Ecological Studies* 185:209-221.
- 388 Hamilton, M., E. Pincus, A. Di Fiore y R. C. Fleischer. 1999. Universal linker and ligation procedures for
389 construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* 27:500-507.
- 390 Hardy, I. C. W. 1997. Opossum Sex Ratios Revisited: Significant or Nonsignificant? *The American*
391 *Naturalist* 150:420-424.
- 392 Hartl D. L. y A. G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetic*. Sinauer, Sunderland. Massachusetts.
393 542 p.

- 394 Hey, J. y C. A. Machado. 2003. The study of structured populations – new hope for a difficult and divided
395 science. *Nature reviews Genetics* 4:535.
- 396 Holmes, D. J. 1991. Social Behavior in Captive Virginia Opossums, *Didelphis virginiana*. *Journal of*
397 *Mammalogy* 72:402-410.
- 398 Jansa, S. A y R. S. Voss. 2000. Phylogenetic Studies on didelphid Marsupials I. Introduction and
399 Preliminary Results from Nuclear IRBP Gene Sequences. *Journal of Mammalian Evolution* 7:43-
400 77.
- 401 Kanda, L. L., T. K. Fuller, P. R. Sievert y K. D. Friedland. 2005. *Urban Ecosystems* 8:215-255.
- 402 Kasparian, M. A., E C. Hellgreen, S. M. Ginger, L. P. Lavesque, J. E. Clark y D. L. Winkerman. 2004.
403 Population characteristics of Virginia opossum in the cross timbers during raccoon reduction.
404 *American Midland Naturalist* 151:154-163.
- 405 Kelly, M. J. y T. Caro. 2003. Low density of small mammals at Las Cuevas, Belize. *Mammalian Biology*
406 68:372-386.
- 407 Krabbe, B. M. y C. Rahbek. 2010. Causality of the relationship between geographic distribution and
408 species abundance. *The Quarterly Review of Biology* 85(1):3-25.
- 409 Lambert, T. D., J. R. Malcolm y B. L. Zimmerman. 2005. Variation in small mammal species richness by
410 trap height and trap type in southeastern Amazonia. *Journal of Mammalogy* 86:982-990.
- 411 Lavergne, A., C. Douady y D. M. Catzeflis. 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in
412 *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae). *Molecular Ecology* 8:517-518.
- 413 MacManus, J. J. 1970. Behavior of captive opossums, *Didelphis marsupialis virginiana*. *American*
414 *Midland Naturalist* 84:144-169.
- 415 MacManus, J. J. 1971. Activity of Captive *Didelphis marsupialis*. *Journal of Mammalogy* 52:846-848.

- 416 MacManus, J. J. 1974. *Didelphis virginiana*. Mammalian Species 40:1-6.
- 417 Maurer, B. A. 2000. Macroecology and consilience. *Global Ecology y Biogeography* 9:275-280.
- 418 Markovchick-Nicholls, L., H. M. Regan, D. H. Deutschman, A. Widyanata, B. Martin, L. Noreke y T. A.
419 Hunt. 2007. Relationships between human Disturbance and Wildlife Land Use in Urban Habitat
420 Fragments. *Conservation Biology* 22:99-109.
- 421 Medina-Romero, M., I. Goyenechea y J. Castillo-Cerón. 2012. Phylogenetic measures applied to the
422 conservation of Mexican marsupials. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83:1216-1220.
- 423 Naranjo, P. E., C. Lorenzo M. y A. Horváth. 2005. La diversidad de mamíferos en Chiapas. *Rodiles-*
424 *Hernández, R. 2005. En Diversidad Biológica en Chiapas, M. González-Espinosa, N. Ramírez-*
425 *Marcial y L. Ruiz-Montoya (eds.). El Colegio de la Frontera Sur, COCYTECH, Plaza y Valdés, S.*
426 *A. de C. V. México. p. 221-264.*
- 427 Orjuela, C. O. J. y G. Jiménez. 2004. Estudio de la abundancia relativa para mamíferos en diferentes tipos
428 de coberturas y carretera, Finca Hacienda Cristales, Área Cerritos-La Virginia, Municipio de
429 Pereira. *Universitas Scientiarum* 9:87-96.
- 430 Peakall, R. y P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for
431 teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- 432 Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain y P. Taberlet. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and
433 solutions. *Nature Reviews Genetics* 6:847-859.
- 434 Ramírez-Marcial, N., M. González-Espinosa y D. Williams-Linera. 2001. Anthropogenic disturbance and
435 tree Diversity in Montane Rain Forests in Chiapas, México. *Forest Ecology and Management*
436 154:311-326.

- 437 Rangel-Salazar, J. L., P. L. Enríquez R. y T. Will. 2005. Diversidad de aves en Chiapas: prioridades de
438 investigación para su conservación. *En* Diversidad Biológica en Chiapas, M. González-Espinosa.
439 N. Ramírez-Marcial y L. Ruiz-Montoya (eds.). El Colegio de la Frontera Sur, COCYTECH, Plaza
440 y Valdés, S. A. de C. V. México. p. 265-324.
- 441 Ringier, H. J. 1961. Review of Oligocene Didelphid Marsupials. *Journal of Paleontology* 35:218-228.
- 442 Rentarúa, A. M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. *En* Ecología molecular, L. E.
443 Eguiarte. V. Souza y X. Aguirre (eds.). Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, México, D.
444 F. p. 541-566.
- 445 Rodiles-Hernández, R. 2005. Diversidad de peces continentales en Chiapas. *En* Diversidad Biológica en
446 Chiapas, M. González-Espinosa. N. Ramírez-Marcial y L. Ruiz-Montoya (eds.). El Colegio de la
447 Frontera Sur, COCYTECH, Plaza y Valdés, S. A. de C. V. México. p. 195-220.
- 448 Rosatte, R., M. Ryckman, K. Ing, S. Proceviat, M. Allan, L. Bruce, D. Donovan y J. C. Davies. 2010.
449 Density, Movements, and Survival of Raccoons in Ontario, Canada: Implications for Disease
450 Spread and Management. *Journal of Mammalogy* 91:122-135.
- 451 Sexton, J. P., P. J. McIntyre, A. L. Angert y K. J. Rice. 2009. Evolution and Ecology of Species Range
452 Limits. *Annual Reviews of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:415- 436.
- 453 Smith, T. B. y R. K. Wayne. 1996. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University
454 Press, Nueva York, Estados Unidos de América. 483 p.
- 455 Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 2003. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*.
456 W. H. Freeman and Company, New York, Estados Unidos de América. 887 p.
- 457 Steiner, C. y F. M. Catzeflis. 2003. Mitochondrial Diversity and Morphological Variation of *Marmosa*
458 *murina* (Didelphidae) in French Guiana. *American Society of Mammalogists* 84:822-831.

- 459 Steiner, C. y F. M. Catzefflis. 2004. Genetic variation and geographical structure of five mouse-sized
460 opossum (Marsupialia, Didelphidae) throughout the Guiana Region. *Journal of Biogeography*
461 31:959-973.
- 462 Stropp, J., H. T. Steege, Y. Malhi, ATDN y RAINFOR. 2009. Disentangling regional and local tree
463 diversity in the Amazon. *Ecography* 32:46-54.
- 464 Sunquist, M. E., S. N. Austad y F. Sunquist. 1987. Movement patterns and home range in the common
465 opossum (*Didelphis marsupialis*). *Journal of Mammalogy* 68:173-176.
- 466 Tyndale-Biscoe, H. y R. B. MacKenzie. 1976. Reproduction in *Didelphis marsupialis* and *D. albiventris*
467 in Colombia. *Journal of Mammalogy* 57:249-265.
- 468 Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Willis y P. Shipley. 2004. Micro-checker: software for
469 identifying and correcting genotyping error in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*
470 4:535-538.
- 471 Vázquez-Domínguez, E., M. Suárez-Atilano, W. Booth, C. González-Baca y A. D. Cuarón. 2012. Genetic
472 evidence of a recent successful colonization of introduced species on islands: *Boa constrictor*
473 *imperator* on Cozumel Island. *Biological Invasions* 14: 2101-2116.
- 474 Voss, R. S. y S. A. Jansa. 2009. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an
475 extant radiation of new world metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of*
476 *Natural History* 322:1-177.

Capítulo 1 Diversidad genética y abundancia de *Didelphis*

- 477 Cuadro 1. Condiciones ambientales de los sitios de captura de *Didelphis marsupialis* y *D. virginiana* en Los Altos (Altos) y la Depresión Central
- 478 (Depresión) de Chiapas. VR = Villa de las Rosas; AV = Amatenango del Valle; CP = Cerro Corral de Piedra; HU = Reserva Huitepec; MO =
- 479 Reserva Moxviquil; CC = Cerro Coquelexquitzan; PP= Precipitación pluvial media anual; HR= Humedad relativa media anual; T = Temperatura
- 480 media anual; ACm = Semicálido húmedo con lluvias en verano; Cw = Templado con lluvias en verano; Cw2 = Templado subhúmedo con lluvias
- 481 abundantes en verano; Aw1 = Cálido subhúmedo con lluvias en verano (García, 1973).

Región	Sitio	Tipo de vegetación	Altitud (msnm)	Latitud (N)	Longitud (O)	Clima	PP (mm)	HR (%)	T (°C)
Altos	VR	Transición entre selva baja caducifolia y bosque de coníferas	1300	16°22'51"	92°22'09"	ACm	1228	60	20
	AV	Bosque de pino-encino	1820	16°32'00"	92°26'00"	Cw	1256	37	16
	CP	Bosque de encino	2120	16°44'12"	92°38'18"	Cw2	1100	72	15
	MO	Bosque de encino	2200	16°45'21"	92°38'06"	Cw2	1100	76	15
	HU	Bosque de encino	2230-2710	16°44'38"	92°40'15"	Cw2	1300	67	15
Depresión	CC	Selva baja caducifolia	770	16°45'00"	93°07'00"	Aw1	922	71	26

482 Cuadro 2. Nombre, secuencia, longitud en pares de bases (pb), tipo de repetición, temperatura de alineamiento (TA) y número de acceso de los
483 siete microsatélites utilizados para la determinación de la diversidad genética de *Didelphis marsupialis* y *D. virginiana*.

Locus	Secuencia	Longitud	Tipo de repetición	TA (°C)	Número de acceso al GenBank
Dm 1	F: GTTCTTTCTGAGTACCAAAATCCC R: GATGCAGAAAGACAGGCACA	207	(TG) ₂ TA(TG) ₇ AATG	55	AJ011037 ^a
Dm 2	F: TCAATTGCAAGCATGACAAG R: ACATGACAACATTAAAAATAAACTG	246	(AG) ₁₇ (AT) ₉	57	AJ011039 ^a
Dm 3	F: GCTAGCTATTATTGTAACCCCC R: GAAATGGGTAGATTCAAAGCCCC	197	(AG) ₃₉	57	AJ011038 ^a
Dm 5	F: AGCCAAACTGCCTAGCCCTT R: CCATCACAGGGCCCTTGTAT	242	(GT) ₁₅	56.5	AJ011040 ^a
Mnud 20	F: CAGTCGGGGGTCATCAGCTCTTTTCAGATGGA CAGC R: GTTTGGCCGTATACAAGCACAGAA	161-221	(GT) ₁₁	54	GQ465313 ^b
Mnud 41	F: CAGTCGGGGGTCATCATTTGTTTCCCATCCATT AGGA R: GTTTCTGGTGCAAAAATAGGTGCTT	175-237	(GA) ₅ GT (GA) ₂₂	56	GQ465321 ^b
Daur 08	F: CAGTCGGGGGTCATCACCAATCAAAAAATGCA GGAAC R: GTTCCCTCCAACTTTTCACCT	193-211	(AC) ₁₄	56	GQ465307 ^b

484 (^a Lavergne et al., 1998; ^b Dias et al., 2009)

485 Cuadro 3. Número de individuos capturados totales, por sexo y especie; en sitios de Los Altos (Altos) y
 486 Depresión Central (Depresión) de Chiapas. VR = Villa de las Rosas, AV = Amatenango del Valle, CP =
 487 Cerro Corral de Piedra, HU = Reserva Biológica Cerro Huitepec; MO = Reserva Biológica Moxviquil; CC
 488 = Cerro Coquelexquitzán.

<i>Región</i>	<i>Sitio</i>	<i>Sexo</i>	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>Didelphis virginiana</i>
Altos	VR	Macho		1
		Hembra		
	AV	Macho	1	
		Hembra	1	1
	CP	Macho	1	2
		Hembra	2	
	MO	Macho		
		Hembra		2
	HU	Macho	3	2
		Hembra	2	2
Total Altos			10	10
Depresión	CC	Macho	5	5
		Hembra	1	4
	Total		6	9
Depresión				
Total			16	19

489 Cuadro 4. Peso y talla promedio por región de muestreo de *Didelphis marsupialis* y *D. virginiana* en Los
 490 Altos (Altos) y la Depresión Central (Depresión) de Chiapas.

<i>Especie</i>	<i>Región</i>	<i>Peso (g) ± EE</i>	<i>Tamaño (cm)</i>
<i>D. marsupialis</i>	Altos	1350 ± 180	74.8 ± 6.66
	Depresión	2250 ± 150	83.2 ± 2.56
<i>D. virginiana</i>	Altos	1500 ± 340	68.1 ± 6.70
	Depresión	2210 ± 250	79.12 ± 0.99

491 Cuadro 5. Diversidad genética en *Didelphis marsupialis* (*D. m*) y *D. virginiana* (*D. v*) en Los Altos (Altos)
 492 y la Depresión Central (Depresión) de Chiapas. N_a = Número de alelos; P = Porcentaje de polimorfismo;
 493 H_o = Heterocigosidad observada; H_e = Heterocigosidad esperada; F = Coeficiente de endogamia; EHW =
 494 Equilibrio de Hardy Weinberg (prueba combinada); H_{eINA} = Heterocigosidad esperada incluyendo alelos
 495 nulos.

<i>Especie</i>	<i>Parámetros</i>		<i>Región</i>	
	<i>genéticos</i>	<i>Altos</i>	<i>Depresión</i>	
<i>D. m</i>	N_a	2.571	2.857	
	P	85.71	100	
	H_o	0.415	0.427	
	H_e	0.489	0.536	
	H_{eINA}	0.503	0.478	
	F	0.081	0.171	
	EHW	No	No	
<i>D. v</i>	N_a	3.143	3.143	
	P	100	100	
	H_o	0.221	0.223	
	H_e	0.578	0.589	
	H_{eINA}	0.641	0.350	
	F	0.630	0.601	
	EHW	No	No	

496 Cuadro 6. Diferenciación genética (F_{st}) de Weir (1996) entre pares de poblaciones de *Didelphis*
 497 *marsupialis* (*D. m*) y *D. virginiana* (*D. v*) en Los Altos (Altos) y la Depresión Central (Depresión) de
 498 Chiapas. Debajo de la diagonal valores de F_{st} excluyendo alelos nulos (ENA) y arriba de la diagonal
 499 incluye los alelos nulos (INA).

<i>Especie</i>	<i>Localidad</i>	<i>D. virginiana</i>		<i>D. marsupialis</i>	
		<i>Altos</i>	<i>Depresión</i>	<i>Altos</i>	<i>Depresión</i>
<i>D. v</i>	Altos	0	-0.008	0.172	0.181
	Depresión	-0.003	0	0.172	0.119
<i>D. m</i>	Altos	0.162	0.164	0	0.065
	Depresión	0.154	0.098	0.094	0

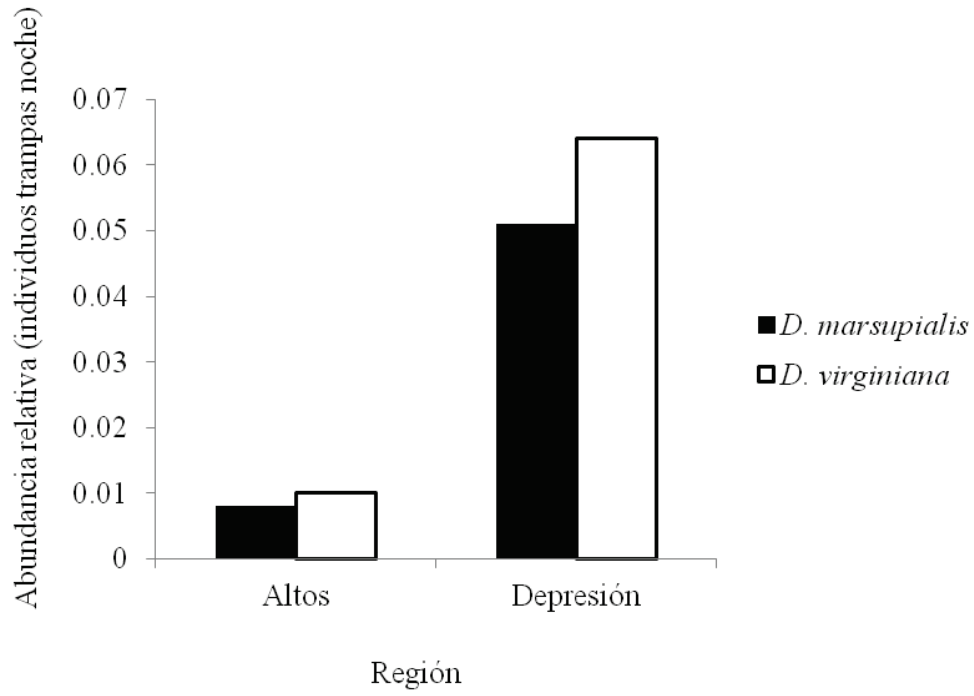
500 Lista de pies de figuras.

501 Figura 1. Abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *D. virginiana* en cada región de Chiapas.

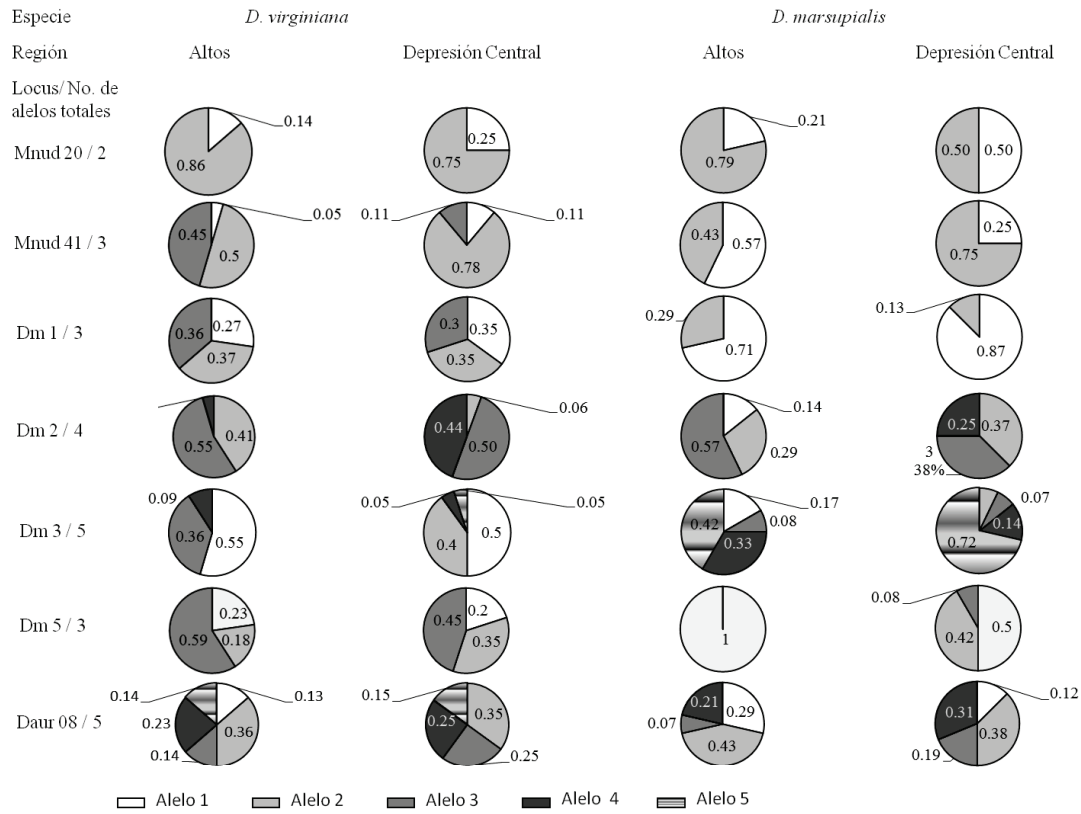
502 Figura 2. Frecuencias alélicas de *Didelphis marsupialis* y *D. virginiana*, por especie, locus y
503 región, en Los Altos (Altos) y la Depresión Central (Depresión) de Chiapas. El peso molecular de
504 los alelos aumenta en orden al número que identifica a cada uno de ellos

505 Figura 3. Dendrograma con base en distancias genéticas de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) de
506 poblaciones de *Didelphis marsupialis* y *D. virginiana* en Los Altos (Altos) y la Depresión Central
507 (Depresión) de Chiapas. (A) Método ENA (D_{cENA}), excluye alelos nulos; (B) Método INA (D_{cINA}), incluye
508 alelos nulos.

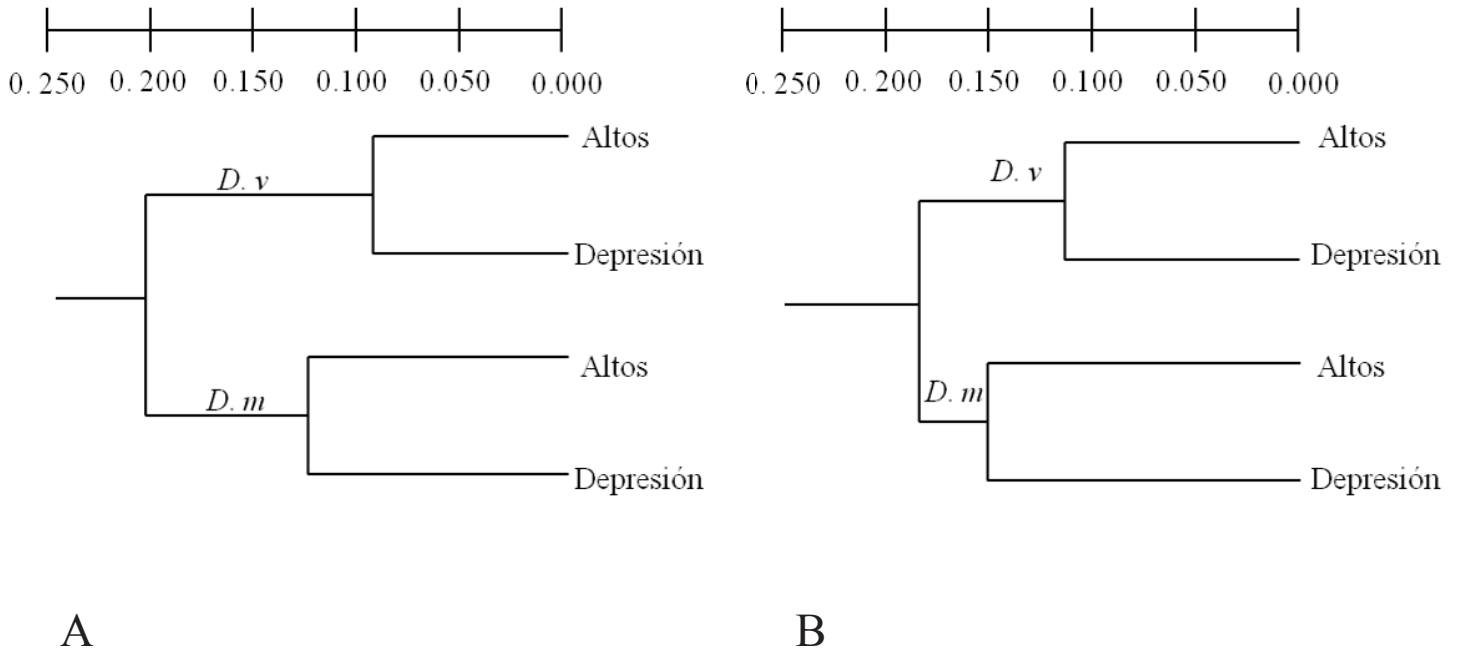
509 Figura 1.



511 Figura 2.



512 Figura 3.



Capítulo 2

1 Submitted to: *Mammalian Biology* (Original Investigation)

2 Genetic diversity of *Didelphis marsupialis* and *D. virginiana* associated to different levels
3 of perturbation in The Highlands and the Central Depression, Chiapas, México

4 Bárbara Cruz-Salazar*¹, Lorena Ruiz-Montoya¹, Luis-Bernardo Vázquez¹ and Ella
5 Vázquez-Domínguez²

6 ¹El Colegio de La Frontera Sur, Carretera Panamericana s/n. Barrio de María

7 Auxiliadora. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México, C. P. 29200;

8 bcruz@ecosur.edu.mx*; lruiz@ecosur.mx; lbvazquez@ecosur.mx

9 ²Departamento Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad, Nacional

10 Autónoma de México. Ap. Postal 70-275, Ciudad Universitaria, México D.F., C. P 04510;

11 evazquez@ecologia.unam.mx

12 Running head: Genetic diversity of *Didelphis* associated to different levels of perturbation

13 Abstract

14 *Didelphis marsupialis* and *D. virginiana* are species considered highly adaptable to
15 anthropogenic perturbations, however the effects of fragmentation and perturbation

16 have not been evaluated in their populations. This study evaluated the population

17 genetic diversity of these common marsupials inhabiting areas that have different

18 disturbance levels, located on The Highlands and Central Depression (Chiapas,

19 Mexico). The genetic diversity was examined based on eight microsatellites loci. Mean

20 genetic diversity was moderate in both species ($H_e = 0.592$ in *D. marsupialis*; $H_e = 0.624$

21 in *D. virginiana*). Diversity was highest in the lowest level of perturbation for *D.*

22 *marsupialis* ($H_e = 0.589$ in The Highlands; 0.617 in Central Depression). Regarding *D.*

23 *virginiana*, diversity was highest in the intermediate perturbation level ($H_e = 0.708$ The
24 Highlands; $H_e = 0.613$ Central Depression). The mean inbreeding coefficient was low for
25 both species, although lower in *D. marsupialis* (-0.001, 0.205 respectively). No genetic
26 differentiation was observed between the studied regions ($F_{rt} = -0.045$ in *D. marsupialis*
27 and $F_{rt} = 0.001$ in *D. virginiana*). Genetic structure and levels of diversity are associated
28 with the perturbation level, although expressed differently for each species. Our results
29 highlight the higher risk projected for *D. marsupialis* due to the fact that it is distributed
30 primarily in relatively conserved areas.

31 Keywords

32 *Didelphis*; Microsatellites; Genetic diversity; Genetic structure; Perturbation

33

34 Introduction

35 Habitat fragmentation in the distribution area of a species often leads to the
36 formation of two or more generally isolated populations. Demographic, environmental
37 and genetic factors, and their interaction, determine the degree of expansion and
38 contraction of those divided populations (Storz and Beaumont, 2002; Jin et al., 2003;
39 Hamrick and Murawski, 1990; Loveless, 1992; Eckert et al., 2010), which is reflected in
40 their diversity and genetic structure (Keyghobadi, 2007; Aguirre-Planter et al., 2000).
41 Fragmentation tends to reduce population size and, in turn, small population size
42 increases the possibility of inbreeding resulting in high coefficients of consanguinity
43 (Wright, 1943). Other genetic factors related to fragmentation and small population size
44 that make populations particularly vulnerable are loss of genetic and allelic variability,
45 genetic bottlenecks, genetic drift and inbreeding. One of the most notable consequence

46 of inbreeding is a reduction of adaptive potential, due to an increase in the frequency of
47 deleterious recessive alleles (Frankham et al., 2002; Milot et al., 2007). Populations in
48 such conditions are highly vulnerable to environmental changes (Young et al., 1996;
49 Frankham et al., 2002), while the interaction of those genetic factors with environmental
50 changes and ecological processes, i.e. habitat perturbation or high disease
51 susceptibility, are all associated with a higher risk of extinction (Frankham, 1997;
52 Castañeda-Rico et al., 2011).

53 Land use by humans is the main cause of habitat fragmentation for many species
54 (Johnstone et al., 2010, Chiappero et al., 2011). The habitat fragments can have
55 different levels of perturbation, depending on the kind of human activity and the degree
56 of habitat transformation, which promote changes in the structure and composition of the
57 landscape. Direct consequences of those perturbations are changes in resources
58 availability and environmental conditions that affect the survival of wild populations
59 (Bissonette, 1997; Spear et al., 2010).

60 *Didelphis marsupialis* (common opossum) and *D. virginiana* (Virginia opossum)
61 are widely distributed throughout Mexico (Ramírez-Pulido et al., 2005). Both species
62 have generalist habits and high reproductive rates; because they inhabit areas
63 characterized by high levels of anthropogenic perturbation, particularly *D. virginiana*,
64 they have low vulnerability to processes of fragmentation and land use changes and are
65 considered relatively adaptable to habitat perturbations (MacManus, 1970; Sunquist et
66 al., 1987; Adler et al., 1997; Cabello, 2006; Markovchick-Nicholls et al., 2007). However,
67 no information regarding the genetic diversity and structure of these species is available,
68 nor has the relationship between genetic structure and habitat perturbation been

69 evaluated. Accordingly, in the present study we aimed to respond two questions: Is
70 genetic diversity in *D. marsupialis* and *D. virginiana* affected by the level of perturbation
71 of the environment they inhabit? Is genetic structure of these species associated with
72 level of perturbation?

73 Considering the biological attributes of these species, we expected an overall
74 high genetic diversity (measured as the level of heterozygosity) and null or low
75 differentiation between populations. We chose to work in two regions the state of
76 Chiapas in southeastern Mexico, characterized by highly contrasting environmental
77 conditions: The Highlands and Central Depression. The former has a cool temperate
78 climate with summer rains and natural vegetation, consisting predominantly of different
79 successional states of pine-oak forest. The latter experiences a hot climate, a long dry
80 season with summer rains and natural vegetation composed primarily of low deciduous
81 forest. In order to evaluate whether there is an association between the degree of
82 perturbation and the diversity and genetic structure of *D. marsupialis* and *D. virginiana*,
83 we established three sample sites varying in perturbation levels as a function of human
84 activity.

85

86 Materials and methods

87 Study area and sampling sites

88 The Highlands (to which we will refer to as Highlands) and the Central
89 Depression of Chiapas (refer to as Depression), vary according to precipitation,
90 temperature, humidity and vegetation type (González-Espinosa et al., 2005). The
91 predominant vegetation in the most conserved areas of Highlands is pine-oak forest in

92 different successional states (Ramírez-Marcial et al., 2001; González-Espinosa et al.,
93 2006). The mean annual temperature is 15°C, with a dry season from November to May
94 and a wet season from June to October. Mean annual rainfall is 1200 mm. In
95 Depression, the predominant vegetation is low deciduous forest in the most conserved
96 areas. The mean annual temperature is 20-29°C, with a dry season from November to
97 May and a wet season from June to October. Mean annual rainfall is 922 mm. Each
98 region is subject to different land uses: agricultural areas, induced grassland, human
99 settlements and forest, associated with different degrees of habitat transformation and
100 fragmentation.

101 The conditions per study region were selected based on general observations of
102 vegetation type and clear presence of anthropogenic perturbation (Table 1). The
103 perturbation levels observed on the field were confirmed by a coarse land cover
104 classification of forest, no-forest vegetation, agriculture areas and human settlements,
105 using a satellite raster image 2008 for the Highlands and 2011 for the Depression.
106 Habitat was classified as: 1) Low perturbation (P1) sites that presented relatively
107 continuous forest (> 10 hectares) with little or nule influence from anthropogenic
108 activities, or with vegetation undergoing a process of natural regeneration due to the
109 cessation of human activities during at least the last 15 years (roughly determined by
110 diameter at breast high of a small sample of trees > 5 m tall); 2) Intermediate
111 perturbation (P2) included sites with some type of agricultural activity, with or without
112 patches of vegetation in an incipient successional state (*acahual* or fallow land with
113 secondary growth vegetation, tree < 5 m); 3) High perturbation (P3), consisted of sites
114 that displayed clear evidence of anthropogenic perturbation such as human settlements

115 and that included leisure, labour, educational and transportation activities; original
116 vegetation, which had been replaced by introduced or ornamental vegetation, did not
117 exist. Because the sampling sites were relatively adjacent, we selected three pseudo-
118 repetitions for each perturbation type, considering that a repetition of the previously
119 explained conditions would not have been possible otherwise. The group of pseudo-
120 repetitions for each level of perturbation was considered a population.

121 The sampling sites for Highlands corresponding to the P1 perturbation
122 classification were Corral de Piedra Hill (CH), Huitepec wildlife reserve (HU) and
123 Moxviquil wildlife reserve (MO), The P2 sampling sites were located in the villages of El
124 Aguaje (AG), and San Isidro Las Huertas (SI), and the third at the km36 of the Tuxtla
125 Gutierrez-San Cristobal de Las Casas (SCLC) highway (K36). Finally, the municipal
126 cementery (MC), sports center (SC) and El Colegio de la Frontera Sur (EC), all in the
127 city of San Cristobal de Las Casas, constituted the P3 sampling sites. Regarding
128 Depression, sampling of the least perturbed environments (P1) was done at
129 Coquelexquitzán Hill (CH), La Cañada (Km 12 on the Tuxtla Gutiérrez-SCLC highway;
130 K12) and at La Pera, Berriozabal (LP). P2 sites were sampled at Rancho Perseverancia
131 (RP) and Rancho al Sol (RS) farms and at Tecnológico de Monterrey University
132 Campus, in the city of Tuxtla Gutierrez (TM), whereas P3 sampling sites were Parque
133 del Oriente (PO) and Parque Joyo Mayu (JM) public parks, and Tecnológico Regional
134 Campus (TR), all within the city of Tuxtla Gutierrez.

135 For the opossum individuals sampling, the design included 18 sites: for each
136 perturbation level repetition (3 conditions x 3 repetitions x 2 regions, for a total of 18).
137 Trapping was performed using 48 Tomahawk traps (15.2 x 15.2 x 48.2 cm) baited with

138 sardines, distributed radially, each separated by 20 m, activated over a period of four
139 consecutive nights (Lambert et al., 2005). A tissue sample was taken from the ear of
140 each captured individual for subsequent genetic analysis. Tissue samples from each
141 individual were ethically obtained, with the corresponding collecting permits, and stored
142 in labeled Eppendorf tubes with 90% ethanol and placed in refrigeration at - 4°C until
143 processed.

144 Genetic analysis

145 Nuclear DNA was obtained from each tissue sample with the phenol-chloroform-
146 alcohol-isoamyl method (Hamilton et al., 1999). We tested 11 microsatellites, three of
147 which were not reproducible. The eight microsatellites amplified were: Dm 1, Dm 2, Dm
148 3 and Dm 5 designed for *D. marsupialis* (Lavergne et al., 1998) and the remaining four
149 (Mnud 20, Mnud 41, Daur 08 and Daur 09) for *Caluromys philander*, *Didelphis aurita*
150 and *Metachirus nudicaudatus* (Dias et al., 2009). Each microsatellite was amplified by
151 Polymerase Chain Reaction (PCR) using a master mix (mastermix; PROMEGA), in a MJ
152 mini Gradient Thermo Cycler and a BIO-RAD Personal Thermal Cycler. Amplification
153 conditions were consistent with Lavergne et al. (1999) and Dias et al. (2009), except the
154 aligning temperature (AT) that was modified in five of the eight markers (Dm 1 = 54 °C;
155 Dm 2 = 49 °C; Dm 3 = 52 °C; Mnud 20 = 51 °C and Daur 08 = 52 °C). The
156 amplifications were visualized using electrophoresis with 10 % polyacrylamide gels,
157 dyed with ethidium bromide and observed under ultraviolet light.

158 The genetic diversity estimates were number of alleles, observed and expected
159 heterozygosity, allelic richness and polymorphism, calculated by condition, region and
160 species, using the software GenAlEx v. 6.4 (Peakall and Smouse, 2006). Hardy-

161 Weinberg equilibrium (HWE) was evaluated by locus and per perturbation level based
162 on a combination of independent test probabilities (Sokal and Rhoif, 2003). Genetic
163 structure was evaluated by different means: first, F_{ST} was estimated between regions
164 and for sampling sites at the different perturbation levels, using GenAlEx v. 6.4. Next,
165 distribution of the genetic variance between regions and within populations (perturbation
166 levels) was examined using a molecular analysis of variance (AMOVA), based on F_{ST} of
167 Weir and Cockerham (1984) with the program ARLEQUIN v.3.1 (Excoffier and Lischer,
168 2010).

169 The presence of null alleles was determined using the program Micro-Checker v.
170 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Allelic and genotype frequencies were corrected
171 using the 95% confidence level and 1000 repetitions (Chakraborty et al., 1992). The
172 corrected F_{st} was estimated considering null alleles and genetic distance (Cavalli-Sforza
173 and Edwards (1967), using the ENA (D_{c-ENA}) and INA (D_{c-INA}) correction method with the
174 program Free-NA (Chapuis and Estoup, 2007). Finally, dendrograms were obtained
175 using the program PHYLIP v. 3.69 (Felsenstein, 2009) based on the estimated Cavalli-
176 Sforza and Edwards's genetic distance. Additionally to traditional analysis of genetic
177 structure, we used the Bayesian clustering method with the software STRUCTURE 2.2.3
178 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003) to infer the most likely number of clusters of
179 individuals (K) in *D. marsupialis* and *D. virginiana*. STRUCTURE was run for $K = 1-9$
180 using a burn in length of 50 000 and 100 000 Markov chains Monte Carlo (MCMC)
181 generations, with the admixture model. All runs were repeated five times for each K . The
182 most probable number of clusters was chosen based on the ΔK method of Evanno et al.
183 (2005).

184 Results

185 Genetic diversity and structure of *Didelphis marsupialis*

186 Thirty one samples from *D. marsupialis*. Results indicated deviation from HWE (χ^2
187 tests) for two loci, Daur 09 from the site with the least perturbation in Highlands and Dm
188 2 from the site with intermediate perturbation in Depression. Results also showed 100%
189 polymorphism and allele frequencies varied across all perturbation levels: three alleles
190 in three loci (Dm 1, Daur 09 and Dm 3) were most frequent at sites that presented the
191 lowest levels of perturbation (P1) in both regions (Figure 1). For the remaining loci, it
192 was the most common allele that differed among perturbation levels and regions (Figure
193 1).

194 Genetic diversity values are shown in Table 2: mean number of alleles ranged
195 between 3.6 and 4.0 (Table 2a). Heterozygosity values were higher in *D. virginiana*
196 (Table 2a, b), while when compared between perturbation levels the higher
197 heterozygosity in *D. marsupialis* was found in low perturbation (Table 2a). Inbreeding
198 coefficients varied between -0.080 and 0.078, corresponding to the intermediate
199 perturbation level in Depression and the site with the least perturbation in Highlands,
200 respectively (Table 3). The lowest inbreeding coefficient value was found in low
201 perturbation sites (Table 3).

202 Regarding genetic structure, results show the highest F_{st} values between
203 perturbation levels (0.11) compared to that between regions (0.05). Also, the highest
204 differentiation was found between populations with less perturbation of the Highlands
205 and intermediate perturbation of the Depression (Table 4a). The AMOVA results
206 indicated, considering regions, that the genetic variation resided mainly within

207 populations (95.1%), while between regions was 4.9%. The AMOVA results estimated
208 for perturbation levels indicated that genetic variation is also mainly within populations
209 (89.4 %) and only 10.6% was between the two perturbation levels where captures were
210 obtained. STRUCTURE results showed that the most probable number of clusters was
211 $K = 2$ when considering regions and $K = 3$ for perturbation levels, with 64% and 80% of
212 individuals assigned to Highlands (cluster A) and Depression (cluster B), respectively
213 (Figure 2a). Regarding perturbation levels, the low perturbation cluster, membership
214 was 58% and 61% for Highlands (cluster A) and Depression (cluster B), respectively;
215 58% of individuals were assigned to the intermediate perturbation level (cluster C)
216 (Figure 2b).

217 Null alleles were detected for the Daur 09 (0.34 frequency). However, expected
218 heterozygosity with corrected allelic frequencies (H_{eINA}) was not significantly different to
219 expected heterozygosity without considering null alleles ($\chi^2 = 0.00042$, $P = 0.999$, $g.l. =$
220 2) (Table 2a). Similarly, genetic differentiation obtained by the ENA (F_{stENA}) and INA
221 (F_{stINA}) methods was 0.116, and 0.118, respectively.

222 Genetic differentiation by population pairs, based on null alleles, presented the
223 same pattern as differentiation without considering null allele probability. Specifically,
224 independent of region, the lowest differentiation between populations was associated
225 with the lowest level of perturbation and was greater between different perturbation
226 levels in different regions (Table 4a). The Cavalli-Sforza and Edwards (1967) genetic
227 distance values, excluding null alleles (D_{cENA}), was lower between populations from sites
228 with the lowest levels of perturbation in both regions (0.084) (Figure 3a, b). Results are
229 consistent with those from STRUCTURE, with an average distance of 0.54 for cluster A

230 and 0.80 for cluster B considering regions, while when based on perturbation levels,
231 mean distance values were 0.60 for cluster A, 0.81 for cluster B and 0.50 for cluster C.

232

233 Genetic diversity and structure of *Didelphis virginiana*

234 *Didelphis virginiana* individuals were captured at all perturbation levels, both in
235 Depression and Highlands with a total of 117 individuals. The HWE (χ^2 tests) detected
236 equilibrium deviation in Highlands for two loci (Dm1 and Daur 08) in low perturbation
237 and four loci (Dm 2, Dm 3, Daur 09 and Mnud 41) in high perturbation sites. All loci at
238 intermediate perturbation site were out of HWE. HWE results for Depression showed
239 deviations at: three loci (Dm 1, Daur 08, Mnud 41 in low perturbation), one locus (Mnud
240 41 in intermediate) and two (Daur 08 and Daur 09 in high). Results indicated 100%
241 polymorphism and allele frequencies showed variation among perturbation levels for
242 each region (Figure 4). The frequency of allele 2 from Daur 09 increased with the
243 degree of perturbation in Highlands, however, this is less evident in Depression. Allele 2
244 from Dm 5 locus showed an inverse relationship with perturbation level, however, this
245 was only observed in Depression (Figure 4). The analysis of the allelic pattern detected
246 local common alleles in all populations with a frequency of 50% or less (Figure 4).

247 The mean allele richness ranged between 2.6 and 4.5 (Table 2b) and mean H_e
248 values were higher for the intermediate perturbation, 0.71 in Highlands and 0.61 in
249 Depression (Table 2b). Inbreeding coefficients were between -0.067 and 0.478 for the
250 low perturbation environments in Highlands and Depression, respectively. In general, a
251 higher inbreeding coefficient was observed in Depression than in Highlands (Table 3). In

252 both regions, the highest levels of inbreeding were found in the low perturbation sites
253 while the lowest was at the high perturbation sites (Table 3).

254 Genetic structure results showed rather low, and similar, F_{st} values for both
255 between perturbation levels (0.05) and between regions (0.03). Genetic differentiation
256 observed was lower in the interior of Highlands, i.e. between the different levels of
257 perturbation in this region, which was not observed in Depression. Furthermore, less
258 genetic differentiation was observed between low and intermediate perturbation, while
259 higher differentiation was detected between high and low perturbation and between high
260 and intermediate perturbation, both within and between each region; this pattern was
261 also found when considering the presence of null alleles (INA method) (Table 4b). The
262 AMOVA results showed that 2.8% of the genetic variation was between regions and
263 97.2% was within, with very similar proportions when estimated between perturbation
264 levels (4.6 % of variation between and 95.4 % within). Also, STRUCTURE results
265 showed that the most probable number of clusters was $K = 2$ for both cases, when
266 considering regions and for perturbation levels. In the first case, with 62% and 68% of
267 individuals assigned to Highlands and Depression, respectively (Figure 5a). Regarding
268 perturbation levels for Highlands, the low perturbation cluster had a membership of 50%
269 and 50% in cluster A and cluster B, respectively; 65% and 35% of individuals were
270 assigned to the intermediate perturbation level (clusters A and B); finally, 88% were
271 assigned to cluster A for the high perturbation level (Figure 5b). Depression region had
272 the following assignment proportions: low perturbation with 87% in cluster B,
273 intermediate with 69% in cluster A and high perturbation with 88% also in cluster A
274 (Figure 5b).

275 Null alleles were detected for Dm 5 (0.14 frequency), Daur 09 (0.37), Mnud 20
276 (0.51) and Mnud 41 (0.19). Nevertheless, expected heterozygosity ($H_{e/INA}$) was not
277 significantly different ($\chi^2 = 0.015$, $P = 0.999$, $g.l. = 5$) to that obtained without
278 consideration of null alleles (Table 2b). Likewise, F_{stENA} and F_{stINA} according, calculated
279 with the ENA and INA methods, respectively was 0.049 for both methods (Table 4b).

280 Genetic distances when excluding null alleles (D_{cENA}) indicated a higher genetic
281 similarity between intermediate and high perturbation sites in Depression (0.60) and
282 between intermediate perturbation in Highlands and low perturbation in Depression
283 (0.117) (Figure 6a). If null allele incidence (D_{cINA}) is considered, then genetic distances
284 are modified, but the lowest genetic distance between intermediate and high
285 perturbation in Depression remains (0.063), and a high degree of similarity is evident
286 between the low perturbation and high perturbation sites in Highlands (0.094). The
287 intermediate perturbation sites in Highlands and the low perturbation sites in Depression
288 showed little relationship with the rest of the populations (Figure 6b). The analysis of
289 genetic structure showed an average distance between individuals of 0.71 in cluster A
290 and 0.70 in cluster B.

291

292 Discussion

293 The results suggests that *D. marsupialis* displays less tolerance to high
294 perturbation than *D. virginiana*. Genetic diversity of both species was related to different
295 perturbation levels. Populations of *D. marsupialis* that occupied sites with the least
296 perturbation showed the highest genetic diversity, whereas in *D. virginiana*, the highest
297 diversity was observed in sites with intermediate perturbation. Also, as a result of the

298 different levels of perturbation, populations of both species were moderately genetically
299 structured.

300 *Didelphis marsupialis* and *D. virginiana* are considered highly resistant to the
301 effects of anthropogenic activities (Adler et al., 1997; Cabello, 2006; Markovchick-
302 Nicholls et al., 2007). Our results suggest that this is not that straightforward: they are
303 both capable of persisting in perturbed environments, although *D. virginiana* has a wider
304 tolerance range than *D. marsupialis*. The fact that *D. marsupialis* is consistently present
305 in conserved sites and not in disturbed ones, could be a result of interspecific
306 competition (Begon et al., 2006). In fact, in areas where *D. virginiana* was not present,
307 *D. marsupialis* is found, in both relatively conserved environments and highly perturbed
308 areas (Orjuela and Jiménez, 2004).

309 The levels of genetic diversity found in this study for both species were within the
310 range observed in other species exposed to processes of fragmentation of habitats by
311 human activities. For example, Olivieri et al. (2008) evaluated three species of rodents
312 (*Microcebus* spp.) in Madagascar and found a decrease in genetic diversity in
313 landscapes transformed by human activities. Also, Chiappero et al. (2011) studied the
314 genetic structure of populations of a rodent (*Calomys musculus*) in urban and rural
315 areas in Argentina, to evaluate the influence of human activities on its genetic structure,
316 and found intermediate levels of heterozygosity ($H_e = 0.783$), lower in urban areas (H_e
317 = 0.763) than in rural areas ($H_e = 0.802$). *Didelphis marsupialis* showed a lower
318 heterozygosity (0.594) compared to *D. virginiana* (0.624). Species possessing
319 intermediate to high levels of genetic diversity are often more capable to respond to
320 environmental changes (Frankham et al., 2002; Keyghobadi, 2007), which might be an

321 advantage for both *Didelphis* species in relation with their tolerance to habitat
322 perturbation.

323 Habitat fragmentation can promote reproductive isolation, a decrease in
324 population size and local adaptation processes, which in concert can potentially reduce
325 diversity and increase genetic differentiation between populations (Keyghobadi, 2007).
326 *Didelphis marsupialis* was restricted mainly to conserved sites and presents a
327 differentiation of around 14%. Because conserved areas are increasingly in decline, in
328 the near future its populations could become more differentiated (Challenger et al.,
329 2010; Rocha-Loredo et al., 2010). On the other hand, genetic diversity of *D. virginiana*
330 was higher in areas with intermediate levels of perturbation, possibly due to larger
331 population sizes that can be sustained in these sites (Markovchick-Nicholls et al., 2007).

332 The results of low levels of inbreeding (consanguinity) observed for *D.*
333 *marsupialis*, suggest that the aggressive and territorial behaviour of the species,
334 particularly during the reproductive season (Sunquist et al., 1987), likely favors random
335 mating or prevents reproduction between related organisms. Coefficients of inbreeding
336 in *D. virginiana* were higher, thus reproduction between related individuals is a
337 possibility. Considering both regions, the lowest level of inbreeding was found in
338 populations from sites with the highest levels of perturbation, which is likely a result of
339 individuals moving between these perturbed areas, in search of available resources. On
340 the other hand, the low levels of genetic differentiation observed between regions for
341 both species, despite the significant distance that separates them and the very unlikely
342 migration between them, could be related to the low evolutionary rate of marsupials
343 (Hutchison and Templeton, 1999; Jansa and Voss, 2000; Steiner and Catzeflis, 2004).

344 However, it is more likely that not enough time has passed for the effects of isolation,
345 due to habitat fragmentation and land use changes, to cause significant population
346 structure at the regional level.

347 Conventional cluster analyses and Bayesian analyses showed a lack of structure
348 with respect to region for both species. In particular for *D. marsupialis*, the highest
349 similarity was observed for those populations in the least perturbed sites. Clustering in
350 these populations was not modified when null alleles were considered. In comparison,
351 the clusters in *D. virginiana* were less clear and groups were slightly changed when
352 considering null alleles. The lack of a similar pattern in function of perturbation level or
353 region could be associated to *D. virginiana* favouring areas subject to human activities
354 (Bozek et al., 2007). If this is the case, this species might be substituting the resources it
355 commonly uses for the resources that are available (Begon et al., 2006), thus resulting
356 in a random genotype distribution (Eckert et al., 2010).

357 This study suggests that even though *D. marsupialis* and *D. virginiana* are
358 common species and relatively resistant to human activities, they are affected by
359 perturbation occurring in the regions of study. These marsupials are species with
360 moderate levels of genetic diversity and a genetic structure associated with perturbation.
361 In particular, *D. marsupialis* could be at risk if confirmed that this species can only
362 establish populations in conserved areas. Environmental modifications driven by
363 present-day climate change generate additional stress on the species (Gaston and
364 Fuller, 2007) therefore, the design of appropriate conservation strategies for *D.*
365 *marsupialis* and *D. virginiana* is fundamental, especially as they carry out diverse
366 functions in the ecosystems they inhabit (Gaston, 2010), and which possess genetic

367 information regarding processes of adaptation and survival throughout of their biological
368 evolution (Voss and Jansa, 2009).

369

370 Acknowledgements

371 We would like to thank Jorge Bolaños Citalán, Eugenia Sántiz López, Alfonso Ortiz
372 Moreno, Wenceslao Bonifaz and Trinidad Alejandro Guillén Díaz for their support in the
373 field. We are also grateful to Maricela García Bautista, María Teresa Pérez Gómez,
374 Nancy del Rocío Morales Ruíz and Quevin Hernández Flores for their help during the
375 laboratory analysis. This study is partial fulfillment of doctoral dissertation of BCS in
376 ECOSUR (CONACyT-Grant number 175336).

377

378 References

- 379 Adler, G.H., Arboledo, J.J., Travi, B.L., 1997. Population dynamics of *Didelphis*
380 *marsupialis* in Northern Colombia. Stud. Neotrop. Fauna. E.32, 7-11.
- 381 Aguirre-Planter, E.G., Furnier, R., Eguiarte, L.E., 2000. Low levels of genetic variation
382 within and high levels of genetic differentiation among populations of species of
383 *Abies* from southern Mexico and Guatemala. Am. J. Bot. 87, 362-371.
- 384 Ayala, J.F., Tracey, M.L., 1974. Genetic Differentiation Within and Between Species of
385 the *Drosophila willistoni* Group. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71, 999-1003.
- 386 Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L., 2006. Ecology: From Individuals to
387 Ecosystems. Blackwell, Australia.
- 388 Bissonette, J.A., 1997. Wildlife and Landscape Ecology, Effects of Pattern and Scale,
389 Springer.

- 390 Bozek, C.K., Prange, S., Gehrt, S.D., 2007. The influence of anthropogenic resources
391 on multi-scale habitat selection by raccons. *Urban Ecosyst.* 10, 413-425.
- 392 Cabello, D.R., 2006. Reproduction of *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia:
393 Didelphidae) in the Venezuelan Andes. *Acta Theriol.* 51, 427-433.
- 394 Castañeda-Rico, S., León-Paniagua, L., Ruedas, L.A., Vázquez-Domínguez, E., 2011.
395 High genetic diversity and extreme differentiation in the two remaining
396 populations of *Habromys simulatus*. *J. Mammal.* 92, 963-973.
- 397 Cavalli-Sforza, L.L., Edwards A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: models and
398 estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.* 19, 233-257.
- 399 Challenger, A., Golicher, D., González-Espinosa, M., March-Misfsut, I., Ramírez-Marcial,
400 N., Vidal-Rodríguez, R.M. 2010. Montañas del Norte y Altos de Chiapas. In:
401 Toledo-Aceves, T. (Eds.), *El Bosque Mesófilo de Montaña en México: Amenazas*
402 *y Oportunidades para su Conservación y Manejo Sostenible*, Comisión Nacional
403 para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO, México, D F, pp.
404 133-141.
- 405 Chapuis, M-P., Estoup, A., 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population
406 Differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24, 621-631.
- 407 Chiappero, M.B., Panzetta-Dutari, G M., Gómez, D., Castillo, E., Polop, J.J., Gardenal,
408 C.N., 2011. Constranting genetic structure of urban and rural populations of the
409 wild rodent *Calomys musculus* (Cricetidae, Sigmodontinae). *Mamm. Biol.* 76,
410 41-50.
- 411 Dias, I.M.G., Amato, G., Cunha, H.M., DeSalle, R., Paglia, A.P., Peterson, J.K.,
412 Fonseca, C.G., 2009. Isolation, characterization and cross-species amplification

- 413 of new microsatellite markers for three opossum species of the Didelphidae
414 family. *Conserv. Genet. Resour.* 1, 405-410.
- 415 Eckert, A.J., Eckert, M.L., Hall, B.D., 2010. Effects of historical demography and
416 ecological context on spatial patterns of genetic diversity within foxtail pine (*Pinus*
417 *balfouriana*; Pinaceae) stands located in the Klamath Mountains, California. *Am.*
418 *J. Bot.* 97, 650-659.
- 419 Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of
420 individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14,
421 2611-2620.
- 422 Excoffier, L., Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to
423 perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.*
424 10, 564-567.
- 425 Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure:
426 extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
- 427 Felsenstein, J., 2009. PHYLIP: Phylogeny Inference Package. Department of Genome
428 Sciences and Department of Biology, University of Washington.
- 429 Frankham, R.J., Ballou, D., Briscoe, D.A., 2002. Introduction to conservation genetics.
430 Cambridge University Press, Cambridge.
- 431 Gaston, K.J., Fuller, R.A., 2007. Commonness, population depletion and conservation
432 biology. *Trends. Ecol. Evol.* 23, 14-19.
- 433 Gaston, K.J., 2010. Valuing Common Species. *Science* 327, 154-155.

- 434 García, E., 1973. Modifications to the climatic classification of Köpen system (to adapt it
435 to the conditions of the Mexican Republic). Instituto de Geografía, Universidad
436 Nacional Autónoma de México, D. F.
- 437 Gonzalez-Espinosa, M., Ramírez-Marcial, N., Méndez-Dewar, G., Galindo-Jaimes, L.,
438 Golicher, D. 2005. Riqueza de especies de árboles en Chiapas: variación
439 espacial y dimensiones ambientales asociadas al nivel regional. In: González-
440 Espinosa M, Ramírez-Marcial N and Ruiz-Montoya L (Eds.). Diversidad Biológica
441 en Chiapas, ECOSUR, COCyTECH, Plaza y Valdez Editores, México, pp. 81-
442 125.
- 443 Hamilton, M., Pincus, E., Di Fiore, A., Fleischer, R. C., 1999. Universal linker and
444 ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for
445 microsatellites. *Biotechniques* 27, 500-507.
- 446 Hamrick, J.L., Murawski, D.A., 1999. The breeding structure of tropical tree populations.
447 *Plant. Species. Biol.* 5, 157-166.
- 448 Hutchison, D.W., Templeton A.R., 1999. Correlation of Pairwise Genetic and
449 Geographic Distance Measures: Inferring the Relative Influences of Gene Flow
450 and Drift on the Distribution of Genetic Variability. *Evolution* 53, 1898-1914.
- 451 Jansa, S.A., Voss, R.S., 2000. Phylogenetic Studies on didelphid Marsupials I.
452 Introduction and Preliminary Results from Nuclear IRBP Gene Sequences. *J.*
453 *Mammal. Evol.* 7, 43-77.
- 454 Jin, Y., Tianhua, H., Bao-Rong, L., 2003. Fine scale genetic structure in a wild soybean
455 (*Glycine soja*) population and the implications for conservation. *New. Phytol.* 159,
456 513-519.

- 457 Johnstone, C.P., Reina, R.D., Lill, A., 2010. Impact of anthropogenic habitat
458 fragmentation on population health in a small, carnivorous marsupial. *J. Mammal.*
459 91, 1332-1341.
- 460 Keyghobadi, N., 2007. The genetic implications of habitat fragmentation for animals.
461 *Can. J. Zool.* 85, 1049-1064.
- 462 Lambert, T.D., Malcolm, J.R., Zimmerman, B.L., 2005. Variation in small mammal
463 species richness by trap height and trap type in southeastern Amazonia. *J.*
464 *Mammal.* 86, 982-990.
- 465 Lavergne, A., Douady, C., Catzeflis, D.M., 1998. Isolation and characterization of
466 microsatellite loci in *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae). *Mol. Ecol.*
467 8, 517-518.
- 468 Loveless, M.D., 1992. Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic
469 organization. *New. For.* 6, 67-94.
- 470 MacManus, J.J., 1970. Behavior of captive opossums, *Didelphis marsupialis virginiana*.
471 *Am. Midl. Nat.* 84, 144-169.
- 472 Markovchick-Nicholls, L., Regan, H.M., Deutschman, D.H., Widyanata, A., Martin, B.,
473 Noreke, L., Hunt, T.A., 2007. Relationships between human Disturbance and
474 Wildlife Land Use in Urban Habitat Fragments. *Conserv. Biol.* 22, 99-109.
- 475 Milot, E., Weimerskirch, H., Duchesne, P., Bernatchez, L., 2007. Surviving with Low
476 Genetic Diversity: The Case of Albatrosses. *Proc. Biol. Sci.* 274, 779-787.
- 477 Olivieri, G.L., Sousa, V., Chikhi, L., Radespiel, U., 2008. From genetic diversity and
478 structure to conservation: Genetic signature of recent population declines in three
479 mouse lemur species (*Microcebus* spp.). *Biol. Cons.* 141, 1257-1271.

- 480 Orjuela, C.O.J, Jiménez, G., 2004. Estudio de la abundancia relativa para mamíferos en
481 diferentes tipos de coberturas y carretera, Finca Hacienda Cristales, Área
482 Cerritos-La Virginia, Municipio de Pereira. Univ. Sci. 9, 87-96.
- 483 Peakall, R., Smouse P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population
484 genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes 6, 288-295.
- 485 Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure
486 using multilocus genotype data. Genetics 155, 945-959.
- 487 Ramírez-Marcial, N., González-Espinosa, M., Williams-Linera, D., 2001. Anthropogenic
488 disturbance and tree Diversity in Montane Rain Forests in Chiapas, México. For.
489 Ecol. Manage. 154, 311-326.
- 490 Ramírez-Pulido, J., Arroyo-Cabrales, J., Castro-Campillo, A., 2005. Estado actual y
491 relación nomenclatural de los mamíferos terrestres de México. Acta. Zool. Mex.
492 (n.s.) 21, 21-82.
- 493 Rangel-Salazar, J.L., Enríquez, R.P.L., Will, T. 2005. Diversity of birds in Chiapas:
494 research priorities for their conservation. In: González-Espinosa M, Ramírez-
495 Marcial N and Ruiz-Montoya L (Eds.). Diversidad Biológica en Chiapas, El
496 Colegio de La Frontera Sur, COCYTECH, Plaza y Valdés, México, pp. 265-324.
- 497 Rocha-Loredo, A.G., Ramírez-Marcial, N., González-Espinosa, M., 2010. Riqueza y
498 diversidad de árboles del bosque tropical caducifolio en la depresión central de
499 Chiapas, México. Bol. Soc. Bot. 87, 89-103.
- 500 Rodiles-Hernández, R. 2005. Diversity of continental fish in Chiapas In: González-
501 Espinosa M, Ramírez-Marcial N and Ruiz-Montoya L (Eds.). Diversidad Biológica

- 502 en Chiapas, El Colegio de La Frontera Sur, COCYTECH, Plaza y Valdés, México,
503 pp. 195-220.
- 504 Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 2003. Biometry. The principles and practice of statistics in
505 biological research. W. H. Freeman and Company, New York, E. U. A.
- 506 Spear, S.F., Balkenhol, N., Fortin, M-J., Mcrae, B.H., Scribner, K., 2010. Use of
507 resistance surfaces for landscape genetic studies: considerations for
508 parameterization and analysis. *Mol. Ecol.* 19, 3576-3591.
- 509 Steiner, C., Catzeflis, F.M., 2003. Mitochondrial Diversity and Morphological Variation of
510 *Marmosa murina* (Didelphidae) in French Guiana. *Am. Soc. Mammal.* 84, 822-
511 831.
- 512 Storz, J.F., Beaumont, M.A., 2002. Testing for genetic evidence of population expansion
513 and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a
514 hierarchical Bayesian model. *Evolution* 56, 154-166.
- 515 Sunquist, M.E., Austad, S.N., Sunquist, F., 1987. Movement patterns and home range in
516 the common oposum (*Didelphis marsupialis*). *J. Mammal.* 68, 173-176.
- 517 Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Willis, D.P.M., Shipley, P., 2004. Micro-checker:
518 software for identifying and correcting genotyping error in microsatellite data. *Mol.*
519 *Ecol. Notes* 4, 535-538.
- 520 Voss, R.S., Jansa, S.A., 2009. Phylogenetic relationships and classification of didelphid
521 marsupials, an extant radiation of new world metatherian mammals. *Bull. Am.*
522 *Mus. Nat. Hist.* 322, 1-177.
- 523 Weuir, B. S., Cockerham, C. C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of
524 population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.

- 525 Wright, S., 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28, 114-138.
- 526 Young, A., Boyle, T., Brown, T., 1996. The population genetic consequences of habitat
527 fragmentation for plants. *Trends. Ecol. Evol.* 11, 413-418.

528 Table 1. Qualitative characterization of perturbation levels of sampling sites for *Didelphis*
 529 *marsupialis* and *D. virginiana*. F = forest, PA = productive activities (agriculture), HS =
 530 human settlements, IV = introduced vegetation, HF = habitat fragmentation, LT = level of
 531 habitat transformation; 0 = absent, + = low, ++ = intermediate, +++ = high.

Perturbation level	F	PA	HS	IV	HF	LT
Low (P1)	+++	0	0	0	+	+
Intermediate (P2)	+	+++	++	++	++	++
High (P3)	0	+	+++	+++	+++	+++

532 Table 2. Genetic diversity values for (a) *Didelphis marsupialis* and (b) *D. virginiana* in
 533 populations with different levels of perturbation (PL) in The Highlands (Highlands) and Central
 534 Depression (Depression), Chiapas, Mexico. P1 = low perturbation, P2 = intermediate
 535 perturbation, P3 = high perturbation, WC = without capture. N = sample size, N_a = observed
 536 number of alleles, N_{ex} = exclusive alleles, H_o = observed heterozygosity, H_e = expected
 537 heterozygosity, $H_{e/INA}$ = expected heterozygosity including null alleles.

<i>(a) Didelphis marsupialis</i>							
Region	PL	N	N_a	N_{ex}	H_o	H_e	$H_{e/INA}$
Highlands	P1	13	3.87	2.36	0.53	0.59	0.61
	P2	0	WC	WC	WC	WC	WC
	P3	0	WC	WC	WC	WC	WC
Highlands	P1	9	4	2.58	0.57	0.62	0.61
	P2	9	3.62	2.39	0.59	0.57	0.57
	P 3	0	WC	WC	WC	WC	WC

<i>(b) Didelphis virginiana</i>							
Region	PL	N	N_a	N_{ex}	H_o	H_e	$H_{e/INA}$
Highlands	P1	19	4.25	3.22	0.51	0.69	0.73
	P2	2	2.62	2.35	0.56	0.71	0.55
	P3	12	3.62	2.51	0.56	0.56	0.53
Highlands	P1	10	3.50	2.41	0.28	0.58	0.65
	P2	48	4.50	2.97	0.55	0.61	0.66
	P 3	26	4.37	2.87	0.58	0.59	0.61

538 Table 3. Inbreeding coefficient (F_{is}) of *Didelphis marsupialis* and *D. virginiana* in
 539 populations with different levels of perturbation (PL) in The Highlands (Highlands) and
 540 Central Depression (Depression), Chiapas, Mexico. P1 = low perturbation, P2 =
 541 intermediate perturbation, P3 = high perturbation, WC = without capture.

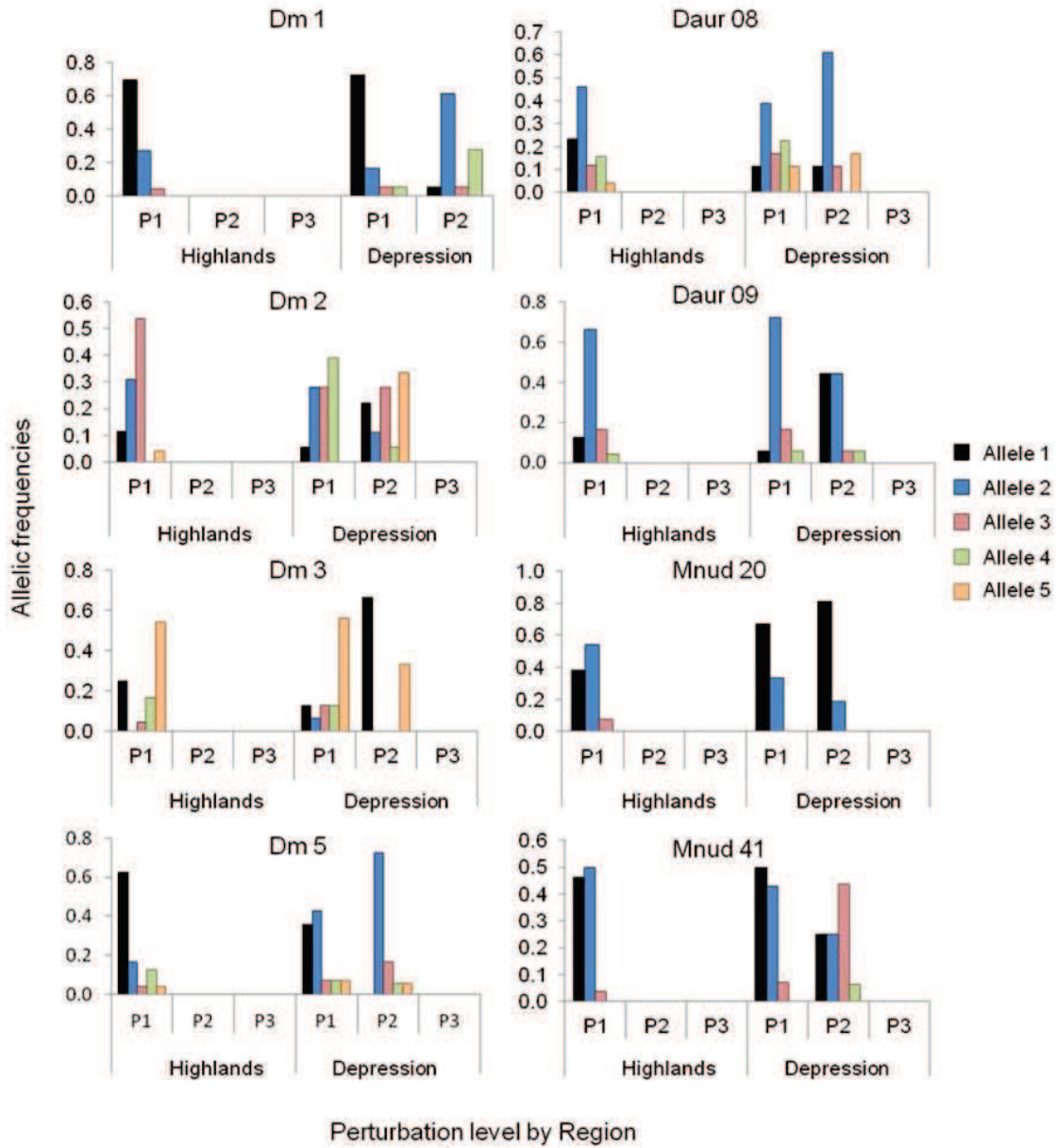
Region	PL	<i>D. marsupialis</i>	<i>D. virginiana</i>
Highlands	P1	0.078	0.266
	P2	WC	-0.067
	P3	WC	-0.031
Depression	P1	0.004	0.478
	P2	-0.080	0.152
	P3	WC	0.054

543 Table 4. Genetic differentiation of (a) *Didelphis marsupialis* and (b) *D. virginiana*, over a
 544 perturbation gradient in The Highlands (Highlands) and the Central Depression
 545 (Depression), Chiapas, Mexico. Values based on *Fst* below the diagonal, above the
 546 diagonal using INA. P1 = low, P2 = perturbation and P3 = high perturbation, WC =
 547 without capture.

(a) <i>Didelphis marsupialis</i>							
Region	Highlands			Depression			
	Population	P1	P2	P3	P1	P2	P3
Highlands	P1	0	WC	WC	0.007 ^{NS}	0.185 ^{NS}	WC
	P2	WC	0	WC	WC	WC	WC
	P3	WC	WC	0	WC	WC	WC
Depression	P1	0.012 ^{NS}	WC	WC	0	0.148 ^{NS}	WC
	P2	0.171 ^{***}	WC	WC	0.135 ^{***}	0	WC
	P3	WC	WC	WC	WC	WC	0

(b) <i>Didelphis virginiana</i>							
Region	Highlands			Depression			
	Population	P1	P2	P3	P1	P2	P3
Highlands	P1	0	0.000 ^{NS}	0.028 ^{NS}	0.032 ^{NS}	0.026 ^{NS}	0.054 ^{NS}
	P2	0.000 ^{NS}	0	0.034 ^{NS}	0.000 ^{NS}	0.032 ^{NS}	0.098 ^{NS}
	P3	0.024 [*]	0.009 ^{NS}	0	0.146 ^{NS}	0.037 ^{NS}	0.063 ^{NS}
Depression	P1	0.027 [*]	0.000 ^{NS}	0.126 ^{***}	0	0.108 ^{NS}	0.134 ^{NS}
	P2	0.022 ^{**}	0.016 ^{NS}	0.032 ^{**}	0.092 ^{***}	0	0.024 ^{NS}
	P3	0.054 ^{***}	0.091 [*]	0.058 ^{***}	0.123 ^{***}	0.024 ^{**}	0

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ^{NS} = not significant.



548 Figure 1. Allelic frequencies of eight microsatellites from *Didelphis marsupialis* in
 549 populations of The Highlands (Highlands) and the Central Depression (Depression),
 550 Chiapas, Mexico. P1 = low perturbation, P2 = intermediate perturbation, P3 = high
 551 perturbation.

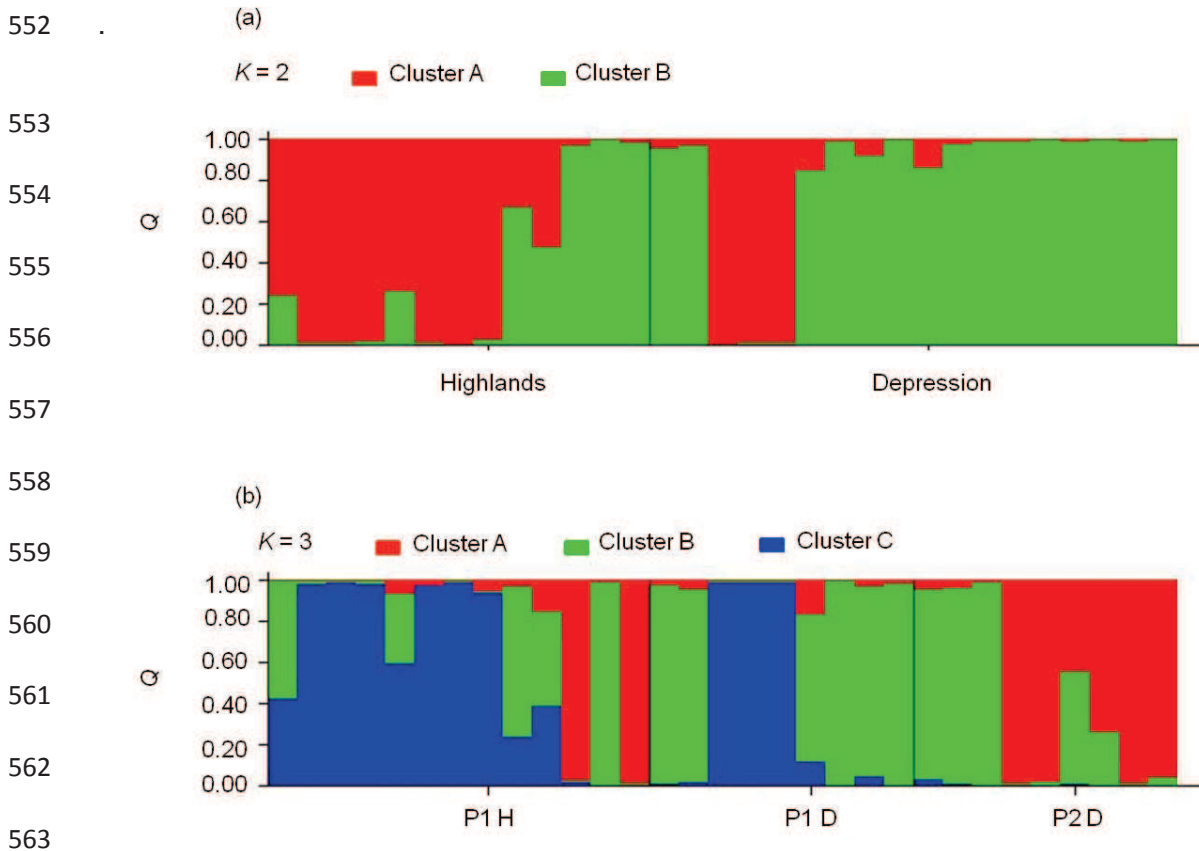
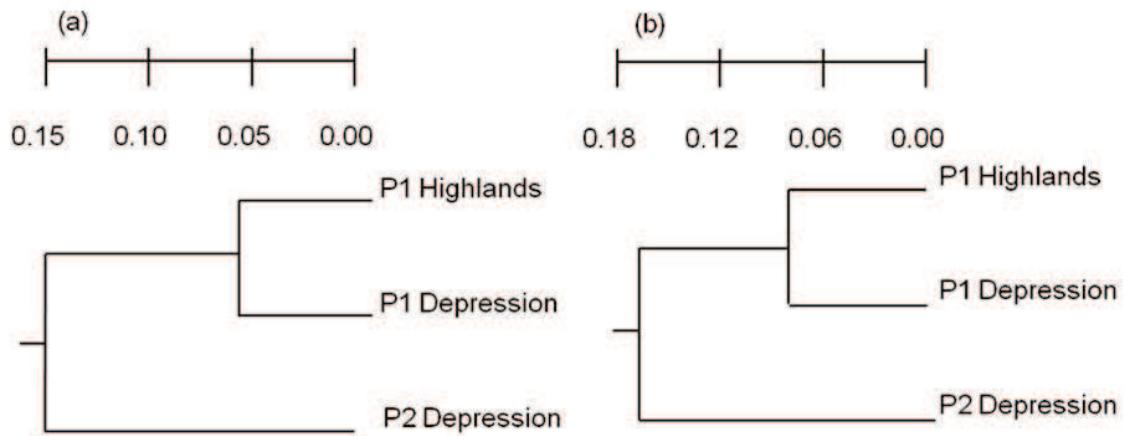
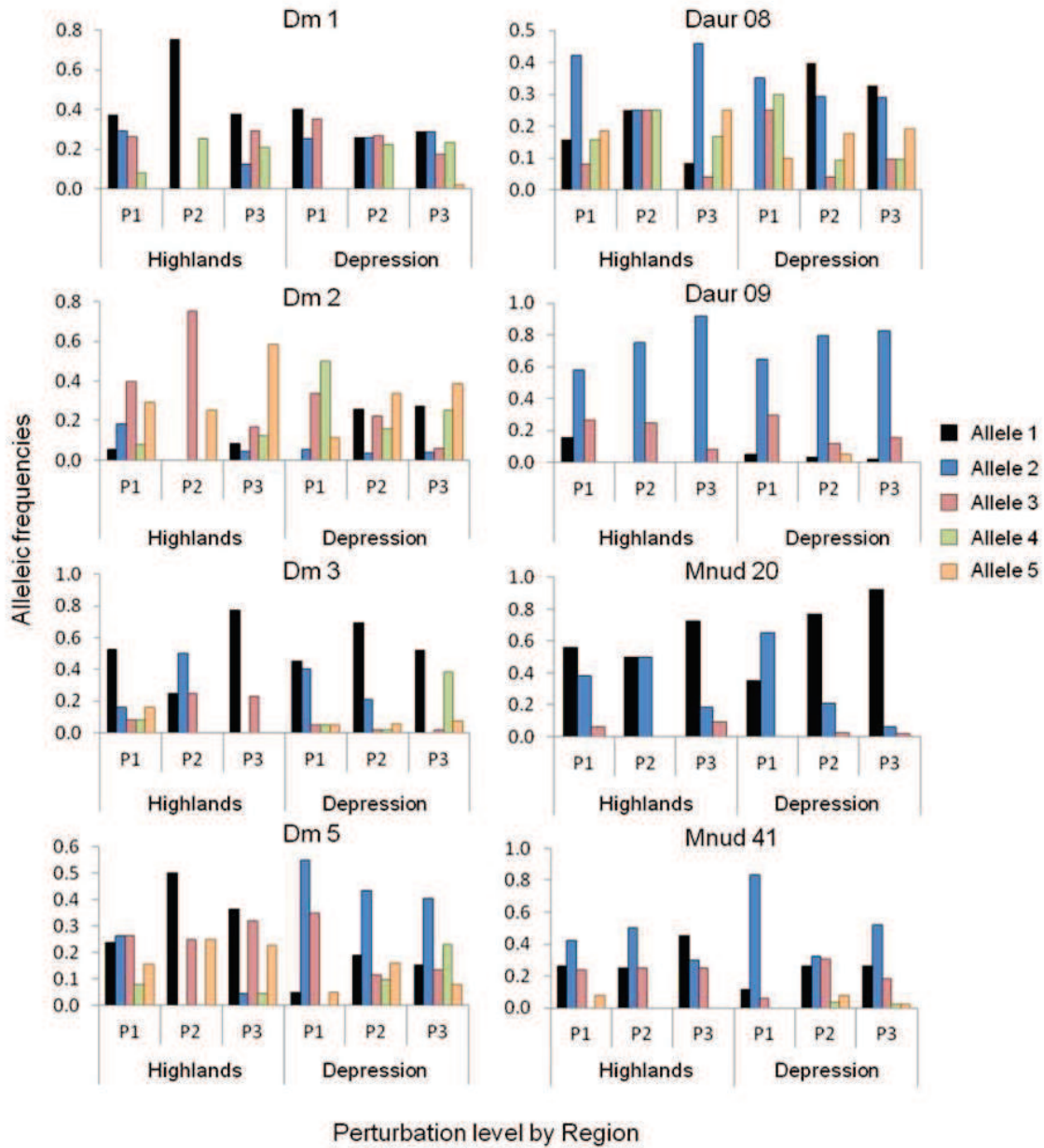


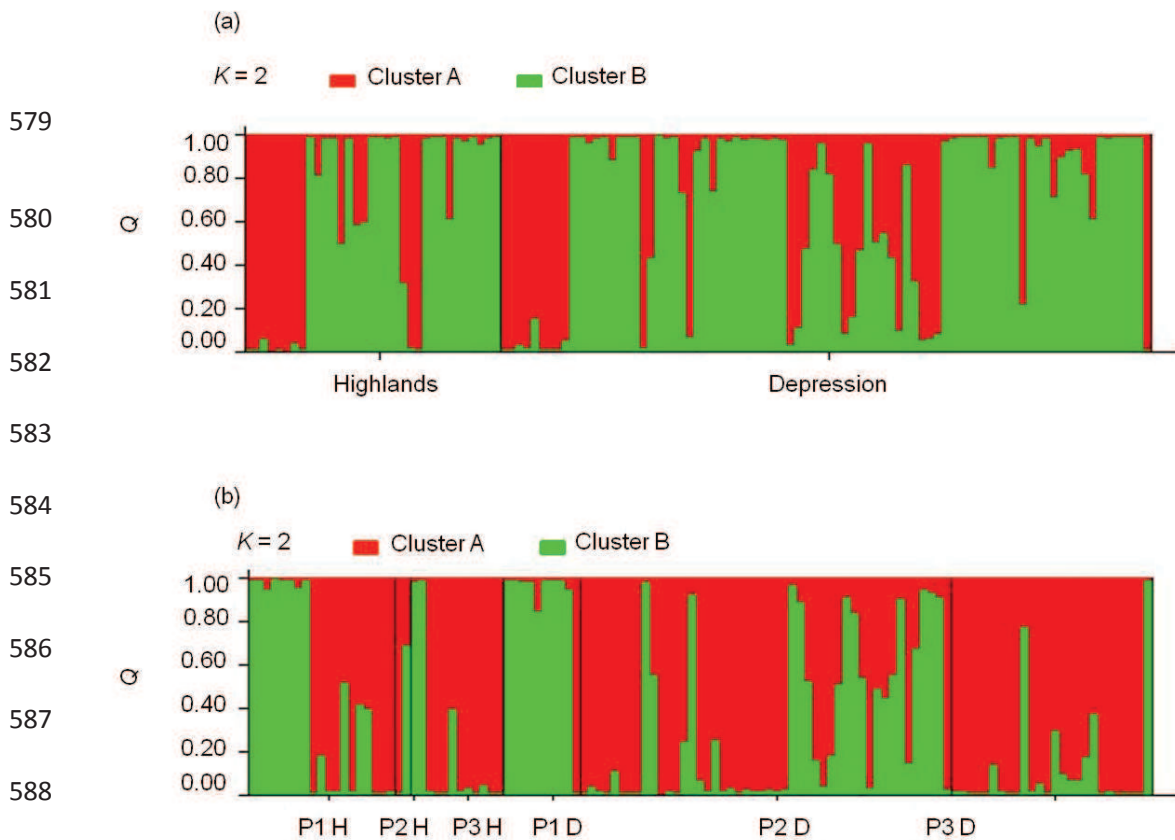
Figure 2. Bayesian clustering analysis performed with STRUCTURE. (a) plot of individual *Didelphis marsupialis* by regions for $K = 2$ in The Highlands (Highlands) and the Central Depression (Depression) of Chiapas. (b) plot of individual *Didelphis marsupialis* by perturbation levels for $K = 3$. P1 H = low perturbation of The Highlands, P1 D = low perturbation of Central Depression, P2 D = intermediate perturbation of Central Depression. Black vertical lines separate populations



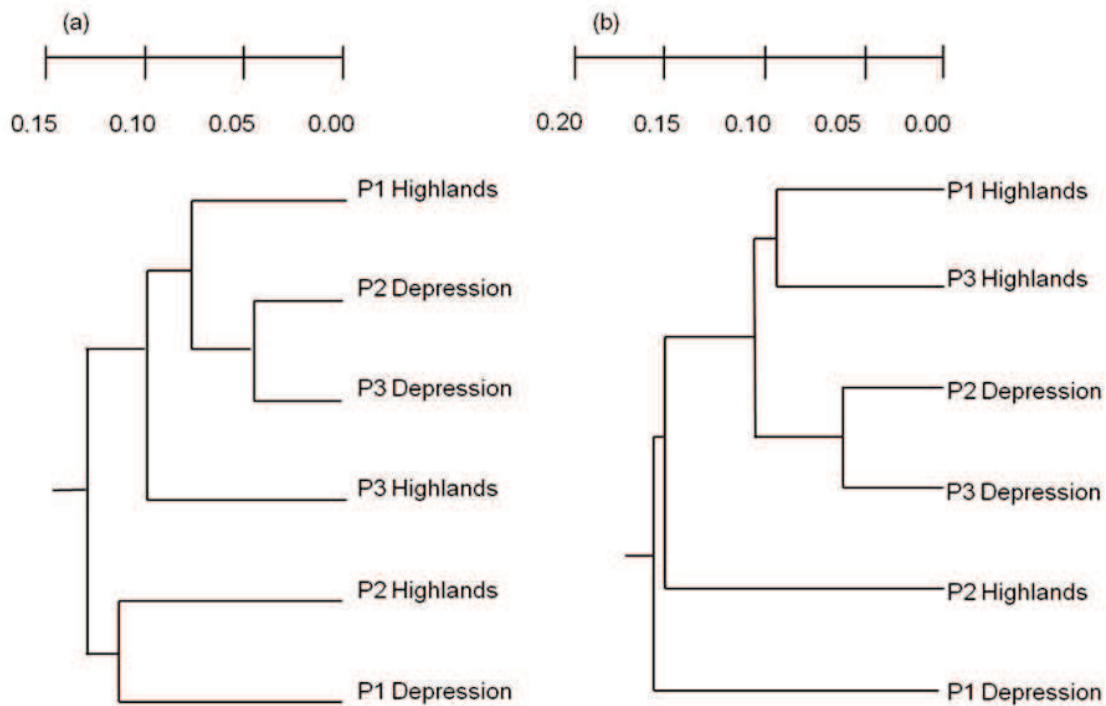
570 Figure 3. Dendrogram based on Cavalli-Sforza and Edwards (1967) genetic distances of
571 *Didelphis marsupialis* populations in The Highlands (Highlands) and the Central
572 Depression (Depression), Chiapas, Mexico. (a) ENA method (D_{cENA}), excluding null
573 alleles; (b) INA method (D_{cINA}), including null alleles. P1= low perturbation, P2 =
574 intermediate perturbation.



575 Figure 4. Allelic frequencies of eight amplified microsatellites from *Didelphis virginiana* in
 576 populations of The Highlands (Highlands) and the Central Depression (Depression),
 577 Chiapas, Mexico. P1 = low perturbation, P2 =intermediate perturbation, P3 = high
 578 perturbation.



590 Figure 5. Bayesian clustering analysis performed with STRUCTURE. (a) plot of
 591 individual *Didelphis virginiana* by regions for $K = 2$ in The Highlands (Highlands) and the
 592 Central Depression (Depression) of Chiapas. (b) plot of individual *Didelphis virginiana* by
 593 perturbation levels for $K = 3$. P1 H = low perturbation of The Highlands, P2 H =
 594 intermediate perturbation of The Highlands, P3 H = high perturbation of The Highlands,
 595 P1 D = low perturbation of Central Depression, P2 D = intermediate perturbation of
 596 Central Depression, P3 D = high perturbation of Depression Central. Black vertical lines
 597 separate populations.



598 Figure 6. Dendrogram based on Cavalli-Sforza and Edwards genetic distances (1967) of
 599 populations of *Didelphis virginiana* in The Highlands (Highlands) and the Central
 600 Depression (Depression), Chiapas, Mexico. (a) ENA method (D_{cENA}), excluding null
 601 alleles; (b) INA method (D_{cINA}), including null alleles. P1 = low perturbation, P2 =
 602 intermediate perturbation, P3 = high perturbation.

Capítulo 3

Efectos de la estructura y composición de paisajes con diferentes grados de perturbación sobre la abundancia de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México.**Resumen**

Las perturbaciones antropogénicas alteran la composición y estructura del paisaje y a su vez modifican la abundancia local de las poblaciones. En este estudio se evaluó la relación de las características del paisaje y el grado de perturbación con la abundancia de *Didelphis marsupialis* y *D. virginiana* en dos paisajes de Chiapas, Los Altos y la Depresión Central. En cada paisaje se localizaron tres grados de perturbación y tres repeticiones para cada uno. La estructura y configuración del paisaje de cada grado de perturbación se estimó mediante índices del paisaje. En cada repetición se colocaron 48 trampas Tomahawk por cuatro noches consecutivas. La abundancia se consideró como el número de individuos capturados y el índice de abundancia relativa se calculó a partir de los individuos capturados por trampas noches. Se realizaron regresiones logísticas con el programa R v. 3 para evaluar la influencia de la región, especie, grados de perturbación y estructura del paisaje en la abundancia y proporción de sexos. La relación entre la composición del paisaje y la abundancia fue medida con una ANCOVA. Por último se evaluó la viabilidad poblacional mediante una simulación de la permanencia de sus poblaciones a 100 años con 100 iteraciones con el programa VORTEX v. 9. 99. Los resultados mostraron menor abundancia en Los Altos ($\mu = 3.83$ individuos trampas noches) que en la Depresión Central ($\mu = 8.33$ individuos trampas noches) y *D. virginiana* fue más abundante en ambas regiones ($\mu = 10.50$ individuos).

No se detectó influencia de los grados de perturbación sobre la abundancia de cada especie a pesar de que *D. marsupialis* no fue detectada en áreas con alta perturbación. La presencia de *D. virginiana* ($v = 1.84$, $P = 6.41^{-08}$) y la región ($v = -17.08$, $P = 0.003$) influyeron sobre la distribución de la abundancia observada. El número de fragmentos determinó la presencia de *D. marsupialis* y para *D. virginiana* no se detectó ninguna relación. El análisis de viabilidad poblacional sugiere una respuesta diferencial entre especies: las poblaciones de *D. marsupialis* podrían estar en riesgo, y las de *D. virginiana* permanecerán estables a través del tiempo. Es necesario estudiar la demografía poblacional de *D. marsupialis* a mayor escala, así como la competencia interespecífica con *D. virginiana*, para evaluar su estado de conservación y los efectos en su distribución geográfica. Este estudio corrobora la alta flexibilidad de *D. virginiana* para desarrollarse en áreas con alta perturbación.

Palabras clave: Paisaje, *Didelphis*, abundancia, perturbación, índices del paisaje

Introducción

El cambio de paisajes naturales y la pérdida de hábitat son factores que han modificado la distribución y abundancia de las especies hasta generar, en algunos casos, la extinción de las mismas (Gorresen y Willig, 2004; Lindenmayer, 2008; Spear et al., 2010). Las actividades antropogénicas, principalmente la agricultura y el desarrollo urbano, alteran los hábitats naturales provocando la transformación y fragmentación del hábitat (Cardillo et al., 2004; Keyghobadi, 2007; Johnstone et al., 2010; Chiappero et al., 2011), lo que modifica la distribución de los recursos y a su vez

las interacciones poblacionales con efectos importantes en la estructura poblacional (Gaston y Fuller, 2007; Johnstone et al., 2010).

Durante el proceso de pérdida de hábitat existe un cambio progresivo en la composición y estructura del paisaje, el cual es reflejado en un mosaico de diferentes tipos de uso suelo, condiciones topográficas, microclimas y estados sucesionales (Law y Dickman, 1998). Generalmente la diversidad de paisajes naturales es transformada gradualmente a paisajes heterogéneos compuestos y estructurados por elementos de vegetación natural y de vegetación modificada, hasta paisajes urbanos totalmente homogéneos (Lockwood y McKinney, 2001; Gorresen y Willig, 2004). La abundancia, uso de fragmentos de hábitat y la permanencia de las poblaciones son fuertemente influenciadas por la historia de vida de la especie, por la medida en que el hábitat se pierde y por el papel que juega la heterogeneidad y composición de la matriz en la conectividad funcional (Bruggeman et al., 2010; Schooley y Branch, 2010).

Las especies generalistas pueden sustituir parcial o totalmente su hábitat por uno modificado (Lindenmayer, 2000b), debido a ésta característica se considera que la fragmentación del paisaje no tiene efectos importantes en sus poblaciones (Markovchick-Nicholls et al., 2007). El tlacuache común (*Didelphis marsupialis*) y el tlacuache de Virginia (*Didelphis virginiana*) son marsupiales comunes, extremadamente adaptables, generalistas, oportunistas y exitosos (Adler, 1997; Cabello 2006; Markovchick-Nicholls et al., 2007), capaces de habitar distintos ambientes, incluso con incidencia de perturbaciones antropogénicas (Sunquist et al., 1987; Adler et al., 1997),

ya que no seleccionan alimentos ni sitios reproductivos y pueden desplazarse a grandes distancias (Gardner, 1973; Sunquist et al., 1987).

Diversos estudios que evalúan la abundancia de estos marsupiales, han reportando una abundancia relativa baja (Adler et al., 1997; Cáceres y Monteiro-Filho 1998; Kelly y Caro, 2003). Asimismo, se ha estudiado la influencia de la estructura y la composición del paisaje en la abundancia de estas especies pero no para México (Orjuela y Jiménez, 2004; Lambert et al., 2005; Markovchick-Nicholls et al., 2007).

Actualmente se reconoce que las especies comunes también son fuertemente afectadas por la pérdida, fragmentación y degradación del hábitat, con efectos en la abundancia local, modificación de su distribución geográfica (Gaston y Fuller, 2007; Gaston, 2010) y estado de conservación. La alta flexibilidad que caracteriza al tlacuache común y al tlacuache de Virginia, la importancia de detectar en las especies comunes cambios poblacionales causados por la pérdida y transformación del hábitat en dichas especies y la falta de estudios en estas especies, respecto a la influencia de las actividades humanas en sus poblaciones, hizo necesario explorar si su abundancia está distribuida de manera homogénea o si es determinada por la estructura y composición del paisaje que varía según el grado de perturbación antropogénica.

Los objetivos de este estudio fueron explorar las posibles relaciones entre la abundancia del tlacuache común y el tlacuache de Virginia y la composición y estructura del paisaje dadas por el grado de perturbación. Asimismo, determinar cómo son estas relaciones, cuáles son los factores del paisaje que influyen y cómo es la viabilidad de las poblaciones en paisajes perturbados. El estudio se realizó en dos paisajes de Chiapas, la

región de Los Altos y la Depresión Central, en cada paisaje se localizaron tres grados de perturbación diferentes, ya que se esperaba observar el mismo patrón en ambos.

Considerando los antecedentes respecto a la estimación de la abundancia de estos marsupiales, se esperaba encontrar bajos niveles de abundancia local. Se consideró que los indicadores de fragmentación como el número de fragmentos, densidad de borde, media del índice del tamaño de forma e índice de Shannon, pueden influir en la distribución de la abundancia de éstos marsupiales ya que describen la diversidad y estructura del paisaje y por lo tanto pueden influir en la conectividad funcional y viabilidad de las poblaciones (Morrison et al., 1998; Schooley y Branch, 2010). Asimismo, en cada paisaje se esperó observar un patrón de la distribución de la abundancia en función al grado de perturbación en ambas especies. Así, en el tlacuache común detectar mayor abundancia a menor perturbación, ya que a pesar de considerarse oportunista y altamente generalista prefiere áreas con menor actividad humana (E. Espinoza-Medinilla, observación personal). En el tlacuache de Virginia observar mayor abundancia en zonas de perturbación intermedia es decir áreas agrícolas, ya que suele seleccionar zonas de cultivos donde encuentra mayor disponibilidad de recursos (Ginger et al., 2003; Markovchick-Nicholls et al., 2007).

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se realizó en dos paisajes correspondientes a dos regiones de Chiapas: Los Altos y la Depresión Central (en adelante se utilizará de forma indistinta región o paisaje). La formación vegetal predominante en Los Altos corresponde a bosques

templados principalmente bosque de encino, pino-encino, pino-encino-liquidámbar, pino y bosque de niebla (Ramírez-Marcial et al., 2001; González-Espinosa et al., 2005). Los bosques de encino han sido continuamente expuestos a la fragmentación, por lo general siendo sustituidos por bosques de pinos, áreas de cultivo y comunidades vegetales secundarias asociadas a la agricultura itinerante en las últimas cinco décadas (González-Espinosa et al., 2005). En la Depresión Central se encuentra principalmente selva baja caducifolia y selva mediana subperennifolia. El principal uso de suelo es de ganadería, extracción de leña, cultivo (hortalizas y frutales), pastizales inducidos y algunas áreas protegidas como el Parque Nacional Cañón del Sumidero, el Corredor Laguna Bélgica y la Reserva Ecológica El Zapotal-Mactumatza (Ramírez-Albores, 2010). Se escogieron estos paisajes por el conocimiento de sus niveles de diversidad de mamíferos, la presencia del tlacuache común y el tlacuache de Virginia en éstas regiones (Naranjo et al., 2005) y los procesos de fragmentación por cambios de uso de suelo que se desarrollan en estas zonas (González-Espinosa et al., 2005; Rocha-Loredo et al., 2010). Las variables explicativas de la abundancia del tlacuache común y el tlacuache de Virginia en este estudio fueron la región, la estructura y composición del paisaje, el grado de perturbación y la presencia de cada especie.

Clasificación de la imagen de satélite

Para cuantificar la estructura y composición de cada uno de los paisajes, utilizamos cuatro imágenes de satélite SPOT de 2008 para Los Altos y 2011 para la Depresión Central. Con las cuales realizamos un mosaico que nos permitió tener la totalidad de las dos zonas de interés. La clasificación de las imágenes se realizó de

manera visual utilizando ArcGIS 9.3 ©. Se hicieron 74 visitas a la zona de estudio y se obtuvieron coordenadas de control para cada una de las clases espectrales de las imágenes con el objetivo de establecer los sitios de muestreo dentro de cada paisaje. Para la región de Los Altos las clases de vegetación y uso del suelo que se obtuvieron fueron: bosque de encino, bosque de pino, bosque de pino encino, bosque de encino pino, humedales, vegetación secundaria, pastizales, agricultura de temporal, áreas urbanas y sin vegetación aparente. Mientras que para la región de la Depresión fueron: selva mediana subcaducifolia, selva baja caducifolia, cuerpos de agua, vegetación secundaria, agricultura de temporal y áreas urbanas.

Índices del Paisaje

En cada paisaje se ubicaron tres grados de perturbación, seleccionados de acuerdo a la composición de la matriz resultante en la clasificación: La primera se trató de un área compuesta por una matriz de bosque o selva relativamente continua, con poca o nula influencia de actividades antropogénicas, o que dichas actividades hubieran sido suspendidas desde hace 15 años o más, y la vegetación cursara por un proceso de regeneración natural; este nivel se denominó baja perturbación (P 1). La segunda condición se trató de un área con la matriz compuesta por vegetación en un estado sucesional inicial (acahual), fragmentos de vegetación original e influencia de actividades antropogénicas (al menos un tipo de sistema de producción), este estado se denominó perturbación intermedia (P 2). El tercer grado estuvo compuesto por una matriz urbanizada casi en su totalidad, compuesta por áreas con infraestructura antropogénica (asentamientos, actividades recreativas, laborales, educativas y/o de transportación),

sin bosque o selva, las áreas verdes corresponden a vegetación introducida y ornamental, esta condición fue denominada como alta perturbación (P 3).

De cada grado de perturbación se obtuvieron tres sitios de muestreo, considerando que tuvieran características de uso y fragmentación semejantes. Los sitios de muestreo fueron, seleccionados en función a su tipo de vegetación, presencia de actividades humanas, clasificación de la matriz usando una imagen satélite y accesibilidad. Cada sitio de muestreo, denominado en este estudio como ventana, fue ubicado geográficamente en el paisaje, contando entonces con un total de nueve sitios o ventanas por paisaje. Para obtener los índices de cada ventana se delimitó un área total de 7.07 km² con un radio de 1.6 km. Para determinar la geometría del paisaje en éste estudio se utilizaron los siguientes índices: número de parches (NP), densidad de borde (ED) e índice medio de forma (MSI). El índice de diversidad de Shannon (SDI) fue utilizado para determinar la composición del paisaje (Badii y Landeros, 2006; Altamirano et al., 2012) (Cuadro 1). Toda la caracterización del paisaje se realizó con ArcGIS 9.3 ©. Los índices del paisaje se calcularon usando la extensión Patch Analyst para Arc Gis 9.3 (Rempel et al., 2012).

Se seleccionaron estos índices de geometría del paisaje debido a que evalúan la estructura y heterogeneidad del paisaje los cuales pueden influir en la abundancia de los mamíferos (Lambert et al., 2005; Garmendia et al., 2013), aspecto de interés en este estudio. Asimismo, la baja tasa de capturas no permitió incorporar un mayor número de índices del paisaje como variables explicativas en los análisis.

Los sitios o ventanas muestreadas en Los Altos fueron el Cerro Corral de Piedra (CP), la Reserva Biológica Cerro Huitepec (HU) y la Reserva Biológica Moxviquil (MO) para la baja perturbación. El Poblado el Aguaje (PA), el Poblado San Isidro Las Huertas (SI) y el Poblado kilómetro 36, de la carretera Tuxtla Gutiérrez-San Cristóbal de Las Casas, Chiapas (K36), para la perturbación intermedia. Para la alta perturbación se muestreó el Panteón Municipal de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas (PM), el Centro Deportivo Municipal de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas (CD) y El Colegio de la Frontera Sur, en el mismo municipio (EC) (Figura 1A).

En la Depresión Central para la condición de menor perturbación se muestreó el Cerro Coquelexquitzán (CC), Cañada Km-12 de la carretera Tuxtla Gutiérrez - San Cristóbal de Las Casas, Chiapas (K12) y La Pera, Berriozábal, Chiapas (LP). Para la perturbación intermedia se muestreó el Rancho Perseverancia (RP), el Rancho al Sol (RS) y el Tecnológico de Monterrey de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (TM). Finalmente para la alta perturbación se muestreó el Parque del Oriente (PO), el Parque Joyo Mayu (PJ) y el Tecnológico Regional de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (TR) (Figura 1B).

Trabajo de campo

En cada sitio de muestreo se colocaron 48 trampas Tomahawk de manera radial y separadas por 20 m en un área total de 289.53 ha, cebadas con sardina por cuatro noches consecutivas (Lambert et al., 2005). El esfuerzo de muestreo total fue de 192 trampas noches por sitio. Cada individuo capturado fue descrito según las características morfológicas que discriminan las especies (Ceballos y Oliva, 2005), geoposicionado,

sexado, pesado y medido en longitud total (cabeza-cola). A las hembras capturadas se les revisó el número de crías cargadas en el marsupio.

Análisis

La abundancia se tomó como el número de individuos capturados y el índice de abundancia relativa (λ) fue calculado a partir del número de individuos capturados por trampas noches (Adler et al., 1997). Mediante el programa estadístico R v. 3 se realizó un análisis de varianza para observar la dispersión de los datos obtenidos. La influencia de la estructura del paisaje en la abundancia se evaluó en cada especie mediante una regresión logística, familia binomial. También se evaluó mediante una ANCOVA la relación entre la composición del paisaje y la abundancia de cada especie. Se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC) para llevar a cabo la selección del modelo que presentara la mejor parsimonia. De esta manera, el modelo con el menor valor de AIC se consideró como el que mejor explica nuestros datos, y que permitiera evaluar la influencia de los factores predictivos (región, grado de perturbación y especie) en la abundancia. Se usaron regresiones logísticas considerando error binomial y error tipo binomial negativa, cuando los datos estuvieron sobredispersados, para determinar si la abundancia de cada especie dependía de los diferentes grados de perturbación y si existía dependencia de la abundancia del tlacuache común respecto a la abundancia del tlacuache de Virginia; así mismo, se usó la misma prueba para determinar si la región o el grado de perturbación fueron factores que establecieron la proporción de sexos de cada especie. Para determinar si la proporción de sexos fue de uno a uno (1:1), se realizó un análisis de Ji cuadrada (χ^2). Para probar diferencias en el peso y la longitud de

los individuos asociados a la diferencia en calidad y disponibilidad de recursos entre paisajes y grados de perturbación se realizó la prueba de *U* Mann-Whitney para cada especie. Por último para explorar la probabilidad de que las poblaciones de cada especie permanezcan en los dos paisajes continuando con este proceso de fragmentación se realizó una simulación de cuan viables son sus poblaciones considerando un lapso de 100 años; para ello se realizaron 100 iteraciones mediante el programa VORTEX v. 9.99

Resultados

Se capturó un total de 73 didélfidos. De los cuales, 10 fueron tlacuaches comunes y 63 tlacuaches de Virginia, no se capturó otro marsupial durante el muestreo. La abundancia media por región fue de 6.08 individuos (3.83 en Los Altos y 8.33 en la Depresión Central). El tlacuache de Virginia fue la especie más abundante en ambos paisajes, su abundancia incrementó a medida que el número de tlacuaches capturados fue mayor. En Los Altos se capturaron cuatro individuos del tlacuache común y 19 individuos del tlacuache de Virginia, y en la Depresión Central seis individuos y 44 individuos, respectivamente.

La abundancia media de ambas especies por nivel de perturbación fue de 4.75 individuos en baja perturbación, 5.75 individuos en perturbación intermedia y 7.75 individuos en alta perturbación. Para cada grado de perturbación por paisaje se obtuvo en Los Altos un promedio de 7.5 individuos en baja perturbación, 0.5 individuos en perturbación intermedia y 3.5 individuos en alta perturbación. En la Depresión Central dos individuos en la menor perturbación, 11 en perturbación intermedia y 12 en la mayor perturbación (Figura 2). De cada especie se encontró una abundancia promedio

de 1.67 individuos del tlacuache común y 10.50 individuos del tlacuache de Virginia. Los datos obtenidos se encontraron sobredispersados, con un intercepto de 8.33 individuos.

Distribución de la abundancia

Las características del paisaje para cada ventana y grado de perturbación se resumen en el Cuadro 2. Se observaron más tlacuaches comunes capturados en las ventanas con mayor número de fragmentos (Cuadro 2). En Los Altos, el tlacuache común se capturó solamente en el área con la menor perturbación (cuatro individuos), en la Depresión Central se capturó en la baja perturbación (tres individuos) y en perturbación intermedia (tres individuos), no se obtuvieron capturas para esta especie en zonas de alta perturbación en ambos paisajes (Cuadro 2). El índice de abundancia relativa (λ) promedio para el tlacuache común por paisaje se encontró entre 0.003-0.005 individuos trampas noches, específicamente 0.01 individuos trampas noches en la menor perturbación de Los Altos, 0.008 individuos trampas noches en la menor perturbación de la Depresión Central y 0.006 individuos trampas noches en la perturbación intermedia de la misma región (Figura 3A).

Respecto al tlacuache de Virginia, las ventanas y grados de perturbación en los que se capturaron más individuos fueron aquellas que tuvieron mayor número de fragmentos y niveles más altos de heterogeneidad (Cuadro 2). Es decir, la mayor abundancia se registró en la baja perturbación en Los Altos (11 individuos) y alta perturbación en la Depresión Central (24 individuos). El índice de abundancia relativa (λ) promedio por región fue de 0.02 individuos trampas noches en Los Altos y 0.04 individuos trampas noches en la Depresión Central. En Los Altos el índice de

abundancia relativa fue de 0.03 individuos trampas noches en la baja perturbación, 0.002 individuos trampas noches en perturbación intermedia y 0.02 individuos trampas noches en la alta perturbación. En la Depresión Central se registró un índice de abundancia relativa de 0.002 individuos trampas noches en la menor perturbación, 0.05 individuos trampas noches en perturbación intermedia y 0.7 individuos trampas noches en la mayor perturbación (Figura 3B).

La regresión logística con error binomial no encontró una influencia del tlacuache de Virginia en la abundancia del tlacuache común, a pesar de observar menor abundancia de este a mayor abundancia del primero (Intercepto = 0.57, abundancia = 0.08) (Figura 4). El análisis con los índices del paisaje revelaron una influencia del número de fragmentos (Intercepto = 2.5×10^{-09} , NP = 0.003) y la densidad de borde (Intercepto = 5.6×10^{-08} , ED = 0.02) sobre la presencia del tlacuache común (Figura 5A). Sin embargo, la evaluación de modelos con el AIC detectó al NP como el mejor modelo que predice la presencia de esta especie (Cuadro 3). En el tlacuache de Virginia su presencia no estuvo determinada por ninguna de las variables del paisaje consideradas (Cuadro 3, Figura 5B). La construcción de la ANCOVA tampoco determinó influencia del SDI para la abundancia de ambas especies (Intercepto = 1.24¹⁵, SDI = 0.73). La regresión logística indicó que el grado de perturbación no determinó la abundancia del tlacuache común y el tlacuache de Virginia (P1: $v = -0.006$, $P = 0.99$; P2: $v = -0.05$, $P = 0.99$), sin embargo se detectó un efecto del tlacuache de Virginia ($v = 1.98$, $P = 0.002$) y de la región ($v = -17.08$, $P = 0.003$) en la abundancia de éstos marsupiales

Medidas de peso y talla

En ambas especies, el peso y talla promedio fue mayor en la Depresión Central ($\mu = 2090$ g, \pm EE= 321.09; $\mu = 84.4$ cm, \pm EE = 2.23 en el tlacuache común y $\mu = 1795.45$ g, \pm EE = 127.67; $\mu = 67.95$ cm, \pm EE= 2.48 en el tlacuache de Virginia) que en Los Altos (1450 g, 75.25 cm en el tlacuache común y 1321.87 g, 62.71 cm en el tlacuache de Virginia), sin embargo la prueba de *U* Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre regiones en el peso y tamaño en ninguna especie (tlacuache común, peso: $U = 5.00$, $P = 0.958$; talla: $U = 7.0$, $P = 0.958$; y tlacuache de Virginia, peso: $U = 255$, $P = 1$; talla: $U = 355$, $P = 1$).

Proporción de sexos

La regresión logística realizada entre sexos no detectó dependencia de la proporción de machos respecto a la de hembras ($v = 1.160$, $P = 0.246$). Al agregar los factores de región, nivel de perturbación y especie, la prueba no encontró influencia de ninguno de ellos sobre la proporción de sexos (región: $v = 0.4$, $P = 0.69$; nivel de perturbación: $v = -0.73$, $P = 0.47$ para P1, y $v = 0.16$, $P = 0.87$ para P2; especie: $v = -0.10$, $P = 0.92$). La independencia de la proporción de sexos para ambas especies sugiere una relación ajustada a la proporción 1:1, la cual fue aprobada con la prueba de *Ji* cuadrada (para el tlacuache común: $\chi^2 = 0.67$, $P = 0.72$ en Los Altos y $\chi^2 = 0.67$, $P = 0.72$ en la Depresión Central; y para el tlacuache de Virginia: $\chi^2 = 0.69$, $P = 0.71$ y en la Depresión Central una $\chi^2 = 1.05$, $P = 0.59$).

Proporción de hembras con crías en el marsupio

En el tlacuache común todas las hembras (una proporción de 1) se encontraron con crías en el marsupio, con un promedio de siete crías en ambas regiones. De las hembras capturadas del tlacuache de Virginia no todas presentaron crías en el marsupio, y el rango de crías observadas fue de entre seis a ocho crías; la mayor proporción de crías cargadas se observó en la perturbación intermedia en ambos paisajes (0.78 en Los Altos y de 1 en la Depresión Central); en la baja perturbación se observó una proporción de cero en Los Altos y de 0.33 en la Depresión Central, y en la alta perturbación se obtuvo una proporción de cero y 0.57, respectivamente.

Viabilidad poblacional

El análisis de viabilidad poblacional indica que las poblaciones de la Depresión Central del tlacuache común podrían estar en riesgo. En 100 simulaciones de 100 años la probabilidad de extinción fue 0.68 y 0.32 de sobrevivencia. Las poblaciones que sobrevivieron a las simulaciones tendrían un tamaño poblacional de 50.15 individuos (\pm DE = 10.30), una heterocigocidad esperada (H_e) de 0.223 (\pm DE = 0.223), 0.228 (\pm DE = 0.231) de heterocigocidad observada (H_o) y 1.71 (\pm DE = 0.68) alelos existentes (N_a). Las simulaciones detectaron un total de 294 poblaciones extintas al menos una vez. La primera extinción sería a los 10.32 años (\pm DE = 7.06), ocurrirían 301 recolonizaciones con una media de tiempo de 1.03 años (\pm DE = 0.13) y 210 extinciones con un tiempo promedio de 10.68 años (\pm DE = 7.84) (Figura 6A). Antes de ser superada la capacidad de carga, la tasa de crecimiento sería de 1.78 (\pm DE = 0.53). En el tlacuache de Virginia se observó una probabilidad de extinción de 0.67 y 0.33 de sobrevivencia. El tamaño poblacional predicho sería de 388.37 (\pm DE = 28.87) y la diversidad genética para las

poblaciones sobrevivientes estaría en $0.906 (\pm DE = 0.027)$ de H_e , $0.909 (\pm DE = 0.031)$ de H_o y $21.87 (\pm DE = 2.9)$ de N_a . Se presentarían un total de 515 poblaciones extintas al menos una vez, la primera extinción sucedería en 1.01 año ($\pm DE = 0.06$) y ocurrirían 115 recolonizaciones con una media de 1.03 años ($\pm DE = 0.18$) sin extinciones (Figura 6B). La tasa de crecimiento llegaría a $2.03 (\pm DE = 0.21)$ antes de superar el límite de la capacidad de carga.

Discusión

Los bajos niveles de abundancia observados en este estudio coinciden con estudios previos (Adler et al., 1997, Cherem et al., 1998; Cáceres y Monteiro-Filho, 1998; Kelly y Caro, 2003), éstos resultados no dejan de llamar la atención debido a las características del tlacuache común y el tlacuache de Virginia, ambas son especies oportunistas, comunes y con altas tasas reproductivas (Cabello, 2006; Markovchick-Nicholls et al., 2007), con lo cual se podría esperar alta abundancia local (Ricota et al., 2008). El tlacuache de Virginia fue la especie más abundante en los dos paisajes estudiados y causó un efecto significativo en la distribución de la abundancia observada, posiblemente por el mayor número de capturas obtenidas de esta especie.

La regresión logística detectó un efecto significativo de la región en la distribución de la abundancia, debido probablemente a la mayor incidencia de tlacuaches observados en la Depresión Central. Mientras que en Los Altos, a excepción de los bosques mesófilos de montaña, la disponibilidad de recursos es poco diversa en bosques dominados por especies de *Pinus* y *Quercus* (González-Espinosa et al., 2008), en la Depresión Central las asociaciones de selvas bajas caducifolias tienen niveles de

diversidad arbórea intermedia y en selvas altas o medianas perennifolias alta riqueza (González-Espinosa et al., 2008). La alta diversidad arbórea y la variación de gradientes climáticos, edáficos, fisiográficos y de perturbación en la Depresión Central (Rocha-Loredo et al., 2010) permite el desarrollo de una gran variedad de frutos, tubérculos y fauna que puede ser alimento disponible para *Didelphis* spp (Ceballos y Oliva, 2005), lo que posiblemente contribuye a una mayor abundancia en ésta región.

En especies comunes como el tlacuache común y el tlacuache de Virginia no se predicen efectos negativos causados por la perturbación (Lindenmayer, 2000b; Ricotta et al., 2008; Markovchik-Nicolls et al., 2007). Sin embargo se conoce que la estructura del paisaje puede influir en la abundancia de las especies (Bruggeman et al., 2010) y que las especies comunes en la actualidad están siendo severamente afectadas por las actividades humanas (Gaston y Fuller, 2007; Gaston, 2010). Los resultados de este estudio revelan que el número de fragmentos influyó en la presencia del tlacuache común: en las condiciones con mayor número de fragmentos se tuvo mayor probabilidad de encontrar a esta especie. No obstante, su presencia también estuvo limitada a áreas relativamente conservadas, lo que puede indicar que esta especie es beneficiada por la subdivisión de fragmentos pero requiere de zonas conservadas. La división de fragmentos tiene un papel fundamental en los procesos de fragmentación de hábitat e implicaciones graves en la sobrevivencia de las subpoblaciones resultantes, ya que para su permanencia y viabilidad es necesario mantener la dispersión y colonización a través de metapoblaciones (Murphy et al., 2010). Kanda et al. (2009) proponen que los recursos provistos en paisajes dominados por actividades humanas funcionan como fuente en una dinámica metapoblacional para el tlacuache de Virginia,

de este modo el sumidero son los hábitats naturales a donde se dispersan los individuos para colonizar nuevos hábitats. Si las poblaciones del tlacuache común se desarrollan en metapoblaciones, es posible que necesiten contar con sitios conservados para la permanencia de la dinámica metapoblacional, esta hipótesis debe evaluarse en estudios posteriores. En cuanto al tlacuache de Virginia su abundancia no estuvo determinada por ningún índice del paisaje lo que sugiere que este marsupial es mucho más flexible a ocupar y desarrollarse en cualquier hábitat con altos niveles de perturbación ya que utiliza los recursos de las actividades humanas para expandir sus poblaciones (Kanda et al., 2009).

A pesar de que se observó una relación entre la abundancia y los grados de perturbación ésta no fue significativa, cada especie respondió de manera diferente al estado de perturbación. El tlacuache común únicamente fue capturado en los sitios con menor perturbación en ambos paisajes, lo que sugiere que pese a ser considerada una especie generalista y altamente flexible (Adler et al., 1997), las actividades humanas podrían estar influyendo en las poblaciones de esta especie. En tanto que, el tlacuache de Virginia se capturó en todos los niveles de perturbación sin ningún patrón, en Los Altos la mayor abundancia relativa se encontró en la menor perturbación, y en la Depresión Central en la mayor perturbación, esto puede deberse a que el tlacuache de Virginia puede o no ocupar áreas con alta incidencia de actividades humanas (Markovchick-Nicholls et al., 2007). Es importante mencionar que no se descarta que la falta de significancia en los análisis, principalmente para el tlacuache de Virginia, sea debido a que los grados de perturbación no influyan en la abundancia de esta especie, puesto que es altamente tolerante a la perturbación (Aranda, 2000; Ceballos y Oliva,

2005). Asimismo, posiblemente, las observaciones obtenidas están influidas por la baja tasa de captura del tlacuache común y/o por el efecto de la variación de las condiciones ambientales entre paisajes.

No se detectó influencia significativa del tlacuache de Virginia en la abundancia del tlacuache común, a pesar de la tendencia que se observó: a mayor abundancia del tlacuache de Virginia, la abundancia del tlacuache común fue menor. Los resultados del presente estudio sugieren que la presencia del tlacuache de Virginia determina la baja abundancia o ausencia del tlacuache común (Begon et al., 2006), sin embargo no es posible demostrar esta observación, por lo que es necesario evaluar en un estudio posterior esta relación y su influencia en la distribución y abundancia de éstos didélfidos.

El análisis de regresión logística no encontró influencia de la región, grado de perturbación y especie sobre la proporción de sexos, contrariamente muestra que la proporción de machos y hembras está distribuida de manera aleatoria. En especies polígamas como el tlacuache común y el tlacuache de Virginia la mayor proporción de machos es un indicador de mayor calidad de recursos cuando la competencia interespecífica es poca o nula (Dickman, 1988; Banks et al., 2008), en este estudio se encontró una relación ajustada a la proporción 1:1 en ambas especies, posiblemente a causa de una competencia interespecífica en áreas donde coexisten (Begon et al., 2006). Sin embargo, esta misma proporción de sexos coincide con lo registrado en áreas de vegetación de costa en una isla a 2,050 m del continente (Cherem et al., 1996) Es importante mencionar que no se excluye la posibilidad del efecto del tamaño de

muestra y la escala considerada, lo cual posiblemente tiene una influencia sobre la proporción de sexos detectada. Asimismo, la proporción de hembras observadas con crías en el marsupio no se encontraron agrupadas a un grado de perturbación y/o estructura del paisaje, lo que sugiere que estos factores no influye en la reproducción de ambas especies, sin embargo es preciso un análisis que explore sus posibles relaciones.

Los análisis de viabilidad poblacional son usados para evaluar el impacto de los cambios del paisaje y fragmentación de las poblaciones ya que permite predecir la probabilidad de extinción y vulnerabilidad poblacional (Lindenmayer et al., 2000a). Los resultados obtenidos en este estudio predijeron alta probabilidad de extinción en las dos especies ante una catástrofe. Sin embargo, en las simulaciones construidas para el tlacuache de Virginia no se presentaron extinciones lo que sí ocurrió en el tlacuache común, posiblemente por la vulnerabilidad asociada a su pequeño tamaño poblacional (Begon et al., 2006; Frankham et al., 2002). Las metapoblaciones definidas como poblaciones (subpoblaciones) espacialmente estructuradas, vulnerables a la extinción y conectadas por la dispersión de individuos, aumentan la permanencia de las poblaciones en paisajes fragmentados, ya que evitan el aislamiento poblacional y las extinciones como consecuencia (Harding y McNamara, 2002; Wilcox et al., 2006). Los resultados de las simulaciones realizadas mostraron un cambio sustancial en la permanencia de las poblaciones cuando se consideró una dinámica metapoblacional: las poblaciones de ambas especies se mantendrían estables a través del tiempo. En el tlacuache común la dinámica metapoblacional parece ser la única estrategia para sobrevivir a catástrofes en ambientes perturbados, en el tlacuache de Virginia a pesar

de tener tamaños poblacionales mayores, bajo una dinámica metapoblacional se predice que sus poblaciones se mantendrán estables a través del tiempo. La falta de evidencia en este estudio para determinar si las poblaciones de estos marsupiales se desarrollan mediante una dinámica metapoblacional hace necesario evaluar este aspecto para entonces pronosticar su futuro y proponer estrategias de conservación que disminuyan el impacto de las actividades antropogénicas en sus poblaciones.

Las poblaciones del tlacuache común en Los Altos y la Depresión Central podrían estar siendo afectadas por la perturbación y su escenario a 100 años es altamente riesgoso. Además, aunque el mayor número de fragmentos aumenta la probabilidad de presencia del tlacuache común, las poblaciones estudiadas estuvieron altamente relacionadas a áreas conservadas, al parecer más fuertemente en áreas donde coexistió con el tlacuache de Virginia. La preferencia del tlacuache común de habitar zonas conservadas podría traer graves consecuencias en su distribución geográfica y diversidad genética, por lo que es ineludible un estudio más amplio en donde se evalúe la demografía poblacional de esta especie y asimismo evaluar su estado de conservación. Este estudio corrobora la alta flexibilidad del tlacuache de Virginia a áreas con alta incidencia humana y la falta de influencia de la estructura y composición del paisaje en la distribución de su abundancia.

Agradecimientos

Expresamos nuestro agradecimiento a Alfonso Ortiz Moreno y Trinidad Alejandro Guillén Díaz por su apoyo en campo. También agradecemos a El Colegio de la Frontera

Sur por los recursos que ayudaron al muestreo de campo. Este trabajo es parte de la tesis de doctorado de BCS (Beca CONACyT-número 175336).

Literatura citada

- Adler, G. H, J. J. Arboledo y B. L. Travi. 1997. Population dynamics of *Didelphis marsupialis* in Northern Colombia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 32:7-11.
- Altamirano A., A. Miranda y C. Jiménez. 2012. Incertidumbre de los índices de paisaje en el análisis de la estructura espacial. *BOSQUE* 33(2): 171-181.
- Aranda, M. 2000. Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Veracruz, México. 212 p.
- Badii M. H y J. Landeros. 2006. Cuantificación de la fragmentación del paisaje y su relación con Sustentabilidad. *International Journal of Good Conscience* 2(1): 26-38.
- Banks S. C., E. J. Knight, J. E. Dubach y D. B. Lindenmayer. 2008. Microhabitat heterogeneity influences offspring sex allocation and spatial kin structure in possums. *Journal of Animal Ecology* 77: 1250-1256.
- Begon M., C. R. Townsend, y J. L. Harper. 2006. *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. 4a Edición. Blackwell Publishing Australia. 738p

- Bruggeman D. J., T. Wiegand y N. Fernández. 2010. The relative effects of habitat loss and fragmentation on population genetic variation in the red-cockaded woodpecker (*Picoides borealis*). *Molecular Ecology* 19: 3679-3691.
- Cabello, D. R. 2006. Reproduction of *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in the Venezuelan Andes. *Acta Therologica* 51: 427-433.
- Cáceres, N. C. y E. L. A. Monteiro-Filho. 1998. Population dynamics of the Common opossum, *Didelphis marsupialis* (Mammalia, Marsupialia), in southern Brazil. *International Journal of Mammalian Biology* 63:169-172.
- Cardillo M., A. Purvis, W. Sechrest, J. L. Gittleman, J. Bielby y G. M. Mace. Human Population Density and Extinction in the World's Carnivores. *PLoS Biology* 2: 0909-0914.
- Ceballos, G. y Oliva G. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 986 p.
- Cherem, J.J., Graipel, M.E., Menezes, M.E., Soldateli, M., 1996. Observações sobre a biologia do gambá (*Didelphis marsupialis*) na Ilha de Raton Grande, Estado de Santa Catarina, Brasil. *Biotemas* 9, 47–56.
- Chiappero M. B., G. M. Panzetta-Dutari, D. Gómez, E. Castillo, J. J. Polop y C. N. Gardenal. 2011. Contrasting genetic structure of urban and rural populations of the wild rodent *Calomys musculus* (Cricetidae, Sigmodontinae). *Mammalian Biology* 76: 41-50.

- Dickman C. R. 1988. Sex-Ratio Variation in Response to Interspecific Competition. *The American Naturalist* 132(2): 289-297.
- Frankham R. J., D. Ballou y D. A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge
- Gardner A. L. 1973. The systematic of the genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. Special Publications the Museum of Texas Tech University 4:1-81.
- Garmendia, A., V. Arroyo-Rodríguez, A. Estrada, E. J. Naranjo y K. E. Stoner. 2013. Landscape and patch attributes impacting medium- and large-sized terrestrial mammals in a fragmented rain forest. *Journal of Tropical Ecology* 29: 331-344.
- Gaston K. J. y R. A. Fuller. 2007. Biodiversity and extinction: losing the common and the widespread. *Progress in Physical Geography* 31: 213-225.
- Gingier S. M., E. C. Hellgren, M. A. Kasparian, L. P. Levesque, D. M. Engle y D. M. Leslie Jr. 2003. Niche shift by Virginia opossum following reduction of a putative competitor, the raccoon. *Journal of Mammalogy* 84(4):1279-1291.
- Gonzalez-Espinosa, M., N. Ramírez-Marcial, G. Méndez-Dewar, L. Galindo-Jaimes y D. Golicher. 2005. Riqueza de especies de árboles en Chiapas: variación espacial y dimensiones ambientales asociadas al nivel regional. *In* Diversidad Biológica en Chiapas, M González-Espinosa, N. Ramírez-Marcial y L. Ruiz-Montoya (eds.). ECOSUR, COCyTECH, Plaza y Valdez Editores, México. p. 81-125.

- González-Espinosa M., N. Ramírez-Marcial y J. M. Rey-Benayas. 2008. Variación Espacial de la diversidad arbórea de Chiapas: patrones regionales y jerarquía de factores determinantes. *En: Ecología, manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México*, L. R. Sánchez-Velásquez, J. Galindo-González, F. Díaz-Fleischer (Eds.). Mundi-Prensa México, S. A. de C. V. México, D. F. p.147-166.
- Gorresen P. M. y M. R. Willig. 2004. Landscape responses of bats to habitat fragmentation in Atlantic Forest of Paraguay. *Journal of Mammalogy* 85(4):688-697.
- Johnstone C. P., R. D. Reina y A. Lill. 2010. Impact of anthropogenic habitat fragmentation on population health in a small, carnivorous marsupial. *Journal of Mammalogy* 91(6): 1332-1341.
- Harding K. C y J. M. McNamara. 2002. A Unifying Framework for Metapopulation Dynamics. *The American Naturalist* 160(2): 173-185.
- Kanda, L. L., T. K. Fuller, P. R. Sievert y R. L. Kellogg. 2009. Seasonal source-sink dynamics at the edge of a species' range. *Ecology* 90(6): 1574-1585.
- Kelly, M. J. y T. Caro. 2003. Low density of small mammals at Las Cuevas, Belize. *Mammalian Biology* 68:372-386.
- Keyghobadi, N. 2007. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Canadian Journal of Zoology* 85: 1049-1064.

- Lambert, T. D., J. R. Malcolm y B. L. Zimmerman. 2005. Variation in small mammal species richness by trap height and trap type in southeastern Amazonia. *Journal of Mammalogy* 86:982-990.
- Law B. S. y C. R. Dickman. 1998. The use of habitat mosaics by terrestrial vertebrate fauna: implications for conservation and management. *Biodiversity and Conservation* 7: 323-333.
- Lindenmayer D. B., R. C. Lacy y M. L. Pope. 2000a. Testing a Simulation model for Population Viability Analysis. *Ecological applications* 10(2): 580-597
- Lindenmayer D. B., M. A. McCarthy, K. M. Parris, M. L. Pope. 2000b. Habitat Fragmentation, Landscape Context, and Mammalian Assemblages in Southeastern Australia. *American Society of Mammalogists* 81(3): 787-797.
- Lindenmayer D., R. J. Hobbs, R. Montague-Drake, J. Alexandra, A. Bennett, M. Burgman, P. Cale, A. Calhoun, V. Cramer, P. Cullen, D. Driscoll, Lenore Fahrig, J. Fischer, J. Franklin, Y. Haila, M. Huter, P. Gibbons, S. Lake, G. Luck, C. MacGregor, S. McIntyre, R. Mac N., A. Manning, J. Miller, H. Mooney, R. Noss, H. Possingham, D. Saunders, F. Schmiegelow, M. Scott, D. Simberloff, T. Sisk, G. Tabor, B. Walker, J. Wiens, J. Woinarski y E. Zavaleta. 2008. A checklist for ecological management of landscapes for conservation. *Ecology Letters*, 11:78-91.
- Lockwood J. L. y M. L. Mckinney. 2001. *Biotic Homogenization*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, E. U. A. 289p.

- Markovchick-Nicholls, L., H. M. Regan, D. H. Deutschman, A. Widyanata, B. Martin, L. Noreke y T. A. Hunt. 2007. Relationships between human Disturbance and Wildlife Land Use in Urban Habitat Fragments. *Conservation Biology* 22:99-109.
- Murphy M. A., R. Dezzani, D. S. Pilliod y A. Storfers. 2010. Landscape genetics of high mountain frog metapopulations. *Molecular Ecology* 19: 3634-3649.
- Naranjo, P. E., C. Lorenzo M. y A. Horváth. 2005. La diversidad de mamíferos en Chiapas. Rodiles-Hernández, R. 2005. *En Diversidad Biológica en Chiapas*, M. González-Espinosa. N. Ramírez-Marcial y L. Ruiz-Montoya (eds.). El Colegio de la Frontera Sur, COCYTECH, Plaza y Valdés, S. A. de C. V. México. p. 221-264.
- Orjuela, C. O. J. y G. Jiménez. 2004. Estudio de la abundancia relativa para mamíferos en diferentes tipos de coberturas y carretera, Finca Hacienda Cristales, Área Cerritos-La Virginia, Municipio de Pereira. *Universitas Scientiarum* 9:87-96.
- Ramírez-Albores J. E. 2010. Avifauna de sitios asociados a la selva tropical en la depresión central de Chiapas, México. *Acta Zoológica Mexicana* 26(3): 539-562.
- Ramírez-Marcial, N., M. González-Espinosa y D. Williams-Linera. 2001. Anthropogenic disturbance and tree Diversity in Montane Rain Forests in Chiapas, México. *Forest Ecology and Management* 154: 311-326.
- Rempel, R. S., D. Kaukinen y A. P. Carr. 2012. Patch Analyst and Patch Grid. Ontario Ministry of Natural Resources. Centre for Northern Forest Ecosystem Research, Thunder Bay, Ontario.

- Rocha-Loredo, A. G., N. Ramírez-Marcial y M. González-Espinosa. 2010. Riqueza y diversidad de árboles del bosque tropical caducifolio en la depresión central de Chiapas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 87:89-103.
- Ricotta C., S. Godefroid y L. Celesti-Grápow. 2008. Common species have lower taxonomic diversity. *Diversity and Distributions* 14: 530-537.
- Schooley R. L. y L. C. Branch. 2011. Habitat quality of source patches and connectivity in fragmented landscapes. *Biodiversity Conservation* 20: 1611-1623.
- Spear S. F., N. Balkenhol, M-J. Fortin, B. H. Mcrae y K. Scribner. 2010. Use of resistance surfaces for landscape genetic studies: considerations for parameterization and analysis. *Molecular Ecology* 19: 3576-3591.
- Sunquist, M. E., S. N. Austad y F. Sunquist. 1987. Movement patterns and home range in the common opossum (*Didelphis marsupialis*). *Journal of Mammalogy* 68:173-176.
- Vila S. J., D. Varga L., A. Llausàs P. y A. Ribas P. 2006. Conceptos y métodos fundamentales en ecología del paisaje (*landscape ecology*). Una interpretación desde la geografía. *Documents d' Anàlisi Geogràfica* 48: 151-166.

Cuadro 1. Características de los índices seleccionados para el análisis de estructura y configuración del paisaje. NP = número de fragmentos, ED = Densidad de borde, MSI = índice medio de forma, SDI = índice de diversidad de Shannon (Vila et al., 2006).

Índice del paisaje	Acrónimo	Propiedad	Interpretación
Número de parches	NP	Grado de fragmentación	Número de fragmentos totales y número de fragmentos de cada clase
Densidad de borde	ED	Característica del borde	Perímetro total del borde en relación con la superficie del paisaje
Índice medio de forma	MSI	Complejidad de forma de los fragmentos	Calcula la forma media a nivel de clase y de paisaje
Índice de diversidad de Shannon	SDI	Diversidad del paisaje	Valora, a partir de probabilidades, la heterogeneidad. El valor representa la probabilidad que dos elementos seleccionados de forma aleatoria puedan ser diferentes

Cuadro 2. Caracterización del paisaje de Los Altos (Altos) y la Depresión Central (Depresión) y abundancia de *Didelphis marsupialis* (*D. m*) y *D. virginiana* (*D. v*) por grado de perturbación (GP) y ventana (V). P 1 = baja perturbación, P 2 = perturbación intermedia, P 3 = alta perturbación, CP = Cerro Corral de Piedra, HU = Reserva Biológica Cerro Huitepec, MO = Reserva Biológica Moxviquil, PA = Poblado el Aguaje, SI = Poblado San Isidro Las Huertas, K36 = Poblado kilómetro 36 Tuxtla Gutiérrez-San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, PM = Panteón Municipal de San Cristóbal Las Casas, Chiapas, CD = Centro Deportivo Municipal de San Cristóbal Las Casas, Chiapas, EC = El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal Las Casas, Chiapas, CC = Cerro Coquelequitán, Km12 = Cañada del Km 12 Tuxtla Gutiérrez- San Cristóbal Las Casas, Chiapas, LP = La Pera, Berriozábal, Chiapas, RP = Rancho Perseverancia, RS = Rancho al Sol, TM = Tecnológico de Monterrey, PO= Parque del Oriente, PJ = Parque Joyo Mayu, TR = Tecnológico regional, NP = número de fragmentos, ED = Densidad de borde, MSI = media del índice del tamaño de forma, SDI = Índice de Shannon.

Paisaje	NP	V	NP	ED	MSI	SDI	<i>D. m</i>	<i>D. v</i>
Altos	P 1	CP	162	273.9	20.1	1.6	1	4
Altos	P 1	HU	100	222.5	21.8	1.6	3	2
Altos	P 1	MO	108	240.1	21.4	1.6	0	5
Altos	P 2	PA	219	172.8	15.2	1.8	0	1
Altos	P 2	SI	88	186.6	20.3	1.7	0	0
Altos	P 2	K36	112	255.6	21.9	1.5	0	0
Altos	P 3	PM	54	93.9	18.4	0.9	0	0
Altos	P 3	CD	36	69.6	18.5	0.4	0	2
Altos	P 3	EC	127	223.8	20.6	2.0	0	5
Depresión	P 1	CC	218	305.2	19.6	1.4	2	0
Depresión	P 1	K12	97	249.7	23.7	1.2	0	1
Depresión	P 1	LP	84	160.9	18.3	0.7	1	0
Depresión	P 2	RP	206	349.6	22.7	1.5	3	8
Depresión	P 2	RS	282	424.3	22.6	1.4	0	3
Depresión	P 2	TM	108	204.0	19.0	1.7	0	8
Depresión	P 3	PO	80	138.6	18.8	0.6	0	2
Depresión	P 3	PJ	96	212.7	21.1	0.9	0	14
Depresión	P 3	TR	90	184.9	19.6	0.9	0	8

Cuadro 3. Regresión logística entre los índices del paisaje (IP) y la abundancia del tlacuache común (*D. m*) y el tlacuache de Virginia (*D. v*) en Los Altos (Altos) y la Depresión Central (Depresión) de Chiapas medidos por el criterio de información Akaike (AIC). ED = Densidad de borde, MSI = índice de media de forma, NP = número de fragmentos.

IP	<i>D. m</i>		<i>D. v</i>	
	Intercepto	AIC	Intercepto	AIC
ED	$5.6 \times 10^{-08**}$	41.33	7.04×10^{-08NS}	130.89
MSI	0.001×10^{NS}	46.51	0.003×10^{NS}	132.06
NP	$2.5 \times 10^{-09*}$	38.57	2.5×10^{-09NS}	131.62

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ^{NS} = no significativo.

Cuadro 1. Características de los índices seleccionados para el análisis de estructura y configuración del paisaje. NP = número de fragmentos, ED = Densidad de borde, MSI = índice medio de forma, SDI = índice de diversidad de Shannon (Vila et al., 2006).

Índice del paisaje	Acrónimo	Propiedad	Interpretación
Número de parches	NP	Grado de fragmentación	Número de fragmentos totales y número de fragmentos de cada clase
Densidad de borde	ED	Característica del borde	Perímetro total del borde en relación con la superficie del paisaje
Índice medio de forma	MSI	Complejidad de forma de los fragmentos	Calcula la forma media a nivel de clase y de paisaje
Índice de diversidad de Shannon	SDI	Diversidad del paisaje	Valora, a partir de probabilidades, la heterogeneidad. El valor representa la probabilidad que dos elementos seleccionados de forma aleatoria puedan ser diferentes

Cuadro 2. Caracterización del paisaje de Los Altos (Altos) y la Depresión Central (Depresión) y abundancia de *Didelphis marsupialis* (*D. m*) y *D. virginiana* (*D. v*) por grado de perturbación (GP) y ventana (V). P 1 = baja perturbación, P 2 = perturbación intermedia, P 3 = alta perturbación, CP = Cerro Corral de Piedra, HU = Reserva Biológica Cerro Huitepec, MO = Reserva Biológica Moxviquil, PA = Poblado el Aguaje, SI = Poblado San Isidro Las Huertas, K36 = Poblado kilómetro 36 Tuxtla Gutiérrez-San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, PM = Panteón Municipal de San Cristóbal Las Casas, Chiapas, CD = Centro Deportivo Municipal de San Cristóbal Las Casas, Chiapas, EC = El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal Las Casas, Chiapas, CC = Cerro Coquelexquitzán, Km12 = Cañada del Km 12 Tuxtla Gutiérrez- San Cristóbal Las Casas, Chiapas, LP = La Pera, Berriozábal, Chiapas, RP = Rancho Perseverancia, RS = Rancho al Sol, TM = Tecnológico de Monterrey, PO= Parque del Oriente, PJ = Parque Joyo Mayu, TR = Tecnológico regional, NP = número de fragmentos, ED = Densidad de borde, MSI = media del índice del tamaño de forma, SDI = Índice de Shannon.

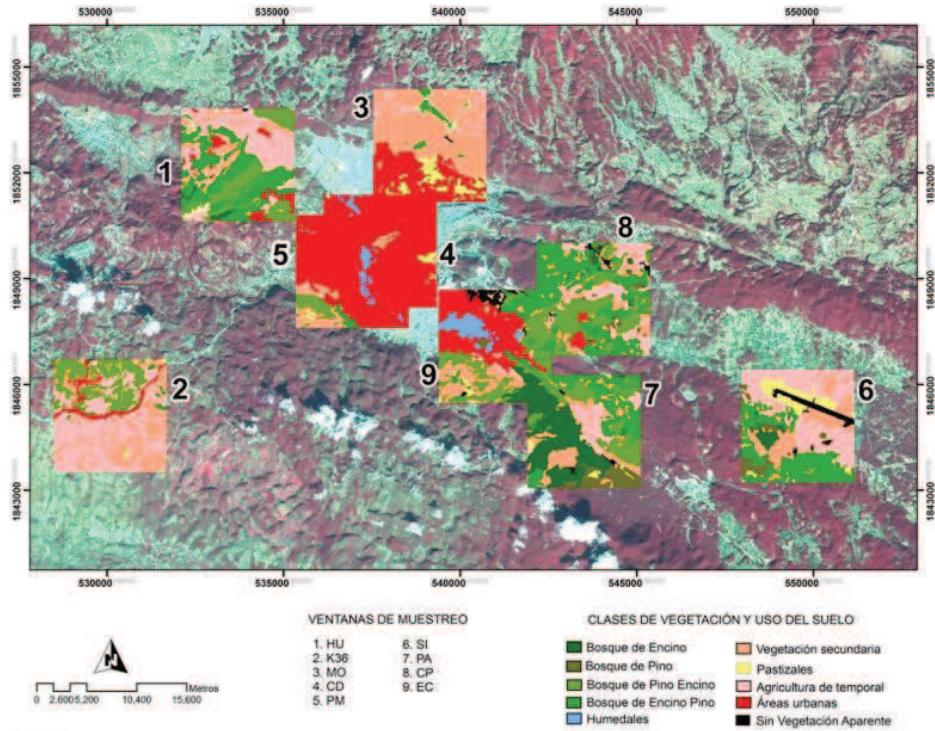
Paisaje	NP	V	NP	ED	MSI	SDI	<i>D. m</i>	<i>D. v</i>
Altos	P 1	CP	162	273.9	20.1	1.6	1	4
Altos	P 1	HU	100	222.5	21.8	1.6	3	2
Altos	P 1	MO	108	240.1	21.4	1.6	0	5
Altos	P 2	PA	219	172.8	15.2	1.8	0	1
Altos	P 2	SI	88	186.6	20.3	1.7	0	0
Altos	P 2	K36	112	255.6	21.9	1.5	0	0
Altos	P 3	PM	54	93.9	18.4	0.9	0	0
Altos	P 3	CD	36	69.6	18.5	0.4	0	2
Altos	P 3	EC	127	223.8	20.6	2.0	0	5
Depresión	P 1	CC	218	305.2	19.6	1.4	2	0
Depresión	P 1	K12	97	249.7	23.7	1.2	0	1
Depresión	P 1	LP	84	160.9	18.3	0.7	1	0
Depresión	P 2	RP	206	349.6	22.7	1.5	3	8
Depresión	P 2	RS	282	424.3	22.6	1.4	0	3
Depresión	P 2	TM	108	204.0	19.0	1.7	0	8
Depresión	P 3	PO	80	138.6	18.8	0.6	0	2
Depresión	P 3	PJ	96	212.7	21.1	0.9	0	14
Depresión	P 3	TR	90	184.9	19.6	0.9	0	8

Cuadro 3. Regresión logística entre los índices del paisaje (IP) y la abundancia del tlacuache común (*D. m*) y el tlacuache de Virginia (*D. v*) en Los Altos (Altos) y la Depresión Central (Depresión) de Chiapas medidos por el criterio de información Akaike (AIC). ED = Densidad de borde, MSI = índice de media de forma, NP = número de fragmentos.

IP	<i>D. m</i>		<i>D. v</i>	
	Intercepto	AIC	Intercepto	AIC
ED	$5.6 \times 10^{-08**}$	41.33	7.04×10^{-08NS}	130.89
MSI	0.001×10^{NS}	46.51	0.003×10^{NS}	132.06
NP	$2.5 \times 10^{-09*}$	38.57	2.5×10^{-09NS}	131.62

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ^{NS} = no significativo.

(A)



(B)

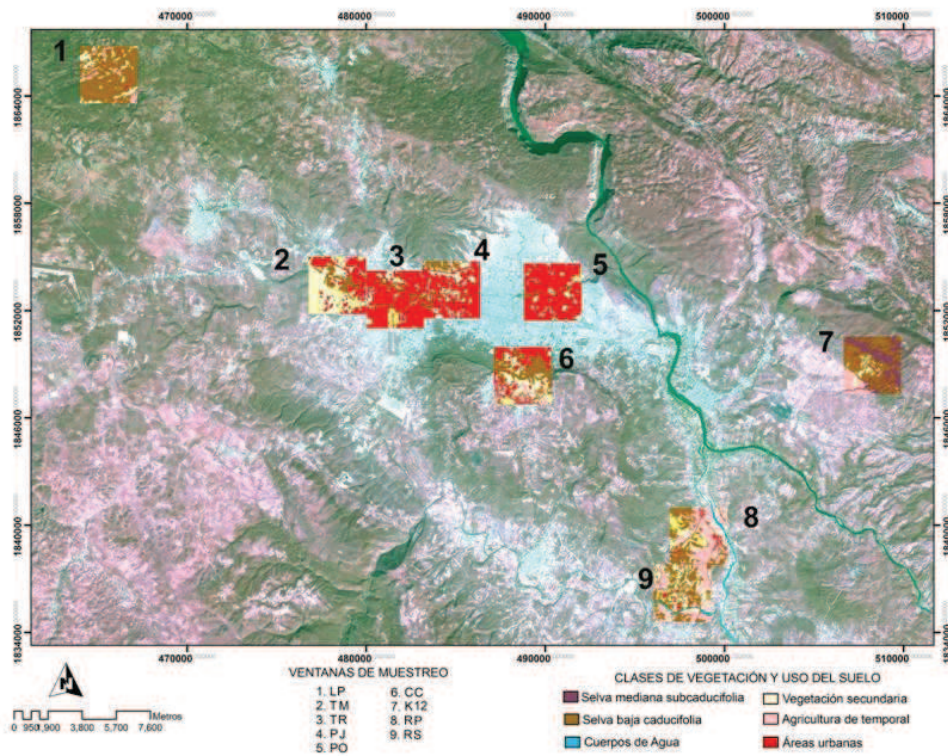


Figura 1. Sitios o ventanas de muestreo para la captura del tlacuache común (*Didelphis marsupialis*) y del tlacuache de Virginia (*D. virginiana*) en Los Altos (A) y la Depresión Central (B) de Chiapas. HU = Reserva Biológica Cerro Huitepec, MO = Reserva Biológica Moxviquil, CP= Cerro Corral de Piedra, PA = Poblado el Aguaje, SI = Poblado San Isidro Las Huertas, K36 = Poblado kilómetro 36 Tuxtla Gutiérrez-San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, CD = Centro Deportivo Municipal de San Cristóbal Las Casas, Chiapas, EC = El Colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal Las Casas, Chiapas, PM = Panteón Municipal de San Cristóbal Las Casas, Chiapas, CC = Cerro Coquelexquitzán, K12 = Cañada Km 12 Tuxtla Gutiérrez - San Cristóbal Las Casas, Chiapas, LP= La Pera, RS = Rancho al Sol, RP = Rancho Perseverancia, TM = Tecnológico de Monterrey de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, PJ = Parque Joyo Mayu, PO = Parque del Oriente, TR = Tecnológico regional de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

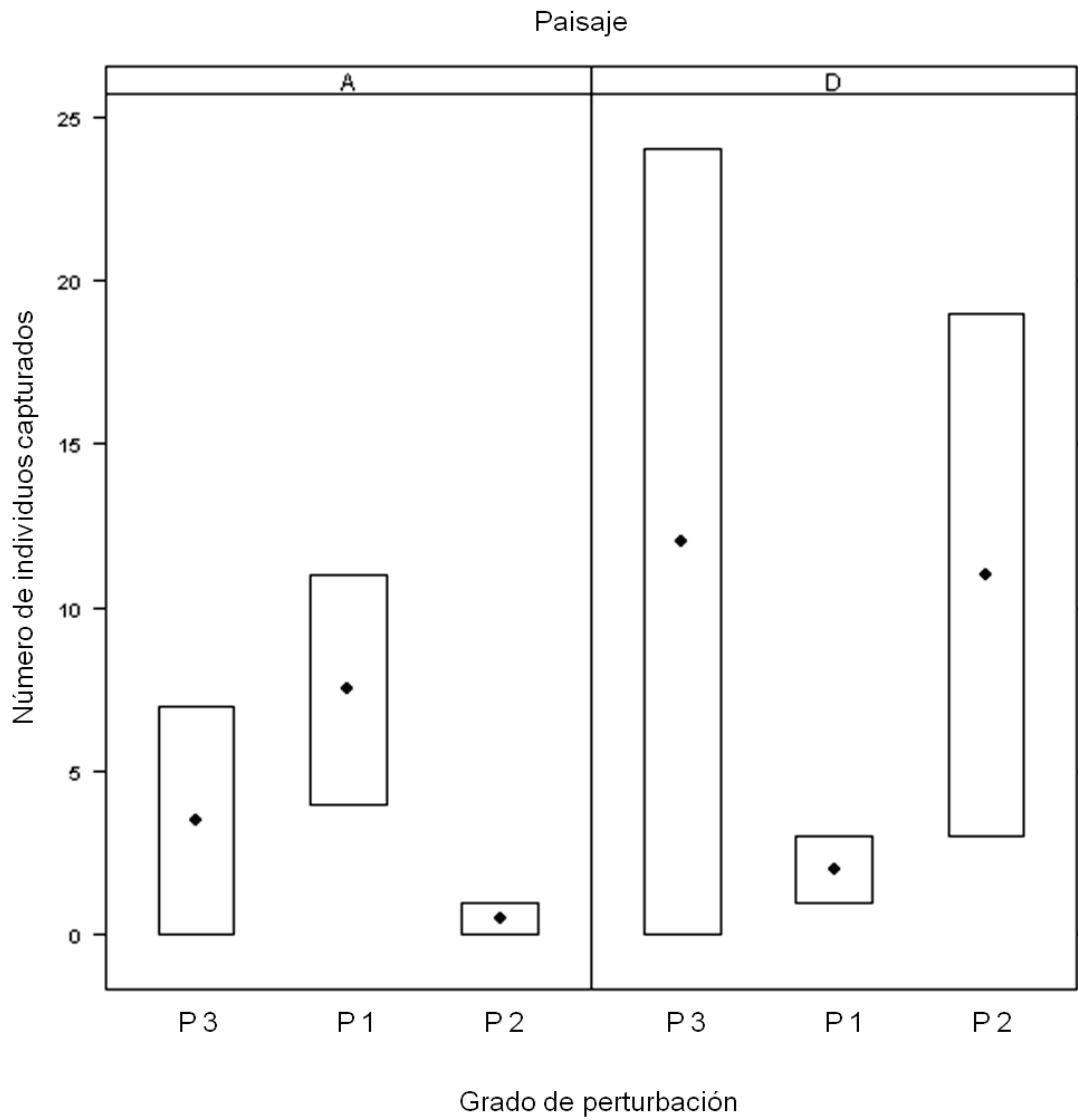


Figura 2. Abundancia promedio del género *Didelphis* por grados de perturbación en Los Altos (A) y la Depresión Central (D) de Chiapas. P 1 = baja perturbación, P 2 = perturbación intermedia, P 3 = alta perturbación.

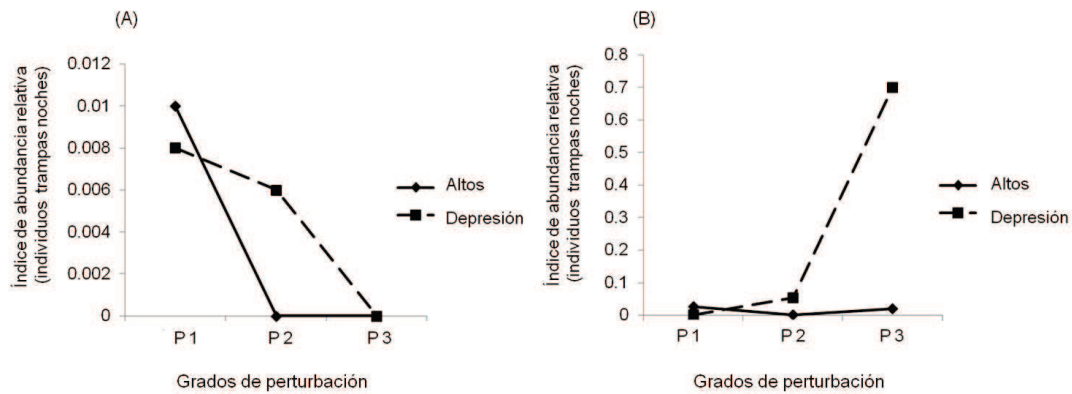


Figura 3. Índice de abundancia relativa (λ) del tlacuache Común (A) y del tlacuache de Virginia (B) por grados de perturbación en Los Altos (Altos) y la Depresión Central (Depresión) de Chiapas. P 1 = baja perturbación, P 2 = perturbación intermedia, P 3 = alta perturbación.

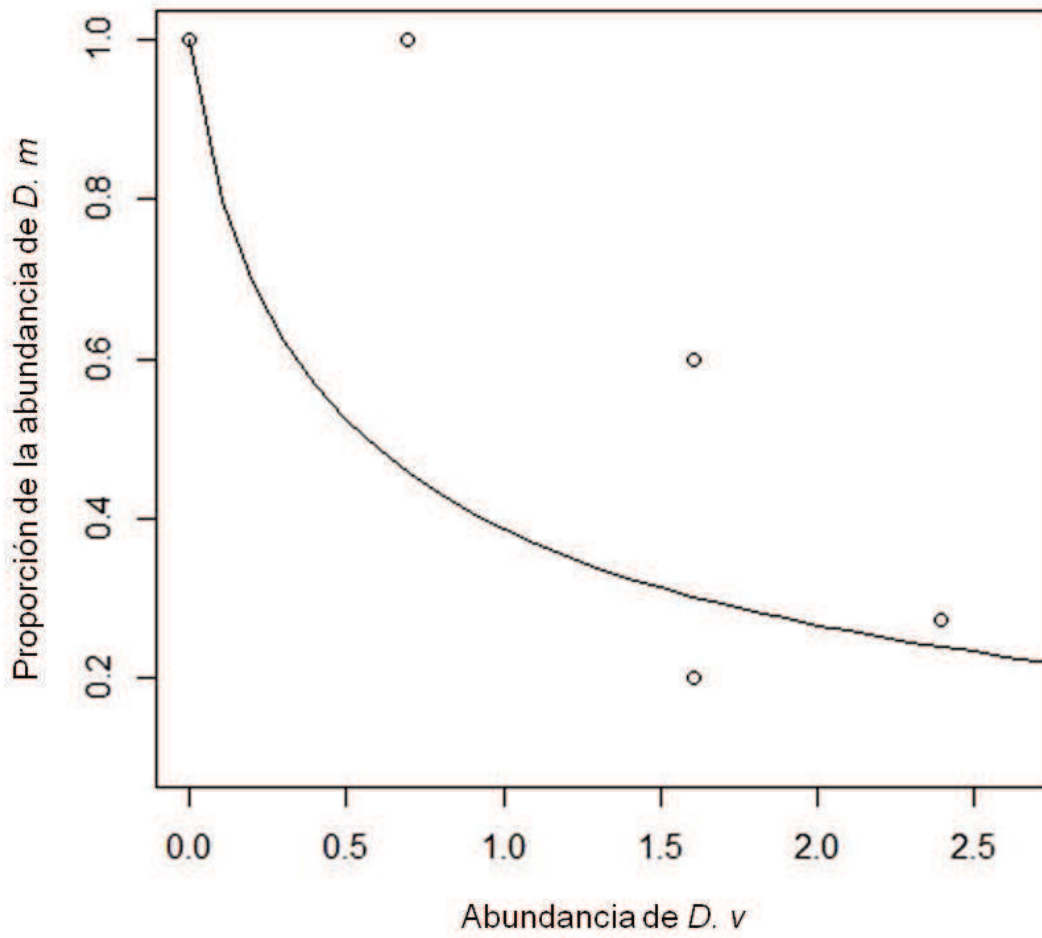


Figura 4. Relación entre la abundancia del tlacuache de Virginia (*D. v*) y la proporción de la abundancia del tlacuache común (*D. m*).

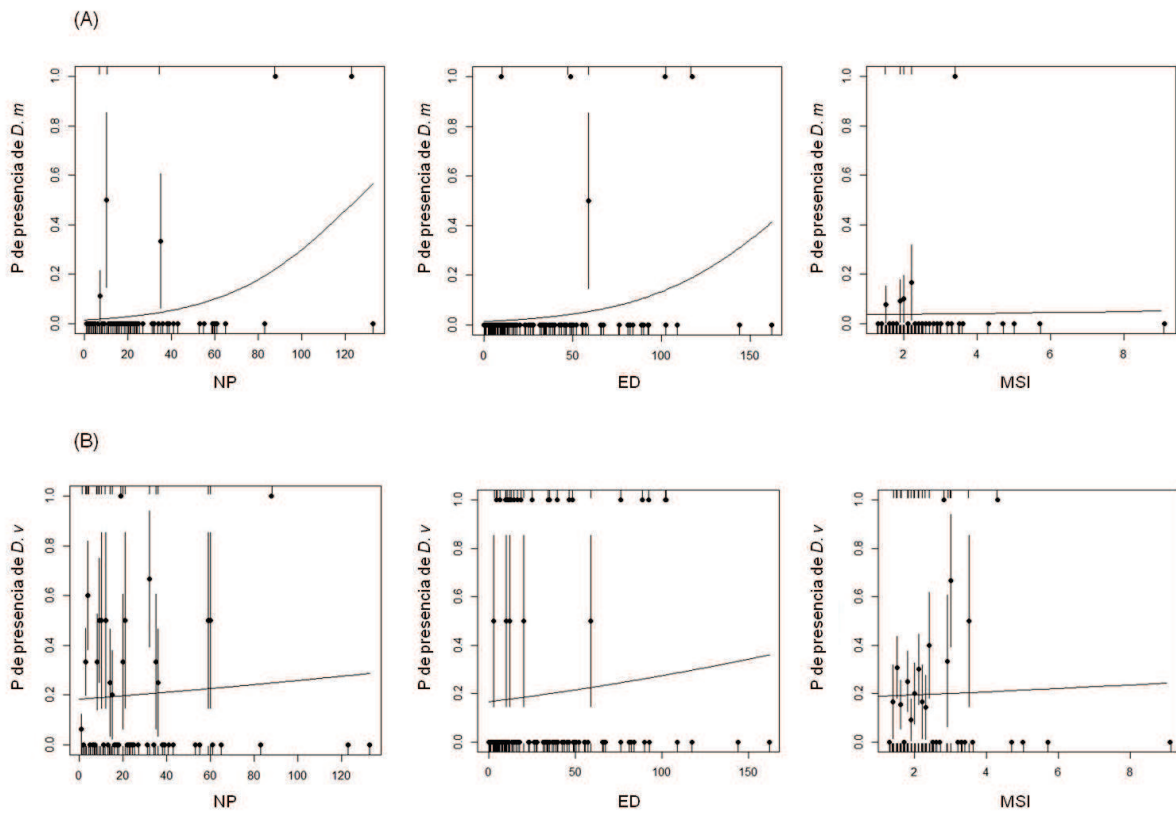


Figura 5. Regresión logística entre la abundancia del tlacuache común (*D. m*) (A) y el tlacuache de Virginia (*D. v*) (B) y los índices del paisaje de Los Altos y la Depresión Central de Chiapas. NP = Número de fragmentos, ED = Densidad de borde, MSI = media del índice del tamaño de forma, P = probabilidad.

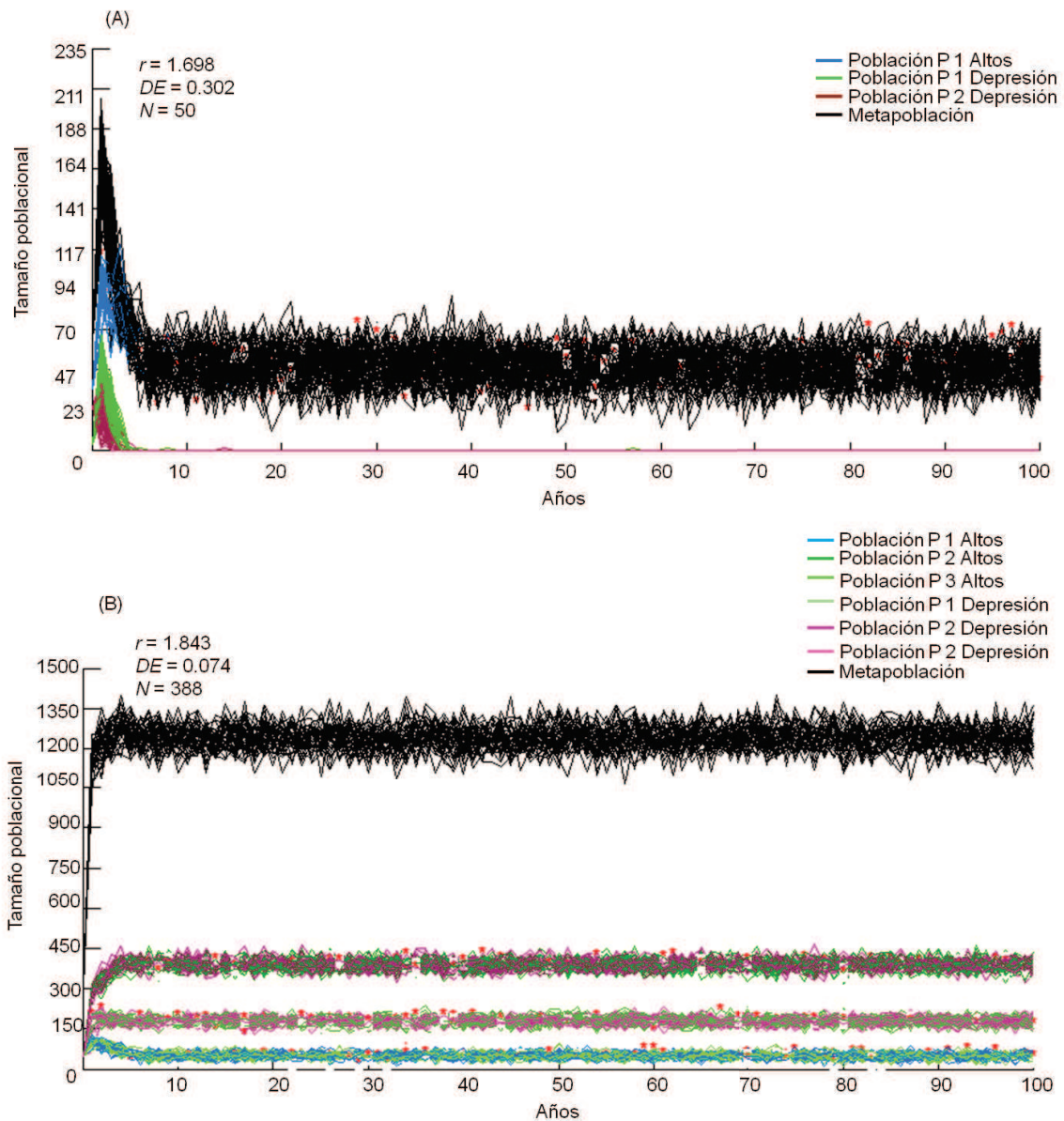


Figura 6. Simulación de viabilidad poblacional del tlacuache común (A) y el tlacuache de Virginia (B) en tres grados de perturbación de Los Altos (Altos) y la Depresión Central (Depresión) de Chiapas. P 1 = baja perturbación, P 2 = perturbación intermedia, P 3 = alta perturbación. r = relación, DE = Desviación Estándar, N = Tamaño poblacional.

Discusión general

Los objetivos de este estudio se relacionan con tres preguntas principales. La primera es ¿cuáles eran los niveles de abundancia relativa local y de diversidad genética de *D. marsupialis* y *D. virginiana*?, además de reconocer los procesos evolutivos relacionados. La segunda, es ¿la diversidad genética de estos marsupiales está asociada a diferentes niveles de perturbación? y, la tercera ¿cómo es la relación entre la abundancia de las especies y las características del paisaje?. En cada capítulo se discutieron los valores de abundancia, diversidad y estructura genética de ambas especies y su relación con la estructura del paisaje en dos regiones de Chiapas, Los Altos y la Depresión Central. Esta investigación en su conjunto representa la documentación, por primera vez en México, de los efectos de la fragmentación en la genética y las poblaciones de estos marsupiales.

Los resultados de este estudio mostraron la existencia de una baja abundancia local, diversidad genética moderada y baja diferenciación genética en las poblaciones estudiadas de *D. marsupialis* y *D. virginiana*, así como las posibles causas y procesos que han dado lugar a los valores observados (Capítulo 1). Se registró una estructura genética moderada en función de la perturbación, con relaciones diferentes para cada especie. En *D. marsupialis* se observó mayor diversidad genética en áreas con menor perturbación, mientras que en *D. virginiana* los niveles más altos de diversidad fueron encontrados en el nivel de perturbación intermedia (Capítulo 2). Las diferencias observadas entre especies en función al nivel de perturbación ayuda a entender las necesidades y la tolerancia de cada una, así como el impacto que causan las actividades humanas en la sobrevivencia de sus poblaciones (Spear et al., 2010).

Otro aspecto relevante de esta tesis doctoral fue reconocer la probable vulnerabilidad de *D. marsupialis* en Los Altos y la Depresión Central de Chiapas, condición determinada a partir de: (1) su baja abundancia local, (2) su distribución restringida a áreas de baja perturbación, en donde también se observó la mayor diversidad genética (Capítulo 2, 3), (3) su disminución en la abundancia en medida que la de *D. virginiana* incrementó y (4) al pronóstico de vulnerabilidad a 100 años como de alto riesgo (Capítulo 3). Estos hallazgos aportan información fundamental que contradice la categoría de no amenazada de *D. marsupialis*. Los resultados de este estudio indican que es preciso monitorear sus poblaciones y diseñar estrategias de conservación para esta especie en las áreas estudiadas. Asimismo, aunque la competencia entre *D. marsupialis* y *D. virginiana* debe evaluarse detalladamente, los presentes resultados contribuyen para entender procesos de competencia interespecífica (Begon et al., 2006).

La notable falta de influencia de la región y de la perturbación en la proporción de sexos, talla, peso y proporción de hembras con crías en el marsupio (Capítulo 1, 3), aporta información relevante sobre la posible homogeneidad de la estructura poblacional de ambos didélfidos a nivel regional (Adler et al., 1997; Begon et al., 2006; Banks et al., 2008).

La permanencia de las poblaciones depende, en gran medida, de la conservación de la diversidad genética (Mace et al., 1996). Banks et al. (2005) evaluaron los efectos de la fragmentación del hábitat en poblaciones de un marsupial carnívoro endémico, catalogado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como en estado de preocupación menor. En este estudio detectaron con 15

microsatélites una media de heterocigocidad esperada (H_e) de 0.860 en áreas no fragmentadas y 0.844 en áreas fragmentadas. Por su parte Carvalho et al. (2011) evaluaron en *Monodelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae) un género de marsupiales ampliamente distribuidos en Sudamérica, las relaciones filogenéticas y patrones filogeográficos, en su trabajo detectaron alta diversidad haplotípica (h) con el citocromo b ($0.985 \pm DE = 0.005$). La diversidad genética observada en este estudio (0.592 en *D. marsupialis* y 0.624 en *D. virginiana*) se encuentra por debajo de lo reportado para marsupiales endémicos y bajo una categoría de riesgo y para especies comunes y ampliamente distribuidas (Banks et al., 2005; Carvalho et al., 2011). Sin embargo, *D. virginiana* se encuentra dentro del rango de especies de mamíferos no amenazados reportado por Frankham et al. (2004): entre 0.62 en el lobo gris hasta 0.73 en el búfalo americano y el perro doméstico. Lo anterior no ocurre en las poblaciones de *D. marsupialis*, que se encuentran por debajo del intervalo descrito, posiblemente por el menor número de poblaciones que fueron muestreadas en este estudio. Así, los niveles moderados de diversidad genética encontrados en las poblaciones estudiadas en el presente estudio sugieren que tanto *D. marsupialis* como *D. virginiana* podrían responder moderadamente a cambios o alteraciones en su entorno, aunque esto debe ser medido de manera directa para poder confirmarse (Frankham et al., 2002; Frankham et al., 2004; Keyghobadi, 2007).

La diversidad genética es estructurada por el sistema reproductor, el flujo genético y los procesos evolutivos que ocurren a escala local (Chung et al., 2002; Arteaga et al., 2012). En este estudio se detectó baja estructura genética en *D. marsupialis* y *D. virginiana*, incluso entre regiones, lo cual coincide con la diferenciación genética

obtenida en estudios filogenéticos con otros marsupiales (Jansa y Voss, 2000; Cervantes et al., 2010), y se puede asociar con cuatro posibles causas. La primera, que estos marsupiales son especies relacionadas filogenéticamente y son consideradas altamente conservadoras (Capítulo 1), por lo tanto, su divergencia genética es reducida (Voss y Jansa, 2009; Medina-Romero et al., 2012). La segunda, es la alta capacidad de dispersión de ambas especies, lo que probablemente permite que parte de las poblaciones estudiadas no se encuentren aisladas, sino que mediante la dispersión a través de la matriz (o corredores entre fragmentos) exista flujo genético entre ellas, ello sugeriría alta conectividad poblacional en sistemas fragmentados (Banks et al., 2005) (Capítulo 1 y 2). En tercer lugar, es posible que la acción de la deriva genética promueva la baja estructuración genética debido a los cambios aleatorios que produce, lo cual puede disminuir la diferenciación entre las poblaciones (Arteaga et al., 2012). Asimismo, la estructura genética moderada en función a los niveles de perturbación observada en ambas especies, indica la influencia de las actividades humanas en la distribución de la diversidad genética (Capítulo 2).

En la introducción se menciona la importancia de conocer la acción de los procesos evolutivos, ya que éstos determinan el arreglo espacial de la diversidad genética y contribuyen a procesos de especiación (Hedrick, 1992; Hernández-Baños et al., 2007). La deriva genética es el proceso en el cual las frecuencias alélicas son modificadas aleatoriamente a través de las generaciones, independientemente de las ventajas o desventajas que ello aporte a la sobrevivencia y reproducción de las poblaciones. Los cambios azarosos en las frecuencias alélicas de dos o más alelos o genotipos dentro de una población podría sugerir la acción de deriva genética (Beggrow y Nehm, 2012). En

este caso, en el Capítulo 1 y 2 se menciona la posibilidad de relacionar potencialmente a la deriva genética con los resultados obtenidos en esta tesis. Es importante considerar que el tamaño de muestra, principalmente en *D. marsupialis*, probablemente influyó en los procesos evolutivos observados ya que, por ejemplo, el número efectivo de individuos reproductores condiciona la probabilidad de que se produzcan procesos de deriva genética (Wright, 1946).

Por otro lado, el sistema de reproducción y el flujo genético son los mecanismos que permiten a las especies mantener una variación genética capaz de adaptarse a diferentes condiciones ambientales a lo largo del espacio y del tiempo (Boshier, 2000). A mayor flujo genético existe mayor probabilidad de permanencia de las especies puesto que el incremento de intercambio reproductivo entre poblaciones generalmente incrementa la diversidad genética, reduce los niveles de endogamia y con ellos disminuye la vulnerabilidad de las poblaciones (Frankhman et al., 2004). La endogamia detectada en este estudio fue reducida en *D. marsupialis*, lo que indica baja probabilidad de que los alelos sean idénticos por descendencia (Frankham et al., 2004). Los bajos niveles de endogamia observados en *D. marsupialis* (Capítulo 2, 3), probablemente sean resultado de su comportamiento agresivo, más intenso en época reproductiva (Sunquist et al., 1987, Cabello, 2006).

En cuanto a *D. virginiana*, los valores observados de consanguinidad fueron elevados y se asocian, en primer lugar a la poca selectividad en cuanto a alimento y áreas reproductivas, así como la ausencia de territorialidad (Aranda, 2000; Ceballos y Oliva, 2005). Otra posible causa de la endogamia es la diapausa embrionaria, un mecanismo mediante el cual se detiene el desarrollo del embrión en una fase de blastocisto hasta

que la cría en desarrollo se fija a la mama, es decir un huevo fertilizado permanece latente en el útero de la madre hasta que puede desarrollarse cuando la madre ya ha parido su cría o camada anterior, lo que produce una descendencia igual o semejante a la anterior (Renfree y Shaw, 2000). La diapausa embrionaria se ha detectado en 70 especies de euterios y 30 especies de marsupiales. A pesar que en *D. virginiana* no se tiene conocimiento de que ocurra diapausa embrionaria y por lo tanto es necesario evaluarlo, es posible que pueda presentarse, de ser así probablemente esto influya en los niveles de consanguinidad encontrados. Por último, la filopatría que es definida como la tendencia de algunas especies a permanecer o volver al mismo territorio en el que nacieron, podría relacionarse potencialmente a los valores de endogamia observados. Sin embargo, es conocido que *D. virginiana* tiene gran capacidad de dispersión y la filopatría aunque podría explicar la endogamia habría generado alta estructuración genética, lo cual no fue observado en los resultados obtenidos (Ceballos y Oliva, 2005; Arteaga et al., 2012). No obstante, es posible que no se haya detectado mayor estructuración genética debido al alto grado de polimorfismo, las altas tasas de mutación (1×10^{-3} a 1×10^{-6}) y la capacidad de los microsatélites de detectar la variación genética relativamente reciente (Rentarúa, 2007).

Por otro lado, las características de poca selectividad de las especies comunes les permiten tener tamaños poblacionales grandes y ser de amplia distribución (Gaston et al., 2000; Krabbe y Rahbek, 2010), sin embargo, los valores de abundancia obtenidos en este estudio fueron bajos y coinciden con estudios previos (Adler et al., 1997, Cáceres y Monteiro-Filho, 1998; Kelly y Caro, 2003; Orjuela y Jiménez, 2004). Ello

sugiere que estas especies mantienen tamaños poblacionales pequeños a pesar de tener altas tasas reproductivas (Ceballos y Oliva, 2005; Cabello, 2006) (Capítulo 1).

En cuanto a la abundancia, los cambios en la estructura del hábitat producen variación en la heterogeneidad ambiental y disponibilidad de recursos, y sus efectos pueden verse reflejados en la fluctuación de la abundancia. Dichos cambios también son afectados por alteraciones en las interacciones poblaciones (Maurer, 2000; Gaston, 2010). En este caso, se observó mayor abundancia de *D. virginiana*, especialmente en la Depresión Central, la variación de la abundancia entre especies sugiere competencia interespecífica (Begon et al., 2006) y entre regiones probablemente se asocia a un efecto de la disponibilidad de recursos en cada paisaje, aunque esto debe confirmarse con estudios enfocados a evaluar los recursos o las interacciones entre individuos de ambas especies si es que existen (González-Espinosa et al., 2008; Rocha-Loredo et al., 2010). *Didelphis marsupialis* fue observada exclusivamente en áreas con menor perturbación, mientras *D. virginiana* estuvo distribuida de manera aleatoria en todos los niveles de perturbación (Capítulo 3).

La escasa relación entre la abundancia relativa y el grado de perturbación en *D. virginiana* indica que las poblaciones de esta especie no son afectadas por las características del paisaje (Capítulo 3). Por el contrario, su alta tolerancia a perturbaciones le permite utilizar el recurso disponible y con ello distribuirse en prácticamente cualquier área, aprovechando el beneficio que pueda obtener de las actividades humanas (Bozek et al., 2007), lo que también genera una distribución azarosa de su diversidad genética (Capítulo 2).

La mayor abundancia se encontró en *D. virginiana* en los dos paisajes estudiados, sin embargo, los mayores niveles de endogamia también fueron encontrados en esta especie, lo cual indica que ocurren apareamientos entre individuos emparentados (Hartl y Clark, 1997). Este aspecto llama la atención porque aunque mantiene tamaños poblacionales relativamente grandes y está distribuida en todos los niveles de perturbación, si las poblaciones disminuyen en tamaño y la endogamia y la deriva genética ocurren en poblaciones pequeñas, la pérdida de diversidad genética puede reducir la capacidad de *D. virginiana* de responder a posibles cambios en su entorno, reduciéndose enormemente las probabilidades de sobrevivencia de sus poblaciones (Frankham et al., 2002; Keyghobadi, 2007) (Capítulo 1, 2).

Las especies comunes se consideran poco afectadas por la fragmentación del hábitat debido a su capacidad de utilizar hábitats potencialmente sustituibles (Lindenmayer, 2000; Markovchick-Nicholls et al., 2007). No obstante, las poblaciones pueden responder de manera diferencial, ya sea por las características de los fragmentos de hábitat y la calidad de la matriz, o por las características biológicas de la especie de interés (Maurer, 2000; Spear et al., 2010). En este caso, el análisis de la influencia de la estructura y composición del paisaje en la abundancia, reveló la influencia del número de fragmentos en la presencia de *D. marsupialis*, la probabilidad de encontrar a este marsupial incrementó a medida que la división de fragmentos fue mayor. Esta evidencia sugiere la capacidad de *D. marsupialis* de vivir en paisajes fragmentados. Sin embargo, su marcada asociación a zonas conservadas permite hipotetizar una dinámica de fuente sumidero en paisajes fragmentados, en los que la matriz debe ser vegetación conservada para asegurar la permanencia de las poblaciones mediante procesos de

dispersión y recolonización entre fragmentos (Murphy et al., 2010). Por su parte, dado que en *D. virginiana* no se detectó ninguna relación entre la distribución de la abundancia y la estructura del paisaje, este estudio confirma la alta capacidad de esta especie de desarrollarse en zonas altamente urbanizadas (Bozek et al., 2007; Markovchick-Nicholls et al., 2007).

Por último, las simulaciones realizadas para evaluar la viabilidad poblacional indican que la única posible permanencia de las poblaciones estudiadas de *D. marsupialis* es bajo una dinámica metapoblacional, lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente. Para el caso de *D. virginiana* las simulaciones construidas pronostican estabilidad poblacional para esta especie. La diferencia entre la viabilidad poblacional entre especies se relaciona con la diferenciación en cuanto a tolerancia, tamaño poblacional y comportamiento (Ceballos y Oliva, 2005), con todo ello se sugiere que *D. marsupialis* podría ser altamente vulnerable a los cambios de hábitat por perturbaciones humanas.

El total de la información obtenida en esta tesis permite predecir situaciones de riesgo en las poblaciones estudiadas. En *D. marsupialis* se sugiere implementar acciones de conservación en las poblaciones de Los Altos y la Depresión Central de Chiapas, pues su tolerancia a la fragmentación está condicionada a la presencia de áreas relativamente conservadas, de no ser así, es posible que estas poblaciones se encuentren en grave peligro en un futuro cercano, debido a que la modificación de áreas conservadas a áreas productivas en éstas zonas no solo permanece sino va en aumento (Challenger et al., 2010; Rocha-Loredo et al., 2010). En el caso de *D. virginiana*, no se considera necesario implementar acciones de conservación

inmediatas pues las poblaciones estudiadas están siendo beneficiadas por las actividades humanas y su escenario futuro predice estabilidad poblacional. Sin embargo, los niveles de endogamia detectados deben considerarse como una amenaza latente, pues a pesar de mantener tamaños poblacionales relativamente grandes, el grado de consanguinidad entre los individuos puede aumentar la probabilidad de manifestar procesos no deseados como mutaciones deletéreas y enfermedades recesivas, esto a su vez disminuir la adecuación de las poblaciones de Los Altos y la Depresión Central de Chiapas (Frankham et al., 2002; Frankham et al., 2004).

Nuevas preguntas

Esta investigación contesta algunas preguntas sobre la genética de la conservación y la ecología del paisaje en dos especies comunes, *D. marsupialis* y *D. virginiana*, sin embargo genera nuevas interrogantes y futuras líneas de investigación. En el Capítulo 2 se detectó un cambio gradual de las frecuencias alélicas lo que podría sugerir la acción de la selección natural, esto genera el cuestionamiento de la intervención de este proceso evolutivo en las poblaciones de éstos marsupiales, para ello se necesita un estudio preciso que evalúe su acción y dirección. Por otro lado, las características morfológicas de estas especies son variables según la zona de distribución (Cervantes et al., 2010), y existen organismos muy difíciles de identificar en campo, esta observación sugiere la pregunta de si existen organismos híbridos en áreas donde coexisten y/o si la plasticidad fenotípica es una estrategia que les está permitiendo responder a cambios ambientales. Además, la falta de estructura genética no permitió

evaluar rutas de flujo genético, sin embargo es posible que la escala de observación haya sido muy pequeña para detectar estructuración genética en estas especies debido a la baja tasa de cambio evolutivo entre ellas (Voss y Jansa, 2009), por lo tanto es necesario hacer un estudio genético más amplio en donde se considere el área de distribución total de cada especie, con ello asegurar definir rutas de flujo genético para entender cuáles son los procesos ecológicos que mantienen la diversidad genética observada. Por su parte, la baja abundancia detectada en las zonas estudiadas propone hacer un análisis con una escala espacial y temporal mayor, para así determinar patrones que expliquen la distribución de la abundancia de éstos marsupiales. Asimismo, la distribución de la abundancia de *D. marsupialis* asociada a sitios conservados y su relación con la fragmentación, identificada con un índice del paisaje (número de fragmentos), genera el cuestionamiento de si las poblaciones de esta especie se desarrollan en un paisaje fragmentado a partir de una dinámica metapoblacional, y cómo es esa dinámica. Otro aspecto importante es la falta de relación encontrada entre los índices del paisaje medidos y la distribución de la abundancia de *D. virginiana*, que hace considerar un estudio futuro que incorpore otras variables del paisaje que puedan explicar la distribución de su abundancia. Del mismo modo, la relación observada entre *D. virginiana* y *D. marsupialis* sugiere evaluar la competencia interespecífica y sus efectos en la abundancia y distribución geográfica de estos marsupiales. Por último, la ausencia de relación entre la estructura poblacional (proporción de sexos y hembras con crías en el marsupio) y las características del paisaje plantea conocer cuáles son los factores del paisaje que influyen en la reproducción y estructura poblacional de éstas especies. Con todas estas preguntas

surgen varias líneas de investigación, sin duda alguna interesantes y con alto potencial de innovación y de aporte a la conservación, ecología, genética, biogeografía y evolución de éstos mamíferos.

Literatura citada.

- Adler, G. H, J. J. Arboledo y B. L. Travi. 1997. Population dynamics of *Didelphis marsupialis* in Northern Colombia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 32:7-11.
- Aranda, M. 2000. Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Veracruz, México. 212 p.
- Arteaga M. C., D. Piñero, L. E. Eguiarte, J. Gasca y R. A. Medellín. 2012. Genetic structure and diversity of the nine-banded armadillo in Mexico. *Journal of Mammalogy* 93: 547-559.
- Banks, S. C., G. R. Finlayson, S. J. Lawson, D. B. Lindenmayer, D. Paetkau, S. J. Ward y A. C. Taylor. 2005. The effects of habitat fragmentation due to forestry plantation establishment on the demography and genetic variation of a marsupial carnivore, *Antechinus agilis*. *Biological Conservation* 122: 581-597.
- Banks, S. C., E. J. Knight, J. E. Dubach y D. B. Lindenmayer. 2008. Microhabitat heterogeneity influences offspring sex allocation and spatial kin structure in possums. *Journal of Animal Ecology*, 77: 1250-1256.

- Beggrow, E. P. y R. H. Nehm. 2012. Students' Mental Models of Evolutionary Causation: Natural Selection and Genetic Drift. *Evolution Education and Outreach* 5: 429-444.
- Begon, M., C. R. Townsend, y J. L. Harper. 2006. *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. 4a Edición. Blackwell Publishing. Australia. 738p
- Boshier, D. H. 2000. Mating systems. *En: Forest conservation genetics: principles and practice*, T. B. D. Boshier y A. Young (Eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. p. 63-79.
- González-Espinosa, M., N. Ramírez-Marcial y J. M. Rey-Benayas. 2008. Variación Espacial de la diversidad arbórea de Chiapas: patrones regionales y jerarquía de factores determinantes. *En: Ecología, manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México*, L. R. Sánchez-Velásquez, J. Galindo-González, F. Díaz-Fleischer (Eds.). Mundi-Prensa México, S. A. de C. V. México, D. F. p.147-166.
- Bozek, C. K., S. Prange y S. D. Gehrt. 2007. The influence of anthropogenic resources on multi-scale habitat selection by raccons. *Urban Ecosystems* 10:413-425.
- Cabello, D. R. 2006. Reproduction of *Didelphis marsupialis* (Didelphimorphia: Didelphidae) in the Venezuelan Andes. *Acta Therologica* 51: 427-433.
- Cáceres, N. C. y E. L. A. Monteiro-Filho. 1998. Population dynamics of the Common opossum, *Didelphis marsupialis* (Mammalia, Marsupialia), in southern Brazil. *International Journal of Mammalian Biology* 63:169-172.

- Carvalho B. de A., L. F. B. Oliveira, A. Langguth, C. C. Freygang, R. S. Ferraz y M. S. Mattevi. 2011. Phylogenetic relationships and phylogeographic patterns in *Monodelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae). American Society of Mammalogists. 92: 121-133.
- Ceballos, G. y Oliva G. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 986 p.
- Cervantes, F. A., J. Arcangeli, Y. Hortelano-Moncada y A. V. Borisenko. 2010. DNA barcodes effectively identify the morphologically similar Common Opossum (*Didelphis marsupialis*) and Virginia Opossum (*Didelphis virginiana*) from areas of sympatry in Mexico. Mitochondrial DNA 21(S1):44-50.
- Challenger, A., D. Golicher, M. González-Espinosa I. March-Misfsut, N. Ramírez-Marcia y R. M. Vidal-Rodríguez. 2010. Montañas del Norte y Altos de Chiapas. *En* El Bosque Mesófilo de Montaña en México: Amenazas y Oportunidades para su Conservación y Manejo Sostenible, T. Toledo-Aceves (eds.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO, México, D. F. p.133-141.
- Chung, M. Y., J. Nason, M. G. Chung, K-J. Kim, C-W. Park, B-Y. Sun y J-H. Pak. 2002. Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). American Journal of Botany 89: 1229-1236.
- Frankham, R. J. D. Ballou y D. A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.

Frankham, R., J. D. Ballou y K. H. McInnes. 2004. A Primer of Conservation Genetics. University of Cambridge, Cambridge. 220 p.

Gaston, K. J., T. M. Blackburn, J. J. D. Greenwood, R. D. Gregory, R. M. Quinn y J. H. Lawton. 2000. Abundance-Occupancy Relationships. *Journal of Applied Ecology* 37:39-59.

Gaston, K. J. 2010. Valuing Common Species. *Science* 327: 154-155.

González-Espinosa, M., N. Ramírez-Marcial y J. M. Rey-Benayas. 2008. Variación Espacial de la diversidad arbórea de Chiapas: patrones regionales y jerarquía de factores determinantes. *En: Ecología, manejo y conservación de los ecosistemas de montaña en México*, L. R. Sánchez-Velásquez, J. Galindo-González, F. Díaz-Fleischer (Eds.). Mundi-Prensa México, S. A. de C. V. México, D. F. p.147-166.

Hartl, D. L. y A. G. Clark. 1997. Principles of Population Genetic. Sinauer, Sunderland. Massachusetts. 542 p.

Hedrick, P. W. y P. S. Miller. 1992. Conservation genetics: Techniques and Fundamentals. *Ecological Applications* 2: 30-46 .

Hernández-Baños, B. E., M. Honey-Escandón, M. N. Cortés-Rodríguez y G. García Deras. 2007. Filogeografía de aves mexicanas. Pp. 470-495. En Eguiarte L. E. V. Souza y X. Aguirre. *Ecología molecular*. Primera edición. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, México, D. F. 592p.

- 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* 7:43-77.
- Kelly, M. J. y T. Caro. 2003. Low density of small mammals at Las Cuevas, Belize. *Mammalian Biology* 68:372-386.
- Keyghobadi, N. 2007. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Canadian Journal of Zoology* 85: 1049-1064.
- Krabbe, B. M. y C. Rahbek. 2010. Causality of the relationship between geographic distribution and species abundance. *The Quarterly Review of Biology* 85(1):3-25.
- Lindenmayer, D. B., M. A. McCarthy, K. M. Parris, M. L. Pope. 2000. Habitat Fragmentation, Landscape Context, and Mammalian Assemblages in Southeastern Australia. *American Society of Mammalogists*. 81(3): 787-797.
- Mace, G. M., T. B. Smith, M. W. Bruford y R. K. Wayne. 1996. An Overview of the Issues. Pp. 3-21. En Smith T. B. y R. K. Wayne. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Primera edición. Oxford University Press, Inc. Estados Unidos de América. 483 p.
- Markovchick-Nicholls, L., H. M. Regan, D. H. Deutschman, A. Widyanata, B. Martin, L. Noreke y T. A. Hunt. 2007. Relationships between human Disturbance and Wildlife Land Use in Urban Habitat Fragments. *Conservation Biology* 22:99-109.
- Maurer, B. A. 2000. Macroecology and consilience. *Global Ecology and Biogeography* 9: 275-280.

- Medina-Romero, M., I. Goyenechea y J. Castillo-Cerón. 2012. Phylogenetic measures applied to the conservation of Mexican marsupials. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83:1216-1220.
- Murphy M. A., R. Dezzani, D. S. Pilliod y A. Storfers. 2010. Landscape genetics of high mountain frog metapopulations. *Molecular Ecology*, 19: 3634-3649.
- Orjuela, C. O. J. y G. Jiménez. 2004. Estudio de la abundancia relativa para mamíferos en diferentes tipos de coberturas y carretera, Finca Hacienda Cristales, Área Cerritos-La Virginia, Municipio de Pereira. *Universitas Scientiarum* 9:87-96.
- Renfree M. B. y G. Shaw. 2000. Diapause. *Annual Review of Physiology* 62: 353-375.
- Rentaría, A. M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. *En Ecología molecular*, L. E. Eguiarte. V. Souza y X. Aguirre (eds.). Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, México, D. F. p. 541-566.
- Rocha-Loredo, A. G., N. Ramírez-Marcial y M. González-Espinosa. 2010. Riqueza y diversidad de árboles del bosque tropical caducifolio en la depresión central de Chiapas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 87:89-103.
- Spear, S. F., N. Balkenhol, M-J. Fortin, B. H. Mcrae y K. Scribner. 2010. Use of resistance surfaces for landscape genetic studies: considerations for parameterization and analysis. *Molecular Ecology*, 19: 3576-3591.
- Sunquist, M. E., S. N. Austad y F. Sunquist. 1987. Movement patterns and home range in the common oposum (*Didelphis marsupialis*). *Journal of Mammalogy* 68:173-176.

- Voss, R. S. y S. A. Jansa. 2009. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of new world metatherian mammals. Bulletin of the American Museum of Natural History 322:1-177.
- Wright S. 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. Genetics 31: 39-59.