

**Pontificia Universidad Javeriana**

**Facultad de Ciencias**

**Carrera de Biología**



**ADN AMBIENTAL COMO HERRAMIENTA PARA LA CONSERVACIÓN DE MAMÍFEROS  
TERRESTRES Y SEMIACUÁTICOS**

**Autora**

**ANGIE CAMILA CADENA RAMOS**

Trabajo de Grado para obtener el título de Bióloga

**Director**

Manuel Ruíz García

**Bogotá D.C.**

**Junio del 2021**

**Pontificia Universidad Javeriana**

**Facultad de Ciencias**

**Carrera de Biología**



**ADN AMBIENTAL COMO HERRAMIENTA PARA LA CONSERVACIÓN DE MAMÍFEROS  
TERRESTRES Y SEMIACUÁTICOS**

**Autora**

**ANGIE CAMILA CADENA RAMOS**

Trabajo de Grado para obtener el título de Bióloga

**Director**

Manuel Ruíz García

**Evaluadora**

Diana Álvarez González

**Bogotá D.C.**

**Junio del 2021**

# ADN AMBIENTAL COMO HERRAMIENTA PARA LA CONSERVACIÓN DE MAMÍFEROS TERRESTRES Y SEMIACUÁTICOS

Angie Camila Cadena Ramos<sup>1</sup>

---

## Resumen

La extracción de ADN, a partir de muestras ambientales de variados orígenes, ha demostrado ser una herramienta rápida, rentable y de amplia cobertura para la implementación de estrategias de conservación de la biodiversidad en distintas regiones del mundo. La mayoría de las publicaciones científicas relacionadas con ADN ambiental se enfocan en peces y macroinvertebrados. Cabe acotar que, recientemente se ha incrementado el número de investigaciones en las que se utiliza eDNA para el estudio de mamíferos. En esta revisión se recopiló información acerca de los aportes del ADN ambiental en la conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos a nivel mundial, y se discutió el potencial uso de esta herramienta en la conservación de mamíferos de Colombia. Debido a que las metodologías de ADN ambiental aún están en desarrollo, en lugar de reemplazar los métodos tradicionales utilizados en programas de conservación de mamíferos, el eDNA es un complemento a éstos. Sin embargo, en el futuro se espera que estudios basados en ADN proveniente del ambiente tengan mayor influencia en el marco legal de protección de especies.

**Palabras clave:** ADN ambiental, conservación de la biodiversidad, mamíferos semiacuáticos, mamíferos terrestres.

## Introducción

De acuerdo con la lista roja de la unión internacional para la conservación de la naturaleza (IUCN 2019), más de una cuarta parte de las especies de mamíferos a nivel mundial se encuentra en estado de amenaza debido principalmente a tres factores: 1) la fragmentación y pérdida de hábitat, 2) la caza, y 3) la introducción de especies exóticas. A estas amenazas se suma el incremento de especies de mamíferos que son percibidos como plagas. Además, la deficiencia de datos impide una estimación sólida del estado tanto de individuos como de poblaciones de mamíferos distribuidos en los diferentes biomas (Harper et al. 2019; Sales et al. 2020a).

Según Lodge et al. (2012), tres aspectos clave suelen guiar la gestión de especies y ecosistemas: 1) prevenir invasiones de especies dañinas, “detección temprana y respuesta rápida”; 2) conservación de especies nativas en peligro, “protección de puntos críticos de biodiversidad”, y 3) evaluar el riesgo de bioseguridad “prevención”. Por otro lado, Ishige et al. (2017) afirman que el primer paso en la conservación de la vida silvestre y el hábitat es contar con un inventario detallado, ya que las decisiones

de conservación eficaces se basan en datos precisos de encuestas (Priestley et al. 2021). Para cumplir con los aspectos y pasos clave en la gestión y conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos, tradicionalmente se utilizan cámaras trampa, trampas mecánicas, entre otras técnicas que suelen ser invasivas, tienen límites de detección espaciales y temporales deficientes, requieren de extensos periodos de tiempo o no son factibles debido a que presentan fallas como el muestreo no estandarizado o resultados incongruentes con la taxonomía moderna. Por lo tanto, existe una clara necesidad de implementación de métodos más rentables y rápidos para desarrollar estrategias efectivas para la conservación y el manejo de los mamíferos terrestres y semiacuáticos (Thomsen et al. 2012).

Un campo que intenta dar solución a las deficiencias presentadas al utilizar métodos tradicionales en la obtención de muestras de vertebrados es el de la genética no invasiva. Esto es, el análisis de material genético dentro de rasgos de organismos como pelo, heces y otros materiales biológicos desprendidos. Un avance en el desarrollo de métodos genéticos no invasivos es el estudio del ADN ambiental (environmental DNA, eDNA) (Barnes & Turner 2016), el cual se define como el material genético extraído directamente de muestras ambientales; es decir, sedimentos, agua en diferentes estados, aire, etc. El término ADN ambiental inicialmente fue considerado para estudios de microbiología con el fin de obtener información genética de los microorganismos que no se pueden cultivar en condiciones de laboratorio. Posteriormente, en el año 2003, a partir de muestras de sedimento se obtuvo ADN de plantas y animales extintos y existentes (Willerslev et al. 2003). Sin embargo, no fue sino hasta el año 2008 que se empleó el término ADN ambiental en estudios de macroorganismos (Ficetola et al. 2008).

En un sentido amplio, la definición de ADN ambiental abarca también ADN de células de la piel, plumas, pelo, heces, saliva o cualquier tejido biológico encontrado en el ambiente, sin necesidad de que el organismo al que pertenece esté presente en el entorno (Thomsen & Willerslev 2015). En un sentido estricto, el ADN proveniente de muestras ambientales sin signos evidentes de material de origen biológico es el único considerado ADN ambiental.

Las investigaciones basadas en ADN obtenido directamente de muestras ambientales han sido enfocadas a estudios de macroinvertebrados y peces. Los mamíferos son el objetivo en sólo 8% de los estudios de vertebrados (Tsuji et al. 2019). Sin embargo, con el desarrollo de técnicas de secuenciación de nueva generación, ha habido un aumento reciente en estudios diseñados para detectar y / o monitorear comunidades de mamíferos en ambientes terrestres y de agua dulce (por ejemplo, Harper et al. 2019; Sales et al. 2020a; Ushio et al. 2017).

Los esfuerzos de conservación y gestión realizados a partir de estudios de ADN ambiental se han visto limitados en gran medida porque están centrados en investigaciones con especies acuáticas (Williams et al. 2018). Pero, en la última década se ha incrementado el número de publicaciones científicas en las que se evidencia que desde muestras de variados orígenes, este proporciona resultados favorables en estudios relacionados con identificación (Barber-meyer et al. 2020, Kinoshita et al. 2019), distribución (Modave 2017), monitoreo (Wheat et al. 2016), sexaje (Barber-meyer et al. 2020, Nichols, Spong 2017), análisis de diversidad (Drinkwater et al. 2020, Egeter et al. 2018), abundancia (Lodge et al. 2012) y riqueza (Sales et al. 2020a) de mamíferos terrestres y semiacuáticos (Padgett-Stewart et al. 2016; Yonezawa et al. 2020) tanto en trabajos con especies comunes como con especies raras, en peligro de extinción o invasoras (Barnes, Turner 2016).

Debido al aumento en el reporte de investigaciones de ADN ambiental relacionadas con mamíferos no acuáticos de distintas regiones del mundo, es pertinente contar con una revisión en la que se proporcione información sobre los aportes de esas investigaciones para la conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo es realizar una revisión sistemática donde se recopile información acerca de los aportes del ADN ambiental en el contexto de conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos, adicionalmente se discute el potencial uso del ADN ambiental como herramienta para la conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos en Colombia.

## 1. Materiales y métodos

**1.1. Búsqueda inicial.** Se realizó una búsqueda inicial en bases de datos científicas (Web of science, Scopus, EbscoHost, ProQuest y Google Scholar). Durante la búsqueda, tanto en inglés como en español, se empleó la combinación de términos o palabras clave y operadores de búsqueda como: “Environmental DNA”, eDNA\*, “dirt DNA”, “environmental samples”, “environmental genomics”, “DNA metabarcoding”, “terrestrial mammals”, “semiaquatic mammals” y mammals\*. En la Tabla 1 se muestran los descriptores de búsqueda utilizados por base de datos. También se extrajo información de otras fuentes de búsqueda tradicionales como Google, que proporcionan documentos como artículos de divulgación y artículos científicos.

*Tabla 1. Descriptores de búsqueda utilizados en las bases de datos Web of science, Scopus, EbscoHost, ProQuest y Google scholar.*

---

**Base de datos**

**Descriptores**

**Campos**

Web of science	(eDNA* AND “Terrestrialmammals”) (“DNA metabarcoding” AND mammals*) (“dirt DNA” AND “EnvironmentalDNA” OR "environmental samples") (“environmental genomics” AND “semiaquatic mammals”)	TEMA
Scopus	(Environmental DNA) AND (Terrestrial mammals) OR (“eDNA*”) AND (Terrestrial mammals) OR (DNA metabarcoding) AND (Terrestrial mammals)	TÍTULO PALABRAS CLAVE
EbscoHost	"TI "eDNA" AND TI mammals""Dirt DNA" AND terrestrial mammals” "DNA metabarcoding ANDterrestrial mammals” “TI environmental dna AND terrestrial mammals”	TÍTULO TEXTO COMPLETO (ENLÍNEA)
ProQuest	((eDNA) AND "terrestrial mammals" NOT noft(amphibian)NOT noft(terrestrial microorganisms) NOT noft(microbial) NOT (terrestrial snake) NOT avian NOT bacteria NOT fishes NOT fish))	TODO EL TEXTO
Google scholar	Environmental DNA eDNA, OR dirt OR DNA, OR mammal "terrestrial mammals" – Fish. eDNA "environmental DNA" OR"dirt DNA" OR "mammal" "terrestrial mammals" -Fish -fish, -arthropods	TODO EL ARTÍCULO

**1.2. Selección de datos.** La búsqueda se efectuó a nivel nacional e internacional, teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión en cada uno de los documentos:

**1.2.1. Criterios de inclusión.**

- Tipo de documento: artículo de investigación, artículo de revisión, tesis y artículo de divulgación.

- Ventana de tiempo: documentos publicados entre 2008-2021, debido a que, a partir del año 2008, se empleó el término ADN ambiental en investigaciones de macroorganismos (Ficetola et al. 2008).

### **1.2.2. Criterios de exclusión.**

- Documentos donde no se mencionan los términos “ADN ambiental”, “environmental DNA”, “eDNA”, “dirt DNA” o “ADN del ambiente”.
- Documentos sin información acerca de mamíferos terrestres o semiacuáticos.

**1.3. Elegibilidad.** Para lograr el objetivo de la revisión, los documentos se filtraron mediante un estudio de títulos y resúmenes. Además, la calidad de la literatura seleccionada se confirmó por los contenidos y sus citas en revistas revisadas por pares. De los resultados obtenidos, se tomaron 70 documentos, de los cuales 60 cumplieron con los criterios anteriormente mencionados. Los artículos seleccionados se documentaron en tres secciones: 1) aplicaciones del ADN ambiental en biología de la conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos, 2) limitaciones y perspectivas futuras y, 3) potencial uso del ADN ambiental como herramienta para la conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos en Colombia.

**1.4. Extracción de datos.** Las características de los documentos incluidos en el presente trabajo se recopilaron en una tabla de conocimiento o matriz de datos que vinculó las siguientes variables: tipo de publicación, autores, revista o sitio donde fue publicado el documento, año de publicación, país donde se realizó la investigación, definición de ADN ambiental usada, tema principal, objetivos, taxones incluidos en la investigación, uso del ADN ambiental como herramienta en la biología aplicada, origen de la muestra de ADN ambiental, observaciones, principales resultados, aporte más importante relacionado con la conservación de la biodiversidad, limitaciones, conclusiones, entre otros.

## **2. Resultados y Discusión**

Actualmente, muchas poblaciones de especies permanecen sin descubrir y de otras sólo se cuenta con escasa información sobre sus distribuciones y densidades. Superar estas carencias de conocimiento y limitaciones prácticas es cada vez más posible mediante técnicas basadas en ADN ambiental (eDNA). Además, con la técnica de eDNA metabarcoding que permite el análisis del ADN proveniente de múltiples especies a partir de una sola muestra ambiental, se facilitan las evaluaciones realistas, de bajo costo y estandarizables de la biodiversidad a distintos niveles taxonómicos (Schnell et al.2012). Por lo que, técnicas basadas en eDNA y en eDNA metabarcoding, posibilitan el surgimiento de nuevas oportunidades para avanzar en la comprensión de las comunidades complejas y ricas en especies. Igualmente, facilitan el desarrollo de programas de biomonitoreo a gran escala, entre otros usos (Zinger

et al. 2020).

Una de las primeras investigaciones en las que se utilizó el término ADN ambiental en estudios de macroorganismos se centró en las ranas toro americanas invasoras (*Rana catesbeiana*) en los humedales franceses (Ficetola et al. 2008). A partir de esa fecha, se ha evidenciado que, el análisis de eDNA de entornos naturales, puede permitir la realización de estudios con diferentes objetivos enfocados en la diversidad biótica de todo tipo de ambientes (Cristescu, Hebert 2018).

Debido a la facilidad de toma de muestras en ecosistemas de agua dulce, la mayoría de las investigaciones de eDNA se han centrado en estudios de especies acuáticas. Sin embargo, el ADN de muestras de agua puede usarse también para estudiar especies terrestres y semiacuáticas (Wang et al. 2019). Además, el eDNA ofrece claras ventajas sobre los enfoques tradicionales de evaluación de la biodiversidad, en ambientes acuáticos y terrestres (Fernandes et al. 2018); en estos últimos, las muestras ambientales pueden tener variados orígenes. Algunos autores consideran que residuos fisiológicos como saliva, orina, mucosa, sangre, gametos o muda de piel encontrados en el ambiente, pueden ser considerados muestras ambientales de las cuales se puede obtener ADN (Barber-meyer et al. 2020; Ishige et al. 2017; Schnell et al. 2012; Van Beeck Calkoen et al. 2019; Wheat et al. 2016). Sin embargo, cuando la elección del sitio de muestreo es influenciada por un conocimiento biológico o ecológico previo de las especies de interés, la muestra ambiental no se distinguiría de la muestra no invasiva, puesto que de antemano se conoce qué organismos son los que probablemente dejaron el rastro. Por lo tanto, cuando se trata de muestras obtenidas a partir de huellas, lamidas de sal, heces, cadáveres, rastros de alimento u otras fuentes a partir de las cuales se puede extraer ADN, el análisis tendría que ser más riguroso en cuanto a si se consideran o no muestras ambientales, debido a que a pesar de estar presentes en el ambiente, si son basadas en conocimientos previos de los organismos, los estudios se verían sesgados a ciertas especies, dejando de lado otras de las cuales también se puede obtener información a partir de la muestra ambiental.

Para el estudio de especies terrestres, surgió una subdisciplina llamada iDNA (ADN derivado de invertebrados), donde el material genético ingerido por los invertebrados (micropredadores), permite caracterizar la biodiversidad de los hospederos; estos son generalmente vertebrados (Schnell et al. 2018). En este caso, dependiendo de la variedad de hospederos que pueda tener el invertebrado, el ADN extraído podría considerarse o no ADN ambiental. Por ejemplo, si el micropredador tiene una dieta especie-específica, el estudio estaría direccionado a una sola especie y no cabría dentro de la definición de ADN ambiental, pero si el invertebrado tiene una dieta generalista, los investigadores no podrían conocer previamente con exactitud qué especies estarán vinculadas en el estudio.

En cuanto a mamíferos, las técnicas de eDNA barcoding y metabarcoding han sido principalmente

reportadas para organismos acuáticos, incluidos mamíferos como manatíes, marsopas, ballenas y delfines (Juhel et al. 2020; Kinoshita et al.2019; Lozano-Mojica & Caballero 2021). No obstante, recientemente, se ha incrementado el número de publicaciones donde se utilizan y desarrollan protocolos y técnicas de ADN ambiental para variados tipos de simulaciones controladas y estudios de campo que tienen que ver con distintas ramas de la biología aplicada a diferentes niveles taxonómicos de mamíferos terrestres y semiacuáticos (Seeber et al.2019; Sellers, Hänfling 2020; Ushio et al.2017). En estas investigaciones se incluyen especies comunes, raras, crípticas, difíciles de detectar, en peligro de extinción o invasoras, las cuales están distribuidas en los diferentes biomas (Harper et al.2019; Hauger et al. 2020; Ishige et al.2017; Rodgers, Mock 2015). Los orígenes de las muestras de eDNA usadas provienen de fuentes hídricas naturales o artificiales y de ambientes terrestres (Kinoshita et al.2019).

**2.1. Aplicaciones del ADN ambiental en biología de la conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos.** A pesar de que los mamíferos constituyen un grupo comparativamente bien estudiado, en la actualidad, se ven afectados por varios factores a un ritmo sin precedentes, entre estos se encuentran la fragmentación y pérdida de hábitat, la caza, la introducción de especies exóticas y el incremento de mamíferos que son percibidos como plaga (Harper et al. 2019; Sales et al. 2020a). Por tal razón, es prioridad conocer a fondo el estado de las poblaciones de mamíferos para establecer adecuados programas de conservación. El ADN ambiental ofrece un enfoque prometedor para evaluar la diversidad de este grupo, ya que ayuda en la documentación de cambios temporales en los rangos de especies conocidas y se prevé puede revelar la existencia de más de 300 nuevas especies en los próximos 20 años (Calvignac-Spencer et al.2013; Coutant et al. 2021).

El ADN ambiental representa una herramienta que puede ser ampliamente utilizada en sistemas acuáticos y terrestres para el estudio de taxones de mamíferos no acuáticos, debido a que proporciona una base para el seguimiento futuro a nivel de paisaje en escalas espaciales y temporales amplias; es decir, el ADN ambiental puede tener repercusiones en las investigaciones regionales y nacionales (Sales et al. 2020b).

A diferencia de los métodos tradicionalmente usados para estudiar mamíferos terrestres y semiacuáticos, con el ADN ambiental no es común encontrar estimaciones sesgadas de ocurrencia, sobre todo de especies raras, esquivas (difíciles de observar) o de baja densidad; mientras que, con los métodos tradicionales, la deficiencia de datos impide una estimación sólida de las expansiones o disminuciones del área de distribución de los mamíferos y las tendencias de la población, lo que obstaculiza la conservación de las especies (Sales et al. 2020b).

La gran variedad de fuentes de eDNA permite hacer estudios más eficientes, de bajo costo y de mayor escala temporal y espacial, basados en evidencia para la conservación y el manejo de las especies (Sales

et al. 2020b). En el anexo 1 se presentan algunas de las aplicaciones del eDNA como herramienta informativa y complementaria a métodos tradicionales en estudios que buscan dar respuesta a dificultades en la detección, identificación, monitoreo, caracterización de la diversidad, gestión de especies invasoras, análisis de dieta y sexaje de mamíferos terrestres y semiacuáticos. A continuación, se detallan los usos más importantes:

**2.1.1. Detección, identificación y monitoreo de especies.** El monitoreo de especies con muestras ambientales proporciona un método de muestreo integral para determinar los datos comunitarios necesarios para su conservación y manejo (Deiner et al. 2017).

Según los estudios existen tres tipos de eDNA que podrían ser útiles para detectar y monitorear mamíferos terrestres: 1) rastros específicos como heces, cabello, orina o huellas, muestreados en áreas donde se espera que haya presencia de mamíferos, 2) iDNA de moscas carroñeras / insectos y sanguijuelas que contienen ADN de mamíferos y, 3) donde termina el ADN, es decir, estanques / agua potable, lamidas de sal, etc. (Winding et al.2019). Cabe aclarar que cuando se trata de rastros específicos o iDNA, la muestra podría ser considerada como no invasiva en lugar de ambiental si antes del análisis genético, se conoce a qué especie pertenece.

Uno de los estudios iniciales en los que se utilizó ADN ambiental para detectar especies de mamíferos fue el de Andersen et al. (2012). A partir de análisis de ADN del suelo, registraron la presencia de grandes mamíferos terrestres en parques de safaris, jardines zoológicos y granjas en tres países europeos (Dinamarca, Alemania y Suecia).

Un ejemplo de detección exitosa de mamíferos terrestres, haciendo uso de eDNA en rastros específicos, es el que se reporta en Kinoshita et al. (2019). Se mostró que es posible recuperar el ADN de huellas de nieve e identificar especies de mamíferos terrestres a partir de sus rastros. Los investigadores lograron reconocer tres especies de carnívoros y un venado en la villa Kuta, al norte de Kyoto, Japón a partir del ADN proveniente de huellas que habían sido formadas días atrás.

En los Estados Unidos, investigaciones similares fueron llevadas a cabo por Franklin et al. (2019) y Barber-meyer et al. (2020). En estos trabajos se reportaron identificaciones contundentes de mamíferos terrestres a partir de huellas en la nieve.

En cuanto a estudios donde se utiliza iDNA de micropredadores para monitorear mamíferos terrestres en ambientes naturales, se encuentra el de Schnell et al. (2012). En esta investigación, a partir del iDNA proveniente de sanguijuelas hematófagas de una selva tropical vietnamita de difícil acceso se identificaron mamíferos crípticos, raros y recién descubiertos. Un estudio similar fue realizado por Schnell et al. (2018). Haciendo uso de iDNA de sanguijuelas hematófagas como herramienta de

detección, se logró identificar varios vertebrados, en su mayoría mamíferos terrestres. Sin embargo, a diferencia de Schnell et al. (2012), este estudio se llevó a cabo en tres continentes, abarcando cinco regiones geográficas diferentes que cubren casi todo el rango de sanguijuelas terrestres hematófagas, representando todos los lugares del mundo donde podría aplicarse el método.

Por otro lado, Rodgers et al. (2017) confirmaron que la metabarcoding de ADN derivado de la mosca carroñera, es una buena herramienta para la detección de mamíferos terrestres ya que al comparar con los resultados obtenidos por las cámaras trampa los investigadores lograron identificar un mayor número de mamíferos terrestres residentes en la Isla de Barro Colorado en Panamá.

Las fuentes hídricas también representan un recurso de eDNA proveniente de mamíferos terrestres y semiacuáticos. Esto es debido a que brindan oportunidades para beber, alimentarse y reproducirse (Harper et al. 2019). Lo anterior da pie para que con métodos basados en eDNA se puedan establecer evaluaciones rápidas y rentables de mamíferos. Por ejemplo, Cannon et al. (2016) reportaron que, con muestras de agua recolectadas del río Cuyahoga en Ohio (Estados Unidos), recuperaron eDNA de una amplia gama de organismos, incluidas 17 especies de mamíferos. La mayoría eran terrestres, pero también encontraron ADN de algunos organismos semiacuáticos como castores y ratas almizcleras. Los autores mencionan que es probable que las muestras de eDNA de mamíferos hayan sido de heces o cadáveres que estaban descomponiéndose en el río. Ushio et al. (2017) destacan el uso de eDNA metabarcoding para detectar taxones de mamíferos usando muestras recolectadas de ecosistemas forestales en Hokkaido (Japón). Resultados similares se obtuvieron en los reportes de Furlan et al. (2020) en parques naturales de Australia y Seeber et al. (2019) en parques naturales de Namibia y Tanzania, al extraer ADN ambiental de zonas áridas o con agua limitada, donde las especies terrestres usualmente se ven obligadas a congregarse en pozos de agua (Furlan et al. 2020; Seeber et al. 2019).

No obstante, para las fuentes de agua, la señal de eDNA de mamíferos silvestres, tiene probabilidades de detección relativamente bajas en comparación con los peces. Sellers & Hänfling (2020) demostraron que la presencia de mamíferos arbóreos y semiacuáticos se puede detectar de manera confiable a partir del eDNA del agua de lagos, siempre que el tamaño de la muestra (densidad poblacional) sea suficiente para adaptarse a las bajas probabilidades de detección.

Cabe aclarar que las muestras de ADN ambiental provenientes de fuentes de agua también han sido utilizadas en estudios piloto para la identificación de especies de mamíferos terrestres en condiciones de cautiverio. Así lo muestran Rodgers & Mock (2015) a partir de la recolección de agua potable en una instalación de coyotes cautivos en Utah (Estados Unidos). Identificaron positivamente la especie de coyote presente. Posteriormente, Ushio et al. (2017) hicieron análisis de metabarcoding de eDNA de muestras de agua de jaulas de zoológicos en Yokohama (Japón) y detectaron con éxito 10 de las 13

especies de mamíferos presentes, entre las que se encontraban mamíferos terrestres y semiacuáticos.

El ADN ambiental, también ha sido usado para rastrear especies terrestres en ecosistemas urbanos. Así lo demuestran Kim et al. (2020), que a partir de la recolección de muestras de agua de un ecosistema urbano de la ciudad de Suwon (Corea del sur) detectaron a nivel específico, mamíferos terrestres como ratones, cánidos, mapaches, ardillas, y por supuesto, humanos. Un estudio similar fue publicado por Hupalo et al. (2021), quienes, con fines educativos, utilizaron ADN ambiental acuático como método rápido de evaluación de la biodiversidad urbana en la ciudad de Trondheim (Noruega) encontrando gran variedad de macroorganismos, entre estos, mamíferos terrestres como cerdos, bovinos, entre otros. Este tipo de hallazgos, permiten que, posteriormente a través de divulgación científica, se promueva el conocimiento sobre la biodiversidad en áreas urbanas, ya que una sociedad educada que demuestra interés y compromiso es un factor clave en la conservación de la biodiversidad.

**2.1.2. Genética/genómica de poblaciones.** El muestreo genético de poblaciones silvestres permite abordar cuestiones de demografía, parentesco individual, estructura de la población y más aspectos importantes de la biodiversidad que difícilmente se resuelven con otro tipo de monitoreos. Por ejemplo, el monitoreo del comportamiento (Aylward et al. 2018). Sin embargo, el estudio de genética de poblaciones a partir de muestras de ADN ambiental ha presentado grandes desafíos en comparación con diferentes estudios basados en eDNA, debido a que, a diferencia de los ya conocidos análisis genéticos poblacionales no invasivos a partir de muestras específicas como cabello, heces, entre otros, el análisis simultáneo de ADN de múltiples individuos y especies requiere de una mejor resolución para evaluar adecuadamente los niveles precisos de variación genética o estimar medidas de población, como el tamaño efectivo, el índice de fijación, entre otras (Barnes & Turner 2016). Algunas publicaciones mencionan métodos novedosos de genómica de poblaciones a partir de muestras de ADN ambiental. Tal es el caso de Aylward et al. (2018). A partir de muestras de corteza de árbol mordidas por lémures, lograron obtener genomas mitocondriales completos para el análisis genómico poblacional de aye-aye de Madagascar (*Daubentonia madagascarensis*), una especie de lémur en peligro de extinción. Sus resultados demostraron una alta diferenciación genética entre algunas poblaciones.

Si bien es cierto que publicaciones como la de Aylward et al. (2018) utilizan muestras no invasivas, sería interesante indagar hasta qué punto estas podrían considerarse ambientales, ya que la muestra es basada en rastros biológicos evidentes y al ser tomada de cortezas que usualmente son mordidas por lémures, se espera obtener ADN de aye-aye.

La aplicación de eDNA para estudios similares en distintos mamíferos terrestres y semiacuáticos puede ser un desafío debido a la considerable falta de datos de referencia de genética de poblaciones. Sin

embargo, mientras más asequibles sean los métodos para realizar estudios genético-poblacionales, además de la facilidad para acceder a los lugares de muestreo, el uso de eDNA en genética de poblaciones puede ser una posibilidad real y cercana (Barnes & Turner 2016).

### **2.1.3. Estimación de medidas e índices de biodiversidad.**

**2.1.3.1. Riqueza.** Los métodos convencionales para estudiar la riqueza y la abundancia están limitados por la identificación taxonómica y pueden causar perturbaciones o destrucción del hábitat. Igualmente, en algunas ocasiones dependen de métodos en los que es difícil detectar especies pequeñas o elusivas, lo que imposibilita las estimaciones para comunidades enteras. El eDNA puede complementar estos métodos al caracterizar con precisión la riqueza de especies de la comunidad en estudio, debido a que permite muestrear una mayor diversidad y aumentar la resolución taxonómica. Gracias al cálculo de índices de diversidad, utilizando el software apropiado, es posible modelar y asociar ecológicamente los resultados de secuenciación de eDNA metabarcoding (Deiner et al. 2017; Thomsen & Willerslev 2015).

Las evaluaciones más comunes incluyen diversidad alfa (rarefacción, visualización de perfiles taxonómicos) y diversidad beta (componentes principales / análisis de coordenadas, ordenación, etc.), antes de la prueba de hipótesis mediante análisis estadístico posterior (Deiner et al. 2017).

*Índice Chao2.* En muestras ambientales, para estimar la riqueza a partir de diversidad alfa, el índice Chao2, es útil en estudios con iDNA. En base a datos de ausencia/presencia, muestra la diferencia en la estructura de la comunidad entre los sitios de muestreo. Es decir, el coeficiente de Chao2 tiene en cuenta el efecto que tienen las especies no detectadas sobre el conjunto total; además, supera a otros índices de disimilitud cuando hay una gran cantidad de especies raras presentes en la muestra (Chao et al. 2005). En la publicación de Drinkwater et al. (2020) se menciona que, la detección de un mamífero a partir de iDNA proveniente de sanguijuelas, requiere que el iDNA dentro del invertebrado esté lo suficientemente intacto para la amplificación por PCR. Por lo tanto, el iDNA probablemente subestime la diversidad real en un hábitat dado. Por esa razón, los investigadores utilizaron el índice de Chao2 para estimar la diversidad alfa de los mamíferos, en función de la incidencia de los taxones y así dar cuenta del potencial de muestreo. Por otro lado, en el estudio también se reporta el uso del índice de Simpson como medida de diversidad, con un intervalo de confianza del 84%.

*Índice de Shannon.* Este índice de estimación de riqueza también ha sido usado para calcular la diversidad de haplotipos de mamíferos terrestres identificados mediante eDNA. Andersen et al. (2012) encontraron que la riqueza de haplotipos aumenta cuando se dispone de réplicas espaciales.

**2.1.3.2. Abundancia relativa.** De acuerdo con Barnes & Turner (2016), distinguir entre la abundancia y la proximidad de organismos (tanto en el espacio como en el tiempo) a partir de ADN

ambiental representa un desafío para las investigaciones en este tema. Ello está motivado al hecho de que el agua y el aire pueden transportar rápidamente el eDNA a distancias lejanas y este se descompone exponencialmente en el ambiente. Por lo tanto, los estudios que incluyen análisis de características como producción, transporte y descomposición del ADN ambiental son los que probablemente estén en la capacidad de estimar la abundancia de organismos a grandes escalas a partir de la cuantificación de eDNA. Las medidas de abundancia obtenidas pueden revelar cambios estacionales en factores como el uso de microhábitats, así como los impactos de la depredación y la competencia (Bohmann et al. 2014).

Hasta la fecha, entre los estudios que han intentado estimar la abundancia de eDNA en mamíferos, se incluye el de Thomsen et al. (2012). Este mostró que la abundancia de eDNA medida por qPCR, se correlaciona positivamente con la abundancia de la población estimada con herramientas tradicionales. Posteriormente, Wilcox et al. (2018) probaron la eficacia del enriquecimiento de captura (un enfoque de optimización de protocolos de amplificación que facilita la metabarcoding) utilizando muestras ambientales y mezclas de ADN genómico de composición conocida para detectar ADN de vertebrados. En el estudio se encontró que el método utilizado refleja con precisión la abundancia relativa de los taxones en cuestión, entre los que se incluyeron mamíferos semiacuáticos como castores, nutrias y visones.

#### **2.1.4. *Especies de principal interés para la conservación.***

##### **2.1.4.1. *Especies amenazadas, raras, esquivas o crípticas.***

La presencia, distribución y datos de interacción ecológica de especies amenazadas en un hábitat son conocimientos esenciales para comprender los requisitos para la persistencia de dichas especies. Por lo tanto, documentar esta información puede desencadenar una serie de acciones bajo las leyes relativas a la planificación de conservación de la biodiversidad. Con frecuencia, los datos relevantes para la toma de decisiones se derivan de los esfuerzos de monitoreo exigidos por las leyes ambientales que imparten una acción concordante con los datos recopilados (Deiner et al. 2017; Huerlimann et al.2020).

El muestreo de eDNA tiene el potencial de mejorar la investigación de especies amenazadas porque no interactúa directamente con el objetivo y, por lo tanto, elude las restricciones de manejo de las especies protegidas, además de minimizar la alteración del hábitat (Huerlimann et al.2020).

De manera similar, la gestión de especies raras es una prioridad de conservación en todo el mundo, pero esta tarea aún tiene dificultades grandes debido a los errores de detección en los estudios poblacionales. Los errores de falso positivo (identificación errónea) y falso negativo (detección perdida) son frecuentes en los estudios de especies raras y pueden afectar las inferencias resultantes sobre el estado o distribución de su población. El ADN ambiental ofrece un enfoque confiable que supera las limitaciones mencionadas y, gracias a su sensibilidad, permite realizar estudios eficientes de

identificación de especies raras (Franklin et al. 2019).

Las especies difíciles de observar (esquivas) y las especies que no se pueden diferenciar morfológicamente (crípticas), normalmente cuentan con datos desactualizados, inexistentes, o insuficientes para la evaluación del estado de conservación; en este caso, la incorporación de métodos de eDNA podría proporcionar datos esenciales o adicionales (Huerlimann et al.2020).

Algunos estudios han demostrado la eficacia de los métodos de eDNA para recopilar información de especies de mamíferos terrestres o semiacuáticos de especial interés para la conservación. Los ejemplos van desde organismos clasificados como “muy raros”, por ejemplo, zarigüeyas y perros de monte neotropicales (Coutant et al.2021) y primates nocturnos, raros, esquivos y amenazados, como los aye-aye (*D. madagascarensis*) en Madagascar (Aylward et al.2018), o carnívoros raros en ambientes forestales (Franklin et al.2019) hasta organismos semiacuáticos raros y amenazados como la nutria euroasiática (*Lutra lutra*) (Thomsen et al. 2012) y la musaraña de agua japonesa (*Chimarrogale platycephala*) (Yonezawa et al. 2020).

Entre las publicaciones más recientes acerca del uso de ADN ambiental para la detección de mamíferos terrestres que se ubican en la categoría de raros y amenazados se encuentra la de Priestley et al. (2021). Estos autores, utilizando tubos revestidos de papel obtuvieron muestras de orina que contenían ADN del lirón avellana (*Muscardinus avellanarius*), un roedor amenazado. Empero, en el estudio se menciona que la muestra fue obtenida en un sitio de ocupación conocido, por lo tanto, no se consideraría estrictamente como ADN ambiental sino como ADN de muestra no invasiva.

Otra publicación acerca del uso de ADN ambiental para la detección de mamíferos terrestres amenazados es la de Sales et al. (2020a); en esta investigación se destaca la identificación de especies amazónicas vulnerables como el oso hormiguero gigante (*Myrmecophaga tridactyla*) y el tapir de tierras bajas (*Tapirus terrestris*). En otro reporte, Coutant et al. (2021) informan que, a partir de eDNA acuático, fue posible la identificación de especies de mamíferos terrestres y semiacuáticos incluidos en la lista roja de la UICN franco-guayanesa. Entre estos están la nutria gigante (*Pteronura brasiliensis*), el jaguar (*Panthera onca*), el puma (*Puma concolor*) y el pecarí de labio blanco (*Tayassu pecari*).

#### 2.1.4.2. Especies invasoras.

Según Bohmann et al. (2014), la conservación de la biodiversidad y el manejo de los recursos biológicos requieren estrategias de manejo multinivel sobre especies exóticas, con el fin de (1) prevenir invasiones biológicas, (2) detectar especies exóticas en una etapa temprana de la invasión, y (3) erradicar o mantener en un nivel bajo de densidad poblacional las especies exóticas que fueron introducidas con éxito. Bohmann et al. (2014) también mencionan que un prerrequisito para cualquier medida de control sobre especies no nativas es la capacidad de identificar rápida y exitosamente las supuestas especies

exóticas amenazantes.

La detección de eDNA ofrece una herramienta prometedora para monitorear los hábitats en busca de nuevos invasores, ya sean transportados desde lejos o en el frente de invasión (Williams et al. 2018). Algunos estudios han propuesto el uso de eDNA para detectar mamíferos terrestres invasores que tienen interacción limitada con el agua (Hauger et al. 2020; Williams et al. 2018). Ensayos similares han identificado con éxito especies de carnívoros terrestres invasores en ecosistemas naturales del estado insular de Tasmania, Australia, como es el caso del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) (MacDonald, Sarre 2015), el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) y el gato doméstico (*Felis catus*) (Modave, 2017).

**2.1.5. Interacciones tróficas (análisis de dieta).** El ADN ambiental, también aporta información útil para comprender interacciones de tipo predador-presa en diferentes hábitats. Por ejemplo, en un estudio realizado por Modave (2017) que consistió en la recolección de heces en hábitats con tres tipos de vegetación (bosques de eucalipto, matorrales costeros y vegetación agrícola-urbana) en Tasmania, Australia, se encontró que el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisi*) tiene una dieta estrecha, ya que esta no varía en función de los tres hábitats en cuestión. Mientras que el gato doméstico (*F. catus*) mostró un aumento en el consumo de mamíferos nativos en los bosques de eucaliptos, en comparación con un aumento de ingesta de roedores introducidos en tierras agrícolas.

Tradicionalmente, los análisis de dieta en vertebrados se realizan observando directamente las fuentes de alimentación de los organismos, buscando huellas en el suelo blando o en la nieve, a través de telemetría, haciendo un recuento de gránulos y análisis histológicos de gránulos y estómagos, o recolectando sus heces y examinando detalladamente, con ayuda de equipos de visualización, posibles fragmentos del alimento (Nichols et al. 2012). Sin embargo, en ausencia de observaciones directas de búsqueda de alimento, estos métodos tienen limitaciones en estudios de ecología de depredadores, competencia interespecífica, partición de nichos, entre otros (Bohmann et al. 2014; Nichols et al. 2012).

Los análisis de dieta a partir de ADN ambiental resuelven algunas de las deficiencias mencionadas para estudios ecológicos. Por ejemplo, Nichols et al. (2012) identificaron algunas especies de ungulados a partir de ADN recolectado de plantas durante el ramoneo, lo que permitió la cuantificación precisa de los patrones de alimentación y las interacciones competitivas en conjuntos de múltiples especies.

**2.1.6. Sexaje.** Los avances más recientes en tecnología y metodología han ampliado la capacidad de la investigación basada en eDNA para incluir la identificación del sexo de los individuos (Huerlimann et al. 2020). Sin embargo, los estudios que afirman haber logrado determinar el sexo de mamíferos terrestres a partir de ADN ambiental, utilizan muestras de residuos biológicos evidentes. Además, en estos estudios es posible la identificación morfológica previa de los individuos. Por lo que a

pesar de que, en las publicaciones los autores mencionan el uso de eDNA, estas muestras estarían mejor categorizadas como no invasivas en lugar de ambientales. Por ejemplo, en la investigación de Nichols & Spong (2017) se determinó el sexo de 62 ungulados con ensayos de SNP a partir de muestras de tejidos en descomposición recolectados en carreteras o en bosques y otros obtenidos por cazadores. Por otro lado, Wheat et al. (2016) reportaron que la saliva residual recolectada de los cadáveres de salmón parcialmente consumidos proporcionó suficiente ADN para detectar el sexo de 62 individuos de oso pardo (*Ursus arctos*).

**2.2. Limitaciones y perspectivas futuras.** A pesar de los múltiples usos del eDNA, aún existen limitaciones y desafíos por superar. El *anexo 2* muestra algunos de los inconvenientes que se han presentado o se pueden llegar a presentar en investigaciones de ADN ambiental con aplicaciones a la conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos. Adicionalmente, se destacan ciertas soluciones propuestas por algunos autores para minimizar o evitar estos problemas.

A partir de las recomendaciones establecidas por Harper et al. (2019) para el estudio de mamíferos utilizando metabarcoding de eDNA, se puede decir que, aunque los análisis basados en ADN ambiental son prometedores para el monitoreo de mamíferos, ya que abarcan especies prioritarias de conservación y manejo, hay factores que, si bien no se tienen en cuenta para estudios de otros vertebrados, sí son necesarios a la hora de diseñar y realizar proyectos de eDNA en este grupo. Los factores por considerar son: 1) las probabilidades de detección de eDNA de mamíferos en sistemas naturales son altas cuando se estudian áreas con poblaciones densas. Sin embargo, se requieren estrategias de muestreo rigurosas para rastrear mamíferos en áreas escasamente pobladas por individuos. 2) Para tener en cuenta las tasas diferenciales de visitas de mamíferos y maximizar las probabilidades de detección de eDNA, se recomienda que los investigadores y los profesionales que utilizan el eDNA metabarcoding para el seguimiento de mamíferos canalicen sus esfuerzos en un muestreo extenso en un área determinada durante escalas de tiempo prolongadas.

De acuerdo con Bohmann et al. (2014) sería posible implementar un muestreo mecánico de eDNA, similar al de las boyas de muestreo de derrames de petróleo o las sonoboyas militares en el futuro. Cuando se combina con la tecnología para transmitir datos en vivo, como la utilizada por el Servicio Meteorológico Nacional de EE. UU, la tecnología que actualmente está desarrollando Oxford Nanopore Technologies para tomar muestras y analizar el ADN utilizando un MinION™ portátil dispositivo, y el proyecto actual en curso para mapear la superficie de la tierra en 3D, no está más allá del ámbito de posibilidad imaginar una situación en la que los videos de eDNA se pueden grabar en tiempo real desde estaciones de muestreo automatizadas. Así mismo, se espera que exista una red a nivel mundial que

coordine actividades de vigilancia y monitoreo de eDNA a medida que se establezca una prueba de principio en una variedad de entornos con sus respectivos organismos residentes. Esto proporcionaría un marco potencial para la predicción de redes de ecosistemas globales y permitiría el desarrollo de modelos dinámicos para todo el ecosistema.

Entre las posibles aplicaciones de eDNA a corto plazo, se tiene su potencial uso como herramienta de modelamiento de distribución de especies. Incluso, esto abre posibilidades para que los investigadores revelen la distribución y la interacción de las especies en un solo estudio (Leempoel et al. 2020).

Sin embargo, ninguna investigación recomienda reemplazar el requisito de experiencia taxonómica sobre la biota o utilizar ADN ambiental como único método para obtener información de organismos, poblaciones o especies. En su mayoría, sugieren concentrar esfuerzos en unificar métodos de estudio tradicionales, con eDNA, para tener un acercamiento más efectivo a la realidad de las especies de mamíferos terrestres y semiacuáticos.

**2.3. Potencial uso del ADN ambiental como herramienta para la conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos en Colombia.** De acuerdo con Lozano-Mojica & Caballero (2021), el ADN ambiental y sobre todo el eDNA metabarcoding representa una fuente confiable de información inicial para mejorar los datos existentes sobre biodiversidad, actualizándolos o completándolos para muchas regiones de Colombia.

La simplicidad de implementación de esta técnica y la variedad de orígenes de muestras para vertebrados ayudaría a que investigadores, gobiernos, comunidades locales, y ONG tomen decisiones relevantes para la conservación de la diversidad de mamíferos en el país.

Dado que hasta la fecha en Colombia sólo hay reportada una investigación en la que se utiliza ADN ambiental para la detección específica de mamíferos, y fue enfocada a una especie acuática (*Kogia sima*) (Juhelet al. 2020), para los primeros análisis de eDNA con mamíferos no acuáticos es posible que gran parte de la información sea difícil de comparar. Por otro lado, ya existen datos basados en ADN ambiental en países con biomas como los que están presentes en Colombia, esto facilita el inicio de estudios piloto con eDNA como herramienta para proyectos de conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos.

En la publicación de Lozano-Mojica & Caballero (2021), mencionan que las muestras de agua podrían usarse para monitorear mamíferos amenazados o raros, debido a que a partir de muestras de cuerpos de agua del norte de Colombia y utilizando cebadores universales para vertebrados, identificaron algunos géneros y especies de mamíferos terrestres y semiacuáticos en peligro de extinción. Sin embargo, de acuerdo con lo discutido en este mismo estudio, las especies más raras pueden tener una menor representación en las muestras, por lo que se recomienda el uso de cebadores específicos de mamíferos

para obtener datos más confiables a nivel de especie.

El ADN ambiental se considera una herramienta inicial de bajo costo y eficiente para monitorear comunidades en una amplia variedad de hábitats (Lozano-Mojica & Caballero 2021). Los estudios basados en ADN ambiental y dedicados al muestreo de mamíferos en trópicos húmedos biodiversos (Coutant et al. 2021; Drinkwater et al. 2020; Ishige et al. 2017; Sales et al. 2020a) pueden servir de base para iniciar investigaciones de monitoreo de mamíferos terrestres y semiacuáticos en la Amazonía colombiana, ya que, aparte de los factores ecológicos y biológicos compartidos, en estos ecosistemas es común el rápido cambio de uso de la tierra para la agricultura entre otras presiones antropogénicas como la deforestación (Drinkwater et al. 2020). En el escenario de la Amazonía colombiana, las muestras ambientales serían útiles para obtener información acerca de las especies u organismos que habitan en zonas de difícil acceso humano ya sea por las condiciones geográficas o sociales del lugar. Por ejemplo, sería posible iniciar análisis de diversidad de mamíferos terrestres y semiacuáticos, de manera similar a como se hizo por Coutant et al. (2021), quienes, a partir de muestras ambientales en tres ríos de la Amazonía Guyana francesa, generaron inventarios de mamíferos emblemáticos de la región y revelaron fuertes variaciones en la riqueza de especies detectadas en los tres ríos.

Sin embargo, debido a que existen algunas dudas sobre la utilidad y capacidad de detección de esta técnica, además de la continua posibilidad de presentar falsos negativos o falsos positivos entre otros errores o problemas comunes, es recomendable que las investigaciones de eDNA estén acopladas a otras técnicas de censos de diversidad de mamíferos como cámaras trampa, análisis genéticos no invasivos o incluso nuevas tecnologías como la toma de datos con ayuda de drones (Bohmann et al. 2014).

Los bosques secos tropicales ubicados sobre todo al norte del país también podrían ser candidatos ideales para iniciar con estudios de eDNA relacionados con detección e identificación de mamíferos terrestres y semiacuáticos. Por ejemplo, se podría tomar como base, la investigación de Rodgers et al. (2017) en la isla de Barro Colorado en Panamá, ya que en el lugar de muestreo se identificaron especies de mamíferos terrestres similares a las que se pueden encontrar en bosques tropicales insulares de Colombia. Algunas de estas especies son monos aulladores (*Alouatta palliata*) y monos araña (*Ateles geoffroyi*).

Los estudios poblacionales a partir de ADN ambiental representan un mayor desafío. En Colombia sería posible el monitoreo de especies emblemáticas, como el oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*), a partir de la saliva u otros rastros depositados en una fuente de alimento o cerca a esta, de igual modo a como se hizo por Wheat et al. (2016) para estimar la densidad de una población de osos pardos (*U. arctos*) en el sureste de Alaska. Sin embargo, hay que tener en cuenta que al tratarse de un rastro biológico observable y ante el previo conocimiento ecológico de la especie, este tipo de muestras basadas en la

dieta de los organismos no representan en sí muestras ambientales sino no invasivas.

Por otro lado, aunque no son tan comunes, también hay evidencias que sustentan el uso de eDNA para identificar la biodiversidad presente en zonas áridas. Furlan et al. (2020) caracterizaron la diversidad local de vertebrados a partir de muestras de agua de pozos de zonas áridas de Australia. Lo anterior, puede ser una guía para estudios de eDNA en zonas áridas de Colombia como desiertos con fuentes de agua naturales donde pueden llegar mamíferos a refrescarse, alimentarse o reproducirse.

El ADN ambiental también representa una herramienta potencial para detectar especies invasoras introducidas en sistemas hídricos de flujo libre. Por ejemplo, después de que investigadores en Michigan, Estados Unidos notaron que era difícil localizar individuos de cerdos salvajes invasores en Norteamérica, debido a sus movimientos frecuentes en grandes áreas de distribución y uso extensivo de humedales y otros ecosistemas de difícil acceso, se empezó a implementar el eDNA como método de monitoreo para cerdos salvajes, lo cual le permite a los administradores de vida silvestre detectar animales antes de que se establezcan grandes poblaciones y ubicar pequeños grupos de individuos presentes en paisajes expansivos para enfocar esfuerzos de erradicación (Hauger et al.2020).

Es posible que los resultados del anterior estudio mencionado proporcionen bases para el desarrollo de técnicas de eDNA, con fines de muestreo y monitoreo de especies invasoras en Colombia que frecuenten sistemas hídricos de difícil acceso. Por ejemplo, el uso de ADN ambiental como herramienta complementaria para el monitoreo de los hipopótamos (*Hippopotamus amphibius*) podría ayudar en la urgente necesidad de determinación del área de distribución de esta especie invasora en la cuenca del río Magdalena. Incluso, no se descartan las alianzas locales de monitoreo participativo en la cuenca media y baja de este río (Castelblanco-Martínez et al. 2021). Es decir, se puede llegar a utilizar esta y otras técnicas involucrando la participación de científicos y comunidades locales para generar resultados válidos en un monitoreo más eficiente de la especie invasora (Castelblanco-Martínez et al. 2021).

### **3. Conclusiones**

El uso de ADN ambiental como herramienta para la conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos se ha incrementado en la última década debido a que permite realizar estudios eficientes, de bajo costo y a escalas temporales y espaciales amplias. El eDNA ha sido utilizado en estudios de detección, identificación, monitoreo, caracterización de la diversidad, gestión de especies invasoras, análisis de dieta y sexaje de mamíferos. Sin embargo, sería interesante analizar en detalle el origen de las muestras ambientales, puesto que ciertas publicaciones no distinguen entre muestra ambiental y muestra no invasiva. Por otro lado, las metodologías basadas en eDNA aún están en desarrollo y no es posible considerar que el ADN ambiental sea un reemplazo total de los métodos tradicionales utilizados en estrategias de conservación; en lugar de eso es un complemento para que los esfuerzos de preservación

de mamíferos a nivel mundial tengan mayor cobertura y confiabilidad. En el futuro, se espera que investigaciones basadas en ADN ambiental sean cada vez más influyentes en el marco legal de protección de especies en todo el mundo. En ese sentido, y siguiendo las recomendaciones de estudios realizados en otros países con diversidad de biomas, el eDNA acoplado a técnicas tradicionales puede llegar a ser una herramienta rentable y eficaz en programas de conservación de mamífero terrestres y semiacuáticos en Colombia.

### **Agradecimientos**

A mi profesor Manuel Ruiz-García por confiar en mí y brindarme el apoyo para realizar este trabajo en un tema de mi elección. A Myreya Pinedo, que estuvo pendiente de mí y quien además de escucharme y aconsejarme en momentos difíciles, ha sido un ejemplo a seguir como investigadora y ser humano. A las profesoras Diana Álvarez y Sandra Baena por inspirarme a seguir adelante como mujer en la ciencia. A las personas que en el camino se fueron sumando como mentores de vida. A mi familia, especialmente a mi mamá por educarme desde el amor y respeto por la vida, por mostrarme el maravilloso mundo de la ciencia y por impulsarme a seguir mis sueños sin olvidar mis principios y valores. A mis abuelas por recibirme con amor en sus hogares. A mis amigos que siempre creyeron en mis capacidades y me demostraron que sin importar qué tan diferentes sean nuestros destinos, la vida es mejor cuando se comparte con amigos. A mi sobrina Melany por alegrar mis días con su sonrisa y su presencia.

### **4. Referencias**

- Aylward ML, Sullivan AP, Perry GH, Johnson SE, Louis Jr EE (2018) An environmental DNA sampling method for aye-ayes from their feeding traces. *Ecology and evolution*, 8(18): 9229-9240 DOI: 10.1002/ece3.4341
- Andersen K et al. (2012) Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology*, 21(8): 1966-1979 doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05261.x
- Barber-meyer SM, Dysthe JC, Pilgrim KL (2020) Testing Environmental DNA from Wolf Snow Tracks for Species, Sex, and Individual Identification. *Canadian Wildlife Biology & Management*, 9(1): 12-20
- Barnes MA & Turner CR (2016) The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1): 1–17 <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Bohmann K et al. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in ecology & evolution*, 29(6): 358-367 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>
- Calvignac-Spencer S et al. (2013) Carrion fly-derived DNA as a tool for comprehensive and cost-effective assessment of mammalian biodiversity. *Molecular ecology*, 22(4): 915-924 doi: 10.1111/mec.12183
- Cannon M et al. (2016) In silico assessment of primers for eDNA studies using PrimerTree and

application to characterize the biodiversity surrounding the Cuyahoga River. *Sci Rep* 6, 22908  
<https://doi.org/10.1038/srep22908>

- Castelblanco-Martínez DN et al. (2021). A hippo in the room: Predicting the persistence and dispersion of an invasive mega-vertebrate in Colombia, South America. *Biological Conservation*, 253: 108923  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108923>
- Chao A, Chazdon R, Colwell RK, Chen, TJ (2005). A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology Letters*, 40(6): 1705–1708  
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00707>
- Coutant O et al. (2021) Amazonian mammal monitoring using aquatic environmental DNA. *Mol Ecol Resour* doi: 10.1111/1755-0998.13393
- Cristescu ME & Hebert, PD (2018) Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49: 209-230  
<https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062306>.
- Deiner K et al. (2017) Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21): 5872–589 <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Drinkwater R et al. (2020) Leech blood-meal invertebrate-derived DNA reveals differences in Bornean mammal diversity across habitats. *Molecular Ecology*, 00:1–14 <https://doi.org/10.1111/mec.15724>
- Egeter B, Peixoto S, Brito JC, Jarman S, Puppo P, Velo-Antón G (2018) Challenges for assessing vertebrate diversity in turbid Saharan water-bodies using environmental DNA. *Genome*, 61(11): 807–814 <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0071>
- Farrell MJ, Govender D, Hajibabaei M, van der Bank M, Davies TJ (2020). Environmental DNA for tracking waterhole visitation in savanna ecosystems. *bioRxiv*  
<https://doi.org/10.1101/2020.11.03.367417>
- Fernandes K et al. (2018) DNA metabarcoding—a new approach to fauna monitoring in mine site restoration. *Restoration Ecology*, 26(6): 1098-1107 <https://doi.org/10.1111/rec.12868>
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet, P. (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4): 423–425 doi:10.1098/rsbl.2008.0118
- Franklin TW et al. (2019) Using environmental DNA methods to improve winter surveys for rare carnivores: DNA from snow and improved noninvasive techniques. *Biological Conservation*, 229: 50-58 <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.11.006>
- Furlan EM, Davis J, Duncan RP (2020) Identifying error and accurately interpreting environmental DNA metabarcoding results: A case study to detect vertebrates at arid zone waterholes. *Molecular Ecology Resources*, 20:1259–1276 <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13170>
- Harper LR et al. (2019) Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological Conservation*, 238: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108225>
- Hauger AN, Hollis-Etter KM, Etter DR, Roloff GJ, Mahon AR (2020) Use of environmental DNA (eDNA) in streams to detect feral swine (*Sus scrofa*). *PeerJ*, 8: e8287  
<http://doi.org/10.7717/peerj.8287>
- Huerlimann R et al. (2020). Enhancing tropical conservation and ecology research with aquatic environmental DNA methods: an introduction for non-environmental DNA specialists. *Animal*

Conservation, 23(6): 632-645 doi:10.1111/acv.12583

- Hupalo K et al. (2021) An urban Blitz with a twist: rapid biodiversity. *Environmental DNA*, 3(1): 203-213 <https://doi.org/10.1002/edn3.152>
- Ishige T et al. (2017) Tropical-forest mammals as detected by environmental DNA at natural saltlicks in Borneo. *Biological Conservation* 210: 281–285 <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.04.023>
- IUCN (2019) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-2 <http://www.iucnredlist.org>
- Juhel JB et al (2020). Detection of the elusive Dwarf sperm whale (*Kogia sima*) using environmental DNA at Malpelo island (Eastern Pacific, Colombia). *Ecol Evol*, 00:1–7 <https://doi.org/10.1002/ece3.7057>
- Kim WM et al. (2020) Review and application of environmental DNA (eDNA) investigation of terrestrial species in urban ecosystem. *Journal of the Korean Society of Environmental Restoration Technology*, 23(2): 69-89 DOI : <https://doi.org/10.13087/kosert.2020.23.2.69>
- Kinoshita G, Yonezawa S, Murakami S, Isagi Y (2019) Environmental DNA Collected from Snow Tracks is Useful for Identification of Mammalian Species. *Zoological Science*, 36(3): 198–207 <https://doi.org/10.2108/zs180172>
- Leempoel K, Hebert T, Hadly EA (2020). A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1918): 23-53 <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2353>
- Lodge DM et al. (2012) Conservation in a cup of water: Estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11): 2555–2558 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05600.x>
- Lozano-Mojica JD & Caballero S (2021) Applications of eDNA Metabarcoding for Vertebrate Diversity Studies in Northern Colombian Water Bodies. *Front. Ecol. Evol*, 8:617948 doi:10.3389/fevo.2020.617948
- MacDonald AJ & Sarre SD (2015). Species assignment from trace DNA sequences: an in-silico assessment of the test used to survey for foxes in Tasmania. *Journal of Applied Ecology*, 52(6): 1649-1655 doi: 10.1111/1365-2664.12506
- Modave E (2017) Identification, distribution and diet of Tasmanian predators inferred by scat DNA. Tesis de doctorado. Facultad de educación, ciencia, tecnología y matemáticas, Universidad de Camberra, Australia
- Modave E, MacDonald A J, Sarre SD (2017). A single mini-barcode test to screen for Australian mammalian predators from environmental samples. *GigaScience*, 6(8): 1-13. doi: 10.1093/gigascience/gix052
- Nichols RV, Königsson H, Danell K, Spong G (2012). Browsed twig environmental DNA: diagnostic PCR to identify ungulate species. *Molecular Ecology Resources*, 12(6): 983-989 doi: 10.1111/j.1755-0998.2012.03172.x
- Nichols RV & Spong G (2017) An eDNA-based SNP assay for ungulate species and sex identification. *Diversity*, 9(3): 1–8 <https://doi.org/10.3390/d9030033>
- Padgett-Stewart TM, Wilcox TM, Carim KJ, McKelvey KS, Young MK, Schwartz MK (2016) An eDNA assay for river otter detection: a tool for surveying a semi-aquatic mammal. *Conservation Genetics*

Resources, 8(1): 5–7 <https://doi.org/10.1007/s12686-015-0511-x>

- Priestley V, Allen R, Binstead M, Arnold R, Savolainen V (2021) Quick detection of a rare species: forensic swabs of survey tubes for hazel dormouse *Muscardinus avellanarius* urine. *Methods in Ecology and Evolution*, 00: 1-10 <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13573>
- Quasim S, MacDonald AJ, Sarre SD (2018). Towards more efficient large-scale DNA-based detection of terrestrial mammal predators from scats. *Mammal Research*, 63(3): 387-393 <https://doi.org/10.1007/s13364-018-0369-x>
- Rodgers TW & Mock KE (2015) Drinking water as a source of environmental DNA for the detection of terrestrial wildlife species. *Conservation Genetics Resources*, 7(3): 693-696 DOI 10.1007/s12686-015-0478-7
- Rodgers et al. (2017) Carrion fly-derived DNA metabarcoding is an effective tool for mammal surveys: Evidence from a known tropical mammal community. *Mol Ecol Resour*, 17:133–145 <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12701>
- Sales NG et al. (2020a) Assessing the potential of environmental DNA metabarcoding for monitoring Neotropical mammals: a case study in the Amazon and Atlantic Forest, Brazil. *Mammal Review*, 50(3): 221–225 <https://doi.org/10.1111/mam.12183>
- Sales NG et al. (2020b) Fishing for mammals: Landscape-level monitoring of terrestrial and semi-aquatic communities using eDNA from riverine systems. *Journal of Applied Ecology*, 57(4): 707-716 <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13592>
- Seeber PA et al. (2019) Terrestrial mammal surveillance using hybridization capture of environmental DNA from African waterholes. *Mol Ecol Resources*, 19:1486–1496 <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13069>
- Schnell IB et al. (2012) Screening mammal biodiversity using DNA from leeches. *Current biology*, 22(8): <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.058>
- Schnell IB et al. (2018) Debugging diversity—a pan-continental exploration of the potential of terrestrial blood-feeding leeches as a vertebrate monitoring tool. *Molecular ecology resources*, 18(6): 1282-1298 DOI: 10.1111/1755-0998.12912
- Sellers GS & Hänfling B (2020) Meta-analysis of eDNA metabarcoding data from UK lakes: optimising species detection probability and sampling effort. Natural England Commissioned Report Number 325.
- Spitzer R et al. (2019). Doubting dung: eDNA reveals high rates of misidentification in diverse European ungulate communities. *European Journal of Wildlife Research*, 65(2): 1-14 <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1264-8>
- Thomsen PF et al. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology*, 21(11): 2565-2573 doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x
- Thomsen PF & Willerslev E (2015) Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183: 4–18 <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Tsuji S, Takahara T, Doi H, Shibata N, Yamanaka H (2019) The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis - A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1: 99-108.

- Ushio M et al. (2017) Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources*, 17(6): 63–75 <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12690>
- Van Beeck Calkoen ST, Leigh-Moy K, Cromsigt JP, Spong G, Lebeau LC, Heurich M (2019) The blame game: Using eDNA to identify species-specific tree browsing by red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in a temperate forest. *Forest Ecology and Management*, 451: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117483>
- Wang P et al. (2019) Environmental DNA: an emerging tool in ecological assessment. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 103(5): 651–656 <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02720-z>
- Wheat RE, Allen JM, Miller SDL, Wilmers CC, Levi T (2016) Environmental DNA from residual saliva for efficient noninvasive genetic monitoring of brown bears (*Ursus arctos*). *PLoS ONE*, 11(11): 1–19 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165259>
- Williams KE, Huyvaert KP, Vercauteren KC, Davis AJ, Piaggio AJ (2018) Detection and persistence of environmental DNA from an invasive, terrestrial mammal. *Ecology and Evolution*, 8(1): 688–695 <https://doi.org/10.1002/ece3.3698>
- Wilcox TM, Zarn KE, Piggott MP, Young MK, McKelvey KS, Schwartz MK (2018). Capture enrichment of aquatic environmental DNA: A first proof of concept. *Mol Ecol Resour*, 18:1392–1401 <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12928>
- Willerslev E et al. (2003). Diverse Plant and Animal Genetic Records from Holocene and Pleistocene Sediments. *Science*, 300(5620): 791–795.
- Winding A et al. (2019) eDNA in environmental monitoring. Aarhus University, DCE – Danish Centre for Environment and Energy, 40 pp. Technical Report No. 133 <http://dce2.au.dk/pub/TR133.pdf>
- Xu N, Xiong M, Shao K, Que Y, Li J (2020). Preliminary Study on Environmental DNA Metabarcoding for Detecting Biodiversity in the Middle and Lower Reaches of the Yangtze River. *Research of Environmental Sciences*, 33(5): 1187–1196 DOI: 10.13198/j.issn.1001-6929.2020.03.06
- Yonezawa S, Ushio M, Yamanaka H, Miya M, Takayanagi A, Isagi Y (2020) Environmental DNA metabarcoding reveals the presence of a small, quick-moving, nocturnal water shrew in a forest stream. *Conservation Genetics*, 21(6): 1079–1084 <https://doi.org/10.1007/s10592-020-01310-5>
- Zinger L et al. (2020) Advances and prospects of environmental DNA in neotropical rainforests. *Tropical Ecosystems in: Advances in Ecological Research*. Academic Press: 331–373

## 5. Anexos

**Anexo 1.** *Ejemplos seleccionados de estudios de ADN ambiental con aplicaciones en conservación de mamíferos terrestres y semiacuáticos a nivel mundial.*

Origen de las muestras	Taxón objetivo	Taxones*	Aplicación	Localización	Referencia
		Mamíferos detectados**	/Descripción del estudio	geográfica del estudio	

Muestras de suelo en parques de safari, jardines zoológicos y granjas.	Vertebrados	Felidae, Bovidae Giraffidae, Equidae	Detección de especies, estimación de diversidad	Dinamarca	Andersen et al. (2012)
Ramas parcialmente consumidas ***	Ungulados ramoneadores	<i>Alces alces</i> (alce), <i>Capreolus capreolus</i> (corzo), <i>Cervus dama</i> (gamo), <i>Cervus elaphus</i> (ciervo rojo)	Identificación de especies	Suecia	Nichols et al. (2012)
iDNA de sanguijuelas	Mamíferos terrestres	Bovidae, Cervidae, Leporidae, Mustelidae, Suidae	Monitoreo de especies	Annamite, Vietnam	Schnell et al. (2012)
Sistemas de agua dulce de Europa: estanques, lagos y arroyos	Vertebrados y crustáceos de agua dulce	<i>Lutra lutra</i> (Nutria europea)	Detección de especies raras y amenazadas	Dinamarca, Suecia, Polonia y Estonia	Thomsen et al. (2012)
iDNA de mosca carroñera	Mamíferos	Artiodactyla, Chiroptera, Eulipotyphla, Primates, Rodentia, Afrosoricida, Carnivora	Detección de especies	Costa de marfil y Madagascar	Calvignac-Spencer et al. (2013)
Agua potable de abrevadero de coyotes cautivos	<i>Canis latrans</i> (coyote)	<i>C. latrans</i>	Detección de especies terrestres de interés para la conservación (estudio piloto)	Instalación de investigación de depredadores de Millville, Utah, EE.UU	Rodgers, Mock (2015)
Agua del recinto de nutrias en el Zoológico de Montana	<i>Lontra Canadensis</i> (Nutria de río de América del Norte)	<i>L. canadensis</i>	Detección de especies	Zoológico de Montana (Billings, MT, EE. UU)	Padgett-Stewart et al. (2016)
Heces y saliva recolectada de cadáveres de salmón parcialmente consumidos ***	<i>U. arctos</i> (Oso pardo)	<i>U. arctos</i>	Monitoreo de poblaciones, sexaje	Cuencas de Chilkoot y Klehini en Alaska	Wheat et al. (2016)

Agua de estanques forestales	Mamíferos de bosques tropicales	Hominidae, Manidae, Elephantidae, Bovidae, Suidae, Cervidae, Felidae Sciuridae	Detección de mamíferos terrestres	Borneo, Malasia	Ishige et al. (2017)
Heces	Mamíferos predadores australianos	Dasyuridae, Canidae, Macropodidae, Muridae, Potoroidae, Felidae, Didelphidae, Vombatidae, Petauridae	Identidad, distribución y dieta de mamíferos depredadores en Tasmania	Isla de Tasmania, Australia	Modave (2017)
Heces	Mamíferos predadores australianos	Canidae, Felidae, Dasyuridae	Discriminación entre heces de grandes mamíferos predadores australianos	Isla de Tasmania, Australia	Modave et al. (2017)
Ramas parcialmente consumidas ***	Ungulados	<i>A. alces</i> (alce), <i>C. capreolus</i> (corzo), <i>C. dama</i> (gamo), <i>C. elaphus</i> (ciervo rojo)	Identificación de especies, sexaje	Suecia	Nichols, Spong (2017)
iDNA de moscas carroñeras	Vertebrados	Atelidae, Myrmecophagidae, Cebidae, Didelphidae, Callitrichidae, Sciuridae, Echimyidae, Procyonidae, Tayassuidae, Felidae, Mormoopidae, Canidae, Bradypodidae, Choloepodidae, Dasypodidae, Phyllostomidae	Detección de especies	Isla de Barro Colorado en Panamá	Rodgers et al. (2017)
Agua de estanques de zoológico	Mamíferos terrestres	Otariidae, Rhinocerotidae, Elephantidae, Cercopithecidae, Macropodidae	Detección de especies	Zoorasia, Jardines zoológicos de Yokohama, Yokohama, Japón	Ushio et al. (2017)
Residuos de saliva en corteza de Árbol ***	<i>Daubentonia madagascariensis</i> (aye-aye)	<i>D. madagascariensis</i>	Genética de poblaciones	Vatovavy - Fitovinany, Madagascar	Aylward et al. (2018)
Cuerpos de agua del desierto	Vertebrados	<i>Canis lupus</i>	Detección de especies	Desierto del Sahara	Egeter et al. (2018)

Heces	<i>Vulpes vulpes</i> (zorro rojo)	Canidae ( <i>V. vulpes</i> ), Felidae, Didelphidae, Dasyuridae	Detección de especie invasora	Tasmania, Australia	Quasim et al. (2018)
iDNA de sanguijuelas	Vertebrado sterrestres	Bovidae, Canidae, Cercopithecidae, Cervidae, Erinaceidae, Eupleridae, Felidae, Herpestidae, Hystricidae, Lemuridae, Macropodidae, Manidae, Mustelidae, Peramelidae, Phalangeridae, Sciuridae, Soricidae, Spalacidae, Suidae, Tenrecidae, Tenrecidae, Tragulidae, Tupaiidae, Ursidae, Viverridae, Vombatidae	Monitoreo de especies	Bosques tropicales de Australia, Madagascar, Malasia, Borneo y Vietnam	Schnell et al. (2018)
Río Rattlesnake Creek	Vertebrados	Mustelidae y Castoridae	Estimación de abundancia relativa	Rattlesnake Creek, Montana, EE. UU	Wilcox et al. (2018)
Revolcaderos artificiales	<i>Sus scrofa</i> (Jabalí)	<i>S. scrofa</i>	Simulación de detección de una especie invasora	Campo de Mississippi del USDA NWRC Estación en Starkville, Mississippi	Williamset al. (2018)
Huellas de nieve ***	Carnívoros forestales, raros y en peligro de extinción	Lince canadiense ( <i>Lynx canadensis</i> ), pescador ( <i>Pekania pennanti</i> ) y glotón ( <i>Gulo gulo</i> )	Reducción de errores de detección	Montana, EE. UU	Franklin et al. (2019)
Cuerpos de agua naturales y artificiales	Mamíferos de especial interés para la conservación	Cricetidae, Mustelidae, Castoridae, Erinaceidae, Cervidae, Felidae, Sciuridae	Monitoreo de especies	Zoológicos y Parques nacionales naturales de Escocia y Yorkshire	Harper et al. (2019)
Huellas de nieve	Mamíferos terrestres	Mustelidae, Cervidae, Canidae	Identificación de especies	Villa Kuta, Kyoto, Japón	Kinoshita et al. (2019)
Agua y sedimentos de pozos naturales y artificiales	Mamíferos terrestres	Elephantidae, Orycteropodidae, Equidae, Hippopotamidae, Bovidae, Hyaenidae, Felidae, Canidae	Monitoreo de especies	Parque Nacional Etosha, región de Karas (Namibia) y Parque nacional Serengueti, Tanzania	Seeber et al. (2019)

Heces	Ungulado europeo	Cervidae, Suidae, Bovidae, Equidae	Discriminación entre heces de especies de tamaños similares	Reservas y Parques naturales en Suecia, Países bajos, Alemania y Polonia	Spitzer et al. (2019)
Ramas parcialmente consumidas	Especies ramoneadoras	Ciervo rojo ( <i>C. elaphus</i> ), Corzo ( <i>C. capreolus</i> )	Análisis de dieta: patrones de ramoneo	Parque Nacional del Bosque Bávaro, Alemania	Van Beeck Calkoen et al. (2019)
Huellas de nieve***	Lobos	<i>C. lupus</i>	Identificación de especies	Bosque Nacional Superior, Minnesota, EE. UU	Barbermeyer et al. (2020)
iDNA de sanguijuelas	Mamíferos	Cervidae, Suidae, Tragulidae, Felidae, Ursidae, Viverridae, Manidae, Cercopithecidae, Elephantidae, Hystricidae	Estimación de diversidad. Análisis de impacto de la degradación de hábitat sobre la diversidad	Sabah, Borneo, Malasia.	Drinkwater et al. (2020)
Pozos de agua en ecosistemas de sabana	Mamíferos	Bovidae, Elephantidae, Equidae, Rhinocerotidae, Giraffidae, Hyaenidae, Suidae, Hippopotamidae, Felidae	Monitoreo de especies	Parque Nacional Kruger, Sudáfrica	Farrell et al. (2020)
Pozos de agua en zonas áridas	Vertebrados	Equidae, Vespertilionidae, Molossidae, Camelidae, Macropodidae	Detección de especies	Pozos de agua de los parques nacionales Watarrka y Tjoritja en Australia	Furlan et al. (2020)
Arroyos	<i>S. scrofa</i> (Jabalí)	<i>S. scrofa</i>	Detección de especie invasora	Arroyos Bluff Creek y Black Creek, Michigan, EE. UU	Hauger et al. (2020)
Agua de ecosistema urbano	Vertebrados	Sciuridae, Canidae, Muridae	Detección de especies en áreas urbanas	Suwon, Corea del Sur	Kim et al. (2020)
Superficie desuelo en reserva biológica	Mamíferos terrestres	Bovidae, Canidae, Cervidae, Cricetidae, Equidae, Felidae, Leporidae, Muridae, Sciuridae, Suidae, Talpidae, Vespertilionidae,	Detección y monitoreo de especies	Reserva Biológica Jasper Ridge (JRBP), California, EE. UU	Leempoel et al. (2020)

		Didelphidae, Geomyidae, Mephitidae			
Ríos, arroyos y sedimentos en bosques tropicales y templados	Mamíferos neotropicales	Procyonidae, Phyllostomidae, Didelphidae, Atelidae, Caviidae, Cricetidae, Cuniculidae, Echimyidae, Sciuridae	Monitoreo de especies	Bosques amazónicos y atlánticos ubicados en Brasil	Sales NGet al. (2020a)
Ecosistemas lóticos naturales: ríos y arroyos	Mamíferos semiacuáticos y terrestres	Cervidae, Cricetidae, Muridae, Soricidae, Felidae, Leporidae, Gliridae, Sciuridae, Mustelidae, Canidae	Detección de especies	Loch Assynt, Escocia y Parque nacional del distrito de los picos, Inglaterra	Sales NG et al. (2020b)
Lagos del reino unido	Mamíferos	Bovidae, Canidae, Suidae, Equidae, Cricetidae, Muridae, Cervidae, Soricidae, Leporidae, Mustelidae, Talpidae, Sciuridae, Castoridae, Vespertilionidae	Detección de especies	Lagos del Reino Unido	Sellers, Hänfling (2020)
Río Yangtze	Vertebrados	Suidae, Bovidae, Muridae	Detección y futuro monitoreo de especies	Río Yangtze, China	Xu et al. (2020)
Cuerpos de agua de bosques templados	<i>Chimarrogale platycephala</i> (musaraña de aguajaponesa)	Soricidae ( <i>C. platycephala</i> ), Muridae, Canidae, Cervidae, Ursidae	Detección de especie en peligro crítico de extinción	Bosques templados de Nantan, Kioto, Japón	Yonezawa et al. (2020)
Ríos amazónicos	Mamíferos del amazonas	Atelidae, Phyllostomidae, Bradypodidae, Didelphidae, Cebidae, Pitheciidae, Choloepodidae, Erethizontidae, Emballonuridae, Cuniculidae, Cyclopedidae, Dasypodidae, Echimyidae Mustelidae, Molossidae, Felidae, Caviidae, Cricetidae, Vespertilionidae, Cervidae,	Monitoreo de especies	Ríos Maroni, Oyapock y Sinnamary en cuencas amazónicas de Guyana Francesa	Coutant et al. (2021)

		Myrmecophagidae, Procyonidae, Noctilionidae, Tayassuidae, Chlamyphoridae, Mormoopidae, Callitrichidae, Sciuridae, Canidae, Tapiridae, Thyropteridae			
Estanques, arroyos, lagos, ríos y mar	Fauna en zonas urbanas	Leporidae, Cervidae, Bovidae, Mustelidae, Suidae	Análisis de diversidad y detección de especies raras	Centro urbano de Trondheim, Noruega	Hupalo et al. (2021)
Cuencas hidrográficas del norte de Colombia	Vertebrados	Mustelidae, Procyonidae, Caviidae, Muridae, Didelphidae, Myrmecophagidae, Atelidae, Cebidae	Detección de especies. Análisis de diversidad Alpha y Beta (sólo para peces)	Norte de Colombia, incluyendo las cuencas de los ríos Magdalena, Sinú, Atrato y San Jorge	Lozano-Mojica, Caballero (2021)
Muestras de orina en tuberías ***	<i>Muscardinus avellanarius</i> (lirón avellana)	<i>M. avellanarius</i> y <i>Peromyscus keeni</i> (ratón ciervo del noroeste)	Detección de especie rara	Centro Británico de Vida Silvestre, Lingfield, Reino Unido	Priestley et al. (2021)

\*Sólo se tuvo en cuenta la detección de mamíferos no humanos y no se tuvieron en cuenta especies extintas.

\*\*Para estudios enfocados en más de cuatro especies, los taxones se detallan a nivel de familia.

\*\*\* Muestras consideradas no invasivas no ambientales.

**Anexo 2. Problemas comunes al usar eDNA como herramienta y sus posibles soluciones.** Tomada y modificada de (Bohmann et al. 2014; Cristescu Hebert 2018; Fernandes et al. 2018).

Problema	Causas comunes	Posibles soluciones *
Falsos positivos (error de tipo I): eDNA detectado donde la especie objetivo no está presente.	<ul style="list-style-type: none"> <li>eDNA afluente de un río cercano,</li> <li>descarga de agua de lastre, aguas residuales,</li> <li>excrementos de animales que se alimentan de las especies objetivo,</li> <li>especies objetivo muertas transportadas en barcos,</li> <li>equipos sin esterilizar.</li> </ul>	<p>Implementar un control de calidad para evitar falsos positivos en la estrategia de muestreo. Por ejemplo: tomar muestras en blanco sobre el terreno para garantizar que no se produzca contaminación en la fase de transporte.</p> <p>Tomar muestras de áreas adyacentes donde se sabe que no existen especies objetivo.</p> <p>Esterilización de equipos.</p>

Falsos negativos (error de tipo II): eDNA no detectado donde la especie objetivo está presente.	Sensibilidad insuficiente o de que los métodos no funcionan como se esperaba.	Se deben realizar pruebas rigurosas de cebadores contra el ADN de la especie objetivo para garantizar una amplificación exitosa, así como optimizar los protocolos para tener confianza en la detección de especies antes de que comience la recolección de muestras.
La incapacidad del eDNA para distinguir entre organismos vivos o muertos.	Una suposición clave de la codificación de metabarras de ADN como herramienta de seguimiento es que la presencia de ADN indica la presencia local del organismo vivo. Si bien esto es lógico para las muestras orgánicas que incluyen partes del organismo real, no es tan obvio para el eDNA. El suelo, por ejemplo, puede preservar el ADN durante miles de años en condiciones específicas.	El muestreo temporal repetido de la misma área puede solucionar este problema hasta cierto punto. Debido a que los cadáveres, la materia fecal de los depredadores u otras fuentes introducidas de ADN se descomponen y degradan con el tiempo, una especie que está permanentemente presente en un medio ambiente seguirá siendo detectada después de que los contaminantes introducidos se hayan degradado más allá del punto de amplificación del ADN. La evaluación de riesgos del estudio debe incluir cualquier organismo muerto observado visualmente.
Método incorrecto: Debido a que los protocolos de campo, laboratorio y bioinformática influyen en la probabilidad de detección de eDNA y las estimaciones de biodiversidad posteriores, la selección de protocolos óptimos es clave.	La falta de familiaridad con la gama completa de opciones analíticas y su impacto en los resultados puede llevar a la adopción de un método poco adecuado.	Realizar estudios más comparativos de protocolos de campo y laboratorio. Adoptar métodos bien validados y justificados. Por ejemplo, la eficacia de todos los protocolos seleccionados para su uso debe validarse mediante el análisis de comunidades simuladas (comunidades artificiales de composición taxonómica conocida) con suficiente diversidad de especies y variación genética para reflejar la diversidad probable en el sistema de estudio.
Resolución espacial incierta	La poca comprensión de los impactos de las condiciones bióticas y ambientales en la ecología del eDNA (su producción, transporte y vida media dentro de un ambiente) hace que sea difícil descartar su origen en otro ambiente. ¿La señal capturada proviene del entorno local o representa la diversidad regional?	En los sistemas fluviales, se puede utilizar información sobre las tasas de desprendimiento, descomposición, sedimentación o resuspensión de eDNA, así como sobre las características físicas básicas de los sitios para predecir el transporte río abajo.

Resolución temporal incierta	<p>La escasa comprensión de la ecología del eDNA dificulta la separación de secuencias derivadas de eDNA frente al ADN antiguo (ancient DNA, aDNA) que comprometen las inferencias temporales. ¿La señal capturada proviene de comunidades bióticas existentes pasadas?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizar patrones de sustitución e incorporación errónea de nucleótidos para discriminar eDNA y DNA;</li> <li>• Utilizar marcadores alternativos basados en ARN (basados en ADN complementario derivado de ARN mitocondrial y / o ARN ribosómico) para proporcionar inferencias espacio-temporales más estrechas, especialmente deseables en ensayos muy sensibles (p. Ej., Detección de especies invasoras, identificación de recambio de especies muy reciente o rápido en respuesta a los estresores ambientales).</li> </ul>
Información ecológica limitada	<p>Falta de información sobre la etapa de desarrollo, sexo, tamaño de los individuos detectados usando eDNA.</p>	<p>Utilizar marcadores específicos de la etapa de la vida y el sexo.</p>
Resolución taxonómica limitada:	<p>Las bibliotecas de referencia incompletas y las secuencias en estas bibliotecas que derivan de especímenes mal identificados significan que una gran fracción de la diversidad fácilmente detectable permanece sin clasificar y mal vinculada a su ecología.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizar bibliotecas de referencia locales cuando se investiguen pocas especies objetivo;</li> <li>• Ampliar la biblioteca de secuencias de referencia global sobre la base de muestras de especímenes bien identificados.</li> </ul>
Comparabilidad limitada	<p>La falta de protocolos estandarizados complica la comparación de resultados entre estudios</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seguir precauciones similares a las establecidas para los protocolos de aDNA;</li> <li>• Comparar directamente nuevos métodos con los existentes en laboratorios independientes y en múltiples condiciones</li> </ul>
Dificultad en la elección de códigos de barras apropiados	<p>No existe un código de barras universal (es decir, una región genética para toda la biota) que proporcione una resolución lo suficientemente potente como para identificar todo el ADN en una muestra. Los cebadores se eligen,</p>	<p>Cuando los investigadores estén interesados en detectar taxones particulares, pueden diseñar ensayos de PCR que sean específicos para el objetivo. Los investigadores interesados en una evaluación más amplia de la biota en una muestra pueden utilizar una serie de marcadores genéticos que comparten una variedad de organismos.</p>

---

dependiendo de los organismos objetivo, para amplificar los códigos de barras en una región genética particular. Estos son teóricamente similares dentro de una especie, pero contienen suficiente variación para separar diferentes especies / linajes.

---

\* Aunque las soluciones presentadas permiten que el ADN ambiental sea menos dependiente de otras herramientas, aún no se cuenta con la tecnología necesaria para utilizar eDNA como único medio de obtención de información. Se recomienda revisar la amplia gama de herramientas para el estudio de mamíferos terrestres y semiacuáticos y combinar las más apropiadas dependiendo de los objetivos de la investigación. Por ejemplo, al implementar los controles de calidad de eDNA para evitar falsos positivos y utilizar cebadores específicos de los taxones de interés para evitar falsos negativos, se abre la posibilidad de estudiar más especies, en diferentes etapas de vida, en áreas más extensas, pero es pertinente contar con protocolos estandarizados e información biológica y ecológica previa para realizar la comparación de los resultados con técnicas tradicionales.