

	UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA GESTIÓN DE BIBLIOTECAS	CARTA DE AUTORIZACIÓN	 <small>SC 7384-1</small>  <small>SA/CERPE 98726</small>  <small>OS CER 98755</small>	
CÓDIGO	AP-BIB-FO-06	VERSIÓN	1	VIGENCIA
2014		PÁGINA	1 de 2	

Neiva, 16 de octubre del 2024

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Neiva

El suscrito:

Karen Natalia Vargas Garzon, con C.C. No. 1004082132, autor de la tesis y/o trabajo de grado titulado Sexaje molecular de las especies de Oso Hormiguero *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia presentado y aprobado en el año 2024 como requisito para optar al título de Biólogo; Autorizo al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permite la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
GESTIÓN DE BIBLIOTECAS

CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO	AP-BIB-FO-06	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 2
--------	--------------	---------	---	----------	------	--------	--------

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE: Karen Natalia Vargas Garzon

Firma:



SC 7384-I SA-CERPE 95726 OS-CER 95755





DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 4

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Sexaje molecular de las especies de Oso Hormiguero *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia

AUTOR:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Vargas Garzon	Karen Natalia

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Barragan Ruiz	Carmen Elena
Rodriguez Castro	Karen Guiselle

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Biólogo

FACULTAD: Ciencias Exactas y naturales

PROGRAMA O POSGRADO: Biología aplicada

CIUDAD: Neiva
PÁGINAS: 122

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2024

NÚMERO DE

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas Fotografías Grabaciones en discos Ilustraciones en general
Grabados Láminas Litografías Mapas Música impresa Planos
Retratos Sin ilustraciones Tablas o Cuadros



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 4

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (*En caso de ser LAUREADAS o Meritoria*):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Dimorfismo sexual	Sexual dimorphism	7. SRY	SRY
2. Xenarthra	Xenarthra	8. ZF	ZF
3. Atropellamiento	Roadkill		
4. Orinoquia	Orinoquia		
5. Puntos calientes	Hotspots		

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

Myrmecophaga tridactyla y *Tamandua tetradactyla* son especies amenazadas por el atropellamiento vial. Esta visible presión, sumada a características como bajas tasas reproductivas, dietas especializadas y largos períodos de cuidado parental incrementan la vulnerabilidad de estos organismos. Adicionalmente, la ausencia de dimorfismo sexual dificulta el establecimiento de las tasas de atropellamiento por género. Así, identificamos el sexo de individuos atropellados a partir del uso de herramientas moleculares para analizar la tasa de mortalidad y las coberturas del paisaje asociadas al atropellamiento. Se colectaron 57 muestras biológicas (28 de *M. tridactyla* y 29 de *T. tetradactyla*) registradas en la ruta nacional 65. El sexaje molecular se realizó amplificando el gen SRY del cromosoma Y y los genes Zinc finger. El análisis de los atropellamientos se realizó por medio de SIRIEMA v. 2.0. Se utilizó una prueba de χ^2 -cuadrado para establecer la significancia estadística entre las proporciones sexuales encontradas y las esperadas para estas especies. El análisis de las coberturas del paisaje se desarrolló con el software QGIS v. 3.3.2. En *M. tridactyla* se identificaron 14 machos y 6 hembras y *T. tetradactyla* 9



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

3 de 4



machos y 17 hembras. Se encontró que la proporción sexual de individuos atropellados de *M. tridactyla* no fue significativamente diferente mientras en *T. tetradactyla* se encontró significancia para las proporciones 2:1 y 3:1. Se identificaron 8 puntos calientes de atropellamiento en toda la carretera. La cobertura predominante fue Pastos. Resaltamos la importancia de este primer análisis de proporciones sexuales asociadas al atropellamiento en Colombia para establecer acciones de conservación.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Myrmecophaga tridactyla and *Tamandua tetradactyla* are species vulnerable for roadkill. This visible effect, added to species characteristics such as low reproductive rates, specialized diet and long parental care periods increases the vulnerability of these organisms. In addition, the lack of sexual dimorphism in the order Xenarthra makes it difficult to establish roadkill rates by gender. We identify the sex of roadkill individuals using molecular tools to analyze the mortality rate and the landscape coverage associated with road mortality. Consequently collected from this investigation 57 samples (28 of *M. tridactyla* and 29 of *T. tetradactyla*) that were recorded on national route 65. Sex identification was made using nuclear fragments of SRY gene and Zinc finger gene. The analysis of roadkill were determined with SIRIEMA v 2.0 software. Also, a χ^2 -square test was used to establish the sexual proportions in the study sample. The analysis of the landscape coverage associated with road accidents was developed using the QGIS v 3.3.2 Lima software. This way, for *M. tridactyla* were identified 14 males and 6 females and for *T. tetradactyla* 9 males and 17 females. As a result, it was found that the sexual proportion of roadkill individuals of *M. tridactyla* was not significantly different, while in *T. tetradactyla*, significance was found for proportions 2:1 and 3:1. In addition, 8 hotspots were identified. The principal landscape coverage was grass. Thus, we highlight the importance of this first analysis of sexual proportions associated roadkills in Colombia to establish conservation actions.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Edgar Andres Bernal Castro

Firma:

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
GESTIÓN DE BIBLIOTECAS

DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO



CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

4 de 4

Nombre Jurado: Mauricio Carrillo Avila

Firma:

Mauricio Carrillo A.

Nombre Jurado: Diana Marcela Polania Caviedes

Firma:

Diana M. Polania C.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

- 1 Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-



Sexaje molecular de las especies de Oso Hormiguero *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia

Karen Natalia Vargas Garzon

Universidad Surcolombiana
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Programa de Biología Aplicada
Neiva, Colombia
2024

- 2** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia

Karen Natalia Vargas Garzon

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al
título de:
Biólogo

Directora: PhD. Carmen Elena Barragán Ruiz

Codirectora: PhD. Karen Giselle Rodríguez Castro

Línea de investigación: Ecología de carreteras y biología molecular

Grupo de Investigación: Ecología Molecular y Sociedad

Universidad Surcolombiana
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Programa de Biología Aplicada
Neiva, Colombia
2024

- 3** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Dedicatoria

Para mi papá

- 4** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 014 de 2018 del Consejo Académico de la Universidad Surcolombiana «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Karen Natalia Vargas Garzon

Fecha 20/04/2024

Agradecimientos

Más allá de un documento académico, este trabajo es el testimonio de las transformaciones y experiencias que he vivido a lo largo de tres años. Así, este no solo es el fruto de mi esfuerzo individual, sino también el resultado del respaldo absoluto de las personas que me rodean, las cuales me brindaron un consejo, comentarios o su apoyo incondicional, por eso, hay mucho que agradecer.

Agradezco profundamente a mi familia, pues, sin su amor, las adversidades serían aún más difíciles de sobrellevar. A mi querido papá, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por cada pequeño grano de sabiduría que compartió conmigo a lo largo de su vida, soy el reflejo de sus enseñanzas y aunque ya no esté conmigo, el recuerdo de su alegría y orgullo, son mi recompensa. A mi mamá mi eterno refugio en los momentos de dificultad. A mis hermanos por siempre cuidarme. A mis sobrinos, cuya curiosidad llenaba de luz las horas que pasaba en el computador.

A mis estimadas directoras, Carmen Barragán Ruiz y Karen Rodríguez Castro, les debo un profundo agradecimiento por su dedicación, respaldo, compromiso y orientación. Me siento honrada de haber tenido la oportunidad de aprender a su lado. Este logro no habría sido posible sin su incansable entrega y confianza en cada una de las etapas de este proyecto. Son el ejemplo vivo de las profesionales que admiro y aspiraré a ser.

A mi casa de estudios, la universidad Surcolombiana, por todas las experiencias que moldearon mi carácter. A Juanita Rodríguez, Diego Tello, Merly Ospina, Jhon Fredy Morales y Karina Pardo, mis amigos y compañeros de equipo, gracias por ser

el sostén que necesitaba cuando todo parecía desmoronarse. A todos mis otros compañeros de cohorte, cada conversación enriqueció enormemente mis experiencias.

A la Universidad de los Llanos, por abrirme sus puertas y recibirme como parte de su comunidad. A Brayhan Ramos y Helena Agudelo, por su dedicación y enseñanzas impregnadas de amor, empatía y respeto. A cada una de las personas que tuve el privilegio de conocer durante mi estadía, les doy las gracias por su cálida acogida.

A Yulieth Losada por brindarme su compañía mientras estuve en Villavicencio. Gracias por ser parte de mi experiencia y hacerla más memorable.

A la fundación Cunaguard representada por Cesar Rojano, mi gratitud por su apoyo y respaldo a este proyecto. Gracias por brindarme la oportunidad de explorar la belleza incomparable de los Llanos orientales de Colombia. Su compromiso y labor con la preservación de los recursos naturales de nuestro país, es un trabajo admirable y de destacar.

Ecología de carreteras de osos hormigueros en Colombia: Una visión molecular

Resumen

El atropellamiento de fauna es una de las principales causas antropogénicas de pérdida de biodiversidad en el mundo. El oso palmero (*Myrmecophaga tridactyla*) y el oso melero (*Tamandua tetradactyla*) endémicos de centro y Suramérica son especies amenazadas por este factor. En Colombia, el atropellamiento de estos especímenes ha sido registrado principalmente en la región de la Orinoquia. Esta visible presión, sumada a características de las especies como bajas tasas reproductivas, dietas especializadas, bajas densidades poblacionales y largos períodos de cuidado parental incrementan la vulnerabilidad de estos organismos. Adicionalmente, la ausencia de dimorfismo sexual presente en la orden Xenarthra dificulta el establecimiento de las tasas de atropellamiento por género. Así, pensando en lo anterior, nuestro objetivo fue identificar el sexo de individuos atropellados a partir del uso de herramientas moleculares para analizar la tasa de mortalidad y las variables asociadas al atropellamiento. De esta manera, la fundación Cunaguard colectó y donó a esta investigación 57 muestras biológicas de tejidos, pelo y sangre (28 de *M. tridactyla* y 29 de *T. tetradactyla*) registradas en la ruta nacional 65 que comunica a los departamentos de Casanare y Meta. La identificación del sexo se realizó utilizando fragmentos nucleares del gen SRY del cromosoma Y y el gen Zinc finger homólogo en los cromosomas Y y X. La determinación de la tasa de mortalidad, los hotspots y el análisis de su distribución se realizó por medio de las pruebas 2D-Ripley K, 2D-Hotspot y el modelo Mortality Rate Estimate del paquete estadístico del software SIRIEMA v. 2.0. Igualmente, se utilizó una prueba de χ^2 -cuadrado a través del programa R para establecer la

significancia estadística entre las proporciones sexuales encontradas y las esperadas para estas especies. Por otra parte, el análisis de las coberturas del paisaje asociadas a los atropellamientos se desarrolló utilizando el software QGIS v. 3.3.2. Lima y el programa *Google Earth*. De esta manera, para la especie *M. tridactyla* se identificaron 14 machos y 6 hembras y en *T. tetradactyla* 9 machos y 17 hembras muertos por atropellamiento. Partiendo de lo anterior, se encontró que la proporción sexual de individuos atropellados de *M. tridactyla* no fue significativamente diferente de lo esperado mientras en *T. tetradactyla* se encontró significancia para las proporciones esperadas 2:1 y 3:1. Por otro lado, se identificaron 8 puntos calientes de atropellamiento en toda la carretera. Así, resaltamos la importancia de este primer análisis de proporciones sexuales asociadas a los atropellamientos de osos hormigueros en Colombia para establecer acciones de conservación enfocadas no solo en las especies, sino también en las características por sexo.

Palabras clave: *Dimorfismo sexual, atropellamiento, hotspots, SRY, ZF, Xenarthra, Orinoquia*

- 9** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Road Ecology of Colombian's anteaters: A molecular ecology vision

Abstract

Road mortality is one of the principal human causes of biodiversity loss in the world. The Giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) and the lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*) endemic to Central and South America are species vulnerable to extinction for this factor. This visible effect, added to species characteristics such as low reproductive rates, specialized diet, low population density and long parental care periods increases the vulnerability of these organisms. In addition, the lack of sexual dimorphism in the order Xenarthra makes it difficult to establish roadkill rates by gender. In Colombia, road-mortality studies with specimens of myrmecophagidae are made principally in Orinoquia. Our aim is to identify the sex of roadkill individuals using molecular tools to analyze the mortality rate and the variables associated with road mortality. Consequently, *Fundación Cunaguaro* collected and donated from this investigation 57 tissue, hair and blood samples (28 of *M. tridactyla* and 29 of *T. tetradactyla*) that were recorded on national route 65 that connects Casanare and Meta. Sex identification was made using nuclear fragments of SRY gene and Zinc finger gene homologous on the Y and X chromosomes. Running-over rates, hotspots and the distribution of events were determined with the 2D-Ripley K, 2D-Hotspot tests and the Mortality Rate Estimate model of the statistical package of the SIRIEMA v 2.0 software. Also, a χ^2 -square test was used in the R program to establish the sexual proportions in the study sample. Moreover, the analysis of the landscape coverage associated with road accidents was developed using the QGIS v 3.3.2 Lima software and the Google Earth program. This way, for *M. tridactyla* were identified 14 males and 6 females and for *T. tetradactyla* 9 males and 17 females.

- 10** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

As a result, it was found that the sexual proportion of roadkill individuals of *M. tridactyla* was not significantly different from what was expected, while in *T. tetradactyla*, significance was found for the expected proportions 2:1 and 3:1. In addition, 8 hotspots were identified. Thus, we highlight the importance of this first analysis of sexual proportions associated with anteaters roadkills in Colombia to establish conservation actions focused not only on the species, but also on characteristics by sex.

Keywords: Sexual dimorphism, roadkill, Hotspot, Molecular sexing, Orinoquia

- 11** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Contenido

	Pág.
Resumen	7
Lista de figuras	13
Lista de tablas	15
Listado de abreviaturas	16
INTRODUCCIÓN	17
1. Planteamiento de la investigación	21
Pregunta de investigación	23
2. Justificación	24
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. Marco teórico	27
4.1 Biodiversidad colombiana	27
4.1.1 Biodiversidad de la región de la Orinoquia	28
4.1.2 Amenazas de la biodiversidad colombiana	29
4.2 Superorden Xenarthra	37
4.2.1 Orden pilosa	37
4.2.2 Dimorfismo sexual	41
4.2.3 Ecología molecular	41
4.2.4 Genética molecular en Xenarthras	42
4.3 Ecología de paisaje	46
4.4 Biología molecular para la conservación	47
4.4.1 Conservación y ecología de carreteras	49
4.4.2 Estado de conservación del orden Xenarthra	49
5. Antecedentes	51

- 12** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

5.1 Ecología de carreteras	51
5.1.1 Estado de Ecología de carreteras en Colombia	51
5.2 Identificación molecular del sexo en mamíferos	54
5.2.1 Identificación molecular del sexo en especímenes colombianos	56
6. Métodos	58
6.1 Declaración de Ética	58
6.2 Área de estudio	58
6.3 Colecta de muestras	59
6.4 Identificación sexual en campo	60
6.5 Procedimientos de laboratorio	61
6.5.1 Extracción del ADN total	61
6.5.2 Marcadores sexuales para la identificación sexual	63
6.6 Cobertura de paisaje	64
6.7 Análisis de datos	66
6.7.1 Atropellamientos	66
6.7.2 Análisis de proporciones sexuales de los atropellamientos	67
6.7.3 Cobertura de paisaje	67
7. Resultados	69
7.1 Datos de atropellamiento e identificación molecular del sexo	69
7.1.1 Extracción e integridad de ADN genómico	69
7.1.2 Identificación molecular del sexo	70
7.2 Puntos calientes y coberturas asociadas a los atropellamientos	72
8. Discusión	78
9. Conclusión	82
10. Implicaciones para la conservación	84
11. Bibliografía	87

- 13** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Individuo adulto de la especie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> avistado en la sabana inundable del departamento del Casanare	39
Figura 2. Individuo adulto de la especie <i>Tamandua tetradactyla</i>	41
Figura 3. Individuo adulto de la especie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> , de sexo desconocido atropellado en la carretera nacional 65, sentido Meta-Casanare	59
Figura 4. Toma de muestras biológicas de un individuo de la especie <i>Myrmecophaga tridactyla</i> atropellado en la carretera 65 que conecta Meta-Casanare.	60
Figura 5. Extracción de ADN de muestras de tejido y pelo. A. Fotografía mostrando la extracción de tejido por el protocolo Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (Sambrook 1989); B. Fotografía siguiendo el protocolo de extracción para pelo del kit Qiagen.	62
Figura 6. Cuantificación de ADN a través de espectrofotometría, utilizando el equipo Nanodrop 2000.	63
Figura 7. Modelo matemático para el cálculo de la tasa de atropellamiento	66
Figura 8. Integridad del ADN evaluada en gel de agarosa al 2% para las especies <i>Myrmecophaga tridactyla</i> y <i>Tamandua tetradactyla</i> con tres tipos de muestras: Tejido, Sangre y Pelo.	70

- 14** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Figura 9. Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de PCR amplificados para los genes en las especies de oso palmero (*Myrmecophaga tridactyla* - M) y oso melero (*Tamandua tetradactyla* - T). Machos exemplificados con dos bandas, hembras con una banda superior. Carril 1: Marcador de peso molecular (Ladder)

71

Figura 10. Gráfica producto del análisis de la prueba K Ripley para la carretera nacional 65. A. Análisis correspondiente a la especie *Myrmecophaga tridactyla*; B. Análisis para la especie *Tamandua tetradactyla*. En negro se observa los límites de confianza superior e inferior y en azul el valor de la función L(r). Se considera que la significancia existe cuando la función L(r) excede los límites de confianza.

73

Figura 11. Hotspots de atropellamiento a lo largo de la carretera 65. El color gris representa a la especie *Myrmecophaga tridactyla* y el rojo a *Tamandua tetradactyla*.

74

Figura 12. Mapa mostrando las coberturas y uso de suelo según Corine Land cover en una escala de proyección de 1:100.000, utilizando imágenes rásteres de píxeles de 30m x 30m. En la figura se muestran los hotspots en carretera que atraviesa a los departamentos de Meta, Cundinamarca y Casanare

75

- 15** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Total de muestras biológicas colectadas para cada especie, con sus respectivas asignaciones de sexo. Se muestra el porcentaje de falla (%) al que no fue posible asignar molecularmente el sexo.....	71
Tabla 2. Resultados del test Chi cuadrado (χ^2) para la mortalidad de <i>Myrmecophaga tridactyla</i> y <i>Tamandua tetradactyla</i> acorde a tres proporciones esperadas. Las proporciones indican una relación macho:hembra. Los valores significativos se señalan en negrita ($p \leq 0.05$)	72
Tabla 3. Porcentaje calculado para los diferentes usos de suelo considerando los buffers de 50 km, 20 km y 5 km.....	76
Tabla 4. Porcentaje calculado para los diferentes usos de suelo alrededor de los hotspots de las especies <i>Tamandua tetradactyla</i> y <i>Myrmecophaga tridactyla</i>	77

- 16** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Listado de abreviaturas

µl: Microlitro

µM: Micromol

ADN: Ácido desoxirribonucleico

IUCN: Unión internacional para la conservación de la naturaleza

Km: Kilómetro

ng: nanogramo

NGS: Secuenciación de Nueva Generación

P: Pelo

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SC: Sangre seca

SRY: Factor de la región de determinación sexual del cromosoma Y

T: Tejido

Zf: Gen del dedo de zinc

INTRODUCCIÓN

Las carreteras, históricamente, han simbolizado un factor importante de desarrollo para las sociedades ya que facilitan el crecimiento económico y social de las naciones (Colorado-Jiménez et al., 2015; Caspa, 2022). Sin embargo, su desarrollo, construcción y uso, afecta los componentes bióticos y abióticos (García-López y García-Peluffo, 2022) de los ecosistemas. De esta manera, estas infraestructuras alteran el microclima, la dinámica hidrológica, contaminan el entorno y limitan el movimiento de las especies causando pérdida de la conectividad entre las poblaciones y fragmentación de sus hábitats (Sánchez et al., 2013). Así, una de las principales representaciones del impacto negativo de las carreteras es el atropellamiento de los individuos que habitan las zonas aledañas de estas estructuras (Arroyave et al., 2006; Sánchez et al., 2013).

El atropellamiento ha sido la principal causa de la mortalidad sobre los vertebrados silvestres (Schwartz et al., 2020; Rodríguez et al., 2023). Siendo que, en el caso particular de los mamíferos, en los últimos años, las colisiones han aumentado pronunciadamente en respuesta de una huella humana que cada vez es mayor y prominente (Moore et al., 2023); así, se ha reportado, que en países como Brasil el número de mamíferos atropellados alcanza los 2,2 millones de individuos al año, mientras que en el continente europeo se reporta anualmente 29 millones de individuos (Ascensão y Desbiez, 2022). Ahora bien, Colombia no es ajena a esta problemática, no obstante, los levantamientos de individuos atropellados y afectados por carreteras aún son limitados (Montenegro, 2018).

Para realizar los levantamientos de fauna atropellada, factores como la dieta, la morfología y la historia de vida de un organismo deben ser considerados

- 18** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

en la hora de entender la vulnerabilidad de las especies ante un atropellamiento (Medrano-Vizcano et al., 2022), siendo que, las tasas más altas de mortalidad debido al atropellamiento, son registradas principalmente en especies con hábitos nocturnos, reproducción rápida, masas corporales intermedias, dieta basada en invertebrados o carroña y movimientos lentos (Medrano-Vizcano et al., 2022). Estos aspectos sumados a mecanismos de dispersión, disponibilidad de recursos y hasta comportamientos intrínsecos, como el sesgo de género, afectan a las poblaciones silvestres pues, según Kuijper y Johnstone (2017) dependiendo de la especie es posible causar una futura pérdida en la diversidad genética de ciertas poblaciones.

Dentro de los vertebrados está el orden Xenarthra que agrupa a la familia Myrmecophagidae que contiene a las especies *Myrmecophaga tridactyla* (Linnaeus 1758) comúnmente llamada como oso hormiguero palmero y *Tamandua tetradactyla* (Linnaeus 1758) conocida como oso melero (Forlano et al., 2013; Rojano et al., 2015b). Estos dos tipos de osos hormigueros se caracterizan por presentar una baja tasa reproductiva (un único individuo por gestación) con periodos largos de cuidado parental (entre 4 y 5 años), movimientos lentos, dieta basada casi exclusivamente en hormigas y termitas (siendo algunas especies más consumidas) y, todavía, carecer de dimorfismo sexual (de Carvalho et al., 2021). Su distribución es limitada a América Central y América del Sur, ya que *M. tridactyla* se reporta desde las zonas neotropicales de Guatemala hasta Argentina, encontrándose en Colombia en las regiones de la Orinoquía, Amazonía, Caribe y ciertos departamentos de la región Pacífica y Andina (Alberico et al., 2000; Rodríguez-Mahecha et al., 2006; Humanez y Chacón, 2014; Rojano et al., 2015a), mientras que *T. tetradactyla* se distribuye únicamente en Sudamérica desde Venezuela hasta Argentina, siendo reportado para Colombia en las regiones de la Amazonía y la Orinoquía (Rojano et al., 2014; Alzate-Gaviria et al., 2016).

- 19** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Sin embargo, a pesar de que su distribución es relativamente amplia, estos mamíferos tienen pocos sobrevivientes en cada uno de sus géneros, siendo que para *Myrmecophaga*, *M. tridactyla* es la única especie viva (Gaudin et al., 2018), razón por la cual se le clasifica como vulnerable por la *Red list of Threatened Species* (IUCN) considerando además de este hecho, que en los últimos 10 años se ha perdido al menos el 30 % de su población (Figel et al., 2015; Fromme et al., 2023). Lo anterior, debido a la pérdida de hábitat, los incendios forestales, la caza furtiva, los procesos de domesticación, la comercialización de su carne, los conflictos con perros y las muertes por los atropellamientos (Miranda et al., 2015; Rojano et al., 2015b; Bertassoni y Ribeiro, 2019). En Colombia, tanto para *M. tridactyla* como *T. tetradactyla*, las colisiones, son consideradas como la mayor amenaza sobre estas especies, debido a que dentro de los registros de mortalidad por acción antrópica se reporta que al menos un individuo muere al día en diversas regiones del país (Holguín-Contreras, 2019; Schwartz, et al., 2020).

Bajo este panorama, es importante comprender e identificar el impacto que las mortalidades tienen sobre estas dos especies de osos hormigueros en el país. Sin embargo, existe un problema que limita aún más los estudios en estos organismos, el cual es la ausencia de dimorfismo sexual (Gaudin et al., 2018). En la mayoría de las especies del orden Xenarthra no es posible el uso de caracteres morfológicos secundarios para la identificación del sexo (Bento et al., 2019; Cots et al., 2019). Sumado a ello, en muchos casos los especímenes que son atropellados son encontrados en un estado de descomposición avanzada o, por lo contrario, sin algunos miembros corporales debido al impacto con el vehículo después de la colisión (Molbert et al., 2023). De este modo, una de las alternativas que surge para ayudar a la identificación sexual de los individuos en especies que sufren esta problemática, es el uso de las herramientas moleculares, que por años han sido de gran ayuda.

Las técnicas moleculares más avanzadas han proporcionado alternativas mediante las cuales es posible, a partir de tejidos como el pelo, la sangre o pedazos de músculos, extraer ADN y analizar secuencias de genes nucleares o mitocondriales (Vozdova et al., 2019; Ardicli, 2021). Así, por ejemplo, el gen SRY del cromosoma Y y, partes del gen *Zinc finger* localizado en los cromosomas Y y X (Barragán-Ruiz et al., 2021a) han permitido identificar satisfactoriamente el sexo de los individuos atropellados en la orden Xenarthra. De esta forma, este método específico ya fue descrito y testado para otras especies de mamíferos, siendo considerado un método eficaz, efectivo y rápido para la identificación del sexo (Rosel, 2003; Bento et al., 2019; Cots et al., 2019; Joshi et al., 2019).

Así y considerando lo anterior, este estudio busca analizar y entender las consecuencias del fenómeno del atropellamiento sobre las especies *M. tridactyla* y *T. tetradactyla* en Colombia, utilizando marcadores moleculares que permitan identificar el sexo de los individuos, así como entender las consecuencias de la perdida de estos en sus respectivas poblaciones.

- 21** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

1. Planteamiento de la investigación

Las carreteras han sido elementos vitales para el desarrollo humano (Healey et al., 2020; Barrientos et al., 2021; Oddone-Aquino y Nkomo, 2021; Ruiz-Ramirez et al., 2022). Sin embargo, estas infraestructuras generan de manera permanente efectos adversos sobre los ecosistemas (Oddone-Aquino y Nkomo, 2021; Rubio-Rocha et al., 2022). Así, uno de los impactos negativos que más afectan a los vertebrados son los atropellamientos que suelen causar la muerte de los individuos cuando cruzan las vías (Heigl et al., 2022; Rubio-Rocha et al., 2022).

En este sentido, Moore et al., (2023) mostró que durante los últimos años la tasa de atropellamiento en mamíferos ha aumentado, pues, comparado con los otros grupos faunísticos, los mamíferos terrestres son los más vulnerables a los efectos antrópicos, ya que la mayoría de ellos presenta una baja densidad poblacional y, además, requieren de extensas áreas para moverse entre grandes distancias (Serrón et al., 2020). Adicional a lo anterior, Carvajal (2013) describe qué características funcionales y comportamentales en los mamíferos, los hacen catalogarse muchas veces como “torpes” de “pobre visión” o con “movimientos lentos en tierra” generando que sean más susceptibles al atropellamiento.

De esta manera, y considerando las anteriores características, uno de los grupos que hoy ha sido catalogado como el más afectado por las colisiones son los Vermilingua (Rojano et al., 2023). Dentro de estos, especies como *M. tridactyla* y *T. tetradactyla* son foco de atención por varios grupos de investigadores en América Latina, ya que a lo largo de su distribución por Centro y/o Sudamérica están en riesgo de extinción debido a los efectos de la vía (Oliveira et al., 2020; Ascensão y Desbiez, 2022; Pinto et al., 2022; Vaschalde et al., 2023).

En Colombia, la región de la Orinoquia es una de las zonas que más ha reportado estas especies afectadas por las carreteras (Rojano y Ávila, 2021; García-López y García-Peluffo, 2022; Rojano et al., 2023). Siendo que, *T. tetradactyla* es una de las especies con mayor número de incidentes por colisiones, mientras que, *M. tridactyla* tiene una alerta de cuidado y diversos planes de conservación debido al riesgo que sus poblaciones presentan ante una inminente disminución de sus individuos (Rojano y Ávila, 2021; García-López y García-Peluffo, 2022) que en algunos años, podría llevar a sus poblaciones hasta una posible extirpación en la zona (Durán-Galindo, 2018; Rojano y Ávila, 2021; Rojano et al., 2023).

En adición, estas especies no presentan un dimorfismo sexual evidente, siendo que, machos y hembras sólo pueden distinguirse mediante una palpación minuciosa de sus genitales (Cots et al., 2019; Fromme et al., 2021), siendo este método más complicado, ya que hay evidencias que han encontrado órganos vestigiales en los individuos del orden (Fromme et al., 2023). En conclusión, según Castillo et al., (2015) ante un panorama como este, la verificación del sexo por inspección no es confiable y en muchos casos no es correcta debido al mal estado con el que quedan los cuerpos tras la colisión.

Considerando lo anterior, es posible pensar en los problemas que podría traer la caracterización de las poblaciones y especies, ya que la identificación del sexo de los individuos es crucial para análisis poblacionales como de viabilidad poblacional, siendo que no está siendo realizada de manera oportuna (Rossell et al., 2011; Gürkan et al., 2023). Así, integrar a los métodos tradicionales de identificación sexual las herramientas moleculares sería una opción para construir hipótesis eficientes que permitan generar información puntual sobre el panorama actual de estas especies en ciertas regiones de Colombia.

- 23** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Pregunta de investigación

¿Cómo las carreteras impactan la razón sexual de las especies *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* en la Orinoquia Colombiana?

2. Justificación

Las carreteras son estructuras de impacto para la vida silvestre ya que son un factor importante en la disminución del número efectivo poblacional de algunas especies (Torres et al., 2016). En Colombia, los estudios que dimensionan la problemática en torno a los efectos de las carreteras sobre la biodiversidad son limitados (Adárraga-Caballero y Gutiérrez-Moreno, 2019). Sin embargo, para la región de la Orinoquia Colombiana, región con exuberante biodiversidad, los estudios realizados (aunque bajos) han mostrado números poco alentadores para algunas especies (Durango-Galindo, 2018; Rojano y Ávila, 2021).

Dentro del complejo de carreteras que atraviesan la región de la Orinoquia, la carretera nacional 65 que comunica a los departamentos de Casanare, Cundinamarca y Meta se caracteriza por extenderse a lo largo del piedemonte llanero atravesando sistemas naturales como bosques, sabanas y humedales (ANI, 2015; Astwood et al., 2018). Así, para algunos tramos de la ruta ya se han reportado tasas de atropellamiento que se consideran altas debido a que comprenden cortos períodos de tiempo (Astwood et al., 2018; Durango-Galindo, 2018).

Para mamíferos, los levantamientos de fauna atropellada no han sido alentadores. Eso, debido al poco conocimiento de las estructuras poblacionales de las especies de la zona siendo que se dificulta la comprensión de la dinámica y estructura de las poblaciones, así como también limitan el entendimiento de su estado ecológico (Rossell et al., 2011; Gürkan et al., 2023). Para xenartros, especialmente osos hormigueros, estas informaciones son aún más escasas, siendo que actualmente son listados como los terceros mamíferos más vulnerables, antecedidos por perros de monte (*Cerdocyon thous*) y zarigüeyas (*Didelphis spp.*).

- 25** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Especies con ausencia de dimorfismo sexual, largos períodos de gestación, dieta limitada, y largas dispersiones, demuestran ser un desafío en este contexto, ya que, tras el atropellamiento, las características visibles morfológicas tienden a empeorar (tornándose en ocasiones irreconocibles con el tiempo) (Gürkan et al., 2023). De esa forma, pensar en alternativas que permitan el estudio de este tipo de especies, se tornan como la única opción viable y confiable para identificar el sexo de los individuos accidentados (Barragán-Ruiz et al., 2021a) e inclusive generar datos poblacionales que puedan ser utilizados en el desarrollo de planos de acción.

Teniendo en cuenta este contexto, es necesario que sean realizadas investigaciones de este tipo en las cuales la interdisciplinariedad se hace presente ya que permiten resolver problemáticas como la determinación sexual de estos organismos y generan información poblacional que ayuda a construir medidas de conservación entorno a especímenes catalogados en peligro o vulnerables (De Antonio et al., 2021; Gutiérrez, 2021).

- 26** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Identificar el impacto que tiene la carretera 65 que comunica los departamentos del Meta, Cundinamarca y Casanare sobre la razón sexual de las poblaciones de *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* en la Orinoquia Colombiana.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar molecularmente el sexo de *M. tridactyla* y *T. tetradactyla* de individuos atropellados considerando que son especies sin dimorfismo sexual;
- ✓ Identificar las coberturas del paisaje asociadas al atropellamiento de individuos de las especies *M. tridactyla* y *T. tetradactyla*;
- ✓ Establecer las zonas calientes (*hotspots*) de los atropellamientos de las especies *M. tridactyla* y *T. tetradactyla*;

4. Marco teórico

4.1 Biodiversidad colombiana

En la actualidad, Colombia es considerada como la segunda nación que más biodiversidad posee en el mundo ya que en tan solo 0,7% de la superficie que ocupa posee el 10 % de la biodiversidad total (González-Galli et al., 2022). En este sentido se posiciona como el primer país en riqueza de especies de aves, segundo en anfibios, peces de agua dulce y mariposas, tercero en reptiles, cuarto en plantas y quinto en mamíferos (Andrade, 2011; Agudelo y Cortes-Gómez, 2021; Ruiz-Agudelo et al., 2022).

Lo anterior es el resultado de su estratégica posición geográfica, su historia geológica y la variabilidad de sus condiciones climáticas, hidrológicas y geomorfológicas que generan una alta heterogeneidad de ecosistemas que ofrecen distintas condiciones a los organismos (García-García y Díaz-Timoté, 2022). Así, en Colombia se encuentran alrededor de 311 tipos de ecosistemas continentales y costeros representados principalmente por bosques, páramos, humedales, sabanas naturales, valles interandinos, desiertos, nieves, pastos, otros sistemas naturales con poca transformación y paisajes transformados para usos antropogénicos (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, 2016). Cabe destacar que esta biodiversidad se encuentra distribuida en cinco regiones naturales denominadas Pacífico, Caribe, Orinoquia, Amazonía y Andina (Rangel, 2015), sin embargo, son los Andes y la Orinoquia las dos regiones más biodiversas del país (Pardo y Rangel, 2014; Castillo-Figueroa et al., 2019; Guerra et al., 2019).

4.1.1 Biodiversidad de la región de la Orinoquia

La región de la Orinoquia representa territorialmente la cuarta parte del país ya que contiene aproximadamente 25 millones de hectáreas, las cuales, se distribuye en los departamentos de Casanare, Meta, Arauca y Vichada (Bastidas et al., 2023; Romero-Hernandez, 2023). Esta región tiene una ubicación geográfica estratégica que le permite contar con 156 ecosistemas naturales distribuidos entre sabanas inundables, altillanuras planas o disectadas, piedemonte, transiciones selváticas y cordillera (Ruden et al., 2020; Rozo-López et al., 2021, Romero-Hernandez, 2023). Es importante resaltar que 58 de estos sistemas naturales no hacen parte de las áreas protegidas del país siendo que, en la región, las Sabanas inundables son las más vulnerables (Rozo-López et al., 2021).

En cuanto a la biodiversidad, esta región contiene el 8 % de musgos, 8 % de líquenes, 16 % de plantas angiospermas, 17 % de helechos, 41 % de aves, 40 % de mamíferos, 24 % de reptiles, 44% de peces dulceacuícolas y el 10 % de anfibios del país (Rangel, 2015; Vargas-Serna et al., 2022).

En el caso particular de los mamíferos, la Orinoquia ha resaltado en términos de endemismos y como reservorio de poblaciones amenazadas (Trujillo et al., 2010; Botero et al., 2021). Esta mastofauna está constituida por organismos andinos, amazónicos y del Escudo Guayanés (Mosquera-Guerra et al., 2020), que se dispersaron en esta zona como resultado de procesos evolutivos y de movilidad durante eventos de glaciaciones e Inter-glaciaciones (Correa et al., 2005; Paez-Vasquez et al., 2020), por tanto, sus ecosistemas presentan una mezcla de fauna y flora proveniente de varios biomas adyacentes (Mora-Fernández et al. 2015). En este sentido, para la región este grupo se representa por especies terrestres grandes y pequeñas, arborícolas, semi-fosoriales, acuáticas y voladores, siendo que se ha reportado una riqueza de 318 especies (Guerra et al., 2019; Botero et al., 2021).

- 29** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Cabe destacar que esta diversidad tiene una gran importancia para los ecosistemas de la región como las sábanas y bosques ya que en estas áreas los mamíferos cumplen múltiples funciones como polinización, control poblacional, dispersión de semillas y ciclaje de nutrientes (Guerra et al., 2019).

■ Sabanas

A nivel Sudamericano, Colombia es considerado como el segundo país con sistemas de sabana naturales más grande después de Brasil (Meza et al., 2021). Estos ecosistemas abarcan aproximadamente 18 millones de hectáreas, de las cuales el 94,4 % están en la región de la Orinoquia (Mijares- Santana et al., 2019).

Las Sabanas de la Orinoquia se clasifican en estacionales e inundables, las primeras se distribuyen en los departamentos de Vichada y Meta mientras las otras están presentes en Arauca y Casanare (Prüssmann et al., 2020; Romero-Hernandez, 2023). Teniendo en cuenta lo anterior la dinámica de estos ecosistemas está fuertemente marcada por el ascenso y descenso de las aguas durante los periodos de invierno y verano (Contreras, 2016).

En general, estos ecosistemas se caracterizan por presentar una cobertura vegetal de herbazales densos con árboles y arbustos dispersos y suelos de baja fertilidad (Romero-Hernandez, 2023).

4.1.2 Amenazas de la biodiversidad colombiana

La pérdida de biodiversidad es una de las crisis ambientales más graves del último siglo (Cardinale et al., 2012; Johnson et al., 2017; DiBattista et al., 2020; Martinelli, 2021), pues, según Peréz-Garcia (2020) se estima que hasta un millón de especies de plantas y animales están en peligro de desaparecer en consecuencia de factores antropogénicos como fragmentación de hábitats, deforestación, ampliación de la frontera agrícola, introducción de especies exóticas,

- 30** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

propagación de patógenos, caza, incendios forestales, cambios de usos de suelo, entre otros (Rangel, 2005; Andrade et al., 2018; Martinelli, 2021).

Históricamente la conjunción de factores como pérdida y degradación del hábitat, introducción de especies, sobreexplotación de recursos, contaminación ambiental y cambio climático han ocasionado las mayores pérdidas en la biodiversidad pues, desde el siglo XVI, han generado la desaparecido de al menos 680 especies de vertebrados (Martínez-Polanco, 2008; Peréz-Garcia, 2020). Igualmente, en la actualidad, se ha reportado un descenso del 69% de las poblaciones de mamíferos, reptiles, aves, peces y anfibios de todo el mundo (WWF, 2022).

Para Colombia se considera que las regiones más ricas serán las que experimentarán los efectos más drásticos sobre la biota (Rangel, 2005). De acuerdo con ello, se ha reportado que la biodiversidad colombiana ha evidenciado una disminución promedio del 18% (Instituto Alexander von Humboldt, 2017). Adicionalmente, en un informe publicado por el Instituto Alexander von Humboldt (2021) se expuso que para el 2030 se prevé que, debido a las presiones antropogénicas, la Orinoquía y la Amazonía tendrán una reducción del 9% de sus coberturas, siendo que, ecosistemas como selvas tropicales y sabanas inundables serán afectadas significativamente, pese a ser actualmente las áreas más grandes con menos transformación en el país.

■ Contaminación causada por infraestructuras

Una de las mayores causas de contaminación ambiental son las infraestructuras viales. Así, es de importancia entender que la fauna cercana a la infraestructura vial es afectada principalmente por dos tipos de contaminación: lumínica y acústica (Cauich, 2021). La contaminación lumínica hace referencia a la emisión excesiva de luz artificial (Reichmann-Martínez, 2022), la cual puede alterar la orientación, el comportamiento, metabolismo y crecimiento de los organismos

- 31** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

regulados por ritmos circadianos (Xue et al., 2020; Cauich, 2021). Igualmente, se ha descrito que el aumento de la luminosidad puede generar que se extiendan los períodos de actividad de especies diurnas o crepusculares (Cauich, 2021). Cabe mencionar que la sensibilidad a la luz depende del diseño y tamaño del ojo del organismo (Gaston et al., 2012; Bliss-Ketchum et al., 2016), partiendo de ello, se ha planteado que ante la luz artificial los mamíferos son los más afectados conductualmente debido a la estructura física de su ojo (Bliss-Ketchum et al., 2016).

Por otro lado, la contaminación por ruido se ha descrito que este altera la distribución espacial y disuade a la vida silvestre de ocupar áreas importantes para alimentación y reproducción, interfiere en la comunicación, el forrajeo, la fisiología y el comportamiento de los organismos al inducir el estrés o distraer e impedir que estos presten atención a la información pertinente del entorno (Kleist et al., 2018; Kok et al., 2023). Con esto, la respuesta conductual más frecuente de los mamíferos es evitar estas fuentes de contaminación (Bliss-Ketchum et al., 2016; Erbe et al., 2022). De esta manera, la contaminación por ruido y luz puede impulsar cambios en la distribución y el uso del hábitat (Kok et al., 2023). En el contexto de las carreteras, esta respuesta genera preocupación, pues, cuando los hábitats son muy fragmentados y la conectividad limitada, la contaminación sonora y lumínica genera una barrera para la migración y dispersión de la fauna (Barber et al., 2011; Bliss-Ketchum et al., 2016; Erbe et al., 2022) lo que a largo plazo puede afectar la diversidad genética y limitar el acceso a recursos (Bliss-Ketchum et al., 2016).

■ Antropización

La antropización se manifiesta cuando la acción del hombre genera pérdida y modificación en las condiciones naturales de un ecosistema (Ornelas et al., 2019; Ramón y Bollo, 2023). Por lo general, estas modificaciones se ejecutan para construir infraestructura de vivienda o vial, usar energías no renovables o expandir

la frontera agrícola y ganadera (Dornelas, 2010; Ochoa-Ochoa y Ríos-Muñoz, 2019).

Así, para la fauna la antropización conduce a la pérdida en la calidad del hábitat (Perrin et al., 2023). Esta pérdida trae consigo la escasez o ausencia de recursos esenciales para las especies (Martínez-Polanco, 2008). Las poblaciones de mamíferos medianos y grandes requieren de extensas áreas de hábitat para suplir sus necesidades (Gallardo-Tellez, 2021), por lo tanto, en estos organismos, la antropización genera una mayor presión ya que se incrementa el riesgo de ser atropellados al movilizarse con más frecuencia en la búsqueda de recursos esenciales en zonas fragmentadas (Rojano et al., 2023).

Sumado a ello, la pérdida y fragmentación del hábitat disminuye el tamaño de las poblaciones y promueve la pérdida de la diversidad genética (Lino et al., 2019). Estos efectos ya se han reportado para poblaciones de osos hormigueros (Rojano et al., 2023).

■ Cambios de uso de suelo

Los cambios en el uso del suelo son ocasionados por actividades humanas como la agricultura, expansión urbana y la deforestación y por fenómenos naturales como el cambio climático, la erosión y las inundaciones (Gelvez, 2021). Así, el cambio en el uso de la tierra es una de las principales causas en la pérdida de biodiversidad global (Watt, 2020), ya que este proceso genera fragmentación y pérdida de hábitat, pérdida en la conectividad y aumento en las interacciones humano-fauna (Narayan y Rana, 2023). Igualmente, altera la composición y diversidad de los biomas con el incremento en la contaminación y alteración de la calidad de los recursos (Isaacsa et al., 2016; da Silva et al., 2018; Gelvez, 2021).

Ahora bien, la fauna reacciona de diferentes maneras a los cambios en el uso de la tierra (Watt, 2020). Los mamíferos grandes difícilmente se mantienen en paisajes dominados por humanos (Sieber et al., 2015), pues, a menudo la

- 33** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

transformación de los ecosistemas conlleva a una reducción en la oferta de recursos necesarios para alimentarse, refugiarse o reproducirse, lo que genera que las especies se vean obligadas a buscar estos servicios, movilizándose a través de otros espacios que en ocasiones le son hostiles e incrementan el riesgo de atropellamiento (San Vicente y Valencia, 2008).

Cabe destacar que para Colombia las mayores transformaciones de los ecosistemas naturales están vinculadas a la expansión de la frontera agrícola y ganadera (Humboldt, 2021). En la Orinoquia las sábanas naturales se han transformado principalmente por el acelerado desarrollo de la agricultura con cultivos de palma de aceite y el desarrollo de la industria petrolera, la ganadería y la expansión urbana con un marcado incremento en la infraestructura vial (Instituto Alexander Von Humboldt, 2021; Ramos-Díaz, 2021).

■ Deforestación

La deforestación es un proceso de destrucción donde se elimina una zona verde como consecuencia de fenómenos naturales o antropogénicos (Panesso et al., 2023). La deforestación causada por el hombre es producto de la tala de árboles, incendios provocados, conflictos bélicos y el crecimiento agrícola, ganadero, minero, vial y urbanístico (Panesso et al., 2023).

En la naturaleza, este fenómeno genera problemáticas como: alteración de la temperatura, retención y emisión de gases de efecto invernadero, inundaciones, compactación del suelo y pérdida de hábitat generando daños en el ecosistema y reducción de biodiversidad (Bonfanti y Sánchez, 2019, Saucedo-Banda, 2023). Igualmente, la deforestación afecta negativamente la riqueza y dispersión de las especies y las dinámicas tróficas de los ecosistemas, siendo que, a partir de su acción, las poblaciones pueden enfrentar procesos graves de defaunación (Calderon-Caro y Benavidez, 2022).

Se estima que globalmente se ha perdido el 15% de las coberturas vegetales como consecuencia de este fenómeno (Panesso et al., 2023). En Colombia, las áreas deforestadas entre el 2019 y 2020 aumentaron entre 158 mil a más de 171 mil hectáreas (Instituto Alexander Von Humboldt, 2022), gracias al cambio en el uso del suelo principalmente con la construcción de carreteras (Chaves, 2023).

■ Carreteras

Las carreteras son elementos de comunicación terrestre vitales para el desarrollo de una población (Villanueva et al., 2018). Sin embargo, estos sistemas generan ciertas consecuencias negativas sobre el ecosistema como la fragmentación, el efecto barrera, el aislamiento de poblaciones, dispersión de especies exóticas, cambios micro climáticos, producción de ruido y luminosidad, contaminación química, modificaciones en el comportamiento de los animales y el incremento de las tasas de mortalidad por atropellamiento (Arroyave et al., 2006; Coffin, 2007; Delgado, 2014; Barragán-Ruiz, 2020).

Así, es el atropellamiento el que mayor efecto tiene sobre las poblaciones de vertebrados silvestres especialmente los mamíferos ya que las vías representan un factor de mortalidad que los amenaza, pues eventualmente se incrementa el riesgo de desaparición local de especies y poblaciones ya que estos por lo general presentan bajas tasas de reproducción y recorren amplios territorios (Coffin, 2007; Laurance et al., 2009; Seijas et al., 2013; Delgado, 2014; Coitiño-Banquero, 2019; Cervantes-Huerta y Durán-Antonio, 2022).

Lo anterior debido a que las carreteras resultan como elementos atractivos para algunos animales en busca de alimentos o termorregulación (Arroyave et al., 2006). Igualmente, ciertos patrones de conducta como migraciones, cortejo, reproducción, apareamiento, entre otros, ocasionan que haya una mayor cantidad de animales muertos en determinados períodos (Cupul, 2002; Arroyave et al., 2006). Sumado a esto, aquellas especies que tienen distintos corredores de

movimiento para sus actividades biológicas están más expuestas debido a que entre más caminos tengan que cruzar dentro de su área de distribución, mayor será la probabilidad de una colisión (Jaramillo-Fayad et al., 2021).

Teniendo en cuenta lo anterior, se ha reportado que está problemática anualmente afecta millones de organismos en el mundo pues países como Brasil han estimado un total de 475 millones de animales atropellados, Estados Unidos 365 millones y Australia cinco millones de anfibios y reptiles (Davenport y Davenport, 2006; Bager et al., 2016; Jaramillo-Fayad et al., 2021).

■ Carreteras de Colombia

En Colombia existen aproximadamente 206.102 km de carreteras de las cuales 299,45 km corresponden para el departamento de Casanare donde el 83,90% de las vías son pavimentadas (INVIAS, 2022). Ahora bien, en la búsqueda de fortalecer el flujo de mercancías, personas y potenciar la presencia del estado en las zonas más remotas se prevé que para el 2035 el país tendrá un aumento de 7.000 km en carreteras (Jaramillo-Fayad et al., 2021).

De acuerdo con Benavides y et al., (2015) es inevitable que estas nuevas intervenciones se ejecuten en zonas de alta biodiversidad, de endemismos, o de ecosistemas vulnerables, por lo cual, es vital la incorporación de acciones de mitigación a los procesos de diseño, construcción y operación ya que según Jaramillo-Fayad y et al., (2021) actualmente la mayoría de las vías del país han sido construidas sin planificar diseños que eviten y reduzcan los impactos de las vías sobre los ecosistemas o la fauna silvestre.

Asimismo, para la región de la Orinoquia se ha reportado que en el departamento de Casanare, el mayor número de colisiones está asociado a la especie *Caiman crocodilus*, mientras en lo relacionado con los mamíferos, las especies más atropelladas fueron *Tamandua tetradactyla* y *Cerdocyon thous*, sin embargo, destaca este factor sobre especies amenazadas como *Myrmecophaga*

tridactyla (Rojano y Ávila, 2021; García-López y García-Peluffo, 2022).

■ **Hotspots o puntos calientes de atropellamientos**

Los puntos calientes de atropellamientos son considerados como las zonas, tramos o intersecciones en donde se concentra la mayor cantidad de accidentes viales, que no son producto del azar y, por tanto, se convierten en potenciales puntos de intervención haciendo necesario el uso de datos de localización que permitan estimar las tasas de colisión entre animales y vehículos (Jibril y Wabundani, 2014; Santos et al., 2015; Bermúdez, 2019; Lota et al., 2022).

Esta localización requiere de un examen regular de los cadáveres en carreteras con la finalidad de identificarlos y georreferenciarlos. Por lo general los hotspots se determinan considerando los taxones por separado, ya que algunas medidas de mitigación son específicas del taxón (Iuell et al., 2003; Glista et al., 2009; Santos et al., 2015; Rodriguez-Castro et al., 2017). Seguidamente estos puntos se hallan mediante herramientas estadísticas basadas en la distancia media observada de los sitios de los atropellamientos de los vecinos próximos (Lota et al., 2022).

Así, su caracterización es necesaria en la evaluación de la muerte de la fauna y la estimación de las áreas propensas de accidentalidad con la finalidad de establecerlas como áreas prioritarias para la aplicación de medidas de conservación y mitigación (Rojano y Ávila, 2021). Con ello, es recomendable que estas investigaciones se ejecuten junto con análisis centrados en la distribución, abundancia y patrones de movimiento de los animales en el área aledaña (Ascensão et al., 2019; Cervantes-Huerta y Durán, 2022).

4.2 Superorden Xenarthra

Actualmente los integrantes de este superorden se distribuyen en Norteamérica, Centroamérica y Suramérica, sin embargo, hace 65-80 Ma se originaron en Sudamérica tras la separación del continente africano (Superina y Abba, 2020). Los Xenarthra se encuentran conformados por los clados Pilosa (osos hormigueros y perezosos) y Cingulata (armadillos), los cuales comparten características únicas como articulaciones intervertebrales adicionales, reducción o pérdida de dientes premaxilares, tasas metabólicas basales bajas y temperaturas corporales bajas y cambiantes (Gaudin y McDonald, 2008; Vizcaíno y Loughry, 2008; Superina y Abba, 2020; Basso, 2021). Sumado a ello sus hábitos son terrestres, cavadores o arborícolas, razón por la cual, tienen extremidades modificadas con uñas grandes y robustas (Basso, 2021).

Filogenéticamente, los Xenartros se consideran como uno de los cuatro linajes principales de mamíferos placentarios (Springer et al., 2005; Murphy et al., 2007; Superina y Abba, 2020). En la actualidad están representados con 31 especies donde 21 especies son armadillos, 6 perezosos y 4 osos hormigueros (Barragán-Ruiz, 2020), no obstante, esto corresponde a una pequeña proporción del pasado ya que se constituían de 400 especies en el Cenozoico (Basso, 2021).

4.2.1 Orden pilosa

El orden Pilosa se compone de cuatro familias: Myrmecophagidae, Cyclopedidae, Bradypodidae y Megalonychidae (Noss et al., 2010) que se distribuyen únicamente en América Central y del Sur (Reyes-Amaya et al., 2015). Cabe señalar que estos se diferencian del orden Cingulata porque su cuerpo no está cubierto por un caparazón dérmico si no por pelo (Cuartas y Marín, 2014). Actualmente se considera que este orden posee 10 especies vivas, para Colombia se reportan 7 donde 4 son de hormigueros y 3 de perezosos (Reyes-Amaya et al.,

- 38** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

2015).

■ Suborden Vermilingua

El suborden Vermilingua se constituye por dos familias: Myrmecophagidae y Cyclopedidae (NCBI, 2023). Estos organismos se caracterizan por la morfología de su lengua ya que es larga, delgada y protráctil y le permite alimentarse de insectos eusociales (Casali y Perini, 2017; Casali et al., 2017). Por otra parte, la distribución de estos organismos es exclusivamente Neotropical desde México hasta Argentina (Casali et al., 2017).

■ Familia Myrmecophagidae

La familia Myrmecophagidae se encuentra representada por los géneros *Myrmecophaga* y *Tamandua* (Gardner, 2008; Portillo et al., 2022). En este sentido los individuos se diferencian por mantener una dieta insectívora, poseer un buen desarrollo del sentido del olfato, pero no de la vista y el oído, un rostro alargado, una lengua larga, pegajosa y retráctil, carecer de dientes, tener mucho pelo en la cola y presentar cinco dedos con cuatro garras en los miembros anteriores y posteriores que se adaptan para funciones terrestres como desenterrar hormigas y romper termiteros (Cuartas y Marín, 2014; Portillo et al., 2022).

■ *Myrmecophaga tridactyla* - Oso palmero

Esta especie conocida comúnmente como oso bandera, oso caballo u oso hormiguero gigante, históricamente se ha distribuido desde Belice hasta el norte de Argentina, (Parera, 2002; Fuster et al., 2018); sin embargo, en el transcurso de los últimos 200 años, su rango de distribución ha disminuido significativamente siendo que, se considera extinta en países como Uruguay, Belice, Guatemala y El

salvador (Parera, 2002; Pérez y Llarín, 2009; González y Martínez-Lanfranco, 2010; Ameneiros et al., 2015; Roberto, 2017).

Morfológicamente esta especie presenta una cabeza elongada y angosta cubierta con pelo corto, delgado y duro, su nariz y orejas son pequeñas, las extremidades anteriores tienen tres garras grandes y dos pequeñas, mientras las posteriores tienen cinco garras cortas y su cola es larga y voluminosa compuesta por pelos que cuelgan (Noss et al., 2010). Adicionalmente, presenta una coloración gris-marrón en la zona dorsal acompañada de una característica franja ancha, negra, bordeada de blanco que se extiende desde los hombros hasta el pecho y cuello (Noss et al., 2010) (Figura 1).

Figura 1. Individuo adulto de la especie *Myrmecophaga tridactyla* avistado en la sabana inundable del departamento del Casanare



Foto: tomada por Cunaguardo, 2021 (<https://www.cunaguardo.org/>)

De manera general, estos organismos ocupan biomas como los bosques lluviosos y secos, sabanas arboladas y pastizales abiertos, no frecuentan zonas altas ni frías, mantiene una dieta principalmente de hormigas y termitas (Di Blanco, 2015; Jiménez et al., 2015), pesan entre los 20 y 45 kg, alcanzan longitudes entre los 1.8 a 2.2 m y logran su madurez sexual alrededor de los dos a los tres años, razón por la cual se catalogan como especies con bajas tasas reproductivas al encontrarse un promedio de una cría por año durante un periodo de gestación

- 40** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

media de 190 días (Di Blanco, 2015; Superina y Abba, 2020). Igualmente, se consideran como individuos solitarios excepto por las épocas reproductivas comprendidas entre ciclos de tres a cinco días y la relación entre la madre y su cría durante el período de crianza de un año (Del Valle y Halloy, 2003; Jiménez et al., 2015).

Respecto a conservación se considera que además de las perturbaciones antropogénicas por cambio de hábitat y por los atropellamientos, características como la especialización de la dieta, la baja tasa reproductiva, la ineficiente capacidad de fuga y los periodos largos de cuidados parental inciden en su supervivencia (Fuster et al., 2018).

■ ***Tamandua tetradactyla* - Oso Melero**

Esta especie conocida como oso melero, oso hormiguero de collar, oso colmenero o zorro hormiguero se caracteriza por habitar biomas como bosques húmedos tropicales, bosques secundarios, áreas inundadas, sabanas y manglares (Alberico et al., 2000; Alzate-Gaviria et al., 2016). En suma, presentan comportamientos solitarios y arborícolas, su dieta está constituida por termitas, hormigas, pupas de insectos, abejas, heterópteros, miel y semillas y son maduros sexualmente tras los dos años siendo que su gestación tiene una duración de 130 a 190 días (Pérez y Gonzales, 2004; Valdes y Brenes, 2012; Hossotani y Luna, 2016; Dupont et al., 2018).

Morfológicamente son de tamaño mediano ya que miden desde 1 a 1,5 m de longitud total y pesan entre 3.8 kg a 8.5 kg, presenta un cráneo alargado y estrecho, una boca pequeña y sin dientes, una lengua larga provista con saliva pegajosa, ojos pequeños y orejas redondeadas grandes, cola y patas delanteras con garras curvas y largas (Alves da Rosa et al., 2010; Dupont et al., 2018). Estos individuos presentan una coloración variable en tonalidades doradas, marrón, o negro (Rojano et al., 2014) (Figura 2).

- 41** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Figura 2. Individuo adulto de la especie *Tamandua tetradactyla*



Foto: tomada por Scholl (2015)

4.2.2 Dimorfismo sexual

El dimorfismo sexual refiere a las diferencias morfológicas y fisiológicas que identifican a los individuos del sexo opuesto de una especie, este presenta un grado de caracterización por lo cual varía entre las especies, siendo que algunas no poseen (Chirinos et al., 2011).

En el caso particular de las especies *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* existe una ausencia de este conjunto de rasgos, por lo que para su caracterización sexual es necesario la intervención y manipulación del organismo para la aplicación de técnicas de palpación de estructuras como criptorquidia y el saco urogenital (Braga, 2010); cabe destacar que esta técnica suele complicarse debido a la localización interna de los testículos, la casi ausencia de un perineo y el reducido tamaño del pene (Rossi et al., 2013).

4.2.3 Ecología molecular

La ecología molecular es una ciencia interdisciplinaria que usa herramientas, teorías y enfoques de la biología molecular, genómica y bioinformática para

resolver incógnitas de la ecología, evolución, conservación y etología (Andrew et al., 2013; Rodríguez-Correa et al., 2017).

Esta disciplina ha evolucionado gracias a la implementación de nuevas tecnologías moleculares (Eguiarte et al., 2007; Rowe et al., 2017), que han sido un aliado importante para el estudio de las poblaciones, al facilitar la identificación de especies, el sexaje, los análisis de diversidad, la filogeografía y el estado epidemiológico de las especies (Barragan-Ruiz et al., 2021a; Moore et al., 2023).

En el sexaje molecular se ha demostrado que el empleo de marcadores moleculares, es eficiente para la identificación de machos y hembras en casos donde las especies o sus circunstancias impiden la identificación a través de características físicas distintivas (Matta-Camacho et al., 2009); así, esta técnica garantiza resultados confiables, exactos y rápidos e igualmente constituye un método que minimiza el estrés de los organismos durante la toma de muestra (Velarde-Félix et al., 2008; Matta-Camacho et al., 2009).

A partir de lo anterior, la identificación molecular del sexo ha jugado un papel crucial en ramas como la ecología, evolución, genética de poblaciones, identificación forense y conservación (Matta-Camacho et al., 2009), siendo que, en campos como ecología de carreteras, la determinación molecular del sexo se ha constituido como una técnica efectiva para identificar la razón sexual de los cadáveres tras la colisión ya que debido al estado de descomposición de los cuerpos no siempre se logra determinar a partir de caracteres morfológicos (Rojano et al., 2023).

4.2.4 Genética molecular en Xenarthras

En los Xenarthras las técnicas moleculares han permitido resolver incógnitas asociadas a su filogenia taxonómica, filogeografía, evolución y sexualidad, (Superina y Loughry, 2015; Gabrielli, 2021; Salazar-Moscoso et al., 2022). En el caso específico de los Vermilingua recientemente se han incrementado los estudios

- 43** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

asociados a su sexualidad ya que al estar ausentes las diferencias sexuales (Guiscafré y Cotts, 2021), hace que organismos como *T. tetradactyla* y otros osos hormigueros sean susceptibles a errores de sexado (Cots et al., 2019).

■ **Sexaje molecular**

El sexaje molecular se desarrolla gracias a las diferencias genéticas presentes en los cromosomas sexuales (Bento et al., 2019; Lim et al., 2020). En la mayoría de los mamíferos los cromosomas sexuales son heterogaméticos ya que los machos presentan un sistema XY mientras las hembras son XX, siendo que la presencia del cromosoma Y es determinante para el desarrollo masculino (Colorado-Garzon et al., 2012). Esta masculinización es gracias a la activación de la región SRY (*sex determining región del cromosoma Y*) ya que durante la etapa embrionaria se encarga del desarrollo de los testículos y caracteres secundarios al activar una liberación de hormonas (Arias y Huanca, 2009; Cervantes et al., 2009; Caselli-Schrader, 2013). Sumado a ello, el gen SRY es una secuencia altamente conservada en mamíferos (Caselli-Schrader, 2013).

Teniendo en cuenta lo anterior, Barragán-Ruiz et al., (2021a) exponen que la amplificación de este gen es idónea para el reconocimiento del sexo masculino en este orden; pues al observarse los productos de amplificación de este gen en un gel de agarosa se puede identificar a los machos a través de la presencia de una única banda y en ausencia de esta a las hembras (Caselli-Schrader, 2013); sin embargo, la amplificación de este único gen es un riesgo debido a la posibilidad de obtener falsos negativos (es decir, exceso de genotipos femeninos) por lo que es necesario la co-amplificación de otros genes (Barragán-Ruiz et al., 2021a; Aznar-Cormano et al., 2021).

Para mamíferos, además de la región Y (SRY) comúnmente se utiliza el gen del dedo de zinc (ZF) (Pelizzon et al., 2017; Lim et al., 2020). El gen ZF se encuentra en el cromosoma X (ZFX) y en el cromosoma Y (ZFY) en la región pseudo-

autosómica (Lim et al., 2020); al estar presentes en los dos cromosomas sexuales son eficientes como control positivo de PCR (Arias y Huanca, 2009; Barragán-Ruiz et al., 2021a; Lim et al., 2020).

Cabe destacar que la co-amplificación o PCR múltiplex se realiza porque, en ocasiones, la baja calidad del ADN con la que se trabaja (tejidos degradados, especímenes de museo o muestras fecales), puede generar inconsistencias en el resultado por la presencia de inhibidores en las muestras (Joshi et al., 2019).

En este sentido, para la realización del sexaje por PCR las fuentes potenciales de ADN son pelos, plumas, uñas, sangre, heces, orina, escamas, cáscaras de huevo, tejido de animales muertos, especímenes de museo o fósiles (Nardelli et al., 2011). En este sentido, si se considera la densidad celular la mayor fuente de ADN es ofrecida por tejidos ricos en células como el hígado, músculo o la sangre, lo cual contrasta con la poca recuperación que se puede obtener de tejidos con menor densidad como plumas, huesos, pelos, escamas, uñas y cuernos (Bengtsson et al., 2012); no obstante, la densidad celular de un tejido varía entre taxones, especie e incluso entre individuos ya que estos cambios están dados por las condiciones funcionales, espaciales o temporales que enfrentan los organismos a lo largo de la vida (Bengtsson et al., 2012).

Sumado a lo anterior, esta técnica es eficiente ante la ausencia de dimorfismo sexual en una especie, ya que proveen muestras de ADN no invasivas que permite caracterizar a los organismos sin tener que capturarlos o incomodarlos (Taberlet et al., 1999; Cervantes et al., 2009) o en el caso de pérdida de caracteres taxonómicos, como en el caso de los atropellamientos.

■ ADN de muestras de tejido

Los tejidos son agregaciones de células especializadas (Richardson y Goosen-de Roo, 2009). De esta manera, en animales, los tejidos se clasifican principalmente en epitelial, conectivo, muscular o nervioso (Boal, 2012). En este

- 45** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

sentido, los tejidos son una excelente fuente de ADN debido a su alta densidad celular, no obstante, son susceptibles a degradarse rápidamente por lo que es necesario almacenarlos y procesarlos tras recolectarlos (Drug-Farma, 2006). En consecuencia, la calidad del ADN depende de la edad del tejido y sus condiciones de conservación (Drug-Farma, 2006).

■ ADN de muestras de sangre

La sangre se constituye un 50% de plasma y el restante de elementos celulares como eritrocitos, plaquetas y leucocitos (Curtis et al., 2008). En mamíferos, los eritrocitos (tras su maduración) y plaquetas (desde su génesis) pierden su núcleo mientras los leucocitos lo conservan (Moras et al., 2017; Soslau, 2020; Martin y D'Avino, 2022; Ducamp y Ostuni, 2023); por tanto, para los análisis con ADN genómico las células de interés son los leucocitos (Lee y Tripathi, 2020).

El ADN presente en la sangre es de alta calidad (Lee y Tripathi, 2020), sin embargo, las células son frágiles y se degradan rápidamente tras el muestreo por lo que es un desafío preservarlas con el tiempo (Ait-Belkacem et al., 2021). Ante este panorama, una opción son las muestras de sangre seca ya que facilita su recolección, el almacenamiento y conservación y disminuye los riesgos de contaminación bacteriana o por hemólisis (Gupta y Mahajan, 2018).

■ ADN de muestra de pelo

Los pelos son elementos epidérmicos queratinizados (Alberts et al., 2010). Su estructura consiste principalmente en el tallo y la raíz (Liu et al., 2023). La raíz posee un bulbo que contiene una papila folicular (Sánchez et al., 2010). La papila folicular se caracteriza por contener células madre, melanocitos y melanosomas e igualmente el tallo presenta células medulares (Sánchez et al., 2010).

En el cabello o pelo se puede encontrar ADN genómico nuclear y

- 46** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

mitocondrial. Sin embargo, el ADN del cabello es muy degradado y fragmentado (Liu et al., 2023). Según Vaishali y et al., (2019) las células del bulbo contienen la mayor cantidad de ADN ya que en el cabello son las únicas células nucleadas debido a que las otras células a medida que se alejan de la capa germinativa por el tallo se aplanan, endurecen y pierden su núcleo (Juárez et al., 2007; D'Orio et al., 2023).

4.3 Ecología de paisaje

La ecología del paisaje es una disciplina que se caracteriza por estudiar las variaciones y funciones de un territorio a diferentes escalas espaciales para determinar su composición y configuración (Gurrutxaga y Lozano, 2008). Así, esta se centra en el análisis de variables del paisaje como patrones espaciales (tamaño, formas, parches, conectividad y corredores), fragmentación, heterogeneidad, usos del suelo, coberturas vegetales, entre otros (Aguilera, 2010).

Partiendo de lo anterior, los parámetros son evaluados por medio de índices, sistemas de información geográfica y métricas (Aguilera, 2010). Las métricas que dependen del enfoque investigativo evalúan la estructura de un paisaje considerando tres niveles: nivel fragmento o parches, nivel clase y nivel paisaje (Medina, 2022).

En la actualidad, las métricas permiten cuantificar los cambios de un territorio a través del uso de índices (Medina, 2022). Un ejemplo de lo anterior fue expuesto por Correa et al., (2014) pues, para cuantificar la estructura y conectividad de un área durante un periodo de tiempo específico utilizaron diez índices de paisaje como métricas de área y configuración de fragmentos (porcentaje de cobertura, tamaño del fragmento, índice del fragmento más grande y densidad de fragmentos) y métricas de conectividad y aislamiento (índice de proximidad, Conectancia y Cohesión).

- 47** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Por otro lado, el uso de este enfoque en la resolución de problemáticas dentro de los vermilingua ha sido principalmente para análisis de atropellamiento, distribución, uso de hábitat, fragmentación y urbanización (Gutiérrez-Sanabria, 2017; Muñoz-Vargas, 2022), un ejemplo de ello se refleja en el estudio realizado en Costa Rica por Gutiérrez-Sanabria (2017) donde el análisis de las variables del paisaje permitió determinar el impacto y las características que favorecen el atropellamiento en la especie *Tamandua tetradactyla*.

Igualmente, en Colombia el uso específico de sistemas de información geográficos ha facilitado la determinación de características como el área de vida y uso de hábitat de especies como *Myrmecophaga tridactyla*, lo cual es un avance, ya que, el conocimiento de las preferencias de hábitats permite predecir patrones en otras poblaciones de esta especie con condiciones de paisaje ecológicamente similares (Muñoz-Vargas, 2022).

4.4 Biología molecular para la conservación

Las iniciativas de conservación se centran en prevenir y detener la extinción de las especies (Hennessy, 2014). Bajo este propósito, los gobiernos crean figuras como áreas protegidas, acuerdos internacionales y marcos jurídicos para proteger a estas especies (Supple y Shapiro, 2018).

En los últimos años la genética ha sido una herramienta importante en la gestión de esta conservación (Nardelli y Túnez, 2017) ya que permite identificar “puntos críticos” de biodiversidad para priorizar su protección (Supple y Shapiro, 2018). Además, permite estudiar rápidamente una extensa gama de características individuales y poblacionales de un sitio determinado (Geffen et al., 2007).

Los mayores beneficios de estas herramientas genéticas se obtienen a partir de la interdisciplinariedad (Byrne, 2018) ya que los datos genéticos son más útiles junto con datos tradicionales como historia de vida, distribución, demografía, etc (Geffen et al., 2007); siendo que, la síntesis de esta variedad de información permite

la toma de decisiones y el establecimiento de políticas de conservación más sólidas desde diferentes perspectivas (Byrne, 2018).

De esta manera, las técnicas moleculares han permitido detectar aspectos importantes para la conservación como zonas híbridas y poblaciones mezcladas, identificar individuos, especies, poblaciones y unidades de conservación, cuantificar la dispersión, diversidad y el flujo genético, estimar el tamaño actual e histórico de las poblaciones y evaluar la paternidad, el parentesco, el éxito reproductivo, los sistemas de apareamiento y la organización social (Geffen et al., 2007; Nardelli y Túnez, 2017).

Ahora bien, uno de los parámetros más importantes en el estudio de la genética de conservación es la estimación del tamaño efectivo de una población debido a que este análisis permite calcular la tasa de perdida de variación genética y la tasa de endogamia (Geffen et al., 2007). El tamaño efectivo de una población puede calcularse a partir de datos demográficos, no obstante, estos datos son difíciles de obtener para la mayoría de las especies (Geffen et al., 2007), pues a menudo la obtención de estos datos se obstaculiza por la propia historia natural de las especies (Katz et al., 2020) o el contexto del estudio (animales muertos o restos de estos) (Zenke et al., 2022).

En poblaciones “ideales” el tamaño de una población es constante y la proporción de sexos es igual, sin embargo, en las poblaciones “reales” esto no ocurre (Geffen et al., 2007). Partiendo de ello, para la conservación es imperativo la estimación de las proporciones de sexos ya que las proporciones de sexos sesgadas en poblaciones pequeñas pueden acelerar la extinción local (Katz et al., 2020). En otras palabras, estos estudios son importantes porque son fuentes de información para evaluar la viabilidad de una población (Holleley et al., 2023) al ser indicativos del estado de los sistemas de apareamiento y el tamaño efectivo de la población (Lehne et al., 2018).

- 49** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

4.4.1 Conservación y ecología de carreteras

Debido al impacto que las carreteras ejercen sobre la biodiversidad, se ha diseñado una amplia gama de herramientas para mitigar sus efectos negativos (Vasiliev, 2022). Estas estrategias de mitigación tienen dos propósitos: influir en el comportamiento de los conductores o influir en el comportamiento animal (Rytwinski et al., 2016). Dentro de las primeras estrategias destacan la instalación de señales de advertencia, educación ciudadana, medidas para reducir el volumen o velocidad del tráfico y cierres temporales de carreteras (Lester, 2015; Rytwinski et al., 2016) mientras en las segundas se encuentran los pasos de fauna aéreos y subterráneos (alcantarillas y túneles), la introducción de barreras físicas como cercas, estrategias para ahuyentar a los animales como repelentes de olores y reflectores de advertencia, entre otros (Bager y Fontoura, 2013; Bennett, 2017).

Ahora bien, la mortalidad en las carreteras es específica para cada especie, pues, una variedad de factores intrínsecos (edad, patrones de actividad, temporada, género, dieta, respuestas conductuales y tamaño del área de distribución) influyen en la tasa de colisión (Bennett, 2017), siendo que, la eficacia de las estrategias de conservación depende para cada especie (Kusta et al., 2015), debido a que no existe una estructura o un elemento disuasorio genéricos que se adapte a todos los organismos, por lo que es imperativo implementar y complementar múltiples formas de mitigación en los que se tengan en cuenta la historia de vida y los factores asociados a la vulnerabilidad de las especies afectadas (Bennett, 2017).

4.4.2 Estado de conservación del orden Xenarthra

El 22,6% de todas las especies de mamíferos evaluadas a nivel global están bajo alguna figura de amenaza (Quintela et al., 2022). Dentro de las 31 especies del orden Xenarthra cinco han sido evaluadas como casi Amenazadas, una en Peligro Crítico y cuatro como Vulnerables (IUCN, 2018), no obstante, estos reportes varían

- 50** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

dependiendo de la localidad, pues, dentro de las quince especies que globalmente se catalogan en Preocupación Menor, ocho están amenazadas en al menos un país en el que se han reportado (Superina y Abba, 2020). Para Colombia, la especie *M. tridactyla* está categorizada como amenazada (Rojano y Ávila, 2021). Partiendo de lo anterior, se supone que al menos la mitad de los organismos de este orden enfrentan amenazas y riesgos significativos para su conservación (Superina y Abba, 2020).

- 51** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

5. Antecedentes

5.1 Ecología de carreteras

A nivel mundial, las carreteras se reconocen como una de las infraestructuras que más afectan a la vida silvestre (Pinto et al., 2022). Así, uno de sus efectos más conocidos es el atropellamiento (Marín-Carvajal et al., 2014) ya que amenaza a la biodiversidad al alterar los patrones de movimientos de los organismos y su flujo de genes lo que puede conducir a futuro a un aislamiento poblacional y posteriormente a la pérdida de la diversidad genética (Medrano-Vizcaino et al., 2022). Ahora bien, debe destacarse que los efectos de estos impactos varían según las diferentes regiones, hábitats y taxones (Medrano-Vizcaíno et al., 2023).

En este sentido, Medrano-Vizcaino et al., (2022) reportó que para Latinoamérica las tasas de atropellamiento eran altas en países ubicados en Centro-América, las regiones andinas (Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú), Uruguay, el este de Brasil, centro y este de Argentina y el sur de Chile; igualmente destacó que las tasas eran más altas para aves grandes y mamíferos medianos con características como reproducción rápida, altas densidades poblacionales, carroñeros o con dietas basadas en invertebrados siendo que en este estudio, para mamíferos, el orden taxonómico con la tasa de atropellamiento más alta fue Pilosa.

5.1.1 Estado de Ecología de carreteras en Colombia

En Colombia la producción de investigaciones académicas en torno al atropellamiento de vertebrados es limitada (García-López y García-Peluffo, 2022). Por tal razón, este impacto ha recibido poca atención en el país, siendo que, aún no hay cifras concretas sobre los atropellamientos de fauna silvestre, ni mucho menos,

evaluación de los costos generados por la pérdida de servicios ecosistémicos ante la afectación sobre la biodiversidad (Meza, 2023; Fayad et al., 2019) ya que, la mayoría de los estudios se han centrado en el recuento de animales atropellados, mientras unos pocos han buscado analizar los patrones espacio-temporales o estimar las tasas de eventos de atropellamiento (Meza, 2023).

Teniendo en cuenta lo anterior, para la región andina, en el municipio de Envigado, Antioquia, Obando-Tobon (2022) reportó 279 eventos de atropellamiento para mamíferos no voladores, aves y reptiles; así, destaca que, en esta área, especies con características como “actividad nocturna”, “búsqueda de recursos (alimento o temperatura)” o “altos requerimientos espaciales” son más vulnerables al atropellamiento. Igualmente, Arana-Rivera et al., (2022) registraron en el departamento del Huila un total de 102 ejemplares muertos donde el 52% corresponde a mamíferos, el 34% reptiles, 12% aves y 3% anfibios.

Por su parte, Lozano y Patiño-Siro (2020) reportaron en el municipio de San Jerónimo, Antioquia 95 eventos de atropellamiento de los cuales el 30% corresponden a mamíferos, 47% a reptiles, 17% aves, y el 4% a anfibios; sumado a ello, en la investigación hallaron una relación entre el diseño geométrico de las vías y las colisiones ya que registraron los puntos calientes en segmentos curvos de las carreteras, por lo que concluyeron que para la fauna de la zona, las carreteras curvas son más peligrosas que las líneas rectas.

De igual modo, Uribe (2019) destaca en su estudio en el Valle de Aburrá y Oriente Antioqueño un total de 100 animales atropellados donde los mamíferos representan la mayor cantidad de eventos con 49 registros, las aves con 35 individuos, los reptiles con 11, y finalmente los anfibios con 3. Así mismo, Uribe (2019) destaca que las variables que más influyen en los atropellamientos son “paisaje/ tipo vegetación” y “mes de registro”.

Por otro lado, en Santander, Meza (2019) reportó 152 mamíferos atropellados de los cuales el 91% estaba representados por las especies *Didelphis*

marsupialis (la zarigüeya común), *Cerdocyon thous* (zorro cangrejero), *Tamandua mexicana* (Tamandua del norte) y *Procyon cancrivorus* (mapache cangrejero).

Asimismo, en la vía el Escobero de Envigado, Antioquia, Delgado (2014) reportó 35 mamíferos atropellados de los cuales el 54% correspondían a marsupiales, 26% a carnívoros y 17% a roedores. En adición, en el 2007, este mismo investigador, reportó en el área 58 mamíferos atropellados donde el 34% eran marsupiales, 34% roedores, 21% carnívoros, 5% insectívoros, 3% lepóridos y 2% dasipódidos (Delgado, 2007).

Ahora bien, para la región del Caribe, López et al., (2022) en la Ruta 90 “troncal del caribe”, halló 98 ejemplares de vertebrados atropellados entre los cuales 45 eran reptiles, 43 anfibios, 8 mamíferos y 2 aves. En adición, López et al., (2022) reportó una tasa de atropellamientos de 1,36 individuos/kilómetro por día. Por su parte, Adárraga-Caballero y Gutiérrez-Moreno (2019) evaluaron en el departamento de Magdalena dos tramos donde la tasa de atropellamiento del primer segmento era de 0.16 Ind/km y 0.12 Ind/km para el segundo; igualmente encontraron un total de 208 atropellamientos de los que 77 eran mamíferos, 63 reptiles, 48 aves y 20 anfibios.

A su vez, en el departamento de Sucre, De La Ossa-Nadjar y De la Ossa-V (2015) reportaron 608 individuos atropellados entre los cuales 253 eran anfibios, 219 reptiles y 111 mamíferos; adicionalmente destacaron que variables climáticas como “sequía” se relacionaban con el aumento en los atropellamientos ya que, ante la escasez de alimento derivada de la falta de lluvias, los animales se veían obligados a recorrer mayores distancias y cruzar vías.

En simultáneo De La Ossa-V y Galván-Guevara (2015) registraron en el departamento de Sucre 431 eventos de atropellamientos donde 28% eran mamíferos, 28% aves, 22% reptiles y 21% anfibios, así, destacaron que las especies más afectadas eran *C. thous* (zorro), *Iguana iguana* (iguana), *Crotophaga ani* (garrapatero), *T. mexicana* (tamandua del norte) y *D. marsupialis* (zarigüeya). Finalmente, Payan et al., (2013) reportaron para la “ruta del sol”, 340 vertebrados

atropellados dentro de los cuales los mamíferos eran los más afectados. Cabe destacar que en esta investigación se halló una tasa de mortalidad anual de 45/ind/km

Respecto a la región del Pacífico, en el Valle del cauca, Stasiukynas et al., (2021) reportaron 175 eventos de atropellamiento, dentro de las cuales las especies más afectadas eran *D. marsupialis* (zarigüeya) y *Rhinella marina* (sapo) ya que tenían comportamientos generalistas y tolerantes a altos grados de perturbación antropogénica. Por otro lado, Castillo et al., (2015) registró en un segmento de la vía panamericana 894 individuos atropellados de los que 362 eran mamíferos, 288 anfibios, 186 aves y 58 reptiles. Cabe destacar que según García-López y García-Peluffo, (2022) para la región amazónica no se ha publicado ningún artículo relacionado con este campo.

En cuanto a la Orinoquia, García-López y García-Peluffo (2022) expusieron que en esta región la mayoría de los organismos afectados pertenecen a reptiles y mamíferos. Por su parte, Rojano y Ávila (2021) registraron 139 eventos de colisión dentro de los cuales sobresalen 8 especies de mamíferos destacando 13 individuos de *Tamandua tetradactyla* (oso melero) y siete de *Myrmecophaga tridactyla* (oso palmero). Adicionalmente, Holguín-Contreras (2019) reportó en el tramo Villavicencio - Casanare, un total de 87 eventos de atropellamientos donde 20 corresponden para la especie *M. tridactyla* y 67 para *T. tetradactyla*. Igualmente, Durán-Galindo (2018) registró 262 ejemplares de organismos atropellados dentro de los cuales las especies con más eventos de atropellamiento fueron *T. tetradactyla*, *Didelphis spp.* (zarigüeya), *C. ani* (garrapatero), *R. marina* (sapo), *I. iguana* (iguana) y *Megascops choliba* (lechucita neotropical).

5.2 Identificación molecular del sexo en mamíferos

La literatura evidencia como las herramientas moleculares han sido un gran aliado para el estudio de las especies de mamíferos. Por ejemplo Gürkan et al.,

(2023) determino el sexo de 109 individuos atropellados de las especies *Canis aureus* (Chacal dorado), *Canis lupus* (lobo) y *Vulpes vulpes* (zorro común) por medio de la amplificación por reacción en cadena polimerasa (PCR) de genes específicos de los cromosomas X y Y (*Zfx* y *Zfy*), encontrando que estos procedimientos son herramientas útiles en estas especies ya que logran establecer diferencias entre machos y hembras al detectar dos bandas de ADN para los machos y una banda en las hembras en la mayoría de las especies.

Por su parte, Barragan-Ruiz et al., (2021a) estandarizaron para los Xenarthra los protocolos de identificación genética del sexo con individuos atropellados de las especies *Myrmecophaga tridactyla* (oso hormiguero), *Tamandua tetradactyla* (oso melero) y *Euphractus sexcinctus* (armadillo amarillo). Lo anterior, por medio de la amplificación por PCR de fragmentos nucleares *Zinc Finger* (*Zfx* y *Zfy*) y de la región Y (SRY). Así, Barragan-Ruiz et al., (2021a) demostraron que esta técnica es eficiente para la identificación del sexo en ejemplares sin dimorfismo sexual o sin características morfológicas de diagnóstico luego de procesos como el atropellamiento.

A su vez, Lim et al., (2020) realizó el sexaje para la especie *Tapirus indicus* (tapir malayo) usando muestras de sangre y tejido de individuos silvestres (rescatados, translocados, atrapados y atropellados) y en cautiverio. Esta identificación Lim et al., (2020) la realizaron mediante la amplificación por PCR de la región SRY y el gen *Zinc Finger*, encontrando que el sistema de marcadores SRY/ZF era confiable al generar resultados que le permitieron tipificar con precisión el sexo de todos los 31 individuos (100%) analizados en la investigación. Igualmente, Miotto et al., (2012) determinaron el sexo de 11 individuos atropellados de la especie *Puma concolor* (puma) a partir de la amplificación por PCR del gen amelogenina (*AMELX* y *AMELY*) presente en ambos cromosomas sexuales, reportando 10 individuos machos y 1 un individuo hembra.

Finalmente, Russell et al., (2011) determino el sexo de zarigüeyas atropelladas a través de la amplificación simultánea por PCR de cebadores W-

(G6PD) y ligados a Y. De esta manera Russell et al., (2011) encontraron que esta metodología proporciona datos valiosos para las especies atropelladas que normalmente no es posible asignar el sexo en campo ya que logró determinar el sexo de 66 especímenes, aumentando así, el tamaño de su muestra para futuros análisis ecológicos y de conservación en esta especie.

5.2.1 Identificación molecular del sexo en especímenes colombianos

Una revisión sistemática realizada durante los últimos 10 años mostró que en Colombia no se han reportado estudios que determinen el sexo de mamíferos a través de herramientas moleculares, casos que todavía son más improbables al hablar de animales atropellados.

Sin embargo, en aves, la identificación molecular del sexo se ha mostrado como una herramienta útil para conseguir ejecutar programas de monitoreo, conservación, producción y análisis de ecología de poblaciones (Matta-Camacho et al., 2009). De esta manera, en Colombia, se han reportado estudios con grupos como *Vanellus chilensis* (alcaraván), *Ara spp* (guacamayos) y *Sicalis flaveola* (canario coronado), en los que se han aplicado técnicas como la PCR para amplificar genes como Helicasa con Cromodominio de Unión a ADN (CHD) ubicado en los cromosomas sexuales W y Z (Cruz-Bernate et al., 2013; Franco-Gutiérrez et al., 2017; Espinoza et al., 2021). Respecto a los mamíferos, López y Vásquez (2004) reportaron la identificación molecular del sexo para el género *Bos spp.* por medio de la amplificación por PCR del gen SRY.

■ Análisis moleculares en la Orinoquia

Para la región de la Orinoquia las investigaciones sobre los análisis moleculares del sexo de los grupos faunísticos y el atropellamiento vial son limitadas (García-López y García-Peluffo, 2022). Así, en la presente revisión de antecedentes se

encontró únicamente un trabajo enfocado en la estandarización de protocolos para la determinación de sexo en mamíferos. En este Colorado-Garzon (2010) realizó un estudio con la especie *Hydrochoerus hydrochaeris* (chigüiro) con el cual buscó estandarizar la PCR sobre los marcadores moleculares Amelogenina (AMEL) y SRY.

Teniendo en cuenta lo anterior, surge la necesidad de producir información para grupos faunísticos como los mamíferos ya que problemáticas como el atropellamiento vial, los posicionan dentro de los grupos taxonómicos más vulnerables en las diferentes vías de las regiones de Colombia (García-López y García-Peluffo, 2022). Así, para la región de la Orinoquia los esfuerzos deben enfocarse especialmente con aquellas especies que frecuentemente se registran afectadas en el contexto de las colisiones, como es el caso de *M. tridactyla* y *T. tetradactyla* que además son reconocidas como especies representativas en la región (Rojano et al., 2023). Sumado a esto, ya que, la mayoría de los estudios en el país se han centrado únicamente en el recuento de animales atropellados, es importante avanzar hacia un análisis multidisciplinario con herramientas como la biología molecular que permite tomar acciones para mitigar los impactos de esta problemática.

- 58** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

6. Métodos

6.1 Declaración de Ética

Este proyecto se desarrolló con muestras que fueron donadas por la fundación Cunaguardo (<https://www.cunaguardo.org/>), siendo estas provenientes de individuos muertos por atropellamiento. Así, no se hace necesario una declaración de ética proveniente de comités, ya que no se implementaron medidas de captura, sedación o cualquier tipo de manipulación a los individuos. Sin embargo, soportando el marco legislativo, para la recolección de muestras, la fundación Cunaguardo cuenta con una autorización de la Corporación Autónoma Regional de la Orinoquía (CORPORINOQUIA) bajo la resolución 500.36.18-1621 del 22 de octubre del 2018.

6.2 Área de estudio

El estudio se realizó en la carretera nacional 65 ubicada en el oriente de Colombia, específicamente entre los departamentos de Meta, Cundinamarca y Casanare. El área monitoreada tenía una extensión de 352 km, iniciando desde la ciudad de Villavicencio, Meta (04°10'04.35"N y 73°36'9.54"O) y finalizando en el municipio de Paz de Ariporo, Casanare (5°52'52"N y 71°53'30"O). Así, esta vía atraviesa los municipios de Villavicencio, Restrepo, Cumaryl, Paratebueno, Barranca de Upía, Villanueva, Monterrey, Aguazul, Yopal, Pore y Paz de Ariporo.

La carretera se rodea por el piedemonte llanero de la cordillera oriental e igualmente se caracteriza por presentar a su alrededor coberturas mixtas de sabana natural inundable, pastizales de uso agrícola, cultivos de uso permanente y semipermanente y bosques de tipo galería aledaños a fuentes hídricas (Rojano y Ávila, 2021). El clima de la región es monomodal con dos períodos hidrológicos: seco (diciembre-marzo) y lluvioso (mayo a octubre) (Rojano y Ávila, 2021).

- 59** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

6.3 Colecta de muestras

Las muestras se obtuvieron de individuos muertos atropellados de *M. tridactyla* y *T. tetradactyla* en la ruta nacional 65 (Meta-Casanare) (Figura 3). Entre los años 2015 y 2022 se colectaron un total de 56 muestras biológicas de tejido (T), sangre seca (SC) y pelo (P), de las cuales 29 corresponden a la especie *T. tetradactyla* (27 T, 1 SC, 1 P) y 27 corresponden a *M. tridactyla* (8 T, 12 SC y 7 P).

Figura 3. Individuo adulto de la especie *Myrmecophaga tridactyla*, de sexo desconocido atropellado en la carretera nacional 65, sentido Meta-Casanare.



Foto: tomada por Cunaguardo, 2022 (<https://www.cunaguardo.org/>)

Las muestras de tejidos blandos fueron colectadas en tubos eppendorf, conservadas en alcohol etílico absoluto y almacenadas en un ultracongelador a -80 °C, hasta la extracción de ADN. Las muestras de pelo se reservaron en seco en bolsas Ziploc con cierre hermético, mientras que las muestras de sangre se conservaron en papel swap hasta su extracción (Figura 4).

- 60** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Figura 4. Toma de muestras biológicas de un individuo de la especie *Myrmecophaga tridactyla* atropellado en la carretera 65 que conecta Meta-Casanare.



Nota: La actividad fue realizada en la expedición “Osos hormigueros” organizada y financiada por la fundación Cunaguardo en Yopal durante el año 2022. En la foto es observado un grupo de estudiantes (incluyendo la autora) participando de la campaña de captura **Foto:** tomado de Cunaguardo, 2022 (<https://www.cunaguardo.org/>)

Para cada muestra se registró información ecológica como: tipo de tejido, fecha, hora, punto de colecta (coordenadas geográficas UTM) registrados a través de GPS y características del paisaje aledaño. La carretera fue monitoreada en un automóvil a una velocidad comprendida desde los 40km/h a los 60 km/h, siendo siempre analizada por dos observadores dentro del vehículo.

6.4 Identificación sexual en campo

La identificación sexual en campo a partir de características morfológicas es casi imposible. No obstante, cuando se hallaba la estructura reproductiva en algunos especímenes durante la necropsia, o por palpación interna invasiva, un especialista identificaba el sexo del individuo. Estos datos fueron usados como datos de control positivo para evaluar el protocolo de sexaje molecular en aquellos individuos en los que el sexo era desconocido. De esta manera, se utilizaron 12

- 61** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

muestras como control: *T. tetradactyla* dos ejemplares hembras y *M. tridactyla* cuatro ejemplares hembras y seis machos.

6.5 Procedimientos de laboratorio

Las pruebas moleculares de extracción, cuantificación, amplificación por reacción en cadena polimerasa (PCR) y electroforesis se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular de la Ciudad de Villavicencio, Universidad de los Llanos, sede Barcelona, bajo la coordinación y orientación de la Profa. Dra. Karen Giselle Rodríguez

6.5.1 Extracción del ADN total

El ADN genómico de las muestras de T y SC se extrajo usando el protocolo convencional Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (Sambrook 1989). Por su parte, la extracción de muestras de P se realizó mediante el Kit *Nucleo Spin-Tissue for hair roots* (Figura 5). Cabe destacar que los pelos de los individuos se seleccionaron con anterioridad a la extracción, teniendo en cuenta la presencia de folículos pilosos completos en sus raíces.

Figura 5. Extracción de ADN de muestras de tejido y pelo. **A.** Fotografía mostrando la extracción de tejido por el protocolo Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (Sambrook 1989); **B.** Fotografía siguiendo el protocolo de extracción para pelo del kit Qiagen.



Nota: La fotografía B representa algunos procedimientos establecidos en el protocolo del Kit Qiagen para la extracción de ADN de muestras de pelo: Lisis celular, congelamiento de las muestras con nitrógeno líquido y aumento de la temperatura con baño maría.

La cuantificación y la evaluación de la calidad del ADN se realizó por medio de electroforesis horizontal, utilizando agarosa a concentración de 2% en gel. De la misma forma, la concentración y la relación de absorbancia que indica la pureza del ADN fueron evaluados por espectrofotometría a través del *Nanodrop 2000* (Figura 6). A partir de las evaluaciones anteriores, se prepararon alícuotas de ADN de las muestras extraídas, considerando la concentración final (ng/ μ l) de ADN en cada una de ellas: muestras con concentraciones menores de 8 a 20 ng/ μ l se depositaron en nuevos tubos eppendorf sin diluir, mientras que las muestras con concentraciones mayores a 30 ng/ μ l se diluyeron y se depositaron en nuevos tubos para catalogarlas como diluciones de uso.

- 63** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

Figura 6. Cuantificación de ADN a través de espectrofotometría, utilizando el equipo *Nanodrop 2000*.



6.5.2 Marcadores sexuales para la identificación sexual

La identificación molecular del sexo fue realizada por PCR *multiplex* juntando dos regiones nucleares. De esta forma, fue realizada una PCR conteniendo un fragmento del gen SRY del cromosoma Y (responsable de la determinación sexual en mamíferos) y otro fragmento del *Zinc finger* en los cromosomas X y Y (Barragán-Ruiz et al., 2021a).

Las reacciones se realizaron siguiendo el protocolo establecido por Barragán-Ruiz et al., (2021a). Fueron utilizados 0,5 µM de cada primer, 1 unidad (U) de *Taq* polimerasa *Master Mix*, y ~30 ng de ADN genómico para un volumen final de 12 µl de reacción. La amplificación consistió inicialmente en una desnaturalización a 94 °C por 3 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento a 62 °C por 45 s, y extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión adicional a 72 °C por 10 min (Barragán-Ruiz et al., 2021a).

Los productos de PCR obtenidos se observaron en un gel de agarosa en concentración de 2 % teñido con Bromuro de Etidio, y se visualizaron en un fotodocumentador. Para cada PCR se incluyeron controles positivos (individuos con sexo conocido) y negativos (blanco sin muestra de ADN, solo agua). En suma, considerando lo sugerido por Barragán-Ruiz et al., (2021a) cada muestra se amplificó tres veces de manera independiente para confirmar los resultados.

Así, la identificación del sexo de los individuos molecularmente se realizó a partir de la media de visualizaciones y el análisis de las bandas amplificadas (360 pb para Zfx y Zfy) y 180 pb para SRY). En consecuencia, el sexaje de los machos se determinó con la amplificación de las dos bandas o únicamente de la banda correspondiente al gen SRY (180 pb), mientras para las hembras se tomó como referencia la amplificación de la banda ubicada en 360 pb.

6.6 Cobertura de paisaje

Las imágenes satelitales para la construcción de los mapas de cobertura y uso del suelo se obtuvieron del satélite *Landsat 8* a través del portal de libre acceso USGS *earth explorer* (<https://earthexplorer.usgs.gov/>). Estas imágenes se descargaron con menos del 20% de nubosidad, con una resolución de 30m x 30m. Fueron seleccionadas cuatro imágenes satelitales distribuidas en los departamentos de Casanare, Meta y Cundinamarca, siendo estas imágenes las únicas disponibles en las plataformas.

Fue utilizado el software QGIS v. 3.3.2. Lima (QGIS Development Team, 2023) para inicialmente realizar ajustes sobre las imágenes satelitales, ajustes como combinación de bandas y corrección atmosférica. Posteriormente, fue diseñado el polígono de la carretera, diseñador buffer de diferentes rangos tomando como referencia la carretera y considerando el mayor y menor rango de movimiento reportado por Miranda, (2004); Medri y Mourão, (2005); Trovati y Brito (2009); Braga (2010) y Barros-Ohana et al., (2015) para estas especies de osos hormigueros. Así,

fueron delimitadas tres áreas de influencia de 50 km, 20 km y 5 km de radio que posteriormente fueron medidas.

Las capas delimitadas se utilizaron como base para realizar el recorte de los raster a través de la herramienta de extracción en el Qgis para cortar raster por capa de máscara. Una vez preparado los raster, se evaluaron y clasificaron las coberturas del paisaje, y para ello, se utilizó el complemento de clasificación semiautomática (SCP) con su herramienta *Band processing: classification* Qgis. Para esto, inicialmente, este complemento se entrenó manualmente con polígonos para crear un área de entrenamiento (ROI) con el fin de identificar y clasificar automáticamente las coberturas. No obstante, fue necesario crear varios ROI manualmente para mejorar y corregir el resultado de la clasificación.

Sumado a ello, para establecer las macro-clases en el ROI se tuvo en cuenta los parámetros establecidos por el IDEAM (2010). Atendiendo a esto se consideró lo siguiente:

- Zonas urbanas: uso del suelo destinado como centro urbano continuo y discontinuo, zonas industriales, zonas verdes urbanas y instalaciones recreativas (alejadas de las ciudades)
- Cultivos transitorios: áreas ocupadas durante temporadas por cultivos de cereales (arroz y maíz), tubérculos, hortalizas, entre otros.
- Cultivos permanentes: áreas ocupadas por cultivos que se desarrollan por más de un año, ejemplo, cultivos de palma, cítricos, mangos, café, plátano, etc.
- Bosques: áreas naturales constituidas por un tejido continuo, fragmentado, denso o abierto de árboles.
- Pastos: pastos limpios, arbolados o enmalezados
- Áreas abiertas sin o con poca vegetación: áreas con poca o inexistente vegetación producto de suelos expuestos a quemas, degradación antropogénica, deslizamientos o condiciones naturales como coberturas arenosas y afloramientos rocosos.

- Aguas continentales: cauces naturales de ríos, quebradas, lagunas y lagos y cuerpos de agua artificiales como embalses y estanques de acuicultura

6.7 Análisis de datos

6.7.1 Atropellamientos

■ Tasa de mortalidad

Se utilizó el software libre SIRIEMA v 2.0 para analizar estadísticamente la dispersión de los eventos de atropellamiento (Coelho et al., 2014). De esta manera, para establecer la tasa de atropellamiento del total de individuos colectados se utilizó el análisis *Mortality Rate Estimate* del paquete de herramientas de SIRIEMA (Teixeira et al., 2013; Coelho et al., 2014). Este análisis se basa en el modelo Propuesto por Teixeira et al., (2013) (Figura 7).

Figura 7. Modelo matemático para el cálculo de la tasa de atropellamiento.

Fuente: Coelho et al., 2014

$$N = \sum_{i=0}^{n-1} N_i = \lambda T_R p \sum_{i=0}^{n-1} \left(1 - \sum_{j=1}^i e^{-\frac{jT_S}{T_R}} p (1-p)^{j-1} \right)$$

Donde: N es el total de individuos atropellados; p es la capacidad de detección del cuerpo en la vía. Para mamíferos este valor corresponde a 0,59 (Coelho et al., 2014; Rojano y Avila, 2021); TR se ha descrito como el tiempo transcurrido entre la colisión y la desaparición del cadáver. Este valor se obtuvo a partir de la función “Estimar TR” disponible en el software SIRIEMA; TS es el intervalo entre los muestreos realizados, λ es el número de individuos atropellados por día, i es un punto específico en la vía y j es cada evento de colisión.

- 67** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

■ **Hotspots de atropellamiento**

La evaluación de la no aleatoriedad de la distribución espacial de los puntos de atropellamiento se realizó a través de la prueba *Ripley's K-statistic* disponible en el software libre SIRIEMA v 2.0 (Coelho et al., 2014). Para ello, se consideró un radio inicial de 300 metros (debido a área probable de movimiento de las especies), aumentando el radio a 500 metros con un intervalo de confianza del 95% y 1,000 repeticiones (Barragán-Ruiz, 2021b). Por su parte, la prueba *HotSpot 2D* se utilizó para establecer la ubicación de los puntos calientes de accidentalidad de las especies (Teixeira et al., 2013). Así, para el cálculo de estos puntos calientes se consideró un radio de 300 m, un intervalo de confianza del 95 %, y 1,000 repeticiones.

6.7.2 Análisis de proporciones sexuales de los atropellamientos

Para determinar la significancia estadística entre las proporciones de machos y hembras afectados por el atropellamiento en el área de interés y las proporciones esperadas para las dos especies se empleó la prueba χ^2 cuadrado usando el software R v. 3.2.5 (R Development Core Team, 2019). De acuerdo con los datos publicados por Barragán-Ruiz et al., (2021b) y los métodos seguidos por el autor, las proporciones sexuales esperadas para las especies en vida libre sin intervención antrópica fueron 1:1, 2:1 y 3:1, siendo siempre proporción de machos: proporción de hembras.

6.7.3 Cobertura de paisaje

Los porcentajes de área ocupada por cobertura fueron calculados a partir de la herramienta SCP: Reporte de la clasificación disponible en el software QGIS v.

- 68** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

3.3.2. Lima donde este porcentaje se calculó para las zonas de influencia de 50 km, 20 km y 5 km. En suma, la zona de influencia de 5 km se consideró para el análisis del uso del suelo alrededor de los *hotspots*. Estos porcentajes fueron analizados por áreas de influencia, siendo que fueron realizados test de significancia utilizando *test t de student* como método de comparación con $p < 0,05$.

- 69** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

7. Resultados

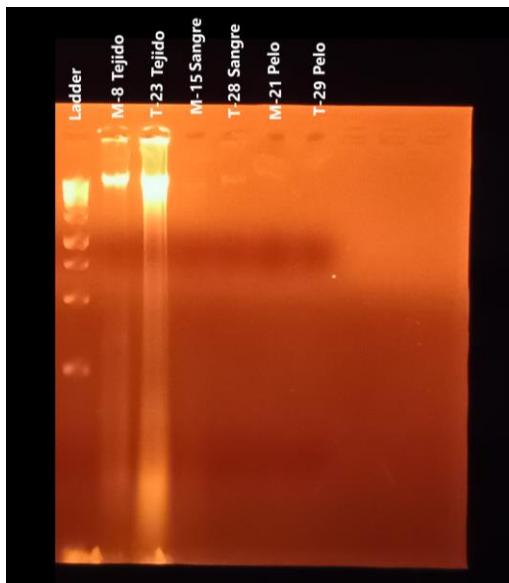
7.1 Datos de atropellamiento e identificación molecular del sexo

Se registró un total de 56 individuos atropellados con una tasa calculada de 0,011 ind/día/km de los cuales 27 corresponden a la especie *M. tridactyla* con una tasa de 0,005 ind/día/km y 29 de *T. tetradactyla* con 0,006 ind/día/km.

7.1.1 Extracción e integridad de ADN genómico

El análisis de calidad e integridad del ADN reveló que las muestras de tejido eran las menos degradadas (Figura 8). Así, los tejidos en *T. tetradactyla* tuvieron un éxito de amplificación del 92% y en *M. tridactyla* un 87%, mientras para las dos especies, aproximadamente el 80% de las muestras de sangre seca se amplificaron, contrastante con muestras como pelo donde el éxito de amplificación fue inferior al 30% en las dos especies.

Figura 8. Integridad del ADN evaluada en gel de agarosa al 2% para las especies *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con tres tipos de muestras: Tejido, Sangre y Pelo.



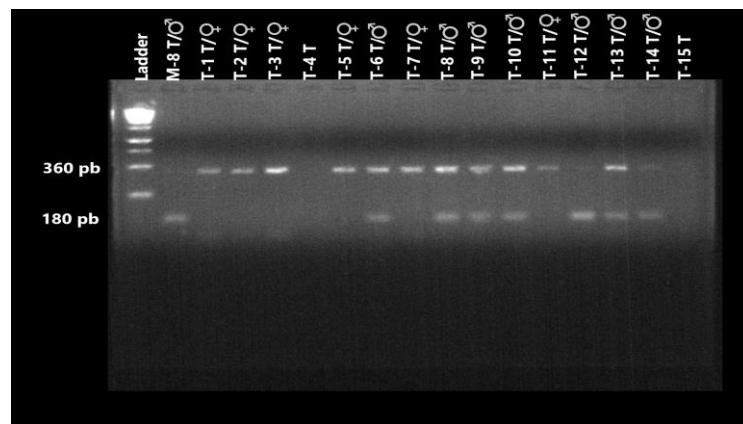
7.1.2 Identificación molecular del sexo

El sexaje fue realizado para 46 especímenes de los 56 colectados, correspondiendo al 82.14 % de los individuos (Tabla 1). Siendo que, a partir del análisis de las bandas amplificadas fue posible sexar el 75 % de los individuos colectados de *M. tridactyla* y 90 % de *T. tetradactyla* (Figura 9).

Tabla 1. Total de muestras biológicas colectadas para cada especie, con sus respectivas asignaciones de sexo. Se muestra el porcentaje de falla (%) al que no fue posible asignar molecularmente el sexo.

Especie	Amplificación		Falla (%)	Total
	Macho	Hembra		
<i>M. tridactyla</i>	14	6	7 (25%)	27
<i>T. tetradactyla</i>	9	17	3 (10%)	29
Total	23	23	10	56

Figura 9. Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de PCR amplificados para los genes en las especies de oso palmero (*Myrmecophaga tridactyla* - M) y oso melero (*Tamandua tetradactyla* - T). Machos exemplificados con dos bandas, hembras con una banda superior. Carril 1: Marcador de peso molecular (Ladder).



Así mismo, el análisis de las 12 muestras de control mostró que en *M. tridactyla* el sexaje molecular coincide con el reportado por el examen morfológico realizado en campo por especialistas, ya que todas las muestras de control se tipificaron correctamente con el sexo. Por su parte, en una muestra de *T.*

- 72** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

tetradactyla se halló una discrepancia entre el reporte molecular y morfológico, pues un individuo sexado morfológicamente como hembra era macho en nuestro análisis.

Igualmente, la caracterización molecular del sexo reveló que la tasa sexual de mortalidad para la especie *M. tridactyla* es 2:1 en una relación macho:hembra, mientras que para *T. tetradactyla* la tasa es 2:1 en la relación hembra:macho. Sin embargo, la proporción encontrada para *M. tridactyla* no es significativamente diferente ($p = 0,6056$) a las proporciones reportadas en la literatura (Tabla 2), contrastante con la proporción de atropellamientos encontrados para la especie *T. tetradactyla* que fue significativamente diferente ($p = 0,00000198$) de las razones 2:1 y 3:1 reportada hasta ahora (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del test Chi cuadrado (χ^2) para la mortalidad de *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* acorde a tres proporciones esperadas. Las proporciones indican una relación macho:hembra. Los valores significativos se señalan en negrita ($p \leq 0.05$).

Especie	Tasas sexuales teóricas									
	1:1 (Desbiez et al., 2020)				2:1 (Alves et al., 2006)				3:1 (Medri y Mourao, 2005)	
	χ^2	df	P	χ^2	df	p	χ^2	df	p	
<i>M. tridactyla</i>	3.2	1	0.073	0.1	1	0.751	0.26	1	0.6056	
<i>T. tetradactyla</i>	2.46	1	0.116	12.01	1	0.00052	22.6	1	1.98E-06	

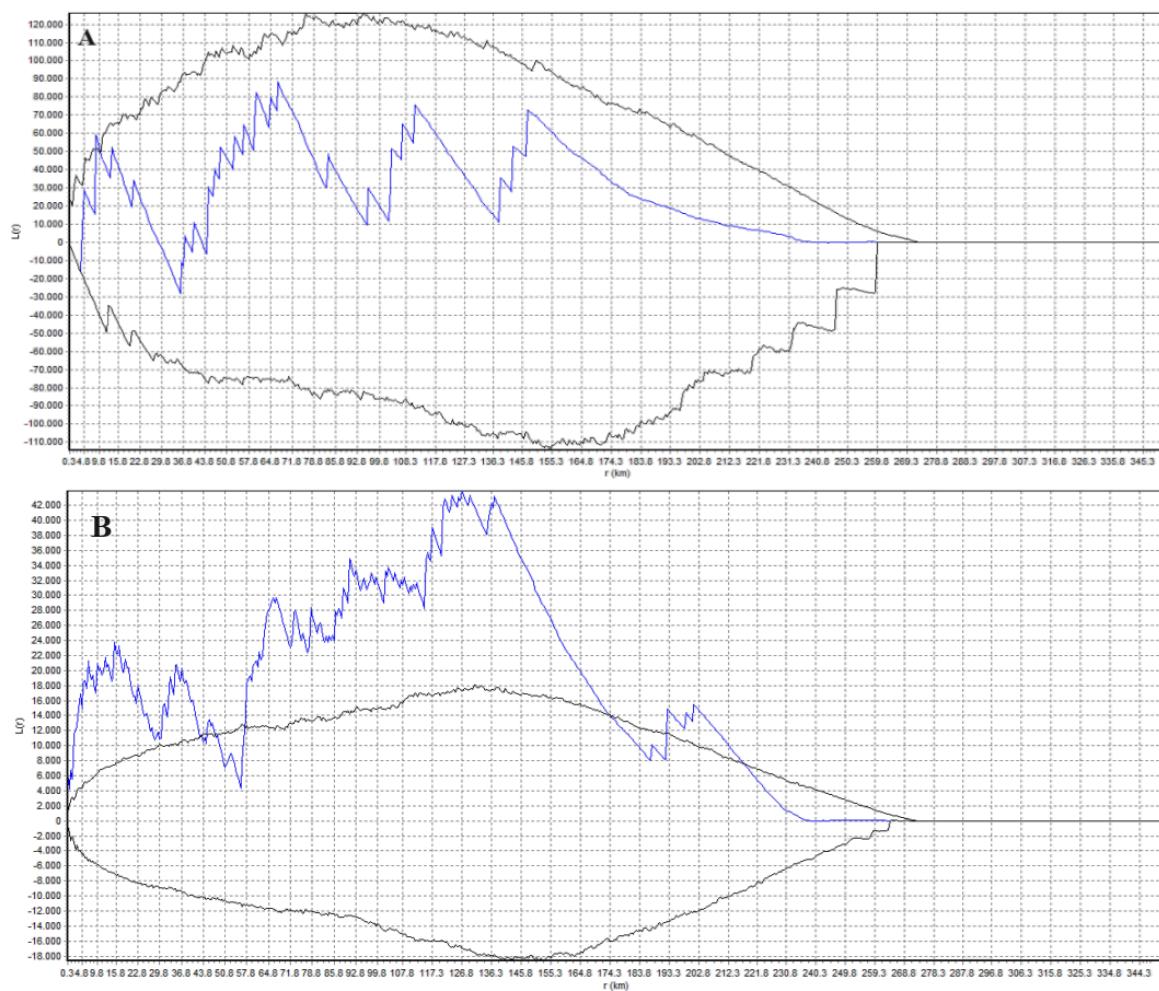
7.2 Puntos calientes y coberturas asociadas a los atropellamientos

A través de la prueba *K Ripley* se encontraron para la especie *T. tetradactyla* bandas de distancias significativas entre los 0,3 km y 49 km y entre las distancias

73 Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia

57 km y 174 km y las distancias 193 km y 216 km. Lo anterior contrasta con el patrón encontrado para *M. tridactyla* donde no se presentaron agregaciones significativas (Figura 10).

Figura 10. Gráfica producto del análisis de la prueba *K Ripley* para la carretera nacional 65. **A.** Análisis correspondiente a la especie *Myrmecophaga tridactyla*; **B.** Análisis para la especie *Tamandua tetradactyla*. En negro se observa los límites de confianza superior e inferior y en azul el valor de la función $L(r)$. Se considera que la significancia existe cuando la función $L(r)$ excede los límites de confianza.



Se identificaron 8 puntos calientes de atropellamiento a lo largo de los 352 km de la carretera nacional 65 (Figura 12). La especie *M. tridactyla* presentó 7 hotspots en los 45 km, 90 km, 172 km, 188 km, 197 km, 242 km y 250 km. Para la especie *T. tetradactyla* se encontró un único punto crítico de atropellamiento entre los 50 km a 60 km (Figura 11)

Figura 11. Hotspots de atropellamiento a lo largo de la carretera 65. El color gris representa a la especie *Myrmecophaga tridactyla* y el rojo a *Tamandua tetradactyla*.

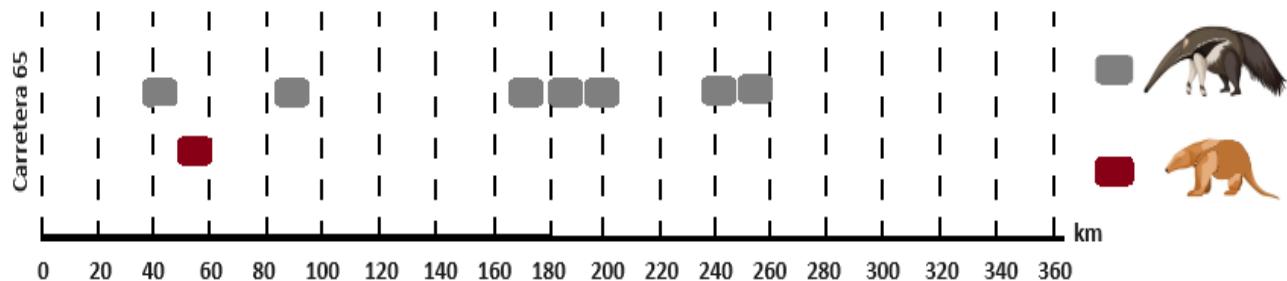
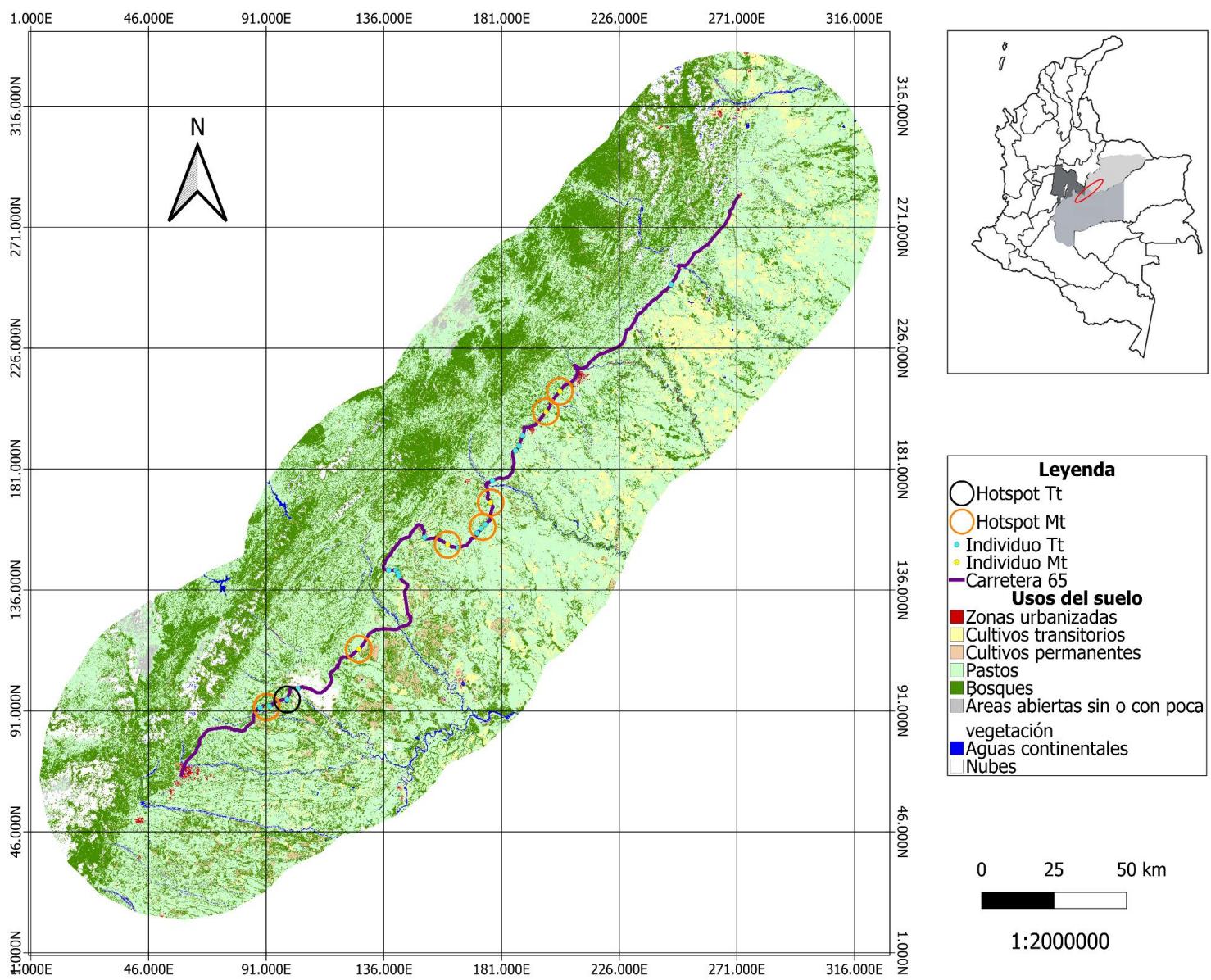


Figura 12. Mapa mostrando las coberturas y uso de suelo según *Corine Land cover* en una escala de proyección de 1:100.000, utilizando imágenes rásteres de píxeles de 30m x 30m. En la figura se muestran los *hotspots* en la carretera que atraviesa a los departamentos de Meta, Cundinamarca y Casanare. **Fuente:** Autor



Se encontró que en los tres *buffers* de 50 km, 20 km y 5 km el paisaje es homogéneo presentando una cobertura de pasto predominante con una variación del 50% al 60%, seguida por coberturas de bosques con una ocupación del 20% al 32% (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje calculado para las diferentes coberturas considerando los *buffers* de 50 km, 20 km y 5 km.

Uso del suelo	Buffers		
	50 km	20 km	5 km
Zonas urbanas	0.3%	0.5%	1.0%
Cultivos transitorios	7%	4.6%	4.8%
Cultivos permanentes	3.3%	4.6%	4.1%
Pastos	55.3%	58.3%	66.0%
Bosques	31.7%	30.0%	21.6%
Áreas abiertas sin o con poca vegetación	1.5%	1.0%	1.3%
Aguas continentales	0.9%	1.0%	1.2%

En suma, alrededor de los *hotspots* de la especie *M. tridactyla* la cobertura de los pastos varió entre el 50% al 82% siendo la cobertura más dominante en todos los *hotspots* de esta especie, seguido de los bosques con una ocupación del 37% al 11% y los cultivos permanentes con el 10% al 1%. En el caso particular del *hotspot*

de *T. tetradactyla* se halló que el pasto predominaba con un 55,3% no obstante, los bosques representaron el 40,2% del uso del suelo en la zona (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje calculado para los diferentes usos de suelo alrededor de los hotspots de las especies *Tamandua tetradactyla* y *Myrmecophaga tridactyla*.

Uso del suelo	<i>Hotspots</i>							
	<i>T. tetradactyla</i>	<i>M. tridactyla</i>						
		57 km	45 km	90 km	172 km	188 km	197 km	242 km
Zonas urbanas	0.1%	0%	0%	0.02%	0.01%	0.02%	0.1%	0.9%
Cultivos transitorios	1.6%	1%	1.3%	1.7%	1.2%	1.7%	3.1%	2.2%
Cultivos permanentes	0.7%	8%	10.3%	3.3%	3.1%	2.9%	1.7%	1.4%
Pastos	55.3%	50%	67.4%	82.2%	82.4%	82.4%	72.4%	73.5%
Bosques	40.2%	37%	20.4%	11.6%	12.9%	11.5%	21.5%	20.1%
Áreas abiertas sin o con poca vegetación	1.9%	2%	0.3%	0.4%	0.4%	0.6%	0.8%	1.4%
Aguas continentales	0.3%	3%	0.1%	0.7%	0%	0.9%	0.4%	0.5%

8. Discusión

A pesar de no conocer las tasas de nacimiento de las especies en la región de la Orinoquia, para *M. tridactyla*, nuestros datos mostraron que no hay diferencias significativas entre los atropellamientos de ambos sexos de la especie, sugiriendo que los atropellamientos se están produciendo de manera aleatoria significando que machos y hembras están muriendo en las mismas cantidades. Sin embargo, al comparar las proporciones encontradas por este estudio con las proporciones de nacimiento establecidas en la literatura para *M. tridactyla* (1.5:1; 2:1; 2,5:1 Medri y Mourao, 2005; Alves et al., 2006; de Freitas et al., 2015, respectivamente) e inexistentes para *T. tetradactyla* (Barros-Ohana et al., 2015) encontramos que solo para *T. tetradactyla* las hembras mueren en mayor proporción (1:2) trayendo consecuencias irreversibles para las poblaciones de esta especie.

Por otro lado, las tasas de atropellamiento encontradas para las especies *M. tridactyla* y *T. tetradactyla* en este estudio, fueron comparadas por las encontradas en la región en el año 2019 por Holguín-Contrera (2019), mostrando que el número de atropellamientos se han mantenido en las mismas proporciones. Esto es una evidencia que las consecuencias ecológicas resultantes al perder individuos por atropellamiento en los tramos estudiados están siendo acumuladas en las poblaciones de osos hormigueros en Colombia. Así, algunas de las explicaciones posibles para nuestros datos, podría inicialmente deberse a que los comportamientos de estas especies están modelados por variables como la temperatura, edad, características del hábitat, disponibilidad de recursos (alimento/refugio), estacionalidad, sexo y condiciones individuales (Rojano et al., 2015a; Muñoz-Vargas, 2022).

Comportamientos de dispersión, por ejemplo, suelen no ser iguales entre machos y hembras (Cockburn et al., 2002; Li y Kokko, 2019) en algunos mamíferos, haciendo que uno de los sexos se torne más vulnerable ante los impactos de las

carreteras (Moore et al., 2023) debido a que termina haciendo mayor uso de estas. En osos hormigueros colombianos, por ejemplo, las hembras poseen un área de vida menor que los machos de la especie (Di blanco, 2015; Rojano et al., 2015a) debido a que el desplazamiento de ellas depende principalmente de la disponibilidad de alimentos y recursos para sus crías. Por otro lado, para los machos, este comportamiento se asocia con la disponibilidad de hembras (suceso reproductivo) haciendo que estos recorren extensas áreas con el propósito de aumentar la tasa de encuentro y marcar territorio (Muñoz-Vargas, 2022) y, por lo tanto, haciendo de estos individuos vulnerables a las colisiones.

Con eso, nuestros datos reafirman algunas hipótesis levantadas por Desbiez et al., (2020) y Noonan et al., (2022), que destacan que la perdida de machos debido a los atropellamientos dentro de una población tiene menor impacto que la perdida de hembras, ya que el sexo limitante para el crecimiento de la población y la reproducción es el femenino. No obstante, es importante resaltar que la alta mortalidad de los machos en una región puede tener con el tiempo efectos genéticos deletéreos que pueden poner en peligro la persistencia de la población (Noonan et al., 2022). Sumado a ello, Moore et al., (2023) destaca que la mortalidad de hembras, aunque sea baja, pero constante, puede conducir a un escenario catastrófico dentro de las poblaciones.

Lo anterior debido a que se reduce el suceso de fecundidad de las poblaciones generando fenómenos biológicos como el efecto Allee o efecto botella, en el que los individuos no se reproducen al no encontrarse con más individuos y en donde sus poblaciones disminuyen su tamaño efectivo poblacional. Igualmente, debe destacarse que la pérdida repentina de hembras en una población puede generar alteraciones en la dinámica del cuidado parental, lo que aumenta la probabilidad de muerte por inanición de sus crías (Moore et al., 2023).

Así, aunque el evento de atropellamiento no necesariamente implique la extirpación de una población local en un lapso corto, este fenómeno si puede alterar su capacidad de supervivencia al causar pérdida de la capacidad de resiliencia y

resistencia de la población para enfrentar otros tipos de amenazas antropogénicas como fragmentación, incendios, contaminación con agroquímicos, encuentros con animales domésticos o enfermedades (Desbiez et al., 2020).

Igualmente, nuestro análisis sobre la distribución de los atropellamientos, en el cual se identifican además algunos puntos *hotspots*, mostró que las coberturas podrían tener algún efecto sobre el movimiento de los individuos y con ello el atropellamiento. Al igual que en nuestros resultados para la especie *T. tetradactyla* Cirino et al., (2022) encontraron que el riesgo de atropellamiento es mayor en la presencia de áreas abiertas como sabanas, incluso, este riesgo incrementa con el desarrollo de la agricultura. Partiendo de ello, los autores explican que este hallazgo se debe al movimiento de los individuos y su relación con los bosques, pues, la especie *T. tetradactyla* mantiene una estrecha relación con las coberturas boscosas debido a las necesidades de refugio térmico y la alta disponibilidad de oferta alimenticia en hormiga y termitas (Hayssen, 2011), por tanto, con la reducción de la conectividad producto de la transformación antropogénica (Cirino et al., 2022) se puede generar una mayor mortalidad (Clevenger y Wierzchowsk, 2006) ya que cuando en el entorno predominan las áreas abiertas, sabanas y monocultivos y carece de bosques densos y continuos para que los individuos se muevan a través de las copas de los árboles, estos tienen que desplazarse por vía terrestre, lo que genera un mayor riesgo de atropellamiento (Cirino et al., 2022).

En los últimos años, los agroecosistemas de la Orinoquia colombiana han incrementado su extensión ocasionando fuertes cambios en las coberturas originales de la región (Prüssmann et al., 2020). En el *hotspot* hallado para esta especie, el 60% de las coberturas corresponden a pastos, áreas sin vegetación y áreas de cultivos. Así, teniendo en cuenta nuestros resultados y lo reportado en la literatura, consideramos la hipótesis de que el aumento de zonas fragmentadas y de poca vegetación posiblemente han tenido un impacto en esta especie.

Este panorama también fue reportado para *M. tridactyla* en biomas de Cerrado brasileños, en donde las coberturas vegetales abiertas (pastos y sabanas)

albergan altas cifras de atropellamiento para los osos hormigueros de la zona (Ascensão et al., 2017). Así, se ha reportado que cuando el porcentaje de bosque es bajo, el efecto del pasto es positivo para predecir el atropello (Cirino et al., 2022) debido a que los individuos atraviesan más veces las carreteras en busca de sombra y alimento (Ohana et al., 2015; Rojano et al., 2015c; Holguín-Contrera, 2019; Cirino et al., 2022) y terminan siendo atropellados.

Nuestra tasa de éxito promedio para la asignación del sexo, utilizando material biológico colectado de individuos atropellados fue 84,8%, porcentaje reportado en otras investigaciones con individuos atropellados del grupo Xenarthras en Latinoamérica (Barragán-Ruiz et al., 2021a). En el caso particular de tejidos no invasivos como pelo, heces y tejidos de individuos en estado de descomposición, suele recuperarse poco ADN con calidad y cantidad baja (Bengtsson et al., 2012). Por otro lado, la discrepancia hallada entre el reporte de sexaje morfológico y molecular de una muestra de *T. tetradactyla*, resalta que este tipo de errores ocurren más frecuentemente en campo, dado que la identificación morfológica del sexo para estas especies es difícil. Lo anterior, debido a la ausencia de dimorfismo sexual de los individuos, la cual hace que la única forma de identificación sea por palpación o ultrasonido (Cots et al., 2019). Así, nuestro estudio refuerza la importancia del uso de las herramientas para el estudio de estas especies.

9. Conclusión

La técnica de PCR múltiplex es una herramienta altamente eficiente en la identificación molecular del sexo de especies sin dimorfismo sexual, siendo que, los resultados de esta investigación respaldan de manera contundente la viabilidad y precisión de este método para especies como *M. tridactyla* y *T. tetradactyla*. De esta manera, este estudio representa un avance importante en la investigación colombiana del orden Xenarthra al emplear por primera vez herramientas moleculares para establecer las proporciones sexuales de estas especies en el escenario de la colisión con vehículos.

Por otro lado, se reconoce que en el transecto de la carretera nacional 65 que atraviesa a los departamentos de Casanare, Cundinamarca y Meta, el tráfico vehicular ejerce una presión sobre las especies estudiadas debido que se identificaron 8 puntos de atropellamiento. Adicionalmente, se ha hallado una relación directa entre los atropellamientos y las coberturas abiertas como pastos de uso agrícola y sabanas. No obstante, debe destacarse que el efecto de este tipo de coberturas parece ser mayor sobre la especie *M. tridactyla* ya que *T. tetradactyla* presenta mayor registro de mortalidad en un transecto con alto porcentaje de bosques. Esta asociación se vincula con la disponibilidad de recursos alimenticios, la conectividad y la baja oferta de refugios térmicos en el área. Con ello, se resalta la importancia de comprender cómo la presencia de estos recursos influye en la frecuencia de los atropellamientos.

Finalmente, se encuentra que la diferencia en la distribución de atropellamientos entre las dos especies estudiadas, con un predominio de hembras en *T. tetradactyla* y machos en *M. tridactyla*, implica una diferencia importante que debe considerarse en la viabilidad poblacional de las especies. Así, estos resultados exponen la urgencia de seguir implementando medidas de conservación en la zona y complementar las existentes por medio de estrategias efectivas como la

- 83** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

instalación y adecuación de pasos de fauna, estructuras de señalización, mantenimiento de los parches de bosque, cercado del área, entre otras.

Por otro lado, considerando el alcance y los beneficios potenciales de las herramientas moleculares, es importante que éstas integren y complementen las investigaciones alrededor de las medidas de conservación y los efectos de las colisiones, pues, la capacidad de estas herramientas para proporcionar información no puede pasarse por alto, ya que, su uso significa un paso relevante dentro del estudio de carreteras y conservación colombiana.

10. Implicaciones para la conservación

Es importante resaltar que este estudio hace evidente que el uso de herramientas moleculares representa una solución para contrarrestar el desconocimiento alrededor de datos específicos como el sexo para especies no dimórficas. Así, al considerar el impacto de los resultados encontrados en esta investigación, es evidente que los atropellamientos son un campo poco estudiado en nuestro país, conclusiones expuestas por varios investigadores que explican que los efectos de la mortalidad en carreteras necesitan más conocimiento básico sobre la ecología, los hábitats, las interacciones entre los organismos y el estado actual de los ecosistemas (García-López y García-Peluffo, 2022)

Los pasos de fauna son infraestructuras vitales para mitigar la mortalidad de los animales en la carretera al conectar áreas de bosque (Denneboom et al., 2021). Según Garzon-Rincon (2022) desde el 2020 a 2022 en la vía Villavicencio-Yopal se han instalado 18 pasos de fauna aéreos construidos en puntos estratégicos para el cruce de mamíferos arborícolas. Durante el monitoreo de la efectividad de algunos de estos pasos de fauna con cámaras trampas se encontró que eran activamente utilizados por especies como mono tití (*Saimiri cassiquiarensis*), chucha roja (*Caluromys lanatus*), chucha común (*Didelphis marsupialis*) y rata de bambú (*Dactylomys dactylinus*) (Garzon-Rincon, 2022). El paso de fauna CTCV08 (4°21'20.30"N y 73°18'42.87"O) ubicado entre Cumaryl-Paratebueno coincide con nuestra área de mayor mortalidad por atropellamiento para *T. tetradactyla* (*hotpots*-kilómetro 57). Atendiendo a lo anterior, destacamos la importancia de desarrollar a futuro un seguimiento de esta infraestructura para evaluar su uso por estas especies, no obstante, un reporte reciente de Covioriente expone que en la vía de estudio (se desconoce su ubicación) el oso melero usa estas infraestructuras para cruzar (Covioriente, 2023).

Igualmente, se ha informado que *M. tridactyla* utiliza activamente los pasos de fauna subterráneos en el área de estudio (Nieto, 2023). Cabe destacar que la ubicación de los cuatro pasos de fauna reportados por Nieto (2023), no coinciden con nuestras zonas de *hotspot* para esta especie, lo cual evidencia que son estrategias positivas en el área de influencia ya que están mitigando en puntos específicos el efecto de las carreteras sobre esta especie.

Considerando todo esto y basados en nuestros resultados, sugerimos que las estrategias existentes de pasos de fauna en la vía de estudio se complementen con otras medidas aplicadas a estas especies en otros escenarios de latinoamerica para así lograr disminuir el impacto de estas infraestructuras sobre estos organismos en la región.

Partiendo de ello, se encuentra que algunos enfoques de mitigación dirigidos a especies con tasas de reproducción bajas y altas tasas de atropellamiento (sea el caso de nuestras especies de estudio) buscan complementar las acciones a través de vallas (señales de alto, límites de velocidad o señales de cruce de fauna) a lo largo de las carreteras ya que se considera como una estrategia eficaz (Noonan et al., 2022; Patterson, 2023), por lo que, basados en su efectividad, sugerimos el uso de estos elementos en las zonas identificadas como puntos calientes a lo largo del transecto de estudio.

Igualmente, proponemos la aplicación de estrategias enfocadas en el acondicionamiento con elementos que dependiendo de la biología de las especies pueden restringir o facilitar su paso en las zonas con mayor accidentalidad. Lo anterior, basados en que con los osos hormigueros, se ha encontrado efectividad en este tipo de estrategias, pues, Spanowicz, et al., (2020); Ascensao et al., (2021) y Noonan et al., (2022) resaltan que cercar las áreas aledañas a carreteras reduce significativamente la probabilidad de atropellamientos, ya que se separa el tráfico de los vehículos con el de los organismos. Sumado a ello, Ordoñez-Cruz (2021) propone que acondicionar los pasos de fauna aéreo con especies arbóreas de rápido crecimiento es una estrategia efectiva ya que se provee cobertura en los

bordes de estas infraestructuras, lo que disminuye la fragmentación y mejora la conectividad, generando que la fauna use estos sistemas (sea el caso de la especie *T. tetradactyla*), sin embargo, el éxito de este tipo de diseños también depende de estrategias como señalización, reductores de velocidad, cercado, educación ambiental y concientización.

Adicionalmente, atendiendo al alto registro de mortalidad asociado con coberturas abiertas otra estrategia de conservación que proponemos a largo plazo es el mantenimiento de los parches de hábitat como bosques ribereños o fragmentos de vegetación nativa dentro de la matriz del paisaje para que las especies puedan acceder más fácilmente a recursos fundamentales como la sombra. Esta propuesta surge al considerar las características y necesidades fisiológicas de estas especies, siendo que autores como Metzger, (2010) y Cirino et al., (2022) plantean que de aplicarse puede ser exitosa con estos individuos. Así mismo, sugerimos implementar iniciativas como la de De Freitas et al., (2015) en la que encontraron que la gestión de los bordes de la carretera puede ser beneficiosa ya que se corta y elimina los nidos de hormigas que pueden representar para estas especies recursos atrayentes hacia las carreteras.

11. Bibliografía

- Adárraga-Caballero, M. A., & Gutiérrez-Moreno, L. C. (2019). Mortalidad de vertebrados silvestres en la carretera troncal del Caribe, Magdalena, Colombia. *Biota colombiana*, 20(1), 106-119.
- Agencia Nacional de Infraestructura (2015). Contrato de concesión bajo el esquema de app n° 10 23 julio 2015. Ministerio de transporte. Agencia Nacional de Infraestructura (ANI).
https://www.ani.gov.co/sites/default/files/hiring/6439/2577/otrosi_no_1_policia_de_carreteras_version_final_0.pdf
- Agudelo, C. A. R., & Cortes-Gómez, A. M. (2021). Sustainable behaviors, prosocial behaviors, and religiosity in Colombia. A first empirical assessment. *Environmental Challenges*, 4, 100088. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.ENVC.2021.100088>
- Aguilera, F. (2010). Aplicación de métricas de ecología del paisaje para el análisis de patrones de ocupación urbana en el Área Metropolitana de Granada. *Anales de Geografía*, vol. 30 (2), 9-29. Universidad Complutense de Madrid.
- Ait-Belkacem, I., Mossadegh-keller, N., Bourgoin, P., Arnoux, I., Loosveld, M., Morange, P. E., ... & Malergue, F. (2021). Cell analysis from dried blood spots: new opportunities in immunology, hematology, and infectious diseases. *Advanced Science*, 8(18), 2100323. DOI: <https://doi.org/10.1002/advs.202100323>
- Alberico, M. S., Cadena, A., Hernández-Camacho, J & Muñoz-Saba, Y. (2000). Mamíferos (Synapsida: Theria) de Colombia. *Biota Colombiana*, 1(1): 43–75.
- Alberts, C. C., Ribeiro-Paes, J. T., Aranda-Silverio, G., Cursino-Santos, J. R., Moreno-Cotulio, V. R., Oliveira, A. L. D., ... & Souza, E. B. D. (2010). DNA extraction from hair shafts of wild Brazilian felids and canids. *Genetics and Molecular Research*, 9(4): 2429-2435.

- Alves, C., Constança de Sampaio E. Paiva & Mourao, G. D. M. (2006). Responses of a specialized insectivorous mammal (*Myrmecophaga tridactyla*) to variation in ambient temperature 1. *Biotropica: The Journal of Biology and Conservation*, 38(1), 52-56.
- Alves da Rosa, C., Hobus, Q & Bager, A. (2010). Mammalia, Pilosa, Myrmecophagidae, *Tamandua tetradactyla* (Linnaeus, 1758): Distribution extension. *Check List*, 6(1): 52–53.
- Alzate-Gaviria, M., González-Maya, J. F & Botero-Botero, A. (2016). Distribución geográfica y estado de conocimiento de las especies del género *Tamandua* (Xenarthra: Myrmecophagidae) en Colombia. *Edentata*, 17(17): 8-16. DOI:doi:10.2305/IUCN.CH.2016.EDENTATA-17-1.3.en
- Ameneiros, A., Aristimuño, M., Artecona, F., Calvo, C., Elgue, E., González, E., ... & Mautone, J. (2015). Distribución del Magnaorden Xenarthra en Uruguay en base a registros bibliográficos y de colecciones. *Edentata*, 16, 21-27.
- Andrade., M. G. (2011). Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales*, 35(137), 491–508. DOI:[https://doi.org/10.18257/raccefyn.35\(137\).2011.2424](https://doi.org/10.18257/raccefyn.35(137).2011.2424)
- Andrade G. I., Chaves, M., Corzo, G., & Tapia, C. (eds.). (2018). Transiciones socioecológicas hacia la sostenibilidad. Gestión de la biodiversidad en los procesos de cambio en el territorio continental colombiano. Primera aproximación. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 220 p.
- Andrew, R.L., Bernatchez, L., Bonin, A., Buerkle, C.A., Carstens, B.C., Emerson, B.C., ... & Rieserberg, L.H. (2013). A road map for molecular ecology. *Molecular Ecology*, 22(10), pp. 2605-2626
- Arana-Rivera, J. S., Gutiérrez-Quintero, S & Alvarez, Natalia (2022). Analysis of Wildlife Roadkill in a Road Circuit. Case study of a Colombian road in the Department of Huila: Neiva-Rivera-Campoalegre. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 26(1), 55-71.

- 89** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

- Ardicli, S. (2021). Sex Determination in Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) Using PCR Amplification. *PROCEEDINGS BOOK*, 65.
- Arias C.N & Huanca L.W. (2009). Un método para el sexaje por ADN de alpaca amplificando el gen SRY mediante PCR. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 20(2), 203-207.
- Arroyave, M. P., Gómez, C., Gutiérrez, M. E., Múnera, D. P., Zapata, P. A., Vergara, I. C., Andrade, L. M, & Ramos, K. C (2006). IMPACTOS DE LAS CARRETERAS SOBRE LA FAUNA SILVESTRE Y SUS PRINCIPALES MEDIDAS DE MANEJO. *Revista EIA*, (5), 45-57.
- Ascensão, F., Desbiez, A. L., Medici, E. P., & Bager, A. (2017). Spatial patterns of road mortality of medium–large mammals in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Wildlife Research*, 44(2), 135-146.
- Ascensão, F., Kindel, A., Teixeira, F. Z., Barrientos, R., D'Amico, M., Borda-de-Água, L., & Pereira, H. M. (2019). Beware that the lack of wildlife mortality records can mask a serious impact of linear infrastructures. *Global Ecology and Conservation*, 19, e00661.
- Ascensão, F., Yogui, D. R., Alves, M. H., Alves, A. C., Abra, F., & Desbiez, A. L. (2021). Preventing wildlife roadkill can offset mitigation investments in short-medium term. *Biological Conservation*, 253, 108902.
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108902>
- Ascensão, F., & Desbiez, A. L. (2022). Assessing the impact of roadkill on the persistence of wildlife populations: A case study on the giant anteater. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 20(3), 272-278.
- Astwood, J. A., Reyes, M. C., Rincón, M. T., Pachón, J., Eslava, P. R., & Parra, C. A. (2018). Mortalidad de reptiles en carreteras del piedemonte de los llanos orientales colombianos. *Caldasia*, 40(2), 321-334.
- Aznar-Cormano, L., Bonnald, J., Krief, S. Guma, N & Debruyne, R. (2021). Molecular sexing of degraded DNA from elephants and mammoths: a genotyping assay

- 90** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

relevant both to conservation biology and to paleogenetics. *Informe científico*, 11 , 7227 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86010-x>

Bager, A., & Fontoura, V. (2013). Evaluation of the effectiveness of a wildlife roadkill mitigation system in wetland habitat. *Ecological Engineering*, 53, 31-38. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.01.006>

Bager, A., Lucas, P. d. S., Bourscheit, A., Kuczach, A., & Maia, B. (2016). Os caminhos da conservação da biodiversidade brasileira frente aos Impactos da Infraestrutura viária. *Biodiversidade Brasileira*, 6(1), 75-86

Barber, JR., Burdett, CL., Reed, SE., Warner, KA., Formichella, C., Crooks, KR., Theobald, DM & Fistrup, KM. (2011). Exposición al ruido antropogénico en áreas naturales protegidas: estimación de la escala de las consecuencias ecológicas. *Landsc Ecol* 26(9):1281. DOI:<https://doi.org/10.1007/s10980-011-9646-7>

Barragán-Ruiz, C. E. (2020). Sexagem molecular em Xenarthras, avaliação espacial-temporal de atropelamentos em tamanduás e diversidade genética em *Myrmecophaga tridactyla*: implicações para conservação. [Tesis doctoral]. Universidade Federal de São Carlos.

Barragán-Ruiz, C. E., Paviotti-Fischer, E., Rodríguez-Castro, K. G., Desbiez, A. L., & Galetti Jr, P. M. (2021a). Molecular sexing of Xenarthra: a tool for genetic and ecological studies. *Conservation Genetics Resources*, 13, 41-45.

Barragán-Ruiz, C. E., Gestich, C., Desbiez, A.J.L & Galetti, P (2021b). How do Temporal and Spatial Features Affect Anteater Roadkill in Brazil?.

Barrientos, R., Ascensão, F., D'Amico, M., Grilo, C. & Pereira, HM (2021). The Lost Road: Are Transportation Networks Endangering Wildlife Population Persistence?. *Perspectivas en Ecología y Conservación*, 19 (4), 411-416. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.07.004>

Barros-Ohana, J.A., Bertassoni, A., Miranda, F.R., De Miranda-Mourão, G., Braga de Miranda,G.H., Ferreira-Costa,J., Moreira da Silva, K.F., Faria-Corrêa, M.A & da Silva-Belentani, S.C.(2015). Avaliação do Risco de Extinção de Tamandua

- 91** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

tetradactyla (Linnaeus, 1758) no Brasil. Série Estado de Conservação da Fauna Brasileira - Nº 2. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

Basso, A. (2021). Morfología funcional del oído medio en armadillos (Mammalia, Xenarthra, Cingulata): implicancias en la adaptación al hábito fosorial. [Tesis doctoral, Universidad Nacional Del Sur]. Determinación de sexo en chigüiro (*Hydrochoerus hydrochaeris*) mediante herramientas moleculares: Posibles usos forenses Nacional del Sur.
<https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/5888>

Bastidas, M., Ospina, L., Rao, I.M., Montoya, A., Villegas, DM., Sotelo, M., ... & Arango, J. (2023). Sistemas innovadores de siembra de *Urochloa humidicola* mediante estolones – un caso exitoso en la altillanura colombiana. Manual Técnico - Volumen 1. Publicación CIAT No. 545. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 24 p. <https://hdl.handle.net/10568/126708>

Benavides, J., Cárdenas, C., & Prieto, J. L. (2015). Plan Maestro de Transporte Intermodal (PMTI) 2015-2035: Infraestructura para el comercio exterior, el desarrollo regional y la integración del territorio. FEDESARROLLO.

Bengtsson, C. F., Olsen, M. E., Brandt, L. Ø., Bertelsen, M. F., Willerslev, E., Tobin, D. J., Wilson, A & Gilbert, M. T. P. (2012). DNA from keratinous tissue. Part I: hair and nail. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 194(1), 17-25.

Bennett, VJ (2017). Efectos de la densidad y el patrón de las carreteras en la conservación de las especies y la biodiversidad. *Curr Landscape Ecol Rep* 2 , 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40823-017-0020-6>

Bento, H., Rosa, J., Morgado, T., Granjeiro, M., Bianchini, M., Iglesias, G., Dutra, V. Nakazato, L & Paz, R. (2019). Sexagem em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) por meio do teste da reação em cadeia da polimerase. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 71(2), 538- 544.

Bermúdez, J.E. (2019). IDENTIFICACIÓN DE PUNTOS CALIENTES DE ACCIDENTALIDAD VIAL EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ PARA EL PRIMER SEMESTRE DE 2018. [Trabajo de grado profesional, universidad Militar Nueva

Granada]. Repositorio institucional universidad Militar Nueva Granada.
<http://hdl.handle.net/10654/20856>

Bertassoni, A & Ribeiro, M. (2019). Space use by the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*): a review and key directions for future research. *European Journal of Wildlife Research*. Pp 65- 93.

Bliss-Ketchum, L. L., de Rivera, C. E., Turner, B. C., & Weisbaum, D. M. (2016). The effect of artificial light on wildlife use of a passage structure. *Biological conservation*, 199, 25-28. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2016.04.025>

Boal, D. (2012). Células y tejidos animales. En *Mecánica de la Célula* (págs. 525-530). Cambridge: Prensa de la Universidad de Cambridge.
DOI:<https://doi.org/10.1017/CBO9781139022217.019>

Bonfanti, F & Sánchez, M. (2019). Dinámica de la deforestación en el noroeste del chaco entre 1995 y 2018. *Boletín Geográfico.*, 41(1), 29–49.

Botero, M., Montilla, S. O., & Mantilla-Meluk, H. (2021). ESTABILIDAD ESPACIAL COMO PREDICTOR DE RIQUEZA DE MAMÍFEROS EN ISLAS FLUVIALES DE LA ORINOQUÍA. *Mastozoología Neotropical.*, 28(2), 629

Braga, F. G. (2010). Ecologia e comportamento de tamanduá-bandeira *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758 no município de Jaguariaíva, Paraná. [Tesis doctoral, Universidade Federal do Paraná]. Repositorio nacional de la universidad federal de Paraná. <http://hdl.handle.net/1884/24958>

Byrne, M (2018). A molecular journey in conservation genetics. *Pacific Conservation Biology* 24 , 235-243. DOI: <https://doi.org/10.1071/PC18025>

Calderón-Caro, J., & Benavides, A. M. (2022). Deforestación y fragmentación en las áreas más biodiversas de la Cordillera Occidental de Antioquia (Colombia). *Biota colombiana*, 23(1). DOI: <https://doi.org/10.21068/2539200x.942>

Cardinale, B. J., Duffy, J. E., Gonzalez, A., Hooper, D. U., Perrings, C., Venail, P., ... & Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401): 59-67. DOI: [doi:10.1038/nature11148](https://doi.org/10.1038/nature11148)

- Carvajal, V. A. (2013). Atropello de mamíferos silvestres: En la ruta de acceso al cantón de Librería, Guanacaste, Costa Rica. *Revista Ventana*, 7(1): 12-14
- Casali, D. M., & Perini, F. A. (2017). The evolution of hyoid apparatus in Xenarthra (Mammalia: Eutheria). *Historical Biology*, 29(6), 777-788. DOI:<https://doi.org/10.1080/08912963.2016.1241248>
- Casali, D. M., Martins-Santos, E., Santos, A. L., Miranda, F. R., Mahecha, G. A., & Perini, F. A. (2017). Morphology of the tongue of Vermilingua (Xenarthra: Pilosa) and evolutionary considerations. *Journal of Morphology*, 278(10), 1380-1399. DOI:<https://doi.org/10.1002/jmor.20718>
- Caselli-Schrader, C. S. (2013). Sexaje molecular a partir de heces en osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*). [Trabajo de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
- Caspa, N. (2022). Historia de las carreteras del Ecuador, 1930-1960: Infraestructura y políticas de transportes. *Revista Uruguaya de Historia Económica*, 22(XXII), 10-32.
- Castillo, J. C., Urmendez, D., & Zambrano, G. (2015). Mortalidad de fauna por atropello vehicular en un sector de la Vía Panamericana entre Popayán y Patía. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 19(2), 207-219. DOI:<https://doi.org/10.17151/bccm.2015.19.2.12>
- Castillo-Figueroa, D., Martínez-Medina, D., Rodríguez-Posada, M., y Bernal-Vergara, S. (2019). Structural differences in mammal assemblages between savanna ecosystems of the Colombian Llanos. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 59, 1-11. DOI:<https://doi.org/10.11606/1807-0205/2019.59.14>
- Cauich, H. F. D. (2021). *Efecto de la contaminación lumínica y acústica en la polinización de Ceiba pentandra* [Tesis para maestría, Instituto Politécnico Nacional].
- Cervantes, F. A., Acosta, C. A., & Morales, R. A. A. (2009). Identificación molecular del sexo utilizando ADN fecal y la conservación del conejo zacatuche (Romerolagus diazi). Aportaciones al conocimiento y conservación de los mamíferos mexicanos. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 309-316

- Cervantes-Huerta, R., & Durán-Antonio, J. (2022). Seasonal variation of mammal roadkill hotspots in the Sierra Madre Occidental, México. *Therya Notes*, 3(2), 70-74. DOI:https://doi.org/10.12933/therya_notes-22-73
- Chaves, I. A. (2023). Herramienta de la jerarquía de la mitigación aplicada en la prevención del atropellamiento de fauna silvestre en Colombia. [Tesis para maestría, Institución universitaria ITM].
- Chirinos, Z., Contreras, G., Zambrano, S., Molero, E., & Páez, A. (2011). Caracterización del dimorfismo sexual en ganado criollo limonero mediante medidas corporales. *Rev. Fac. Agron.(UCV)*, 28(1), 554-564.
- Cirino, D. W., Lupinetti-Cunha, A., Freitas, C. H., & de Freitas, S. R. (2022). Do the roadkills of different mammal species respond the same way to habitat and matrix?. *Nature Conservation-Bulgaria*, 47, 65-85. DOI: <https://doi.org/10.3897/natureconservation.47.73010>
- Clevenger, A. P., & Wierzchowski, J. (2006). Maintaining and restoring connectivity in landscapes fragmented by roads. *CONSERVATION BIOLOGY SERIES-CAMBRIDGE*, 14, 502.
- Cockburn, A., Legge, S., & Double, M. C. (2002). Sex ratios in birds and mammals: can the hypotheses be disentangled. *Sex ratios: concepts and research methods*. Cambridge University Press, 266, 266-286. DOI:<https://doi.org/10.1017/CBO9780511542053.014>
- Coffin, A. W. (2007). From roadkill to road ecology: A review of the ecological effects of roads. *Journal of Transport Geography*, 15(5), 396-406. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jtrangeo.2006.11.006>
- Coitiño-Banquero, H. I. (2019). Efectos de las carreteras en el paisaje y la distribución de medianos y grandes mamíferos en Uruguay. [Tesis para maestría, Universidad de la república de Uruguay].
- Colorado-Garzon, F. A., Matta Camacho, N. E., & Sánchez, A. (2012). Sex-Determination systems and their evolution: Mammals. *Acta Biológica Colombiana*, 17(1), 3-18.

- Colorado-Garzón, F. A. (2010). Determinación de sexo en chigüiro (*Hydrochoerus hydrochaeris*) mediante herramientas moleculares: Posibles usos forenses. [Tesis para maestría, Universidad nacional de colombia]. Repositorio universidad nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11250>
- Colorado-Jiménez, A. M., Sarmiento-Bolívar, L. C., & Yepes-Cuervo, L. C. (2015). Autopista para la prosperidad desarrollo vial en Antioquia. Institución universitaria esumer.
- Contreras, M. (2016). SABANAS INUNDABLES, CULTURA LLANERA Y CONSERVACIÓN. UNA APROXIMACIÓN AL ANÁLISIS DE LA RELACIÓN SER HUMANO NATURALEZA EN LOS LLANOS DE ARAUCA. [Tesis para maestría, Universidad de los Llanos]. Repositorio universidad de los Llanos. <https://repositorio.unillanos.edu.co/handle/001/1200>
- Correa, C.A., Mendoza, M. E., & López, E. (2014). Análisis del cambio en la conectividad estructural del paisaje (1975-2008) de la cuenca del lago Cuitzeo, Michoacán, México. *Revista de geografía Norte Grande*, (59), 7-23. DOI:<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34022014000300002>
- Correa, H., Rioz, S & Arévalo, L. (2005). Plan de Acción de Biodiversidad de la Cuenca del Orinoco-Colombia 2005-2015. Propuesta técnica. Corporinoquia. Cormacarena. 330 pp.
- Cots, L., Moratelli, R., Silva, D.A., Carvalho,E.F., Loiola, S & Amaral, C.R.L. (2019). Integrating molecular and morphological data in the secondary sexual identification of museum specimens of *Tamandua tetradactyla* (Xenarthra, Pilosa). *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1), 296-298. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.09.105>.
- Covioriente (2023). Los animales transitan con tranquilidad por el corredor Villavicencio-Yopal. Youtube. https://www.youtube.com/watch?v=Nnc-r6LyjqA&t=123s&ab_channel=CoviorienteOficial

Cruz-Bernate, L., Riascos, Y., & Barreto, G. (2013). Dimorfismo sexual y determinación del sexo con DNA en el Pellar Común (*Vanellus chilensis*). *Ornitol. Neotrop.*, 24(4), 433-444.

Cuartas, C & Marín, D. (2014). Guía Ilustrada Mamíferos cañón del río Porce - Antioquia. EPM E.S.P. Universidad de Antioquia, Herbario Universidad de Antioquia - Medellín. 156 pp.

Cunaguardo (2022). Registro de un individuo atropellado de la especie *Myrmecophaga tridactyla*.

Cunaguardo (2022). Toma de muestras de la especie *Myrmecophaga tridactyla* en el marco de la expedición oso hormiguero.

Cupul, F. (2002). Víctimas de la carretera: fauna apachurrada. *Gaceta CUC*. Departamento de Ciencias. Centro Universitario de la Costa.

Curtis H., Barnes N., Massarini A & Schnerck A (2008). BIOLOGIA. Edición 7º. Editorial Médica Panamericana.

Davenport, J., & Davenport, J. (2006). The Ecology of Transportation: Managing Mobility for the Environment. *Ed. Springer Science & Business Media*.

Da Silva, V. D. P. R., Silva, M. T., Singh, V. P., de Souza, E. P., Braga, C. C., de Holanda, R. M., ... & Braga, A. C. R. (2018). Simulation of stream flow and hydrological response to land-cover changes in a tropical river basin. *Catena*, 162, 166-176. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.11.024>

De Antonio, E. S., Fraga, R. E., & Tomazi, L. (2021). Sexagem molecular em araras vermelhas e Centros de Triagem de Animais Silvestres: Revisão. *PubVet*, 15(11), 1-10. DOI:<https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n11a961.1-10>

De Carvalho, G. O., Meire, R. O., Lino, A. S., Yogui, D. R., Desbiez, A. L. J., Torres, J. P. M., & Malm, O. (2021). Biomonitoring mercury contamination using fur from roadkilled giant anteaters. *Chemosphere*, 270, 128644. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128644>

- De Freitas, C. H., Justino, C. S., & Setz, E. Z. (2015). Road-kills of the giant anteater in south-eastern Brazil: 10 years monitoring spatial and temporal determinants. *Wildlife Research*, 41(8), 673-680. DOI:<https://doi.org/10.1071/WR14220>
- De La Ossa, J., & Galván-Guevara, S. (2015). Registro de mortalidad de fauna silvestre por colisión vehicular en la carretera Toluviejo–ciénaga La Caimanera, Sucre, Colombia. *Biota Colombiana*, 16(1), 67-77.
- De La Ossa-Nadjar, O, & De La Ossa V., J. (2015). ATROPELLAMIENTO DE FAUNA SILVESTRE EN LAS DOS VÍAS QUE CIRCUNDAN LOS MONTES DE MARÍA, SUCRE, COLOMBIA. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18(2), 503-511
- Del Valle, S & Halloy, M. (2003). El oso hormiguero, *Myrmecophaga tridactyla*: crecimiento e independización de una cría. *Mastozoología Neotropical*, 10(2), 323-330.
- Delgado, C. (2014). ADICIONES AL ATROPELLAMIENTO VEHICULAR DE MAMÍFEROS EN LA VÍA DE EL ESCOBERO, ENVIGADO (ANTIOQUIA), COLOMBIA. *Revista EIA*, (22), 147-153.
- Delgado, C. (2007). Muerte de mamíferos por vehículos en la vía del Escobero, Envigado (Antioquia), Colombia. *Actualidades Biológicas*, 29(87), 229-233. DOI:<https://doi.org/10.17533/udea.acbi.329342>
- Denneboom, D., Bar-Massada, A., & Shwartz, A. (2021). Factors affecting usage of crossing structures by wildlife—A systematic review and meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 777, 146061. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146061>
- Desbiez, A. L. J., Bertassoni, A., & Traylor-Holzer, K. (2020). Population viability analysis as a tool for giant anteater conservation. *Perspectives in Ecology and Conservation*, 18(2), 124-131. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.pecon.2020.04.004>
- DiBattista, J. D., Reimer, J. D., Stat, M., Masucci, G. D., Biondi, P., De Brauwer, M., ... & Bunce, M. (2020). Environmental DNA can act as a biodiversity barometer of

- 98** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

anthropogenic pressures in coastal ecosystems. *Scientific reports*, 10(1), 1-15.
DOI:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-64858-9>

Di Blanco, Y. (2015). Patrones de actividad y de uso de hábitat de osos hormigueros (*Myrmecophaga tridactyla*) reintroducidos en Iberá, Corrientes, Argentina. [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Córdoba]. Repositorio digital UNC. <http://hdl.handle.net/11086/11919>

D'orio, E., Calabrese, G., Lucanto, C., & Montagna, P. (2023). ASSESSING PERFORMANCE IN FORENSIC HAIR EXAMINATION: A REVIEW. *International Journal of Law in Changing World*, 1(2), 102-119

Dornelas, M. (2010). Disturbance and change in biodiversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 365(1558), 3719-3727. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0295>

Drug-Farma (2006). Guía práctica para la utilización de muestras biológicas en investigación biomédica. Fundación Instituto Roche. Obtenido de: <https://books.google.com.co/books?id=BA-iPQAAQAAJ>

Ducamp, S. & Ostuni, MA (2023). Physiology of Red Cell Lineage: From Erythroblast Progenitors to Mature Red Blood Cell. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 24 (11), 9715. DOI:<http://dx.doi.org/10.3390/ijms24119715>

Dupont, J., Grandez, R & Hermoza, C. (2018). Parámetros ecográficos de los órganos abdominales del tamandúa (*Tamandua tetradactyla*). *Rev Inv Vet Perú*; 29(4): 1137-1146. DOI:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15305>

Durán-Galindo, I. (2018). Atropellamiento Vial de Fauna Silvestre en la Carretera entre los Municipios de Villavicencio - Barranca de Upía (Meta) Colombia. [Trabajo de grado, Universidad de los Llanos]. Repositorio universidad de los Llanos. <https://repositorio.unillanos.edu.co/handle/001/1459>

Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (2007). *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología.

Eguizábal, GV., Palme, R., Superina, M., Asencio, CJ., García Capocasa, MC., & Busso, JM. (2019). Characterization and correlations of behavioral and adrenocortical

- 99** Sexaje molecular de las especies de osos hormigueros *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* con una perspectiva de ecología de carreteras en Colombia
-

activities of zoo-housed lesser anteaters (*Tamandua tetradactyla*). *Biología zoológica*, 38(4), 334-342. DOI:<https://doi.org/10.1002/zoo.21492>

Espinoza, C., Castro, I., & Cruz-Bernate, L. (2021). Dimorfismo sexual críptico en *Sicalis flaveola* (Aves: Thraupidae) en el trópico. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 25(1), 55-70. DOI:<https://doi.org/10.17151/bccm.2021.25.1.4>

Erbe, C., Dent, M.L., Gannon, W.L., McCauley, R.D., Römer, H., Southall, B.L., ... & Thomas, J.A. (2022). Los efectos del ruido en los animales. En *Explorando el comportamiento animal a través del sonido: volumen 1: métodos* (pp. 459-506). Cham: Springer International Publishing. DOI:https://doi.org/10.1007/978-3-030-97540-1_13

Fayad, J. C. J., Manosalva, J. L. G., Barberi, J. R., & Vélez, J. C. G. (2019). Ecología de carreteras e infraestructura verde. En *Workshop: estrategia para la formulación de proyectos de innovación social Biohacking: escuela de creación Divulgación y Difusión de los nuevos paradigmas del Diseño. TEC social*, 5(1), 36-44

Figel, J., Botero, S., Sánchez-Londoño, J. & Quintero Angel, A. (2015). Unexpected documentation and inter-Andean range expansion of a vulnerable large mammal (Mammalia, Pilosa, *Myrmecophaga tridactyla*) in Colombia. *Mammalia*, 80(4), 449-452. DOI:<https://doi.org/10.1515/mammalia-2015-0037>

Forlano, M., Mujica, F., Gallardo, J. & Rodríguez, J. (2013). Identificación de ectoparásitos en Oso melero (*Tamandua tetradactyla*), Estado Lara, Venezuela. *Revista MVZ Córdoba*, 18(1), 3738-3742.

Franco-Gutiérrez, L. J., Álvarez-Cardona, J. & Soto-Calderón, I. D. (2017). Sex identification of neotropical macaws (*Ara* spp.) from invasive and non-invasive samples: Identificación del sexo en guacamayas neotropicales (*Ara* spp.) a partir de muestras invasivas y no invasivas. *Ornitología Colombiana*, 16(1), 1-07.

Fromme, L., Yogui, D. R., Alves, M. H., Desbiez, A. L. J., Langeheine, M., Santos, A. L. Q., ... & Brehm, R. (2023). Spermatogenesis in the giant anteater (*Myrmecophaga*

- tridactyla). *Theriogenology Wild*, 2, 100018.
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.therwi.2023.100018>
- Fromme, L., Yogui, D. R., Alves, M. H., Desbiez, A. L., Langeheine, M., Quagliatto, A., Siebert, U & Brehm, R. (2021). Morphology of the genital organs of male and female giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *PeerJ*, 9, e11945.
DOI:<https://doi.org/10.7717/peerj.11945>
- Fuster, A., Diodato, L., & Contreras, J. H. (2018). Dieta de *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae) en pastizales y bosques del noreste de Santiago del Estero y su relación con las hormigas. *Acta zoológica illoana*, 62(1), 1-9.
DOI:<https://doi.org/10.30550/j.azl/2018.62.1/1>
- Gabrielli, M. (2021). Filogeografía de *Zaedyus pichiy* (Mammalia, Xenarthra) y su correlación con el paleoclima del sur de Sudamérica [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata]. Repositorio institucional UNLP. <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/122099>
- Gallardo-Tellez, E. G. (2021). Evaluación de efectos de antropización en los ensambles de mamíferos medianos y grandes de bosque templado de la región aguacatera de Michoacán. [Tesis de maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo].
- García-García, J. A., & Díaz-Timoté, J. (2022). Disponibilidad y eficiencia en el uso de recursos naturales, biodiversidad y servicios ecosistémicos. *Biodiversidad en la Práctica*, 7(1), e1120–e1120. DOI:<https://doi.org/10.21068/26193124.1120>
- García-López, Y. A., & García-Peluffo, J. D. (2022). Atropellamiento de fauna en Colombia: una revisión desde sus causas, conocimiento actual, perspectivas de manejo y regulación. [Trabajo de grado, Universidad de Antioquia]. Repositorio institucional universidad de Antioquia. <https://hdl.handle.net/10495/29226>
- Gardner A. (2008). Mammals of South America, volume 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. Chicago: University of Chicago Press. 2(1), pp 690.
DOI:<https://doi.org/10.7208/9780226282428>

- Garzon-Rincon, B. D. (2022). Monitoreo de pasos de fauna silvestre y su uso en el corredor vial villavicencio-yopal. [Trabajo de grado, Universidad Antonio Nariño]. Repositorio Universidad Antonio Nariño. <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/6490>
- Gaston, K. J., Davies, T. W., Bennie, J., & Hopkins, J. (2012). Reducing the ecological consequences of night-time light pollution: options and developments. *Journal of Applied Ecology*, 49(6), 1256-1266. DOI:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02212.x>
- Gaudín, T & McDonald, H. (2008). Morphology-based investigations of the phylogenetic relationships among extant and fossil xenarthrans. *The Biology of the Xenarthra* (SF Vizcaíno & WJ Loughry, eds.). Prensa de la Universidad de Florida, Gainesville, pp 24-39
- Gaudin, T., Hicks, P & Di Blanco, Y. (2018). *Myrmecophaga tridactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae). *Mammalian Species*, 50(956), pp 1-13. DOI:<https://doi.org/10.1093/mspecies/sey001>
- Geffen, E., Luikart, G & Waples, RS (2007). Impactos de las técnicas genéticas moleculares modernas en la biología de la conservación. *Temas clave en biología de la conservación*, 46 .
- Gelvez, J. S. (2021). Efectos del cambio en el uso y cobertura del suelo sobre el régimen hidrológico de la cuenca del río Coello. [Trabajo de grado, Universidad Santo Tomas]. Repositorio Universidad Santo Tomas. <http://hdl.handle.net/11634/38193>
- Giroux, A., Ortega, Z., Oliveira-Santos, L. G. R., Attias, N., Bertassoni, A., & Desbiez, A. L. J. (2021). Sexual, allometric and forest cover effects on giant anteaters' movement ecology. *Plos one*, 16(8), e0253345. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253345>
- Glista, D., DeVault, T & DeWoody, J. (2009). A review of mitigation measures for reducing wildlife mortality on roadways. *Landscape and Urban Planning* , 91(1), 1 – 7. DOI: 10.1016/j.landurbplan.2008.11.001
- González, E & Martínez-Lanfranco, J. (2010). Conservación de los mamíferos en Uruguay. In: Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y

- conservación (E. M. González & J. A. Martínez-Lanfranco, eds). Banda Oriental, MNHN y Vida Silvestre Uruguay. *Mastozoología Neotropical*, 17(2), 355–378.
- González-Galli, L., Bernal Castro, I. C., Porras Contreras, Y. A., Pérez Mesa, M. R., Prieto Piraquive, É. F., Gómez Galindo, A. A., ... & Roa Acosta, R. (2022). Educación en Biodiversidad. Perspectivas y retos. Cátedra 10. *Universidad Pedagógica Nacional*.
- Guerra, F. M., Trujillo, F., Cuero-Aya, C., Bolívar, L., Valencia, K., Vargas-Arboleda, A. F. V., & Mantilla-Meluk, H. (2019). MAMÍFEROS ARAUCA. Biodiversidad del departamento de Arauca Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Federico-MosqueraGuerra/publication/337340229_Mamiferos_Arauca/links/5dd3dd5292851c382f49f1d5/Mamiferos-Arauca.pdf.
- Guiscafré, A., & Cotts, L. (2021). Resúmenes de Tesis. INTEGRATIVE ANATOMY OF THE APENDICULAR SKELETON OF LIVING AND FOSSIL SPECIMENS OF TAMANDUA TETRADACTYLA (XENARTHRA, VERMILINGUA): DEVELOPMENT, PATHOLOGY AND EVOLUTION. *Mastozoología Neotropical*, 28(1), 606
- Gupta K & Mahajan R. (2018). Applications and Diagnostic Potential of Dried Blood Spots. *Int J Appl Basic Med Res*, 8(1):1-2. DOI:doi:10.4103/ijabmr.IJABMR_7_18
- GÜRKAN, Ö. F., İBİŞ, O., ÖZCAN, S., TEZ, D. C., GHARAKHLOO, M. M., & TEZ, C. (2023). Genetic variation in Zfy final intron region on Y-chromosome of Canis aureus, Canis lupus and Vulpes vulpes and sex determination for samples of three canid species. *Turkish Journal of Biodiversity*, 6(1), 1-13. DOI:<https://doi.org/10.38059/biodiversity.1253563>
- Gurrutxaga, S. V. M., & Lozano, V. P. J. (2008). Ecología del Paisaje. Un marco para el estudio integrado de la dinámica territorial y su incidencia en la vida silvestre. *Estudios Geográficos*, 69(265), 519–543. DOI:<https://doi.org/10.3989/estgeogr.0427>
- Gutiérrez, G. A. (2021). Determinación del sexo en dos especies de aves silvestres de los Andes Ecuatoriales: el Zambullidor Plateado (*Podiceps occipitalis*) y la Focha

Andina (*Fulica ardesiaca*) utilizando la técnica de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR). [Trabajo de grado, Universidad Central de Ecuador]. Repositorio Universidad central de Ecuador.
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/24393>

Gutiérrez-Sanabria, D. R. (2017). Evaluación del riesgo de las carreteras nacionales para la fauna silvestre y el uso de ciencia ciudadana como herramienta para el monitoreo de fauna silvestre atropellada en Costa Rica. [Tesis maestría, Universidad Nacional de Costa Rica]. Repositorio Universidad Nacional de Costa Rica.
<http://hdl.handle.net/11056/14139>

Hayssen, V (2011). *Tamandua tetradactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae). *Especies de mamíferos*, 43(875), 64-74. DOI:<https://doi.org/10.1644/875.1>

Healey, R. M., Atutubo, J. R., Kusrini, M. D., Howard, L., Page, F., Hallisey, N., & Karraker, N. E. (2020). Road mortality threatens endemic species in a national park in Sulawesi, Indonesia. *Global Ecology and Conservation*, 24, e01281. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01281>

Heigl, F., Teufelbauer, N., Resch, S., Schweiger, S., Stückler, S & Dörler, D. (2022). A dataset of road-killed vertebrates collected via citizen science from 2014–2020. *Sci Data*, 9(1), 1-6. DOI:<https://doi.org/10.1038/s41597-022-01599-6>

Hennessy, E. (2014). El giro molecular en la conservación: genética, naturaleza prístina y el redescubrimiento de una especie extinta de tortuga gigante de las Galápagos. *Anales de la Asociación de Geógrafos Estadounidenses*, 105 (1), 87–104. <https://doi.org/10.1080/00045608.2014.960042>

Holleley, CE., Whiteley, SL., Devloo-Delva, F., Bachler, A., Llinas, J & Georges, A. (2023). Identificación molecular del sexo para aplicaciones en conservación, industria y medicina veterinaria. *Applied Environmental Genomics*, 74.

Holguín-Contreras, O. (2019). Patrones espaciales, temporales y apreciaciones sociales asociados al atropellamiento de hormigueros (Xenarthra: Vermilingua) en la vía Marginal de la Selva, Colombia. [Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Universidad Javeriana. <http://hdl.handle.net/10554/44161>

- Hossotani, C & Luna, H. (2016). Aspectos reproductivos do tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758). *R. bras. Reprod. Anim.*, 40(3), 95-98.
- Humanez, E. & Chacón, J. (2014). Taxonomía, identificación y distribución de las especies del suborden Vermilingua en Colombia. Pp. 18–31 in: Manual de rehabilitación de hormigueros de Colombia (C. Rojano, L. Miranda & R. Avila, eds.). Fundación Cunaguaro, Geopark Colombia S.A.S., El Yopal, Casanare.
- Instituto Alexander von Humboldt (2017). Biodiversidad colombiana: números para tener en cuenta. Recuperado de: <http://www.humboldt.org.co/es/boletines-y-comunicados/item/1087-biodiversidad-colombiana-numero-tener-en-cuenta>
- Instituto Alexander von Humboldt (2021). Grave deterioro de la biodiversidad nacional pone en riesgo la vida en Colombia. Boletín de prensa. Recuperado de: <http://www.humboldt.org.co/es/boletines-y-comunicados/item/1658-grave-deterioro-de-la-biodiversidad-nacional-pone-en-riesgo-la-vida-en-colombia>
- Instituto Alexander von Humboldt (2022). Decálogo por la Biodiversidad 2022-2026. Recuperado de: <http://humboldt.org.co/images/documentos/DECALOGO-DE-LA-BIODIVERSIDAD.pdf>
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (2010). Leyenda Nacional de Coberturas de la Tierra. Metodología CORINE Land Cover adaptada para Colombia Escala 1:100.000. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. 72p. IDEAM.
- Instituto Nacional de Vías (2022). Mapa de carreteras de Colombia 2022. Casanare. INVIA
- Isaacsa, P., Echeverría-Londoñob, S., Urbinac, N., & Purvisb, A.(2016). Composición de especies y cambio en el uso del suelo. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C., Colombia. 106 p
- Iuell, B., Bekker, H., Cuperus, R., Dufek, J & Fry, G. (2003). WILDLIFE AND TRAFFIC - A EUROPEAN HANDBOOK FOR IDENTIFYING CONFLICTS AND DESIGNING SOLUTIONS. Comisión Europea.

- Jaramillo-Fayad, J.C., Velázquez, M.M., Premauer, J.M., González, J.L., & González Vélez, J.C. (2021). Atropellamiento de fauna silvestre en Colombia: Guía para entender y diagnosticar este impacto. Gobierno Nacional de Colombia – Institución Universitaria ITM.
- Johnson, C. N., Balmford, A., Brook, B. W., Buettel, J. C., Galetti, M., Guangchun, L & Wilmshurst, J. M. (2017). Biodiversity losses and conservation responses in the anthropocene. *Science*, 356(6335): 270–275. DOI:doi:10.1126/science.aam9317
- Joshi, B. D., De, R., & Goyal, S. P. (2019). Utility and applicability of a universal set of primers in identifying the sex of South and Southeast Asian mammals. *Zoological Studies*, 58. DOI:10.6620/ZS.2019.58-19
- Jibril, M. S & Wabundani, J. (2014). Spatial distribution of accident black spots along Kaduna-Zaria. *Civil and Environmental Research*, 6(4),9–20.
- Jiménez, I., Delgado, A., Di Blanco, Y., Abuin, R., Antúnez, B., Galetto, E., ... & Heinonen, S. (2015). Reintroducción del hormiguero gigante (*Myrmecophaga tridactyla*) en la Reserva Natural Iberá (Argentina): ¿misión cumplida?. *Edentata*, 16(1),11–20.
- Juárez, D., Estrada, C., Bustamante, M., Quintana, Y., Moreira, J & López, J. (2007). Guía Ilustrada de Pelos para la Identificación de Mamíferos Medianos y Mayores de Guatemala. *Dirección General de Investigación, Universidad de San Carlos de Guatemala*, 28, pp 107.
- Katz, AD, Pearce, S., Melder, C., Sperry, JH & Davis, MA (2020). El sexado molecular es una alternativa viable al sondeo para determinar el sexo en la serpiente de pino de Luisiana (*Pituophis ruthveni*), en peligro de extinción. *Conservation Genetics Resources*, 12(4), 537–539. DOI:10.1007/s12686-020-01145-9
- Kleist, N. J., Guralnick, R. P., Cruz, A., Lowry, C. A., & Francis, C. D. (2018). Chronic anthropogenic noise disrupts glucocorticoid signaling and has multiple effects on fitness in an avian community. *Proceedings of the national academy of sciences*, 115(4), E648-E657. DOI:<https://doi.org/10.1073/pnas.1709200115>

- Kok, A. C., Berkhout, B. W., Carlson, N. V., Evans, N. P., Khan, N., Potvin, D. A., ... & Wascher, C. A. (2023). How chronic anthropogenic noise can affect wildlife communities. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1130075. DOI:<https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1130075>
- Kuijper B & Johnstone RA. (2017). How Sex-Biased Dispersal Affects Sexual Conflict over Care. *The American Naturalist*, 189(5), 501-514. DOI:doi: 10.1086/691330.
- Kusta T, Keken Z, Jezek M & Kuta Z. (2015). Effectiveness and costs of odor repellents in wildlife-vehicle collisions: a case study in Central Bohemia, Czech Republic. *Transp Res D Transp Environ*. 38:1–5. DOI:10.1016/j.trd.2015.04.017.
- Laurance, W.F.; Goosem, M & Laurance, S.G.W. (2009). Impacts of roads and linear leasings on tropical forests. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(12), 659-669. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.06.009>
- Lee, K., & Tripathi, A. (2020). Parallel DNA extraction from whole blood for rapid sample generation in genetic epidemiological studies. *Frontiers in genetics*, 11, 374. DOI:<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00374>
- Lehnen, L., Schorcht, W., Karst, I., Biedermann, M., Kerth, G & Puechmaille, S. J. (2018). Using Approximate Bayesian Computation to infer sex ratios from acoustic data. *Plos one*, 13(6), e0199428. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199428>
- Lester, D. (2015). Effective wildlife roadkill mitigation. *Journal of Traffic and Transportation Engineering*, 3(1), 42-51. DOI: 10.17265/2328-2142/2015.01.005
- Lino, A., Fonseca, C., Rojas, D., Fischer, E., & Pereira, M. J. R. (2019). A meta-analysis of the effects of habitat loss and fragmentation on genetic diversity in mammals. *Mamm Biol* 94 , 69–76. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.09.006>
- Lopez, I. M. T., Gonzales, L. T. C., & Vargas, J. C. A. (2022). Ocurrencias de atropellamiento de fauna silvestre en un tramo de carretera de Dibulla, La Guajira, Colombia. *Ciencia e Ingeniería: Revista de investigación interdisciplinaria en biodiversidad y desarrollo sostenible, ciencia, tecnología e innovación y procesos productivos industriales*, 9(1), e6722334. DOI:<https://www.doi.org/10.5281/zenodo.6722334>

- López, E., & Vásquez, N. (2004). Determinación del sexo y genotipificación del gen de la k-caseína en embriones bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(3), 231-240.
- Lota, L., Cruz, J., Peña, S & Barreto, J. (2022). Priorización de Tramos Críticos: Análisis de la siniestralidad vial en vías urbanas de Medellín y municipios cercanos Bello, Copacabana, Itagüí, Sabaneta, La Estrella y Caldas en el departamento de Antioquia. Priorización de Puntos Seguros Integrales. Director de la Agencia Nacional de Seguridad Vial.
- Lozano, J. A., & Patiño-Siro, D. (2020). Does the geometrical design of roads influence wildlife roadkills? Evidence from a highway in central andes of Columbia. *European Journal of Ecology*, 6(1), 58-70. DOI: <https://doi.org/10.17161/eurojecol.v6i1.13688>
- Li, X. Y., & Kokko, H. (2019). Sex-biased dispersal: A review of the theory. *Biological Reviews*, 94(2), 721-736. DOI:<https://doi.org/10.1111/brv.12475>
- Lim, Q.L., Tan, Y.L., Ng, W.L., Yien Yong, CS., Ismail, A., Rovie-Ryan, J., Rosli, N & Annabi, G. (2020). Molecular sexing and preliminary assessment of population sex ratio of the endangered Malayan tapir (*Tapirus indicus*) in Peninsular Malaysia. *Sci Rep*, 10, 3973. DOI:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-60552-y>
- Liu, Z., Simayijiang, H., Wang, Q. Jingyi, Y., Hongyu, S., Riga, W., & Jiang, W. (2023). DNA and protein analyses of hair in forensic genetics. *Int J Legal Med*, 137 , 613–633. DOI:<https://doi.org/10.1007/s00414-023-02955-w>
- Marín-Carvajal, L. A., Valencia, L. C., Salamanca, I. L., & Delgado, P. A. (2014). Registros de atropellamiento de mamíferos en algunos corredores viales colombianos. *Mammalogy Notes*, 1(1), 12-13. DOI:<https://doi.org/10.47603/manovol1n1.12-13>
- Martin, J. F., & D'Avino, P. (2022). A theory of rapid evolutionary change explaining the de novo appearance of megakaryocytes and platelets in mammals. *Journal of Cell Science*, 135(24). DOI:<https://doi.org/10.1242/jcs.260286>
- Martínez-Polanco, M. F. (2008). Una pregunta para la historia ambiental colombiana: ¿Qué ha pasado con la fauna silvestre desde la colonia a la

actualidad?. *Diálogos. Revista Electrónica de Historia*, 9(1),109-129.

DOI:<https://doi.org/10.15517/dre.v9i0.31118>

Martinelli, R. D. (2021). Estudio de la biodiversidad acuática de vertebrados en la Amazonia y Orinoquia Colombiana por medio de ADN ambiental. [Trabajo de grado, Universidad de los Andes]. Repositorio Universidad de los Andes. <http://hdl.handle.net/1992/51307>

Matta-Camacho, N.E., Ramírez Martín, N., Zúñiga Díaz, B.C, & Vera, V. (2009). DETERMINACIÓN DE SEXO EN AVES MEDIANTE HERRAMIENTAS MOLECULARES. *Acta Biológica Colombiana*, 14(1), 27-40.

Medina, D. G. (2022). Ecología del paisaje para la conservación de las Microcuencas: Chalpi y Victoria (Tesis de Maestría, Universidad Tecnológica Indoamérica). Repositorio de la Universidad Tecnológica Indoamérica. <http://repositorio.uti.edu.ec//handle/123456789/2707>

Medrano-Vizcaíno, P., Grilo, C., & Gonzalez-Suarez, M. (2023). Research and conservation priorities to protect wildlife from collisions with vehicles. *Biological Conservation*, 280, 109952. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2023.109952>

Medrano-Vizcaíno, P., Grilo, C., Silva Pinto, F. A., Carvalho, W. D., Melinski, R. D., Schultz, E. D., & González-Suárez, M. (2022). Roadkill patterns in Latin American birds and mammals. *Global Ecology and Biogeography*, 31(9), 1756-1783. DOI: <https://doi.org/10.1111/geb.13557>

Medri, I. M., & Mourao, G. (2005). Home range of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) in the Pantanal wetland, Brazil. *Journal of Zoology*, 266(4), 365-375. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0952836905007004>

Metzger, JP. (2010). O Código Florestal tem base científica?. *Natureza & Conservação*. 8(1), 1–5. DOI:<https://doi.org/10.4322/natcon.00801017>

Meza, F. L. (2023). Road Permeability Index as a tool for mitigation planning of road impacts on wildlife in Colombia: a case study using mammals. *Caldasia*, 45(1). DOI: <https://doi.org/10.15446/caldasia.v45n1.94046>

- Meza, M. C., González, T., Reyes, A & Armenteras, D. (2021). Diferencias en la composición, estructura y diversidad entre bosques inundables de aguas claras y aguas mixtas, Reserva Natural Bojonawi, río Orinoco y planicie inundable, Vichada, Colombia. Pp. 489-503. En: Lasso, C. A., F. Trujillo y M. A. Morales-Betancourt (Eds.), VIII. Biodiversidad de la Reserva Natural Bojonawi, Vichada, Colombia: río Orinoco y planicie de inundación. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. DOI: 10.21068/A2021FSNVIII19
- Meza, F. L., Ramos, E., & Cardona, D. (2019). Spatio-temporal patterns of mammal road mortality in Middle Magdalena Valley, Colombia. *Oecologia Australis*, 23(3), 575-588. DOI:<https://doi.org/10.4257/oeco.2019.2303.15>
- Mijares - Santana, F. J., Pérez-Buitrago, N., & Pérez-Cárdenas, N. (2019). Variación estacional de la composición florística en sabanas inundables en Arauca, Colombia. *Caldasia*, 41(2), 404–421. DOI:<https://doi.org/10.15446/caldasia.v41n2.70467>
- Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible. (2016). *Política nacional para la gestión integral de la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos (PNGIBSE)*. https://minciencias.gov.co/sites/default/files/politica_nacional_de_biodiversidad.pdf
- Miotto, R. A., Cervini, M., Begotti, R. A., & Galetti Jr, P. M. (2012). Monitoring a puma (*Puma concolor*) population in a fragmented landscape in southeast Brazil. *Biotropica*, 44(1), 98-104. DOI:[doi:10.1111/j.1744-7429.2011.00772.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2011.00772.x)
- Miranda, F.R., Chiarello, A.G., Röhe, F., Braga, FG., Mourão, G.M & Miranda, G.H.B. (2015). Avaliação do risco de extinção de *Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus 1758 no Brasil. In: ICMBio (ed) Avaliação do Risco de Extinção dos Xenartros Brasileiros. ICMBio, Brasília, pp 89– 105
- Miranda, G. H. B. (2004). Ecologia e conservação do tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla* Linnaeus, 1758) no Parque Estadual das Emas. (Tesis de doctorado, Universidad de Brasília).

- Molbert, N., Ghanavi, H. R., Johansson, T., Mostadius, M., & Hansson, M. C. (2023). An evaluation of DNA extraction methods on historical and roadkill mammalian specimen. *Scientific Reports*, 13(1), 13080. DOI:10.1038/s41598-023-39465-z
- Montenegro, H. M. (2018). Fauna silvestre atropellada en la vía mamatoco–minca, Santa Marta, Caribe Colombiano. [Trabajo de grado, universidad del Magdalena]. Repositorio digital institucional unimagdalena. <http://repositorio.unimagdalena.edu.co/handle/123456789/753>
- Moore, L. J., Petrovan, S. O., Bates, A. J., Hicks, H. L., Baker, P. J., Perkins, S. E., & Yarnell, R. W. (2023). Demographic effects of road mortality on mammalian populations: a systematic review. *Biological Reviews*. 98(4), 1033-1050. DOI:<https://doi.org/10.1111/brv.12942>
- Mora-Fernández, C., Peñuela-Recio, L., & Castro-Lima, F. (2015). Estado do conhecimento sobre os ecossistemas das savanas inundadas no Orinoquia Colombiana. *Orinoquia*, 19(2), 253-271.
- Moras, M., Lefevre, S. D & Ostuni, M. A. (2017). From erythroblasts to mature red blood cells: organelle clearance in mammals. *Frontiers in physiology*, 8, 1076. DOI:<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01076>
- Mosquera-Guerra, F., Trujillo, F., Gómez-Guevara, E., Castañeda, B., González, T. M., & Mantilla-Meluk, H. (2020). Mamíferos no voladores de la Reserva Natural Bojonawi (Escudo Guayanés), Orinoquia, Vichada, Colombia, pp. 301-321. En: Lasso, C. A., F. Trujillo y M. A. Morales-Betancourt (Eds.), VIII. Biodiversidad de la Reserva Natural Bojonawi, Vichada, Colombia: río Orinoco y planicie de inundación. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. DOI: 10.21068/A2021FSNVIII09
- Muñoz-Vargas, A. D. (2022). Área de vida y uso de hábitats de dos osos hormigueros gigantes (*Myrmecophaga tridactyla*) en una zona rural con expansión urbanística y en una reserva natural, en el departamento de Casanare, Colombia. (Tesis doctoral, Unilasallista Corporación Universitaria). Repositorio unilasallista corporación universitaria. <http://hdl.handle.net/10567/3264>

- Murphy, W., Pringle, T., Crider, T., Springer, M & Miller, W. (2007). Using genomic data to unravel the root of the placental mammal phylogeny. *Investigación del genoma*, 17(4), 413-421. DOI:10.1101/gr.5918807
- Narayan, E & Rana, N. (2023). Interacción entre humanos y vida silvestre: pasado, presente y futuro. *BMC Zoo* 8 , 5. DOI:<https://doi.org/10.1186/s40850-023-00168-7>
- Nardelli, M., Tunez, J. I., Centrón, D & Cassini, M. H. (2011). Non-invasive sampling techniques applied to the genetic study of mammals. *Interciencia*, 36(6), 404-411.
- Nardelli, M & Túnez, J. I. (2017). Aportes de la genética de la conservación al estudio de los mamíferos neotropicales: revisión y análisis crítico. *Ecología austral*, 27(3), 421-436.
- NCBI (2023). taxonomy last update. Lifemap. Recuperado de: <https://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/?tid=948952#>
- Negret, P.J., Luskin, M.S., Gomez-Valencia, B., Diaz-Pulido, A., Romero, L.H., Restrepo, A., ... & Mendes, C.P.(2023). Neotropical understory birds and mammals show divergent behaviour responses to human pressure. *Perspectivas en Ecología y Conservación*, 21 (2), 180-188. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.pecon.2023.04.002>
- Neto, G. D. S. F., Barros, A. C., Sobroza, T. V., Neves, P. U. C., Phillips, M. J., & Guimarães, E. F. (2020). Period of the day and food-based enrichment affect behaviour activity of Tamandua tetradactyla in captivity?. *Pesquisa e Ensino em Ciências Exatas e da Natureza*, 4, e1498. DOI:10.29215/PECEN.V4I0.1498
- Nieto R, L. V. (2023). Pasos de fauna, estrategia para mitigación del atropellamiento de fauna silvestre. [Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Pontificia Universidad Javeriana. <http://hdl.handle.net/10554/65172>.
- Noonan, M. J., Ascensão, F., Yogui, D. R., & Desbiez, A. L. (2022). Roads as ecological traps for giant anteaters. *Animal Conservation*, 25(2), 182-194. DOI:<https://doi.org/10.1111/acv.12728>
- Noss, A., Cuéllar, E., Gómez, H., Tarifa, T., Vargas, J & Aliaga, E. (2010). Myrmecophidae - Ciclopedidae - Bradypodidae - Megalonychidae. In Distribución,

ecología y conservación de los mamíferos medianos y grandes de Bolivia. pp 213-234.

Obando-Tobón, J. (2022). Configuración espacial y ecológica del atropellamiento de fauna silvestre en vías periurbanas de los Andes colombianos (Envigado, Valle de Aburrá, Colombia). [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio universidad nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/81310>

Ochoa-Ochoa, L. M., & Ríos-Muñoz, C. A. (2019). Estimación de adecuabilidad de especies en ambientes antropizados desde el enfoque de modelado de nicho. *Antropización: primer análisis integral, ibunam-conacyt*, 345-361. DOI:<https://doi.org/10.22201/ib.9786073020305e.2019.c18>

Oddone-Aquino, AGHE & Nkomo, SPL (2021). Spatio-Temporal Patterns and Consequences of Road Kills: A Review. *Animales*, 11(3), 799. DOI:<https://doi.org/10.3390/ani11030799>

Ohana, J. A., Bertassoni, A., Miranda, F., Mourão, G. D., Miranda, G. H., Costa, J. F., ... & Belentani, S. D. S. (2015). Avaliação do Risco de Extinção de Tamandua tetradactyla (Linnaeus, 1758) no Brasil. *Biodiversidade I-ICM de C da (Ed.) Avaliação do Risco de Extinção dos Xenartros Brasileiros*. 107-117.

Oliveira, W. J., Santos, A. L. Q., Souza, W. V., Custódio, A. E. I., Hoppe, E. G., Tebaldi, J. H., & Moraes, F. R. (2020). Helminthological characterization of giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) and lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*) roadkilled on BR-050 and BR-455 highways (Minas Gerais, Brazil). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72(6), 2175-2185. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-11833>

Ordóñez-Cruz, H. (2021). Arborización y enriquecimiento vegetativo de pasos de fauna, proyecto rehabilitación y ampliación Ruta Nacional No. 1, sección: Limonal-Cañas. [Trabajo de grado, Instituto tecnológico de Costa Rica]. Repositorio del Instituto tecnológico de Costa Rica. <https://hdl.handle.net/2238/12405>

- Ornelas, C. P., Álvarez, F., & Wegier, A. (2019). Antropización: Primer análisis integral. Universidad Nacional Autónoma de México. Ibunam, CONACYT, 416
- Páez-Vásquez, M., Aya-Cuero, C.A., Moreno-Niño, N., Mora-Beltrán, C., Castaño, J.H. & Mantilla-Meluk. H. (2020). Murciélagos de la Reserva Natural Bojonawi (Escudo Guayanés), Orinoquia, Vichada, Colombia. Pp. 323-343. En: Lasso, C. A., F. Trujillo y M. A. Morales-Betancourt (Eds.), VIII. Biodiversidad de la Reserva Natural Bojonawi, Vichada, Colombia: río Orinoco y planicie de inundación. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. DOI:10.21068/A2021FSNVIII10
- Panesso, E. S. A., Asprilla, J. A. P., & Escobar, Y. B. R. (2023). Consejos comunitarios como eje central para la gobernanza territorial contra la deforestación en el departamento del chocó. *Revista Jurídica Mario Alario D' Filippo*, 15(30), 340-359. DOI:10.32997/10.32997/2256
- Pardo, A., & Rangel, J.O. (2014). Mamíferos de la Orinoquia. Colombia Diversidad Biótica XIV. Bogotá DC (Rangel, J.O. Ed.). Universidad Nacional de Colombia, 751-784.
- Parera, A. (2002). Los mamíferos de la Argentina y la región austral de Sudamérica. Buenos Aires: Editorial El Ateneo. pp 453
- Patterson, SFT (2023). Los mamíferos con grandes áreas de distribución, bajas tasas reproductivas y tamaños corporales pequeños son los más vulnerables a las carreteras: un metaanálisis. [Tesis doctoral, Universidad de Carleton]. Repositorio universidad de Carleton. <https://repository.library.carleton.ca/concern/etds/h128ng05f>
- Payan, E., Soto, C., Diaz-Pulido, A., Benítez, A & Hernández, A (2013). Wildlife road crossing and mortality: lessons for wildlife friendly road design in Colombia. In *Proceeding of International Conference on Ecology and Transportation* (pp. 2-18).
- Pelizzon, C., da Silva Carvalho, C., Caballero, S., Galetti, P & Sánchez, A. (2017). Sex identification of the extant mega mammal, the lowland tapir, *Tapirus terrestris* (Tapiridae, Mammalia), by means of molecular markers: new outlook for non-

invasive samples. *Conservación Genet Resour*, 9(1), 17–19.

DOI:<https://doi.org/10.1007/s12686-016-0607-y>

Pérez, G & González, G. (2004). Evaluación de una dieta para tamanduás (*Tamandua spp*) utilizadas en el Jardín Zoológico de Rosario, Argentina y el Zoológico La Aurora, Guatemala. *Edentata*, 6(1), 43- 50. DOI:<https://doi.org/10.1896/1413-4411.6.1.43>

Pérez-García, J. N. (2020). Causas de la pérdida global de biodiversidad. *REVISTA DE LA ASOCIACION COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLOGICAS*, 1(32), 183–198. DOI:<https://doi.org/10.47499/revistaaccb.v1i32.219>

Pérez, J.G & Llarín, A.L. (2009). Contribución al conocimiento de la distribución del oso hormiguero gigante (*Myrmecophaga tridactyla*) en Argentina. *Edentata*, 8(10), 8-10.

Perrin, A., Schaffner, F., Christe, P., & Glaizot, O. (2023) Efectos relativos de la urbanización, la deforestación y el desarrollo agrícola en las comunidades de mosquitos. *Landsc Ecol* 38 , 1527–1536. DOI:<https://doi.org/10.1007/s10980-023-01634-w>

Pinto, FAS., Cirino, DW., Cerqueira, RC., Rosa, C & Freitas, SR (2022). How Many Mammals Are Killed on Brazilian Roads? Assessing Impacts and Conservation Implications. *Diversidad*, 14(10), 835. DOI:<http://dx.doi.org/10.3390/d14100835>

Portillo, A., Sibille, S & Panaifo, N. (2022). Record of melanism in *Tamandua tetradactyla* (Pilosa: Myrmecophagidae) in Perú. *Revista Peruana de Biología*, 29(2). DOI:<http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v29i2.22106>

Prüssmann, J., Rincón, S., Tavera, H., & Suárez, C. (2020). Estructura ecológica principal de la Orinoquia colombiana-Actualización metodológica mapa Sulu, pp 88., Cali (Colombia).

Quintela, FM., Lopes, CM & Gonçalves GL. (2022). Editorial: Genética aplicada a la conservación de mamíferos. *Portada. Genet.* 13:974631. DOI: [10.3389/fgene.2022.974631](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.974631)

Rangel, J. O. (2005). La biodiversidad de Colombia. Universidad nacional de Colombia, *Palimpsestos*, (5), 292-304

- Rangel, J. O. (2015). La biodiversidad de Colombia: significado y distribución regional. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(151), 176-200. DOI:<https://doi.org/10.18257/raccefyn.136>
- Ramón, P. A. M & Bollo M. M. (2023). El índice de antropización de la cubierta vegetal como medida de la antropización de áreas naturales protegidas: Caso Pico Azul-La Escalera, México. *Revista de Ciencias Ambientales*, 57(2), 1-25. DOI:<https://dx.doi.org/10.15359/rca.57-2.4>
- Ramos-Díaz, A., Palacios-Vargas, J & Pinzón-Florián, O. (2021). Diversidad de colémbolos epiedáficos en plantaciones forestales de *Acacia mangium* y sabanas en la Orinoquía colombiana. *Rev. Mex. Biodiv*, 91(4). DOI:<https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3276>
- Reichmann-Martínez, F. I. (2022). Luz, ruido y biodiversidad: interrelación y gestión de la contaminación lumínica y sonora a nivel del paisaje. [Trabajo de grado, Centro Universitario Regional Este]. Repositorio del Centro Universitario Regional Este. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/34922>
- Reyes-Amaya, N., Gutiérrez-Sanabria, D. R., Castillo-Navarro, Y., Rodríguez, R. A., & Plese, T. (2015). Información demográfica de *Bradypus variegatus*, *Choloepus hoffmanni* y *Cyclopes didactylus* (Xenarthra: Pilosa) en un bosque húmedo tropical secundario de Santander, Colombia. *Mastozoología neotropical*, 22(2), 409-415
- Richardson, M., & Goosen-de Roo, L. (2009). CELL AND TISSUE STRUCTURE IN ANIMALS AND PLANTS. *BIOLOGICAL SCIENCE FUNDAMENTALS AND SYSTEMATICS-Volume I*, 359.
- Roberto, V. (2017). *Distribuição potencial e atual do tamanduá-bandeira (Myrmecophaga tridactyla) e indicação de áreas prioritárias para sua conservação* [Tesis de maestría, Universidade de São Paulo]. Repositório universidad de São Paulo. <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/91/91131/tde-02052018-182256/pt-br.php>
- Rodriguez, A. N. O., García-Sánchez, S., Juárez-Agis, A., Alvarez-Alvarez, E. A., Salome, B. O., Torres, J. Z., & González, M. R. (2023). Vertebrados silvestres

- atropellados en asentamientos humanos del Pacífico sur mexicano. *Revista de Biología Tropical*, 71(1), 1-9. DOI:<https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop..v71i1.53600>
- Rodríguez-Correa, H., González-Rodríguez, A & Oyama, K. (2017). Perspectivas de la Ecología Molecular en un país megadiverso. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88(1), 3-13. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.002>.
- Rodríguez-Castro, K.G., Ciochetti, G., Ribeiro, J.W. Ribeiro, M.C & Galetti, P. (2017). Using DNA barcode to relate landscape attributes to small vertebrate roadkill. *Biodivers Conserv*, 26(5), 1161–1178. DOI:<https://doi.org/10.1007/s10531-017-1291-2>
- Rodríguez-Mahecha, J. V., M. Alberico, F. Trujillo & J. Jorgenson. (2006). Libro Rojo de los mamíferos de Colombia. Serie Libros Rojos de especies amenazadas de Colombia. Conservación Internacional Colombia, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Bogotá. 443 pp
- Rojano, C., Humanez-López, E. & Rincón-Aranguri, M (Editores). 2023. Manual de campo para el estudio de hormigueros. Fundación Cunaguard, Parex Resources Colombia Ltd. Sucursal, Corporinoquia.
- Rojano, C & Ávila, R. (2021). Mortalidad de vertebrados silvestres por atropellamiento en el departamento de Casanare, Colombia. *Rev Med Vet*, 42(1), 27-40. DOI:<https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss42.4>
- Rojano, C., López-Giraldo, M. E., Miranda-Cortés, L., & Ávila-Avalán, R. (2015a). Área de vida y uso de hábitats de dos individuos de oso palmero (*Myrmecophaga tridactyla*) en Pore, Casanare, Colombia. *Edentata*, 16(1),37-45.
- Rojano, C., Miranda, L., & Ávila, R. (2015b). Endoparasitos de *Myrmecophaga tridactyla* y *Tamandua tetradactyla* (pilosa: vermilingua) silvestres en Casanare, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 7(2),154-159. DOI:<https://doi.org/10.24188/recia.v7.n2.2015.255>
- Rojano, C., Miranda, L., & Ávila, R. (2015c). Densidad poblacional y biomasa del oso hormiguero gigante (*Myrmecophaga tridactyla*) en Pore, Casanare, Colombia. *Revista Biodiversidad Neotropical*, 5(1),64-70.

- Rojano, C., Miranda, L., Ávila, R. (Editores). 2014. Manual de Rehabilitación de Hormigueros de Colombia. Fundación Cunaguaro, Geopark Colombia S.A.S. El Yopal, Casanare. 155 p
- Romero-Hernandez, A. (2023). Sostenibilidad de la Ganadería Bovina en la Orinoquía: Caso municipio de Paz de Ariporo, Casanare. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/83494>
- Rosel, P. E. (2003). PCR-based sex determination in Odontocete cetaceans. *Conservation genetics*, 4(5), 647-649. DOI:10.1023/A:1025666212967
- Rossi, L., Rhon, E., Alonso, F., Luaces, J & Merani, M. (2013). Observaciones anatómicas e histológicas del sistema reproductor masculino y femenino en *Tamandua tetradactyla* (Myrmecophagidae: Xenarthra). *InVet.* 15(1): 17-28
- Rowe, G., Sweet, M., & Beebee, T. J. C. (2017). An introduction to molecular ecology. Oxford University Press, 535.
- Rozo-López, D. P., Carmona-Bedoya, M., Vallejo-Arévalo, H., Chala-Rosado, D. M., Cárdenas-Urrego, W., Hincapié-Parra, D. A., Pachón, P & Hernández Cervantes, M. (2021). Informe deforestación y vulnerabilidad climática de la Región Orinoquía.
- Rubio-Rocha, Y., Gaxiola-Camacho, S., Morales-García, M., Artigas-Gutiérrez, B., Sánchez-Ríos, A., Carvajal-Sauceda, F., & Espinoza-Evans, G. (2022). First records of road-killed mammals in the state of Sinaloa, México. *Therya Notes*, 3(2), 53-58. DOI: https://doi.org/10.12933/therya_notes-22-70
- Ruden, A., Castro, J. P., Gutiérrez, J. F., Koenig, S., Sotelo, M., & Arango, J. (2020). GANSO: Nuevo modelo de negocios y de asistencia técnica para la profesionalización de la Ganadería Sostenible en la Orinoquia colombiana.
- Ruiz-Agudelo, C. A., Suarez, A., Gutiérrez-Bonilla, F. de P & Cortes-Gómez, A. M. (2022). The economic valuation of ecosystem services in Colombia. Challenges, gaps and future pathways. *Journal of Environmental Economics and Policy*. 12(3), 285-304. DOI:<https://doi.org/10.1080/21606544.2022.2134218>

- Ruiz-Ramírez, L., González-Gallina, A., Soto, V., Pacheco-Figueroa, C. J & Pech-Canché, J. M. (2022). Comparison of road-killed mammals on roads of different types of jurisdictions and traffic volume in Veracruz, México. *Therya Notes*, 3(2), 82-86. DOI: https://doi.org/10.12933/therya_notes-22-75
- Russell, T. C., Neaves, L. E., & Herbert, C. A. (2011). Allocating sex in road-killed possums using PCR. *Australian Mammalogy*, 33(1), 1-4. DOI:<https://doi.org/10.1071/AM09028>
- Rytwinski, T., Soanes, K., Jaeger, J. A., Fahrig, L., Findlay, C. S., Houlahan, J., ... & van der Grift, E. A. (2016). How effective is road mitigation at reducing road-kill? A meta-analysis. *PLoS one*, 11(11), e0166941. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166941>
- Salazar-Moscoso, Y. M., Martínez-Garro, J., Guzmán-González, P. A & Plese, T. (2022). Extracción de ADN usando métodos mínimamente invasivos en Xenarthra orden Pilosa, una contribución a su conservación. *Actualidades Biológicas*, 44(116). DOI:<https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v44n116a06>
- Sánchez, D. A. G., Alfaro, N. A & Sandoval-Tress, C. (2010). Estructura molecular y desarrollo del pelo. *Dermatología cosmética, médica y quirúrgica*, 8(1), 54-61.
- Sánchez, P. J. I., Delgado-Trejo, C., Mendoza-Ramírez, E & Sauzo-Ortuño, I. (2013). Las carreteras como una fuente de mortalidad de fauna silvestre de México. CONABIO. *Biodiversitas*, 111, 12-16.
- Santos, S., Marques, J., Lourenço, A., Medinas, D., Barbosa, A., Beja, P & Mira, A. (2015). Sampling effects on the identification of roadkill hotspots: Implications for survey design. *Journal of Environmental Management*, 162(1), 87-95. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.037>
- San Vicente, M. G., & Valencia, P. J. L. (2008). Evidencias sobre la eficacia de los corredores ecológicos: ¿Solucionan la problemática de fragmentación de hábitats?. *Observatorio Medioambiental*, 11, 171-183.
- Saucedo-Banda, L. A. (2023). Análisis de la deforestación del Distrito Huabal–Región Cajamarca durante el periodo 2005–2020 y su proyección al año 2050 con

- teledetección. [Trabajo de grado, universidad nacional de Cajamarca]. Repositorio universidad nacional de Cajamarca. <http://hdl.handle.net/20.500.14074/5608>
- Scholl, B (2015).*Tamandua tetradactyla*. Bigal River Conservation Project. Recuperado de: https://www.flickr.com/photos/bigal_river_conservation_project_ecuador/
- Schwartz, A. L., Shilling, F. M., & Perkins, S. E. (2020). The value of monitoring wildlife roadkill. *European journal of wildlife research*, 66(1),1-12. DOI:10.1007/S10344-019-1357-4/FIGURES/4
- Seijas, A. E., Araujo-Quintero, A, & Velásquez, N. (2013). Mortalidad de vertebrados en la carretera Guanare-Guanarito, estado Portuguesa, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 61(4), 1619-1636.
- Serrón, A., Coitiño, H., & Segura, Á. (2020). Atropellos de mamíferos en la Región Este de Uruguay y su relación con los atributos del paisaje. *Innotec*, (20),139-157. DOI:<https://doi.org/10.12461/20.05>
- Sieber, A., Uvarov, N. V., Baskin, L. M., Radeloff, V. C., Bateman, B. L., Pankov, A. B., & Kuemmerle, T. (2015). Post-Soviet land-use change effects on large mammals' habitat in European Russia. *Biological Conservation*, 191, 567-576. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.07.041>
- Soslau, G. (2020). The role of the red blood cell and platelet in the evolution of mammalian and avian endothermy. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 334(2), 113-127. DOI:<https://doi.org/10.1002/jez.b.22922>
- Superina, M & Abba, A. (2020). CONSERVATION PERSPECTIVES FOR A HIGHLY DISPARATE LINEAGE OF MAMMALS: THE XENARTHRA. *Mastozoología neotropical*, 27, 48-67.
- Superina, M., & Loughry, W. J. (2015). Why do Xenarthrans matter?. *Journal of Mammalogy*, 96(4), 617–621. DOI:<https://doi.org/10.1093/jmammal/gv099>
- Supple, MA & Shapiro, B. (2018). Conservación de la biodiversidad en la era de la genómica. *Genome Biol* 19, 131. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1520-3>

- Spanowicz, A. G., Teixeira, F., & Jaeger, A. (2020). An adaptive plan for prioritizing road sections for fencing to reduce animal mortality. *Conservation Biology*, 34(5), 1210-1220. DOI: <https://doi.org/10.1111/cobi.13502>
- Springer, M., Murphy, W., Eizirik, E & O'brien, S. (2005). Evidence for major placental clades. The rise of placental mammals. Universidad Johns Hopkins
- Stasiukynas, D.C., Mejía, A., Lizarazo, J., Wagner-Wagner, C. M., Gómez, M. F & Payán, E. (2021). Las carreteras al mar: estudio sobre el impacto de los vertebrados silvestres y los ecosistemas circundantes en dos corredores viales de Colombia. *Trilogía Ciencia Tecnología Sociedad*, 13(24), 6-31. DOI:<https://doi.org/10.22430/21457778.1637>
- Taberlet, P., P. Waits & G. Luikart. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(8), 323-327. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01637-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01637-7)
- Trovati, R. G & Brito, B. D. (2009). Nota sobre deslocamento e área de uso de tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) translocado no Cerrado brasileiro. *Neotropical Biology and Conservation*, 4(3), 144-149. DOI:10.4013/nbc.2009.43.04
- Trujillo, F., M. Gutiérrez, A. Díaz-Pulido, A. Pérez, & E. Payan. (2010). Mamíferos. En: Biodiversidad de la cuenca del Orinoco: bases científicas para la identificación de áreas prioritarias para la conservación y uso sostenible de la biodiversidad (C. A. Lasso, J. S. Usma, F. Trujillo & A. Rial, eds.).
- Torres, A., Jaeger, J. A., & Alonso, J. C. (2016). Assessing large-scale wildlife responses to human infrastructure development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(30), 8472-8477. DOI:<https://doi.org/10.1073/pnas.1522488113>
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. (2018). La Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN. Versión 2017-3.
- Uribe, H. A. (2019). Aplicación y evaluación de una propuesta metodológica para la determinación del impacto de la infraestructura vial sobre la mortalidad de fauna silvestre en el Valle de Aburrá y el Oriente Antioqueño. [Tesis de Maestría, Instituto

- Tecnológico Metropolitano]. Repositorio Instituto Tecnológico Metropolitano. <http://hdl.handle.net/20.500.12622/5822>
- Vaishali B. M, Vijaya P, Deepak Y. K, Bhausaheb P. M, Krishna V. K. (2019). Hair: a good source of DNA to solve the crime. *Archivos de investigación clínica y biomédica* 3: 287–295.
- Valdes, E & Brenes, A.(2012). Feeding and nutrition of anteaters. In: Fowler's zoo and wild animal medicine. Current therapy. Elsevier Saunders. p 378-383.
- Vargas-Serna, J., Valencia, S., & Villegas, J. C. (2022). Análisis del uso de la tierra en las sabanas de los Llanos Orientales de Colombia, la región de la Orinoquía, desde 1999 hasta 2022 [Trabajo de grado, universidad de Antioquia]. Repositorio de la Universidad de Antioquia. <https://hdl.handle.net/10495/28560>
- Vaschalde, P. J., Flores, F. S., Fernández, M. C. F., Barolin, J., Tauro, L. B., & Monje, L. D. (2023). Anaplasmataceae presence in *Amblyomma calcaratum* associated with anteaters (*Tamandua tetradactyla*) in the rainforest ecoregion, Argentina. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 14(6), 102222. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102222>
- Vasiliev, D. (2022). Infraestructura vial y conservación de la biodiversidad. En: Kabashkin, I., Yatskiv, I., Prentkovskis, O. (eds) Fiabilidad y estadísticas en el transporte y la comunicación. *Apuntes de la conferencia sobre redes y sistemas*, vol. 410. Springer, Cham. DOI:https://doi.org/10.1007/978-3-030-96196-1_34
- Velarde-Félix, J. S., Molina-Benítez, C. E., del Rocío Solórzano-Rosales, S., Cázares-Salazar, S. G., Rendón-Aguilar, H., Murillo-Llanes, J & Ríos-Tostado, J. J. (2008). Identificación del sexo mediante análisis molecular del gen de la amelogenina. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 55(1), 17-20.
- Villanueva, V., Aguilar, V., Lólez, J. R & Nigenda, Q. M. (2018). Las vías de comunicación terrestre y su efecto en la biodiversidad. *Biología y sociedad*, 1(1), 44-54.
- Vizcaíno, S & Loughry, W. (2008). Xenarthran biology: Past, present and future. En: The Biology of the Xenarthra. Vizcaíno SF, Loughry WJ (eds), pp. 1-7.

- Vozdova, M., Kubickova, S. & Rubes, J. (2019). Sex determining region Y (SRY) sequencing and non-invasive molecular sexing in three wild species: brown (*Parahyaena brunnea*) and spotted (*Crocuta crocuta*) hyenas and aardvark (*Orycteropus afer*). *Reproduction, Fertility and Development*, 31(8), 1419-1423. DOI:<https://doi.org/10.1071/RD18468>
- Watt, A. (2020). Land-use intensity and land-use change: impacts on biodiversity. In *Life on land* (pp. 603-615). Cham: Springer International Publishing. DOI:https://doi.org/10.1007/978-3-319-71065-5_87-1
- WWF (2020). Informe Planeta Vivo 2022. Hacia una sociedad con la naturaleza en positivo. Almond, R.E.A.; Grootenhuis, M.; Juffe Bignoli, D. y Petersen, T. (Eds). WWF, Gland, Suiza.
- Xue, X., Lin, Y., Zheng, Q., Wang, K., Zhang, J., Deng, J., ... & Gan, M. (2020). Mapping the fine-scale spatial pattern of artificial light pollution at night in urban environments from the perspective of bird habitats. *Science of the Total Environment*, 702, 134725. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134725>
- Zenke, P., Zorkóczy, OK., Lehoczky, P., Ózsvári, L & Pádár, Z. (2022). Detección molecular del sexo y de la especie de animales de caza europeos con astas con fines forenses. *Animals*, 12, 246. DOI:<https://doi.org/10.3390/ani12030246>