



**Caracterización de la diversidad y estructura genética espacial de la zarigüeya común
(*Didelphis marsupialis*) en la matriz urbana del Área Metropolitana del Valle de Aburrá**

Carolina Henao Sáenz

Trabajo de grado para optar por el título de bióloga

Iván Darío Soto Calderón

Asesor

Juliana Herrera Pérez

Coasesor

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Biología
El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia
2022

Cita	(Henao-Sáenz et al., 2022)
Referencia	Henao Sáenz C., Soto Calderón I.D.& Herrera Pérez J. (2022). <i>Caracterización de la diversidad y estructura genética espacial de la zarigüeya común (Didelphis marsupialis) en la matriz urbana del Área Metropolitana del Valle de Aburrá</i> [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Grupo de Investigación en Agrociencias, Biodiversidad y Territorio (GAMMA)

Seleccione centro de investigación en Ciencias y Naturales (CIEN)



Biblioteca Seccional Oriente (El Carmen de Viboral)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: Adriana Echeverry Isaza

Jefe departamento: Ana Esperanza Franco.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Caracterización de la diversidad y estructura genética espacial de la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*) en la matriz urbana del Área Metropolitana del Valle de Aburrá

Carolina Henao-Sáenz^{1,3}, Iván Soto-Calderon^{1,2,4}, Juliana Herrera Perez^{1,5}

¹Laboratorio de Genética Animal, Grupo Agrociencias, Biodiversidad y Territorio, Universidad de Antioquia.

²Docente Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, A.A. Medellín (Antioquia), Colombia

Correos electrónicos

³carolina.henaos@udea.edu.co, ⁴ivan.soto@udea.edu.co, ⁵juliana.herrera.p@gmail.com

Número de páginas: 19; Número de figuras: 6; Número de figuras suplementarias: 0; Número de tablas: 3; Número de palabras: 5570; Resumen: 164; Introducción: 586; Discusión: 912.

Abreviaciones: AMVA, Área Metropolitana del Valle de Aburrá; Cytb, Citocromo B; STR, secuencias cortas de ADN; SPCA, Análisis espacial de componentes principales.

Declaración de significancia: Este estudio corresponde al primero en evaluar diversidad y la estructura genética espacial de *D. marsupialis* en ambientes urbanos. Particularmente, se evaluaron las características genéticas de la especie en un ambiente altamente heterogéneo y densamente poblado como lo es el AMVA. La integración de los datos genéticos de este estudio con otros proporcionará una comprensión más profunda de la especie.

Resumen

La zarigüeya común, *Didelphis marsupialis* es una especie generalista con alta capacidad de dispersión. Aunque no se encuentra en estado de amenaza, en zonas urbanas es percibida como una especie no carismática, con altos índices de atropellamiento y agresión. En Colombia no se ha estudiado su demografía ni su diversidad genética. Este es el primer reporte que caracteriza su diversidad y estructura genética espacial mediante el uso de secuencias mitocondriales del gen Citocromo B y genotipos multilocus de nueve loci microsatélite, centrándose en la población de zarigüeyas del Área Metropolitana del Valle de Aburrá (AMVA), Antioquia, Colombia. Se

encontraron cinco sitios polimórficos en cuatro haplotipos mitocondriales. Los marcadores microsatélite revelaron una diversidad genética alta ($H_e = 0.852$ y $H_o = 0.698$) sin evidencia de estructura genética ni barreras físicas a la dispersión según el análisis espacial de componentes principales (sPCA). Aunque la matriz urbana podría no restringir la conectividad funcional en la población, es necesario evaluar el impacto de posibles liberaciones hechas por la autoridad ambiental.

Palabras claves: biodiversidad, conservación, *Didelphis*, Citocromo B, fauna urbana, genética de la conservación, microsatélite, mitocondria.

Introducción

Las principales amenazas para la diversidad biológica son la pérdida de hábitat y la fragmentación del paisaje (Huxel & Hastings, 1999), llevando a pérdida de los corredores naturales y reducción de los parches de hábitat idóneo (Herrera, 2011). Casos extremos son las matrices altamente modificadas como las de las áreas urbanas en donde la conversión del hábitat para uso humano provoca perturbaciones que influyen directamente sobre la conectividad y que pueden afectar la abundancia de especies, la composición de la comunidad, los tamaños poblacionales y los procesos ecológicos dentro de parches de vegetación nativa a través de tres efectos asociados con (i) el movimiento y la dispersión; (ii) los recursos provistos dentro de la matriz, y (iii) el entorno abiótico de los parches (Driscoll, 2013).

Además, la fragmentación y la degradación del hábitat influyen sobre los procesos evolutivos de las poblaciones al alterar los patrones de selección natural, modificando el flujo de genes, disminuyendo la diversidad genética y promoviendo la endogamia, lo que puede dar lugar a extinciones locales (Munshi et al., 2013; Ruell et al., 2013; Templeton et al. 1990; White et al., 1999). A pesar de ello, algunas especies silvestres son capaces de persistir en ambientes urbanizados, donde pueden encontrar recursos abundantes a lo largo del año (Ives et al., 2016) e incluso ver aumentada su capacidad de dispersión reduciendo así la probabilidad de aislamiento, cuellos de botella, y deriva genética (Miles, 2019). En este sentido se pueden predecir resultados alternativos para los organismos que son muy móviles o aquellos que prosperan en hábitats urbanos, debido a que la urbanización puede facilitar el flujo de genes a través de la creación de corredores o la eliminación de barreras (Holderegger & Di Giulio, 2010). Por ejemplo, en algunos

mamíferos los jardines, zonas verdes y arbolados pueden facilitar dispersión y explotar diferentes recursos, lo que les confiere cierto grado de tolerancia o incluso ventajas para la dispersión.

Tal es el caso de la zarigüeya común, *Didelphis marsupialis*, una especie de la familia Didelphidae con un rango geográfico que va desde el sur de México hasta el norte de Argentina (Astúa et al., 2021). Se encuentra en la selva tropical y subtropical, bosques secundarios y cerca de asentamientos humanos como viviendas y tierras agrícolas. Es una especie generalista de hábitos nocturnos con alta capacidad de movimiento, pues no permanecen en sus madrigueras por más de cinco días. Su dieta es muy amplia por lo que se denominan omnívoros oportunistas, ya que cambian con relativa facilidad ante la disponibilidad de distintos recursos alimenticios, lo que probablemente le ha ayudado a ocupar grandes áreas en su distribución geográfica (Ringier, 1961; Gardner, 1973). Esta especie no se encuentra amenazada (Astúa et al., 2021), pero en zonas urbanas es percibida como un animal dañino e indeseable con altos índices de atropellamiento y agresión (Delgado, 2007). En este escenario, en Colombia se han planteado diversos programas para la protección y conservación de la zarigüeya, y los pocos estudios que se han realizado se enfocan principalmente en conocer su abundancia poblacional, su reproducción, sus características morfológicas y su relación parasito-hospedero (Tyndale & Mackenzie, 1976; Adler et al., 1997; Ramírez & Osorio, 2014; Saldaña et al., 2019). Sin embargo, no se ha estudiado su demografía ni su diversidad genética, la cual resulta importante para entender los fenómenos evolutivos que atraviesan. Es por esto que, en este estudio se caracterizó la diversidad y estructura genética de la zarigüeya común (*D. marsupialis*) en el Área Metropolitana del Valle de Aburrá mediante el uso de marcadores mitocondriales y loci microsatélite.

Métodos

Captura de individuos y toma de muestras

Entre los meses de septiembre y diciembre de 2021 se realizó un muestreo oportunista de individuos rescatados por la autoridad ambiental en zonas urbanas de seis de los diez municipios del Área Metropolitana del Valle de Aburrá (Copacabana, Bello, Medellín, Envigado, Itagüí y La Estrella; Figura 1). Los individuos fueron llevados a la Estación de Paso del AMVA ubicada en el Jardín Botánico de la ciudad de Medellín. Se colectaron siete muestras de sangre, y en animales con protocolo de eutanasia 71 de tejido de oreja o cola (Tabla 1). Dichas muestras fueron

almacenadas en etanol al 96% en tubos eppendorf® de 1.5 µl, y llevadas al laboratorio de Genética Animal de la Universidad de Antioquia para ser procesadas.

Este estudio se realizó bajo la aprobación del Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Antioquia (CEEA). El protocolo fue revisado y aprobado en el acta de sesión N° 142 del 05 de octubre del 2021.

Métodos de laboratorio

Extracción de ADN

Las extracciones de ADN de las muestras de sangre se realizaron utilizando el kit comercial *DNA easy Blood and Tissue kit* (QIAGEN, 2020), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Para las muestras de tejido se usó el método tradicional *Salting Out* (Tabla 1). Las extracciones se realizaron en una cámara de presión positiva, la cual se limpió y se expuso a la luz ultravioleta para disminuir el riesgo de contaminación. Al preparar las muestras antes de la extracción se cambiaron los guantes y el equipo fue limpiado y esterilizado entre cada muestra. *Secuenciación y análisis del gen mitocondrial CytB*

Un fragmento de 874pb del gen Citocromo B (Cyt B) se amplificó mediante PCR en un volumen total de 15µl, utilizando 2µl de ADN, 1.5µl de Taq Buffer (10x), 1.5µl de BSA, 0.3µl de dNTPs (10mM), 0.3µl cebador forward (10mM), 0.3µl cebador reverso (10mM), 0.2µl (1U) de Taq polimerasa y un volumen variable de MgCl₂ (2mM), haciendo uso de los cebadores Didm1413F (5'-AACCTATGGCATGAAAACCATYG-3') y Didm15007R (5'-AAATAGAAAATACCATTCTGGCTTGAT-3') diseñados para este estudio por Soto-Calderón (2021). La amplificación se hizo según las siguientes condiciones: 94 °C durante 5 min; 34 ciclos de 94°C por 35 s, 58.3°C por 35 s y 72 °C por 1 min; 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se verificaron en electroforesis de gel de agarosa al 2% para comprobar la amplificación y los resultados positivos se purificaron usando 1 µl de mezcla de exonucleasa I (ThermoFisher Scientific Ltd.) y FastAP Fosfatasa alcalina termosensible (ThermoFisher Scientific Ltd.) con una proporción de 1:1 (Ross et al., 2020).

De los productos de PCR se secuenció exitosamente un fragmento de 771 bp en 57 muestras mediante contratación de en un servicio comercial de secuenciación. Las secuencias fueron editadas con el software Geneious Prime v2020.0.5 (<https://www.geneious.com>). El alineamiento

se realizó usando el algoritmo ClustalW en el software MEGA X11 (Tamura et al., 2021), el cual luego se exportó al software DNAsp versión 5.1.1.8 (Librado & Rozas, 2009) para estimar el número de haplotipos (h), el número de sitios polimórficos (S), los valores de diversidad de haplotipos (Hd) y nucleótidos (π), además de calcular los estadísticos de desviación de la neutralidad D de Tajima (1989) y F de Fu (1996).

Para analizar los patrones de distribución geográfica y relaciones de haplotipos, se realizó un Median-Joining, red implementada en PopART versión 1.7 (Leigh & Bryant, 2015) utilizando solo las secuencias obtenidas en este estudio.

Para el análisis filogenético se descargaron 19 secuencias de referencia del Genbank (Clark et al., 2016) de *D. marsupialis* y tres secuencias de referencia de *D. virginiana*, especie que se utilizó como grupo externo. Dichas secuencias se alinearon con las secuencias obtenidas y se construyó un árbol filogenético bayesiano forzando la monofilia de *D. marsupialis* e implementando un *Yule's process* con un modelo mutacional GTR y 50 millones de pasos, muestreando cada 1000. Para el árbol se descartaron como *burnin* el 10% (5000) de los árboles. Todos los demás parámetros permanecieron sin modificar. La filogenia se construyó en el programa BEAST v2.5 (Bouckaert et al., 2019).

Estandarización y genotipificación de microsatélites

Se probaron nueve marcadores microsatélite diseñados previamente para zarigüeyas (Lavergne et al., 1999; Fike et al., 2009; Dias et al., 2009), cuyos protocolos fueron estandarizados individualmente. Cada reacción de 15 μ l contuvo 1.5 μ l de Taq Buffer (10x), 1.5 μ l de BSA, 0.3 μ l de dNTPs (10mM), 0.3 μ l cebador forward (10mM) marcado en su extremo 5' con fluorocromos (Tamra, Fam, Hex), 0.3 μ l cebador reverso (10mM), 0.2 μ l (1U) de Taq polimerasa y un volumen variable de MgCl₂ (Tabla 2). Las condiciones de PCR fueron 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 35 s, Δ °C por 30 s y 72 °C por 45 s, y 72 °C durante 7 min. Con los amplicones previamente chequeados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% se combinaron tres grupos de loci, distinguibles por color o tamaño de cada individuo (Tabla 2). Los tamaños alélicos se identificaron mediante electroforesis capilar en un equipo ADN ABI 3730, con un estándar de tamaño LIZ-500. Finalmente, la asignación a grupos alélicos se hizo con Geneious Prime v2020.0.5

Análisis de los marcadores nucleares microsatélite

Debido al número variable de genotipos obtenidos para cada microsatélite, los análisis se realizaron en 53 individuos con genotipos completos, para los cuales se evaluaron pares de loci en desequilibrio de ligamiento, se identificaron posibles errores de genotipificación por presencia de alelos nulos y se calculó el contenido de información polimórfica (PIC) con el software Cervus (Kalinowaki et al., 2007).

Para evaluar la variabilidad y diversidad genética se calcularon en el programa GenAlex v6.5 (Peakall & Smouse, 2006) los siguientes parámetros: número total de alelos por locus (N_a), número de efectivo de alelos por locus (N_e), heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o) y desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE).

Análisis de la estructura genética espacial

Se realizó un análisis espacial de componentes principales (sPCA) que a diferencia del PCA convencional identifica patrones asociados a la mayor variación genética y no considera modelos genéticos particulares como los supuestos del equilibrio de Hardy-Weinberg o el desequilibrio de ligamiento (Jombart et al., 2008) De esta manera, se produjo un *screetplot* para visualizar la varianza y la autocorrelación espacial de Moran's I e inferir la existencia de estructuras espaciales generales. Adicionalmente se ejecutó la prueba de Monte Carlo con 999 permutaciones para probar estadísticamente la presencia de estructura espacial global (diferencia entre grupos o clines) y local (diferencias entre vecinos). Estos análisis se llevaron a cabo con el paquete ADEGENET v.2.1.1 en R (Jombart, 2015), y con los datos generados se hizo un mapa con el programa Qgis para visualizar la estructura en el espacio (Neteler & Mitasova, 2008).

Resultados

Análisis de datos mitocondriales

Se obtuvieron como resultado cinco sitios polimórficos que definen cuatro haplotipos ($H_d= 0.280$ [$sd=0.072$]; $\pi= 0.00288$ [$sd= 0.00291$]) (Tabla 4). La red de haplotipos obtenida fue en forma de triángulo y reveló un haplotipo modal central H1 presente en 48 individuos (84.2%) y en todos los municipios del AMVA que fueron muestreados (Figura 2). El H2 está presente en siete individuos

de los municipios de Medellín y Envigado, H3 solo se encontró en un individuo de Medellín. Finalmente, el haplotipo H4 se identificó en un individuo de Envigado.

El árbol filogenético mostró un agrupamiento de los haplotipos H1, H3 y H4 con dos secuencias de referencia reportadas en Panamá (KT437726 y MG491975) con probabilidad posterior cercana a 1.0, y una clara separación con respecto al haplotipo H2. Se identificó además un tercer grupo con un bajo valor de soporte estadístico constituido por todas las demás secuencias de referencia utilizadas en este estudio reportadas en Perú (KJ129895 y AJ606420), Brasil (JF280998, JF280999, JF281000, JF281001, JF281002, JF281004, JF281005, JF281006, KT447521 y U34665), Guyana (KT53570, KT153571 y KT153572) y México (HM589701 y HM589702) (Figura 3).

Se encontró además una baja diversidad de haplotipos ($H_d = 0.280 \pm 0.072$) en donde hay un 28% de probabilidad que al escoger dos haplotipos estos sean diferentes entre sí. También se encontró una baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0.0029 \pm 0.00291$) entendida como la probabilidad de que dos sitios homólogos sean diferentes (Excoffier & Lischer, 2010). Este resultado es comparable con la red de haplotipos ya que se observaron pocos cambios nucleotídicos entre haplotipos y un haplotipo dominante (H1) distribuido en todos los municipios del AMVA que fueron muestreados. Las pruebas de neutralidad ($D = -1.17584$, $F = -1.176$) arrojaron valores negativos consistentes con un proceso de expansión poblacional, pero no fueron significativamente diferentes de cero ($P > 1.10$).

Análisis de los marcadores microsatélite

En total fueron identificados 148 alelos en nueve loci, con un promedio de 16,4 alelos por locus. El mayor número de alelos (N_a) se encontró en el locus *Dm3* con 25 alelos en total, mientras que el menor número de alelos se encontró en el locus *Op48* con 11 alelos. El promedio del número efectivo de alelos por locus (N_e) fue de 8.610, con valor mínimo de 2.579 en *Mnud41* y valor máximo de 17.128 en *Dm3*. Los valores del contenido de información polimórfica (PIC) fueron altos en todos los loci, siendo *Dm3* aquel con el PIC más alto (0.939), mientras que en el locus *Mnu41* presentó el PIC más bajo (0.618). La probabilidad de alelos nulos varía desde 0.0197 hasta 0.3539 presentándose la probabilidad más alta de alelos nulos en el marcador *Dm1* (Tabla

3). Además, se encontró que los locus *Dm1-Dm3*, *Dm3-Dm5*, *Dm5-Dm9* se encuentran ligados entre sí, por lo cual dan la misma información mutacional.

El valor promedio de Fis fue de 0.175 con valores desde 0.014 hasta 0.518 (Tabla 3). La heterocigosidad observada (H_o) promedio fue de 0.698, variando entre 0.415 y 0.792. La heterocigosidad esperada (H_e) promedio fue de 0.852, y osciló entre 0.612 y 0.942. Estos valores muestran un déficit de heterocigotos en la población, pues H_e obtuvo valores más elevados que H_o en los nueve microsatélites. Esto explica la desviación del equilibrio de Hardy Weinberg en siete de los nueve loci (Tabla 3).

Análisis de la estructura genética espacial

El primer y segundo componente explicaron la mayor variación y tuvieron los valores propios más altos, por lo que se consideraron como los más importantes para explicar la variación genética (Figura 4a). El *screeplot* (Figura 4b) mostró a $\lambda_1 = 0.135$ como el valor propio positivo más alto con niveles de autocorrelación espacial I de Moran = 0.514 y a $\lambda_2 = -0.076$ como el valor propio negativo más alto con autocorrelación espacial I de Moran = -0.355. Las pruebas de permutación de Monte Carlo no identificaron una estructura genética global ($P = 0.087$), ni tampoco local ($P = 0.33$), en donde los valores de prueba observados fueron menores tanto a nivel global (0.025) como local (0.024). Por lo tanto, se aceptó la hipótesis nula que predice una distribución aleatoria de las frecuencias alélicas de los individuos en la red de conexiones (Montano & Jombart, 2017).

La localización en un mapa de los puntajes de los valores propios individuales del primer componente del (sPCA1) sugiere que las frecuencias alélicas se distribuyen aleatoriamente por todo el paisaje urbano (Figura 5). Estos resultados correspondieron a las pruebas estadísticas, pues en el mapa no se identifica una estructura definida. Así mismo en el mapa de la distribución de las heterocigosidades observadas (figura 6) no se identifican diferencias geográficas en los niveles de heterocigosidad.

Discusión

Hasta donde se conoce, este estudio corresponde al primero en evaluar diversidad y la estructura genética espacial de *D. marsupialis* en ambientes urbanos. Particularmente, se evaluaron las características genéticas de la especie en un ambiente altamente heterogéneo y densamente

poblado como lo es el AMVA. La integración de los datos genéticos de este estudio con otros proporcionará una comprensión más profunda de la especie.

Aunque el marcador mitocondrial Cytb no es tan informativo, como sí lo son los marcadores STR nucleares, ambos tipos de marcadores coinciden en que la población de zarigüeyas que habitan el AMVA no presentan evidencias de estructuración genética y por tanto ningún efecto de posibles barreras a la dispersión. El AMVA posee una superficie de 1,157 km² y las zarigüeyas tienen un rango de hogar en donde las hembras promedian 0.163 km² y los machos 1.23 km² por área (Sunquist, et al., 1987), aunque es una distancia relativamente pequeña, estos animales no permanecen por más de cinco días en sus madrigueras, lo que hace que estén en constante movimiento a lo largo de su vida. Así mismo sus hábitos alimenticios generalistas oportunistas le permiten adaptarse a diferentes entornos, siendo entonces una especie ecológicamente flexible (Kasparian et al., 2004). Por tal motivo estos factores se pueden considerar como facilitadores para la conectividad genética de la población (Chemisquy et al., 2021). Los resultados de este estudio dan cuenta de una alta capacidad de dispersión de *D. marsupialis* en los ambientes urbanos de AMVA.

Si bien la historia de vida de la especie tiene una gran influencia en los resultados encontrados, es importante destacar el papel que tienen los rescates y liberaciones que se realizan por parte de autoridades ambientales, pues según los datos históricos de liberación de zarigüeyas dentro del territorio del AMVA, se registran liberaciones desde el año 2020 en zonas periurbanas y rurales en nueve de los diez municipios que componen el Área. Tales eventos también pueden actuar como facilitadores para el flujo de genes, ya que dichas traslocaciones podrían facilitar la dispersión de la especie por encima de las capacidades propias, llevando a superar posibles barreras a la dispersión, ahorrando distancias de recorrido y eliminando las barreras urbanas. Esto podría afectar la aptitud de la población negativa o positivamente. En el primer caso el flujo de genes entre poblaciones localmente adaptadas puede conducir a que alelos genéticamente incompatibles se recombinen en el mismo genoma o a una depresión por exogamia (Crispo et al, 2011). En el segundo caso, el flujo de genes permite el intercambio de mutaciones beneficiosas entre los grupos de genes que pueden rescatar a pequeñas poblaciones aumentando su diversidad genética previniendo la extinción al incrementar la variación genética (Holt & Gomulkiewicz, 1997). Sin

embargo, estos efectos positivos son de esperar cuando el flujo de genes entre poblaciones es moderado, por lo cual resulta importante hacer un seguimiento adecuado los individuos que son liberados, considerando sus puntos georreferenciados de rescate y así mismo los de liberación.

Aun cuando el ADN mitocondrial se hereda de la madre y su patrón difiere del patrón biparental de los microsatélites, la falta de una estructura genética indica que no existen diferencias entre sexos en patrones de dispersión (Ballard & Whitlock 2004). Cytb es ampliamente utilizado para análisis filogeográficos y permite inferir historias evolutivas además de reconocer barreras geográficas, pero a nivel intraespecífico puede ser engañoso, pues para mamíferos se ha encontrado que este marcador posee poca variación (Kartavtsev & Lee, 2006). Se sugiere entonces en futuros estudios el uso de un marcador mitocondrial presuntamente más polimórfico como lo es el D-loop.

A pesar de que las zarigüeyas son especies generalistas con un alto rango geográfico y cierta resistencia a la perturbación (Kasparian et al., 2004), se esperaba que la población analizada presentara cierto grado de estructura genética, debido a las barreras físicas que pueden generar los efectos de la urbanización, pero se encontraron altos niveles de diversidad genética, ya que las estimaciones promedio de $H_e = 0.85$. Esto comparado con lo reportado en otros estudios, en donde se han informado niveles de diversidad para una población silvestre de *D. marsupialis* en La Guyana Francesa, con estimaciones promedio de $H_e = 0.93$ (Lavergne et al., 1999), y niveles moderados para una población de Chiapas, México, con $H_e = 0.57$ (Cruz & Ruiz, 2020). Se encontró también que el H_o fue menor que el H_e en todos los loci, con desviaciones de HWE en siete de los nueve loci analizados, lo cual indica una deficiencia de heterocigotos. Este déficit podría deberse a diversos factores como alelos nulos, presión de selección sobre los loci *Dm1-Dm3*, *Dm3-Dm5*, *Dm5-Dm9* que están ligados (Van Oosterhout et al., 2006) o la facilitación de la dispersión mediante las liberaciones realizadas.

En conclusión nuestros resultados sugieren que los procesos de urbanización no tienen un efecto de aislamiento geográfico sobre *D. marsupialis*, así que para comprender mejor los procesos evolutivos de este mamífero, es importante abordar en futuros estudios otras cuestiones como la identificación de las características del paisaje que han permitido la subsistencia de la especie, las

rutas que están permitiendo que haya flujo genético y los procesos ecológicos que podrían estar manteniendo la diversidad genética y les está permitiendo responder a cambios ambientales producto de la actividad humana. Los datos genéticos de este estudio son los primeros en reportar la diversidad y estructura genética espacial para *D. marsupialis* en Colombia, utilizando marcadores moleculares, además su integración con otros estudios proporcionará una comprensión más profunda de la especie.

Agradecimientos

A mi familia por apoyarme en estos años de carrera, principalmente a mi Madre quien fue el pilar para mantenerme en el pregrado. A mis amigos que se convirtieron en familia. Al Laboratorio de Genética Animal y a todos sus integrantes por estar dispuestos siempre a brindarme su conocimiento, especialmente Omer quien me acompañó en cada paso y me enseñó pacientemente sus trucos moleculares. A mis asesores Iván Darío Soto y Juliana Herrera por su acompañamiento, tiempo y dedicación. Al Área Metropolitana del Valle de Aburrá (AMVA), por el apoyo económico otorgado para la realización de mi tesis de pregrado.

Referencias

- 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.
- Astúa, D., Lew, D., Costa, L.P. & Pérez-Hernandez, R. (2021). *Didelphis marsupialis* (amended version of 2016 assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species 2021*: e.T40501A197310576. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T40501A197310576.en>. Acceso el 17 de febrero de 2022.
- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4), 729-744.
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., & Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software

platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 15(4), e1006650.

Chemisquy, M. A., Morínigo, F. M., Fameli, A., & González-Ittig, R. E. (2021). Genetic diversity of the white-eared opossum *Didelphis albiventris* (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE) in Argentina. *Mastozoología Neotropical*, 28(1).

Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic acids research*, 44(D1), D67-D72.

Crispo, E., Moore, J. S., Lee-Yaw, J. A., Gray, S. M., & Haller, B. C. (2011). Broken barriers: Human-induced changes to gene flow and introgression in animals: An examination of the ways in which humans increase genetic exchange among populations and species and the consequences for biodiversity. *BioEssays*, 33(7), 508-518.

Cruz-Salazar, B., & Ruiz-Montoya, L. (2020). Population genetics of the common opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphimorphia: Didelphidae), in southeastern Mexico. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 1-9.

Cruz-Salazar, B., Ruiz-Montoya, L., Navarrete-Gutiérrez, D., Espinoza-Medinilla, E. E., Vázquez-Domínguez, E., & Bernardo Vázquez, L. (2014). Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(1):251–261.

Delgado, V. C. (2007). Muerte de mamíferos por vehículos en la vía del Escobero, Envigado (Antioquia), Colombia. *Actual Biol*, 29(87), 229-233. <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/actbio/article/view/329342/20785822>

Dias, I. M., Amato, G., Cunha, H. M., DeSalle, R., Paglia, A. P., Peterson, J. K., & Fonseca, C. G. (2009). Isolation, characterization, and cross-species amplification of new

- microsatellite markers for three opossum species of the Didelphidae family. *Conservation Genetics Resources*, 1(1), 405-410.
- Driscoll, D. A., Banks, S. C., Barton, P. S., Lindenmayer, D. B., & Smith, A. L. (2013). Conceptual domain of the matrix in fragmented landscapes. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(10), 605-613. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.06.010>
- Excoffier, L., & Lischer, H.E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Fike, J. A., Beasley, J. C., & Rhodes, O. E. (2009). Isolation of 21 polymorphic microsatellite markers for the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Molecular ecology resources*, 9(4), 1200-1202.
- Fu, Y. X. (1996). New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics*, 143(1), 557-570.
- Gardner, A. L. (1970). The Systematics of the Genus *Didelphis* (Marsupialia:Didelphidae) in North and Middle America, 1-81.
- Herrera, J. M. (2011). El papel de la matriz en el mantenimiento de la biodiversidad en hábitats fragmentados. De la teoría ecológica al desarrollo de estrategias de conservación. Redalyc.org. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54022121003>.
- Holderegger, R., & Di Giulio, M. (2010). The genetic effects of roads: A review of empirical evidence. *Basic and Applied Ecology*, 11(6), 522– 531. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2010.06.006>
- Holt, R. D., & Gomulkiewicz, R. (1997). How does immigration influence local adaptation? A reexamination of a familiar paradigm. *The American Naturalist*, 149(3), 563-572.
- Huxel, G. R., & Hastings, A. (1999). Habitat loss, fragmentation, and restoration. *Restoration ecology*, 7(3), p. 309-315.

- Ives, C. D., Lentini, P. E., Threlfall, C. G., Ikin, K., Shanahan, D. F., Garrard, G. E., Bekessy, S. A., Fuller, R. A., Mumaw, L., Rayner, L., Rowe, R., Valentine, L. E., & Kendal, D. (2016). Cities are hotspots for threatened species. *Global Ecology and Biogeography*, 25(1):117–126.
- Jombart, T., Devillard, S., Dufour, A. B., & Pontier, D. (2008). Revealing cryptic spatial patterns in genetic variability by a new multivariate method. *Heredity*, 101(1), 92–103. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.34>
- Jombart, Thibaut. (2015). A tutorial for the spatial Analysis of Principal Components (sPCA) using adegenet 2.0.0. MRC Centre for Outbreak Analysis and Modelling, 1–50
- Kalinowaki, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5), 1099–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- Kartavtsev, Y. P., & Lee, J. S. (2006). Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome b and cytochrome oxidase 1 genes at the population, species, and genus levels. *Russian Journal of Genetics*, 42(4), 341-362.
- Kasparian, M. A., E C. Hellgreen, S. M. Ginger, L. P. Lavesque, J. E. Clark y D. L. Winkerman. 2004. Population characteristics of Virginia opossum in the cross timbers during raccoon reduction. *American Midland Naturalist* 151:154-163.
- Lambert, T. D., Malcolm, J. R., & Zimmerman, B. L. (2005). Variation in small mammal species richness by trap height and trap type in southeastern Amazonia. *Journal of Mammalogy*, 86(5), 982-990.
- Lavergne, A., Douady, C., & Catzefflis, F. M. (1999). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae). *Molecular ecology*, 8(3), 517-518.

- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Longmire, J. L., Maltbie, M., & Baker, R. J. (1997). Use of "lysis buffer" in DNA isolation and its implication for museum collections. *Occasional papers, The Museum of Texas Tech University*, 163, 1-3.
- Miles, L. S., Rivkin, L. R., Johnson, M. T., Munshi-South, J., & Verrelli, B. C. (2019). Gene flow and genetic drift in urban environments. *Molecular ecology*, 28(18), 4138- 4151. <https://doi.org/10.1111/mec.15221>
- Montano, V., & Jombart, T. (2017). An Eigenvalue test for spatial principal component analysis. *BMC bioinformatics*, 18(1), 1-7.
- Munshi-South, J., Zak, Y., & Pehek, E. (2013). Conservation genetics of extremely isolated urban populations of the northern dusky salamander (*Desmognathus fuscus*) in New York City. *PeerJ*, 1:e64
- Neteler, M. Y Mitasova, H. Open source gis: A grass gis approach, 2008.
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.
- QIAGEN. (2020) DNA easy Blood and Tissue kit [En línea] Disponible en: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=68f29296-5a9f-40fa-8b3d-1c148d0b3030&lang=en>
- Ramírez, G. F., & Osorio, J. H. (2014). Identificación de helmintos en zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) en el Suroccidente Colombiano. *Biosalud*, 13(1), 37-44.
- Ringier, H.J. (1961). Review of Oligocene *Didelphis marsupialis* *Journal of Paleontology*,

- Ruell, E., Riley, S., Douglas, M., Antolin, M., Pollinger, J., Tracey, J., Lyren, L., Boydston, E., Fisher, R., & Crooks, K. (2013). Urban Habitat Fragmentation and Genetic Population Structure of Bobcats in Coastal Southern California. *The American Midland Naturalist*, 168(2):265–280
- Saldaña, I., Cadavid, A., & Gómez, D. (2019). Abundancia relativa y patrones de actividad de *Didelphis marsupialis* en un área periurbana de Medellín, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 24(3), 7366-7371
- Sánchez-Londoño, J. D., Marín-C, D., Botero-Canola, S., & Solari, S. (2014). Imama. Mamíferos silvestres del Valle de Aburrá. Área Metropolitana del Valle de Aburrá, Corantioquia, Universidad de Antioquia. Medellín.
- Sunquist, M., S. Austad, F. Sunquist. 1987. Movement patterns and home range in the common opossum (*Didelphis marsupialis*). *Journal of Mammalogy*, 68:1: 173-176.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Templeton, A. R., Shaw, K., Routman, E., & Davis, S. K. (1990). The genetic consequences of habitat fragmentation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 13-27.
- Tyndale-Biscoe, C. H., & Mackenzie, R. B. (1976). Reproduction in *Didelphis marsupialis* and *D. albiventris* in Colombia. *Journal of Mammalogy*, 57(2), 249-265.
- Van Oosterhout, C., Weetman, D., & Hutchinson, W. F. (2006). Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 255-256.
- Vivas, C., Flórez, F., & Castrillón, J. (2016). Pautas para el manejo de crías de zarigüeya en estado de indefensión. Medellín: Secretaría de Medio Ambiente de Medellín.

White, G. M., Boshier, D. H., & Powell, W. (1999). Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis*. *Molecular Ecology*,8(11),1899-1909. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00790.x>

Leyenda de figuras y tablas

Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo de zarigüeyas en el Área Metropolitana del Valle de Aburrá. Los puntos amarillos representan los sitios de liberación y los puntos rojos los individuos muestreados.

Figura 2. Red de haplotipos mitocondriales del gen Citocromo B de *Didelphis marsupialis* en El AMVA.

Figura 3. Reconstrucción filogenética bayesiana de *Didelphis marsupialis* con el gen Citocromo B. Los números sobre las ramas corresponden a la probabilidad posterior. El color rojo representa bajos valores (0) de probabilidad posterior y verde valores altos (1).

Figura 4. Resultados del análisis de componentes principales espaciales (sPCA) basado en 9 loci de microsatélites. Los diagramas de valores propios (a) y el *screepplot* (b) indican que los dos primeros ejes son los más importantes para explicar la variación genética. El *screepplot* traza la relación entre la varianza explicada por cada eje y la autocorrelación espacial dentro de cada eje.

Figura 5. Puntuación sPCA 1 trazada en coordenadas espaciales que representa la estructura genética espacial de los individuos de zarigüeyas en el AMVA. Los puntos amarillos representan los sitios de liberación y los cuadrados representan la puntuación de genotipo de cada individuo, donde los cuadrados blancos tienen valores positivos y los negros los valores negativos. El tamaño de los cuadrados corresponde a la magnitud de la varianza.

Figura 6. Distribución de los valores de Heterocigosidades observadas (H_o) en el AMVA. Los puntos amarillos oscuros representan los sitios de liberación y en color verde se indican sus valores más bajos, en amarillo sus valores medios y en rojo sus valores más altos.

Tabla 1. Número de muestras colectadas y extraídas

Tabla 2. Cebadores de nueve microsatélites con sus respectivas condiciones finales

Tabla 3. Diversidad genética en *Didelphis marsupialis*.