



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Y OCEANOGRÁFICAS



COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DE CAPTURA Y MÉTODO MOLECULAR
CON ADN AMBIENTAL PARA DETECCIÓN DE LA PRESENCIA Y ABUNDANCIA
DE LA LAMPREA DE BOLSA *Geotria australis*

Hugo David Durán Sepúlveda

Profesor Guía: Daniel Gomez-Uchida

Profesora Co-Guía: Celia Fernandes de Lima

Seminario de Título presentado a la
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar al Título de
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

Concepción - Chile

2024

Este seminario de título ha sido realizado en el Laboratorio de Genómica en Ecología, Evolución y Conservación (GEECLAB) del Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Daniel Gomez-Uchida

Profesor Co-guía

Dra Celia Fernandes de Lima

Profesores Evaluadores

Dr. Claudio Quezada-Romegialli

Dr. Fernando Cruzat

Profesor Coordinador

Dr. Fernando Cruzat

Concepción, octubre 2024

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre, mi Abuela y mi Hermana, la familia que siempre ha estado ahí para mí y quienes me han hecho la persona que soy hoy.

A Leandro y Vicente, mis hermanos de otra sangre, los amigos y compañeros con quienes he crecido desde hace ya tantos años.

A mis amigos y compañeros de carrera, con quienes pasamos todo tipo de momentos y luchamos por conseguir completar nuestros estudios.

A los profesores Daniel y Celia, por guiarme en este tema e inspirarme a aprender tanto.

A todos los miembros del GEECLAB, por su ayuda y enseñarme tanto en mi desarrollo como profesional, especialmente a Vasti y Tomás por su apoyo en terreno.

A la Corporación privada de San Carlos (CORDESAN) por permitirme a mí y a decenas de otros estudiantes de San Carlos residir y estudiar en Concepción pese a nuestras situaciones socioeconómicas.

Al Núcleo Milenio INVASAL NCN 2021-056 por su financiamiento para el desarrollo de este Seminario de Título.

Índice

Resumen	3
Abstract.	5
1. Introducción.	7
2. Hipótesis y Objetivos	17
2.1. Pregunta de investigación	17
2.2. Hipótesis	17
2.3. Objetivo General	18
2.3.1. Objetivos Específicos	18
3. Materiales y métodos	19
3.1. Área de estudio	19
3.2. Toma de muestras ambientales	22
3.3. Pesca eléctrica y captura de lampreas	23
3.4. Diseño de ensayo de PCR cuantitativa	25
3.4.1. Selección y validación de partidores	25
3.4.2. Diseño de sonda TaqMan	27
3.5. Trabajo de laboratorio	28
3.5.1. Extracción de ADN	28
3.5.2. qPCR de muestras ambientales	29
3.5.3 Curva estándar	30
3.6. Bioinformática y análisis estadísticos	31
4. Resultados	32
4.1. Captura y CPUE	32
4.2. Validación de partidores y diseño de sonda	36
4.3. Curva estándar y qPCR en muestras ambientales	38
5. Discusión	44
5.1. Análisis de terreno y captura de individuos	45
5.2. Validación de partidores y diseño de sonda	47
5.3. Detección de <i>Geotria australis</i> en muestras ambientales	49
5.4. Oportunidades a futuro	52
6. Conclusiones	54
Referencias	55
ANEXOS	63

Índice de Figuras

Figura 1 Mapa del área de estudio.	23
Figura 2. Captura por unidad de esfuerzo para cada especie en las estaciones de muestreo ubicadas en el río Lia.	35
Figura 3. Captura por unidad de esfuerzo para cada especie en las estaciones de muestreo ubicadas en el río Andalién.	37
Figura 4. Boxplot con los valores de Ct (Cycle threshold) en el qPCR para la detección de <i>Geotria australis</i> en muestras de agua para cada estación de muestreo.	41
Figura 5. Curva estándar de 5 puntos realizada a partir de una dilución seriada con ADN extraído de tejido de <i>Geotria australis</i> . Gráfico obtenido con BioRad CFX Manager 2.1	42
Figura 6. Scatterplot para visualizar la relación entre las variables CPUE y concentración de ADN ambiental ($R^2 = 0.03277$).	44
Figura 7. Scatterplot para visualizar la relación entre las variables CPUE y Ct (cycle threshold) ($R^2 = 0.00293$).	45

Índice de Tablas

Tabla 1. Detalle de las estaciones de muestreo con fecha y coordenadas.	22
---	----

Resumen

Las lampreas son vertebrados acuáticos sin mandíbula, de las cuales, en Chile sólo se han descrito 2 especies, ambas nativas, *Geotria australis* y *Mordacia lapicida*, la última siendo endémica de Chile. Por su parte, *Geotria australis* se distribuye además por Nueva Zelanda, Australia y Argentina, en dónde existe un “interés intermedio” para su conservación. El desarrollo de métodos moleculares con ADN ambiental (environmental DNA, eDNA) para detectar la presencia de organismos acuáticos poco abundantes, difíciles de monitorear mediante métodos tradicionales, se ha vuelto una herramienta clave en ecología.

En este estudio se aplicó un diseño experimental basado en PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR) que incluyó una validación de partidores específicos ya establecidos para la especie y el diseño de una sonda de hidrólisis (TaqMan) para mejorar la especificidad. Se realizó captura de individuos mediante pesca eléctrica y recolección de muestras ambientales en dos cuencas de la región del Biobío, el río Andalién y río Carampangue, específicamente su tributario, el río Lia, con el objetivo correlacionar la abundancia medida con captura con la concentración de ADN ambiental en las muestras ambientales.

En el río Lia, se capturaron varias especies de peces nativos, estando presentes en todas las estaciones de muestreo individuos del género *Percilia*, distintas especies de

la familia Trichomycteridae e individuos larvales de *Geotria australis*, los cuales tuvieron la mayor abundancia relativa (captura por unidad de esfuerzo, CPUE). Se capturó un porcentaje muy bajo de *Salmo trutta* y *Oncorhynchus mykiss*, que son especies exóticas invasoras. En el río Andalién, se capturaron principalmente *Galaxias maculatus* e individuos larvales de la familia Trichomycteridae.

Los resultados indican que no hubo una correlación significativa entre la abundancia relativa de las especies en las estaciones y la concentración de ADN ambiental calculada mediante qPCR. Se discuten las limitaciones de este estudio y la oportunidad de aplicar diseños experimentales que incorporen los avances recientes en la validación y estandarización de métodos moleculares para detectar especies.

Abstract.

Lampreys are jawless aquatic vertebrates, of which only two of them have been described as native species in Chile: *Geotria australis* and *Mordacia lapicida*, the latter being endemic to Chile. *Geotria australis* is also distributed in New Zealand, Australia and Argentina, where there is “medium” global interest in its conservation. The development of molecular methods using environmental DNA (eDNA) to detect the presence of rare aquatic organisms that are difficult to study through traditional capture methods has become a key tool in ecology.

This study implemented an experimental design based on quantitative real-time PCR (qPCR), which included the validation of species-specific primers already established for *Geotria australis* and the design of a hydrolysis probe (TaqMan) to improve specificity of the assay. Individuals were captured using electrofishing, and environmental samples were collected from two basins in the Biobío region, the Andalién River and the Carampangue River, specifically its tributary, the Lia River. The objective was to correlate the abundance estimated through capture with the concentration of eDNA in environmental samples.

In the Lia River, several native fish species were captured, individuals of the genus *Percilia*, some species of the family Trichomycteridae, and larval stages of *Geotria australis* being present at all sampling stations. There, *Geotria australis* showed the

highest relative abundance (catch per unit effort, CPUE). A very low percentage of *Salmo trutta* and *Oncorhynchus mykiss*, both invasive exotic species, was recorded. In the Andalién River, the captures mainly included *Galaxias maculatus* and larval stages of the Trichomycteridae individuals.

The results indicate that there was no significant correlation between the relative abundance of the species at the sampling stations and the concentration of eDNA measured by qPCR. The study discusses its own limitations and the opportunity to apply experimental designs that incorporate recent advances in the validation and standardization of molecular methods for species detection.

1. Introducción.

Los ecosistemas acuáticos continentales sustentan más de 13.000 especies de peces, siendo el 40% de todas las especies de peces (Dudgeon et al., 2006; Lundberg et al., 2000). Sin embargo, la diversidad de peces de agua dulce en Chile es reducida, siendo conformada por 48 especies correspondientes a 7 órdenes, 10 familias y 19 géneros, además de 2 especies de lampreas. Entre el 70% a 80% de estas especies son endémicas de nuestro país (Habit et al., 2006, 2019; Habit & Victoriano, 2005). Dada la importancia del agua dulce como recurso, la integridad de los ecosistemas acuáticos continentales se ve vulnerada por actividades desencadenantes de cambios ecológicos como el uso del suelo, alteración de los cauces, construcción de embalses, extracción de agua para riego, salinización del agua, cambio climático e introducción de especies exóticas invasoras. Estas son causantes de reducir la supervivencia o limitar el movimiento y espacio de los organismos dulceacuícolas (Dudgeon et al., 2006; Reid et al., 2019). Es necesaria la aplicación de planes de manejo para fortalecer los esfuerzos de conservación de la diversidad dulceacuícola, y para ello, los peces son muy buenos indicadores de la integridad del ecosistema. En nuestro país la información sobre aspectos biológicos, distribución y densidad de peces de agua dulce, incluyendo lampreas, es en la mayoría de los casos incompleta o inexistente (Habit et al., 2006, 2019; Habit & Victoriano, 2005).

Las lampreas son vertebrados sin mandíbula del Orden Petromyzontiformes, del cual se reconocen actualmente 3 familias: Petromyzontidae, Geotriidae y Mordaciidae (Van Der Laan et al., 2014; WoRMS, 2024). En el hemisferio sur solo se ha descrito la presencia de lampreas pertenecientes a las familias Geotriidae y Mordaciidae (Miller et al., 2021). De las más de 40 especies de lampreas descritas mundialmente, diez se han descrito como anádromas: organismos que desarrollan la mayor parte de su ciclo de vida en el mar y migran a agua dulce para reproducirse (Clemens et al., 2021; Miller et al., 2021). Las únicas dos especies de lampreas descritas en Chile pertenecen a este grupo y son *Geotria australis*, descrita como deficiente de información en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) y *Mordacia lapicida*, descrita recientemente como vulnerable por la IUCN (Baker & Bice, 2021; Colin, 2023). Son conocidas coloquialmente como lamprea de bolsa y lamprea de agua dulce respectivamente, siendo esta última endémica de Chile (Clemens et al., 2021; Habit et al., 2006; Habit & Victoriano, 2005; Miller et al., 2021). A nivel nacional, la clasificación de especies, según conservación del Ministerio de Medio Ambiente, las describe como vulnerables y en peligro, respectivamente (MMA, 2024). El estado de conocimiento de nuestras lampreas nativas no difiere mucho del estado de conocimiento mundial sobre las lampreas anádromas (Clemens et al., 2021).

Mordacia lapicida, así como otras especies de agua dulce a nivel internacional, carece de información completa acerca de su estado actual, ciclo de vida, fase marina, conducta de desove, entre otros, lo que complica su estudio y dificulta la implementación de planes de manejo (Lucas et al., 2021; Miller et al., 2021). *Geotria australis* por su parte está distribuida en regiones de altas latitudes en el hemisferio sur: Nueva Zelanda, Australia, Argentina y Chile (Miller et al., 2022; Potter et al., 1980). En contraste a *M. lapicida*, existe un interés intermedio en sus esfuerzos de manejo e investigación (Clemens et al., 2021). En Chile, la distribución de *Geotria australis* se estima desde la región Metropolitana hasta Tierra del fuego (MMA, 2023; Lobao-Tello et al., 2014). La especie tiene importancia cultural para el pueblo mapuche, quienes las conocen como “filoko” o “filokomo” y donde su influencia va desde la alimentación a lo espiritual e incluso medicinal (Lobao-Tello et al., 2014; Villagrán et al., 2018). Su pesca no está regulada, pues se limita a localidades aledañas a la cuenca hidrográfica del río Toltén, en la región de la Araucanía, donde destaca la comunidad mapuche de Gorbea, quienes realizan la captura a mano en el río Donguil, tributario del río Toltén, en un área establecida que actúa como barrera de migración para las lampreas (Lobao-Tello et al., 2014; Villagrán et al., 2018).

Se desconocen muchos aspectos de la ecología de la lamprea de bolsa. Los factores de riesgo que afectan a esta especie son las barreras de migración, la modificación de los cauces, calidad del agua y presencia de pesticidas (Clemens et al., 2021; Habit et al., 2024). El estudio de especies elusivas en programas de monitoreo es crítico,

ya que, estimar tamaños de población, comportamiento o hábitats es necesario para la conservación, pero especies como *Geotria australis* son difíciles de monitorear con los métodos tradicionales (Miller et al., 2022). En este trabajo nos referiremos a los estadios de vida de las lampreas bajo la terminología descrita por Clemens (2019).

Habit et al., 2019 (en la COP25) defienden la necesidad de combatir las brechas de conocimiento acerca del estado de la biodiversidad dulceacuícola chilena y de fortalecer la adquisición de información para los esfuerzos de conservación. Según Radinger et al. (2019), “El monitoreo de peces de agua dulce involucra el muestreo reiterado y detección sistemática de cambios a nivel poblacional o comunitario. Requiere de objetivos y metodologías específicas para cada ecosistema o comunidad en particular”. Éste, es necesario para la adquisición de conocimiento acerca del estado de un ecosistema y fauna de peces que lo habita. En Chile, el instrumento de gestión ambiental denominado Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (SEIA) lo exige como un requisito en evaluaciones de proyecto, como parte de un plan de seguimiento ambiental para monitorear la flora y fauna acuática que podría resultar alterada (FIPA, 2016). Los métodos utilizados para el monitoreo de la biodiversidad dulceacuícola están bien descritos y su ejecución está estandarizada con la ayuda de guías y manuales de muestreo. Como ejemplo nacional, están la “Guía metodológica y protocolos de muestreo de flora y fauna acuática en aguas continentales de Chile” (FIPA, 2016) o la “Guía de monitoreo de humedales” (MMA-ONU Medio Ambiente, 2022). Si bien existen métodos de censo visual, la captura es una constante de estas

metodologías. La captura puede ser pasiva, realizada con redes, espineles o nasas; o puede ser activa, realizada principalmente con pesca eléctrica, la cual consiste en aturdir al pez con una descarga eléctrica no letal para su captura y sedación (FIPA, 2016; Elosegui, 2009). La captura permite el conteo y medición de parámetros biológicos como riqueza específica, abundancia, diversidad y datos biométricos, como el tamaño y peso, siendo estas últimas evidentemente, exclusivas de métodos con captura.

Con el manejo y captura de peces, existe la probabilidad de ejecutar una mala maniobra que involucre daños físicos, estrés e incluso la muerte. En artes de pesca como la pesca eléctrica, se ha descrito que existe la posibilidad de causar heridas internas, hemorragias o daño espinal a los peces muestreados (Snyder, 2003). Sin embargo, este problema está estrictamente relacionado a la capacitación de los operarios en la manipulación de especímenes vivos y en el manejo de equipos. Otro obstáculo de las metodologías de captura es la pesca de aquellas especies elusivas, con una baja densidad o poca ocupación de un área, lo que implica una baja probabilidad de captura y por ende la emisión de falsos negativos que impiden la detección de su presencia en el ecosistema (Piggott et al., 2021; Sard et al., 2019). Las especies elusivas, en peligro de extinción o especies acuáticas invasoras, suelen tener ciclos de vida más complejos, por lo que dada su distribución o ciclo de vida, una no-detección se deba a su tamaño o estado de desarrollo y no a una ausencia en el ecosistema como tal (Miller et al., 2022; Piggott et al., 2021; Radinger et al., 2019).

Actualmente, el desarrollo de métodos moleculares utilizando ADN ambiental (*environmental DNA*, eDNA por sus siglas en inglés) como matriz para la detección de especies raras en los monitoreos de macrofauna de agua dulce ha ido en aumento (Evans & Lamberti, 2018; Wang et al., 2021). El ADN ambiental se refiere a trazas de material genético que se encuentran en muestras ambientales. En el caso de los peces, provienen de la liberación de mucosa, fecas, gametos, células epiteliales muertas o descomposición que resultan en ADN suspendido en la columna de agua y/o sedimentos de los ecosistemas acuáticos (Baltazar-Soares et al., 2022; Lacoursière-Roussel et al., 2016). La herramienta principal en estos estudios, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes. La detección de especies viene de secuencias utilizadas como marcadores genéticos llamadas partidores. Son secuencias cortas complementarias al genoma de las especies objetivo, que guían a la polimerasa en el PCR y es su especificidad la que determina la precisión de la técnica. Estas pueden ser secuencias específicas, para detectar una especie determinada o universales para analizar una comunidad (Wang et al., 2021).

Dentro de la disciplina de ADN ambiental, el método denominado *metabarcoding* se utiliza para estudios a nivel comunidad y se fundamenta en la utilización de partidores dirigidos a una región hipervariable del genoma que permite la amplificación de secuencias representativas para varias especies en la muestra. Una posterior secuenciación y evaluación taxonómica por comparación en una base de datos,

permite detectar múltiples especies de interés (Estragues Núñez, 2018). Requiere de una gran inversión debido al uso de plataformas secuenciación de alto rendimiento como MiSeq (Nakao et al., 2021), pero es eficiente, dado que la inversión considera el estudio de la comunidad completa, siempre y cuando la especificidad de los partidores lo permita (Estragues Núñez, 2018; Lynch, 2023). Por su parte, el uso de partidores específicos, aquellos dirigidos a regiones conservadas del genoma de un organismo, permiten la detección exclusiva de una especie gracias a técnicas de PCR cuantitativa (*quantitative PCR*, qPCR) o Digital PCR, las que permiten cuantificar la concentración de ADN en la muestra. La inversión es menor, pero solo considera el estudio de unas pocas especies objetivo, lo que significa obviar el resto de la información en la muestra. Sin embargo, estas técnicas son estadísticamente más sensibles (Lynch, 2023). Es por ello que son mejores para evaluar especies amenazadas o invasoras cuando se busca una alta probabilidad de detección (McColl-Gausden et al., 2023).

La utilización de ADN ambiental para el monitoreo de la presencia-ausencia de las especies objetivo, ha demostrado ser una herramienta excelente en ecología, pero su utilización no es independiente a los métodos de captura. El estudio ecológico con ADN ambiental carece de la adquisición de información morfológica (tamaño, peso y otros) por lo que su uso dependerá de los objetivos del monitoreo (Piggott et al., 2021; Sard et al., 2019). Citando a Piggott et al. (2021), “Complementar las detecciones de ADN ambiental con datos de estudio adicionales puede mejorar la fiabilidad de las

inferencias de ADN ambiental sobre la presencia y ausencia de especies raras de peces de agua dulce en una región objetivo”. Aún hay vacíos de conocimiento sobre cómo se relaciona el ADN ambiental y la abundancia o densidad de organismos, pues una mayor cantidad de ADN en la muestra no necesariamente indica la misma proporción de aumento de densidad de peces (Lacoursière-Roussel et al., 2016; Kamoroff & Goldberg, 2018). La denominada “Ecología del ADN ambiental” define los factores de influencia que afectan la medición del ADN en las muestras ambientales y su aplicación estadística permitiría una correlación más precisa del ADN ambiental con valores de densidad o abundancia (Caza-Allard et al., 2022; Yates et al., 2021). La cantidad de material genético que es liberado por los organismos de la columna de agua y su paradero depende varios parámetros biológicos como la tasa metabólica, comportamiento, cambios fisiológicos con la temperatura y abundancia, así como parámetros ambientales como la degradación, salinidad, UV, resuspensión, inhibidores de PCR, nucleasas, o la interacción del material genético con la corriente (Caza-Allard et al., 2022; Rourke et al., 2022; Wang et al., 2021; Yates et al., 2021). En ecosistemas lóticos, teóricamente, se provoca un efecto de transporte y acumulación debido a la corriente, pero se ha descrito que dicho efecto presumiblemente se ve contrarrestado por efectos como sedimentación, degradación mecánica, dilución, entre otros (Bracken et al., 2019; Cantera et al., 2022). Por otro lado, la matriz de donde se obtiene ADN ambiental afecta en gran medida la detección. Aparte de usar filtración de agua, también se puede utilizar sedimento para la detección de organismos acuáticos. En dicha matriz ambiental, se suele considerar

que la vida media del ADN es mayor, dada una degradación más lenta del material genético asociado al sustrato, implicando la probabilidad de falsos positivos cuando se busca inferir tendencias espacio temporales, además de una mayor probabilidad de inhibición del PCR (Turner et al., 2015). Otra matriz pueden ser extracciones de biofilm (Rivera et al., 2023).

Los ensayos cuantitativos con ADN ambiental dirigidos a especies únicas, aportan una oportunidad para monitorear a mayor escala, la distribución de las distintas especies de lampreas y se espera que el desarrollo de estas técnicas siga aumentando esta década, dando valor al uso del ADN ambiental como indicador en ecología (Lucas et al., 2021). Nardi et al., 2020 implementó el ADN ambiental para evaluar la presencia y distribución del género *Geotria* en Tierra del Fuego (Argentina), sumando además análisis filogenéticos a los especímenes capturados gracias al monitoreo previo del ADN ambiental. Además, se ha evaluado el valor de la concentración del ADN como indicador en sucesos biológicos como el desove, donde se conoce que ocurre un aumento de secreciones, y por ende, de ADN suspendido en la columna de agua. El monitoreo periódico de la tendencia del ADN ambiental en la cuenca puede brindar información acerca de hábitats críticos de las especies (Bracken et al., 2019; Tsuji & Shibata, 2021; Wu et al., 2022). El uso de qPCR y partidores específicos para el estudio de especies elusivas depende mucho de la sensibilidad de los partidores y el diseño experimental, por lo que estandarizar los protocolos es necesario para su aplicación (Xia et al., 2021). Estimar la abundancia o

densidad de organismos acuáticos con ADN ambiental no es exacto y dependerá mucho de las características biológicas de la especie y del protocolo de laboratorio para poder interpretar los resultados correctamente. Junto a un muestreo con captura tradicional, podría brindar datos importantes acerca del tamaño relativo de la población (Bracken et al., 2019; Piggott et al., 2021).

Este estudio buscó poner en práctica un método molecular con un enfoque de qPCR cuantitativo y compararlo con una metodología de captura tradicional para estimar la presencia y abundancia de *Geotria australis* en un sistema lótico dentro de su rango de distribución. Y con ello, evaluar si la cuantificación del ADN ambiental puede brindar información útil acerca de la abundancia relativa de segmentos de la población y distribución de una especie poco abundante y elusiva.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Pregunta de investigación

¿Existe una correlación positiva entre la abundancia relativa medida con métodos de captura tradicionales con la concentración de ADN ambiental para una especie elusiva y poco abundante como *Geotria australis* en el ambiente?

2.2. Hipótesis

La concentración de ADN ambiental correspondiente a *Geotria australis* en las muestras ambientales cuantificadas con un método de qPCR están positivamente relacionadas con la abundancia relativa medida con un método de captura.

2.3. Objetivo General

Evaluar la correlación entre la abundancia relativa de *Geotria australis* medida con métodos tradicionales de captura y la concentración de ADN ambiental medida con ensayo molecular cuantitativo.

2.3.1. Objetivos específicos

- 1-. Evaluar la presencia y abundancia de *Geotria australis* en los sitios de muestreo mediante una metodología de muestreo con captura física.
- 2-. Determinar la presencia y concentración de ADN correspondiente a *Geotria australis* en los sitios de muestreo mediante un ensayo cuantitativo de qPCR con ADN ambiental en muestras de agua.
- 3-. Describir la relación estadística entre los resultados del análisis cuantitativo de ADN ambiental con la presencia y abundancia relativa de *Geotria australis* medida con el muestreo con captura.

3. Materiales y métodos

3.1. Área de estudio

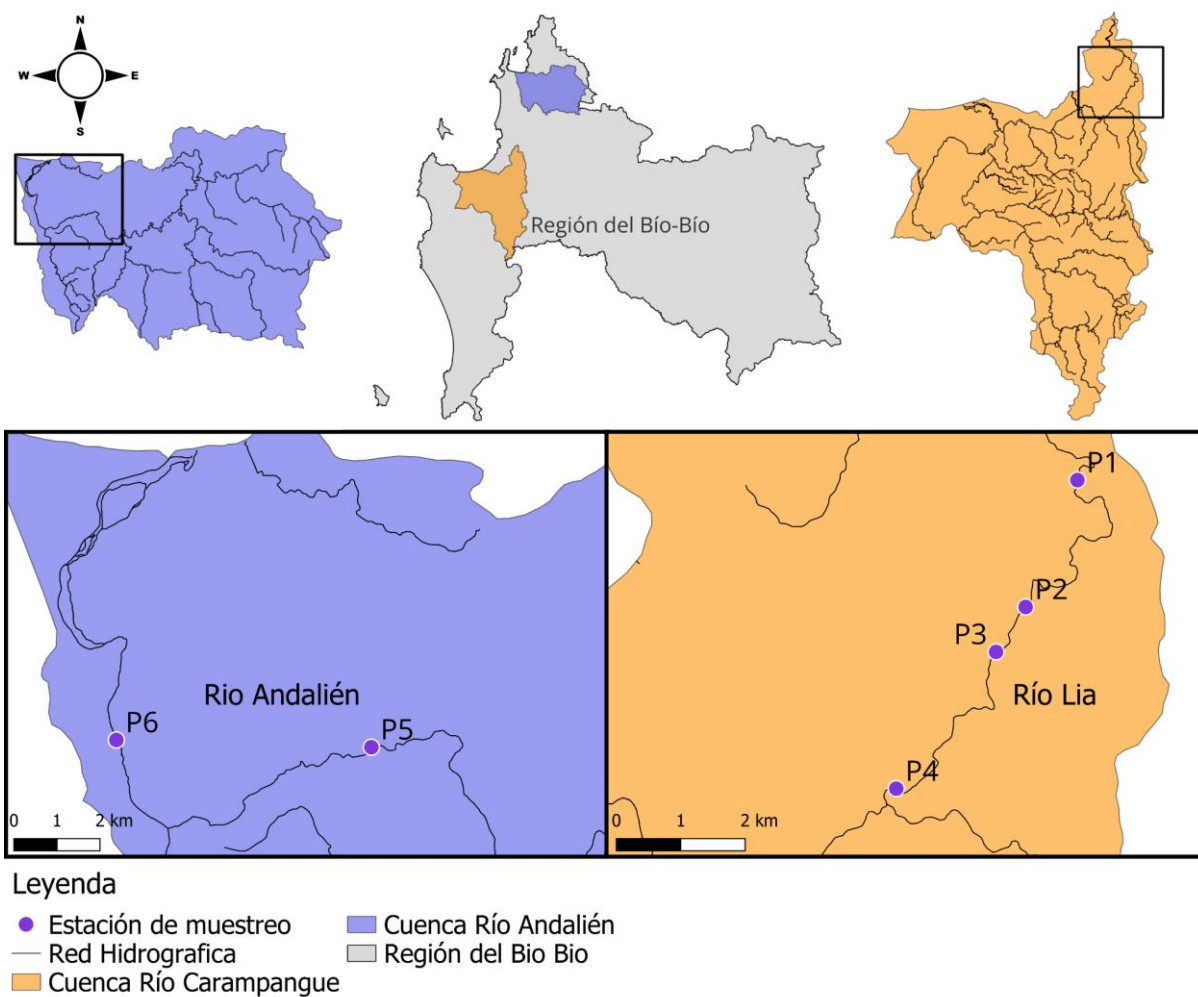
Un total de 6 estaciones de muestreo fueron seleccionadas para este estudio y se visitaron durante otoño de 2024 (Tabla 1), ubicadas en dos cuencas de la región del Biobío. La primera de ellas es la cuenca del río Andalién, cuyo río principal cubre 793 km², su curso tiene 36 km de longitud y tiene su origen en la cordillera de la costa (MMA, 2004). En esta cuenca se encuentran una alta diversidad de especies debido a la variedad de hábitats dentro de su curso y se encuentra bien caracterizada. Se han descrito la presencia de 27 especies de peces y la lamprea *Geotria australis* (Habit & Victoriano, 2005; Ruiz, 1993). La bibliografía ha descrito la presencia de lampreas en la cuenca, específicamente en las áreas potamales de la misma, sin embargo, Moraga et al., (2022) indica la pérdida de ambas especies de lampreas en la cuenca, dado el colapso de biodiversidad por la alteración en el ecosistema.

Las estaciones de muestreo que se realizaron en este río se ubicaron en dos puntos descritos históricamente por tener hábitats favorables para dichas especies (Habit et al., 2006, 2007; Neira, 1984; Ortiz-Sandoval et al., 2009; Ruiz, 1993). El área está altamente influenciada por la actividad urbana dado que cruza la ciudad de Concepción (Habit et al., 2007). La segunda cuenca corresponde a la cuenca del río Carampangue, específicamente uno de sus tributarios que nace de la cordillera de Nahuelbuta, el Río Lia. Cubre un área total de 343 km² (MMA, 2024). Dada su

ubicación y al pertenecer a la cordillera de la costa, en este río se espera encontrar una variedad de hábitats que albergan un alto nivel de endemismo, propio de ríos tributarios insertos en bosques nativos (Soria et al., 2019), así como la diversidad esperada de las cuencas costeras (Habit & Victoriano, 2005). En este río, se ubicaron cuatro estaciones de muestreo en el tramo accesible al río desde una desviación de la ruta de la madera hacia Guallerehue, camino que sigue el curso del río Lia hasta Carampangue, el área está altamente influenciada por la actividad de camping.

ID	Río	Fecha de muestreo	Coordenadas	
			Latitud	Longitud
P1	Lia	18-04-2024	37°11'38.5"S	73°00'19.7"W
P2	Lia	18-04-2024	37°12'42.2"S	73°00'52.3"W
P3	Lia	03-06-2024	37°13'04.7"S	73°01'10.9"W
P4	Lia	03-06-2024	37°14'13.3"S	73°02'13.8"W
P5	Andalién	02-06-2024	36°47'57.1"S	72°57'47.2"W
P6	Andalién	02-06-2024	36°47'51.7"S	73°01'46.2"W

Tabla 1. Detalle de las estaciones de muestreo con fecha y coordenadas.



3.2. Toma de muestras ambientales

La recolección de muestras ambientales en cada una de las estaciones de muestreo, se realizó a partir de filtrado de agua. El equipo de filtración de agua consistió en una bomba peristáltica “Pegasus Alexis®” junto a un conjunto de filtro de celulosa (0,45 µm) con portafiltros, cuyo manejo y esterilización de material, se realizó siguiendo el protocolo establecido por Estragues, (2018).

La filtración del agua se realizó en terreno en donde el equipo era instalado en la orilla del río y el portafiltro se colocaba en contra de la corriente para empezar la filtración y en algunos casos, en laboratorio, dependiendo de las condiciones ambientales y de terreno. En dichos casos, el agua fue recolectada contra de la corriente con botellas estériles de 1 L, transportada en hielo y almacenada a 4°C hasta la filtración. El volumen total de agua filtrado por estación de muestreo fue de un litro en duplicado, a excepción de las estaciones de muestreo del río Andalién (P5 y P6), cuyo volumen filtrado fue de 0.5 L debido a la turbidez y carga de sólidos disueltos del agua causados por las condiciones ambientales. Los filtros de celulosa resultantes fueron retirados del portafiltros con pinzas esterilizadas y previamente ambientadas en agua del sitio (Estragues, 2018), para finalmente ser almacenados en criotubos de 2 mL con etanol 75° y conservados a -20°C hasta la extracción de ADN (Bracken et al., 2019).

3.3. Pesca eléctrica y captura de lampreas

Posterior a la recolección de muestras ambientales, la captura de individuos fue efectuada en cada estación de muestreo mediante pesca eléctrica y redes de inmersión, también llamadas quechas. Esta metodología permite caracterizar las especies ícticas de cada estación de muestreo, así como también se ha definido como una manera eficaz de capturar lampreas (Litts et al., 2023). El equipo de pesca eléctrica utilizado fue una mochila Halltech “BackPack Electrofisher HT-2000” y las redes de inmersión tenían un ancho de malla de 20 mm en el caso de las estaciones 1 y 2 del río Lia y un ancho de malla <5 mm para las siguientes estaciones. La captura se realizó en transectos de no más de 100 metros en contra de la corriente, en donde los operarios del equipo recorrieron todo el terreno vadeable dentro del transecto del río hacia río arriba, orilla a orilla.

Para caracterizar la riqueza y abundancia relativa de la comunidad de peces en cada estación de muestreo, se llevó a cabo el registro del tiempo de pesca efectiva, definida como el tiempo en que el botón de descarga del equipo era presionado y el número de individuos capturados. También se midieron otras variables como peso y longitud total de los individuos capturados. Si bien, para efectos de este trabajo, sólo se utilizó la información obtenida correspondiente a *Geotria australis*, la medición de los datos obtenidos para el resto de las especies nativas y exóticas, quedará disponible en la base de datos del laboratorio de genómica en ecología, evolución y conservación de

la Universidad de Concepción (GEECLAB). Con dicha información, se midió captura por unidad de esfuerzo (CPUE) como un índice de abundancia relativa, en donde “n” representa al número de individuos capturados y “t” representa al tiempo de pesca efectiva en horas.

$$CPUE = \frac{n}{t}$$

3.4. Diseño de ensayo de PCR cuantitativa

3.4.1. Selección y validación de partidores

Para realizar la PCR cuantitativa en tiempo real y hacer una detección específica de *Geotria australis* a partir de las muestras de ADN ambiental se decidió utilizar dos pares de partidores diseñados y probados por Nardi et al., (2020) para *Geotria australis*. El primer par de partidores fue, *forward* 5' - CCTACATACATCTCAACAA - 3' y *reverse* 5' GGTATTCTACTGGTTCAC- 3', dirigido al gen de citocromo oxidasa b con un amplicón de 119 bp y el segundo par de partidores fueron *forward* 5' - CCTCGTTCGTTGATTATTCTCC - 3' y *reverse* 5'-GTTGGCTTAGTTCTGCTCGAAT - 3', dirigidos a una región conservada del gen citocromo oxidasa subunidad 1, COI con un amplicón de 125 bp.

Cómo describe su publicación de origen, una validación in silico mediante la herramienta web “Primer-BLAST” de NCBI con las especies descritas en la zona fue necesaria. Para ello, se trabajó con una lista de especies esperadas en el área de la cordillera de la costa y en el río Andalién (Anexo 1) (Habit et al., 2007; Habit & Victoriano, 2005; MMA, 2004; Ortiz-Sandoval et al., 2009). Con dicha lista, mediante el “Taxonomy browser” de NCBI, se revisó las entradas disponibles para dichas especies en la base de datos de “nucleotide” y mediante la herramienta “Primer-

BLAST” se determinó la especificidad de los partidores y posibles alineamientos para ambos pares de partidores.

El set de partidores que mostró mejor resultado fue solicitado a IDT y una vez obtenido, se realizó un PCR convencional para validar la especificidad de los partidores mediante un par de controles positivos con el ADN de *Geotria australis* obtenido a partir de tejido. Las condiciones de amplificación para la cPCR fueron, un primer paso de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, hibridación por un minuto con un gradiente de temperatura a 58°C, 59°C, 60°C, 61°C y 62°C y una extensión a 72°C por un minuto. Finalizando con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Las muestras usadas en la validación se realizaron en triplicado, una réplica por temperatura de hibridación y las especies probadas fueron, *Geotria australis* capturada en el Rio Lia y *Geotria australis* de Puerto Cisnes además de las siguientes especies cuyo ADN eluido se obtuvo de la colección de GEECLAB: *Percilia gillissi*, *Percichthys trucha*, *Galaxias maculatus*, *Basilichthys microlepidotus*, un camarón no identificado (Parastacidae) y un control negativo. Los resultados de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%.

3.4.2. Diseño de sonda TaqMan

Una vez seleccionado el set de partidores a utilizar, se decidió sumar al diseño experimental, el uso de una sonda de hidrólisis (TaqMan) a partir del amplicón esperado del set de partidores seleccionado, la información del amplicón esperado se obtuvo de manera in silico mediante la secuencia mitocondrial completa (Accession Number NC_029404) disponible en NCBI (Ren et al., 2016). Se diseñaron candidatos mediante la plataforma PrimerQuest™ (IDT, Coralville, Iowa, USA.) cuya selección se hizo utilizando la herramienta OligoAnalyzer™ (IDT, Coralville, Iowa, USA.), para descartar la formación de dímeros y horquillas y “BLAST” (NCBI) para descartar alineaciones en secuencias no objetivo (Langlois et al., 2021). La validación en “BLAST” se hizo bajo la misma lista mencionada para la validación de los partidores. La sonda seleccionada fue solicitada bajo el mismo proveedor con el fluoróforo FAM.

3.5. Trabajo de laboratorio

3.5.1. Extracción de ADN

La extracción y purificación del ADN ambiental de los filtros de celulosa, se realizó con el kit de extracción comercial "DNeasy Blood and Tissue" mediante un protocolo modificado del fabricante propuesto por Kawato et al., (2021). En este, el filtro es cortado en trozos pequeños previo a la extracción para aumentar el rendimiento del ADN, incluye PBS en la solución de lisis como agente extra y el tiempo de incubación es de dos horas. Este procedimiento se ejecutó en laboratorio, bajo campana previamente esterilizada con luz UV por 20 minutos.

Para validar los partidores y elaborar una curva estándar, se preparó además una extracción y purificación del ADN total de una muestra de tejido de *G. australis* con el mismo kit comercial utilizado para los filtros de celulosa, en este caso, siguiendo el protocolo estandarizado dictado por los fabricantes. El tejido se obtuvo de cortar un trozo de $\leq 20\text{mg}$ de una de las lampreas capturadas y de una muestra obtenida de la colección del GEECLAB correspondiente a una *Geotria australis* (metamórfica) capturada en Puerto Cisnes durante el 2021. La cuantificación de las muestras de ADN purificado se hizo con el espectrofotómetro Epoch, utilizando la microplaca Take3 (Biotek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA).

3.5.2. qPCR de muestras ambientales

Las condiciones y protocolo de amplificación utilizados en el ensayo qPCR fueron los establecidos para los partidores por Nardi et al., 2020, que consisten en un primer paso de desnaturalización a 95°C por diez minutos, seguido de cuarenta ciclos de desnaturalización a 95°C por veinte segundos e hibridación/extensión a 60°C por un minuto. El equipo utilizado fue un “CFX OPUS 96 Real-Time PCR System” (Bio-Rad 12011319) y el volumen total de cada muestra fue de 20 µL, que incluía 2 µL de ADN, el juego de partidores FW y RV más sonda (concentración inicial 10 µM) con un volumen de 0.2 µL cada uno y 10 µL del master mix “TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0” seleccionado por su fiabilidad para aliviar la inhibición en muestras ambientales (Uchii et al., 2019) y por recomendación de la publicación de origen de los partidores (Nardi et al., 2020). Todas las amplificaciones se realizaron en triplicado e incluyeron un negativo en triplicado con agua ultrapura para PCR.

3.5.3 Curva estándar

Para determinar la eficacia de los partidores y cuantificar las concentraciones de ADN en las muestras ambientales, se realizó una curva estándar a partir de una dilución seriada de 6 puntos, realizada en un ratio 1:4 a partir de las extracciones de ADN de tejido de *Geotria australis* obtenida del río Lia cuyas concentraciones en ng/μL fueron 2.5×10^{-1} , 6.25×10^{-2} , 1.52×10^{-2} , 3.9×10^{-3} , 9.77×10^{-4} . Los estándares se amplificaron en triplicado y la reacción se hizo en conjunto a las muestras ambientales (Nardi et al., 2020; Piggott et al., 2021).

3.6. Bioinformática y análisis estadísticos

El manejo de datos, cálculos y generación de gráficos se realizaron en el lenguaje de programación R versión 4.4.1 (2024-06-14 ucrt) (R Core Team, 2024) junto al visualizador de código RStudio (RStudio Team, 2020). Para evaluar la correlación estadística entre la abundancia relativa de *Geotria australis* medida con captura (CPUE) y concentración de ADN ambiental (ng/μL), se midió una correlación de Pearson comparando solo aquellos puntos en donde ambos métodos hayan detectado presencia para determinar el grado de asociación entre las variables. Finalmente se graficó un scatterplot para visualizar los resultados de abundancia relativa y la amplificación.

La curva estándar y visualización de los resultados de amplificación se hicieron mediante el software BioRad CFX Manager™ 2.1. Finalmente, el mapa de las áreas de muestreo fue elaborado mediante el Software QGIS 3.34.

4. Resultados

4.1. Captura y CPUE

A lo largo de cada estación de muestreo estudiada dentro del río Lia, se encontró una variedad de hábitats disponibles: el lecho mayormente rocoso, troncos caídos, pozones y tramos bien protegidos por la sombra generada por los árboles que recorren el curso del agua. En casos particulares, como en la estación P1, destacaba la alteración del sustrato, presumiblemente por la previa construcción del puente Lia, y en la estación P2, el sustrato mostraba signos de ser alterado posiblemente para la recreación y actividades de camping.

En el río Lia se capturó un total de 129 individuos, los cuales pertenecían a al menos a 7 especies distintas (Figura 1; Anexo 2). La mayor abundancia individual en casi todos los puntos de muestreo fue de *Geotria australis*, especie observada en cada estación de muestreo del río. También individuos de *Nematogenys inermis*, que presentaron el mayor tamaño de todos y también se destaca la aparición de individuos del género *Diplomystes*. El resto de los individuos de Trichomycteridae podrían haber correspondido a individuos de *Trichomycterus areolatus* o estadios tempranos de otras especies, sin embargo, la identificación de especies no fue el fuerte de este estudio. Otro género presente en cada estación de muestreo en el río fue *Percilia*. Solo un 5.42% de los individuos capturados en el río Lia pertenecen a especies

exóticas, específicamente trucha café *Salmo trutta* y trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*.

Con respecto a las lampreas, un total de 75 individuos de *Geotria australis* fueron capturados, siendo la estación P3 la cual tuvo mayor abundancia relativa. De todos los individuos capturados, sólo se observó lampreas en estado de desarrollo larval y metamórficos (Anexo 3).

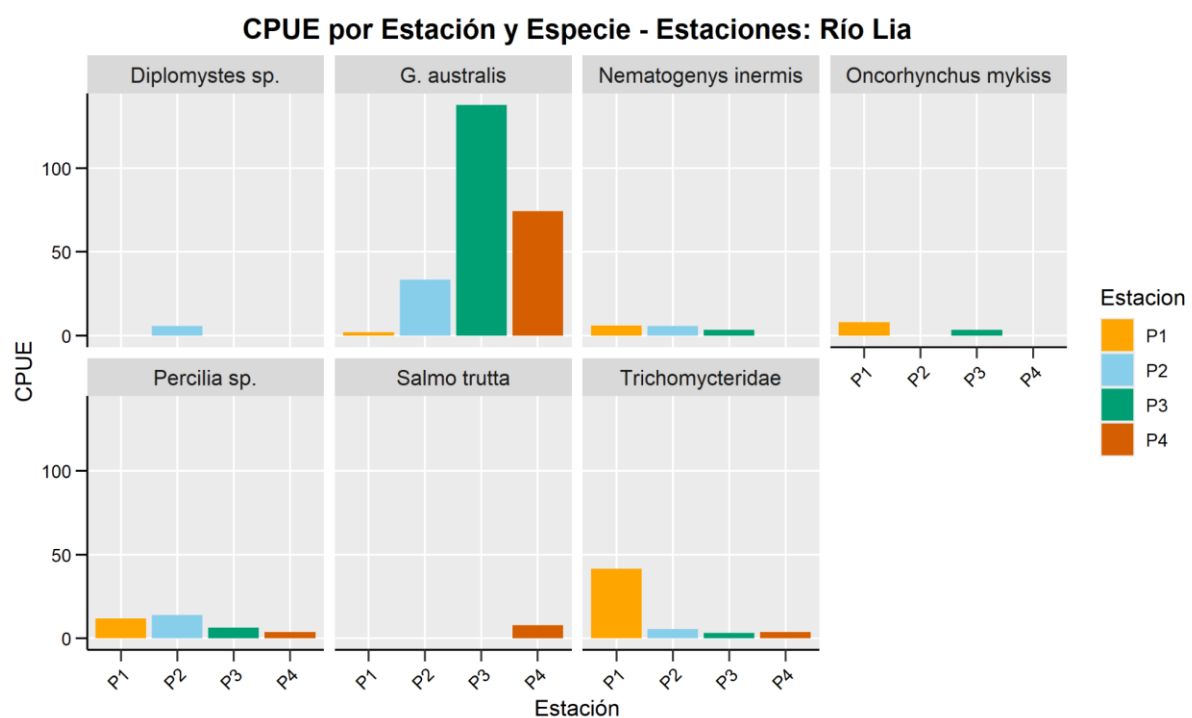


Figura 2. Captura por unidad de esfuerzo (Número de individuos / hora) para cada especie en las estaciones de muestreo ubicadas en el río Lia.

En las estaciones del río Andalién, se capturó un total de 33 individuos, pertenecientes a alrededor de 7 especies (Figura 2; Anexo 2). La estación P5 tuvo la mayor diversidad con 5 especies, entre ellas, un único individuo de *Geotria australis* en estado larval, mientras que en la estación P6 solo se encontraron 2, ninguna de las especies presentes en una estación apareció en la otra.

Si bien se trató de zonas potamales, hubo precipitaciones el día previo a la pesca, lo que aumentó la velocidad de corriente y el caudal. Esto causó que, al aumentar el ancho del río, en la estación P6, gran parte del sustrato vadeable fuera la vegetación de las orillas del río, hábitat en donde se encontró la totalidad de individuos en dicha estación.

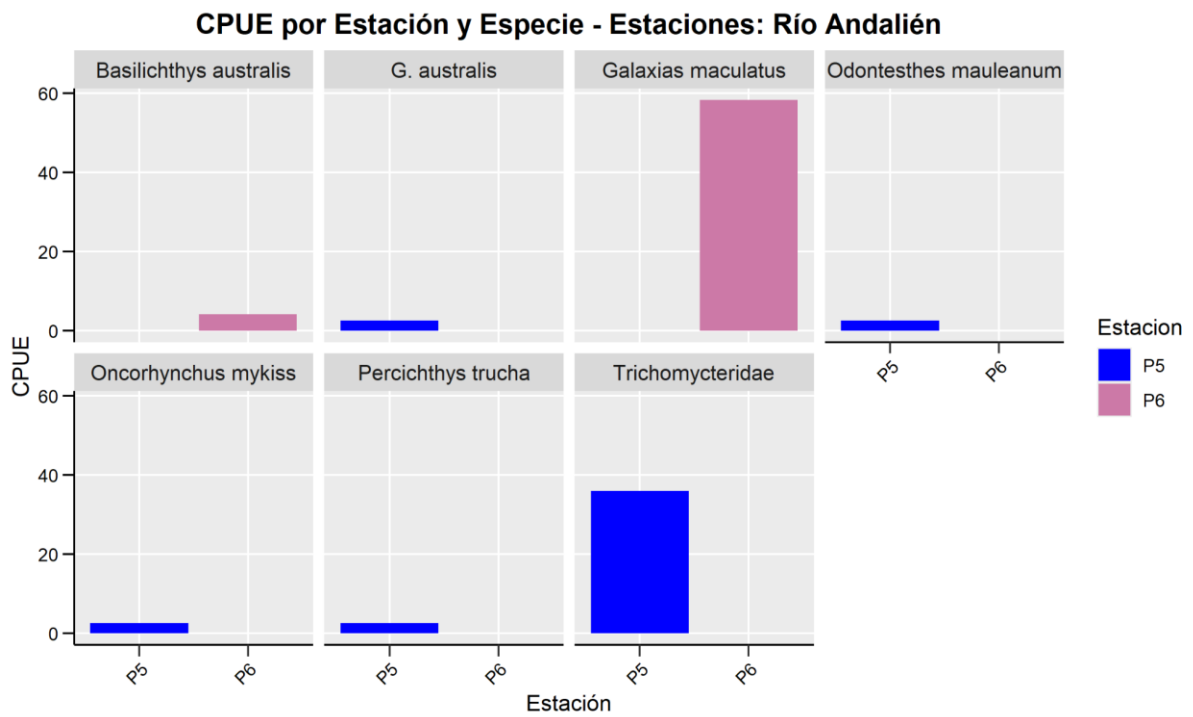


Figura 3. Captura por unidad de esfuerzo (Número de individuos / hora) para cada especie en las estaciones de muestreo ubicadas en el río Andalién.

4.2. Validación de partidores y diseño de sonda

Se estimó la especificidad de los partidores diseñados por Nardi, et al. (2020) mediante una validación in silico con “Primer-BLAST”. El set de partidores para cyt b, mostró alineaciones en “Primer-BLAST” con las especies exóticas *Salmo trutta*, *Carassius carassius* y *Cyprinus carpio* además de las especies nativas *Mugil cephalus* y *Eleginops maclovinus*. En contraste, el par de partidores dirigidos a COI no mostró posibles productos con las especies esperadas en el área, por lo tanto, fueron los seleccionados para el diseño experimental.

En la validación con PCR convencional, hubo amplificación exclusivamente en las muestras de ADN correspondientes a *Geotria australis* del río Lia y el espécimen de Puerto Cisnes. No hubo señales de productos no esperados en ninguna de las otras especies probadas y ni signos de contaminación a partir de 60°C como temperatura de hibridación.

Se diseñaron con la herramienta PrimerQuest™ varias sondas posibles; sin embargo, la elegida fue AGTGCGGTTTCCTACTATTCCTGCTC. La sonda va en antisentido, tuvo una longitud de 25 bp, una T_m de 67°C y un GC% de 52.

Mediante “BLAST” se obtuvo un 100% de alineamiento únicamente con *Geotria australis* (Secuencia de referencia NC_029404.1, genoma mitocondrial completo) (Ren et al., 2016). La sonda fue solicitada a IDT con las siguientes características: PrimeTime® Eco Probe 5' 6-FAM/ZEN/3' IBFQ y la secuencia final fue /56-FAM/AG TGC GGT T/ZEN/C CTA CTA TTC CTG CTC /3IABkFQ/ con T_m 60.1°C.

4.3. Curva estándar y qPCR en muestras ambientales

La amplificación de las muestras de ADN ambiental proveniente de filtros se realizó en triplicado. Los filtros correspondientes a las estaciones P1, P2, P3, P4 y P5 tuvieron al menos una amplificación, observándose valores altos de Ct (Cycle threshold, umbral de ciclo) y réplicas que no amplificaron para todas las estaciones, lo que indica una baja concentración de ADN. La excepción fue P4, estación correspondiente al río Lia. Mediante el test de Levene, se obtuvo un valor $p > 0.05$, lo que indica que las varianzas son homogéneas entre las réplicas y no afectan la confiabilidad de los datos.

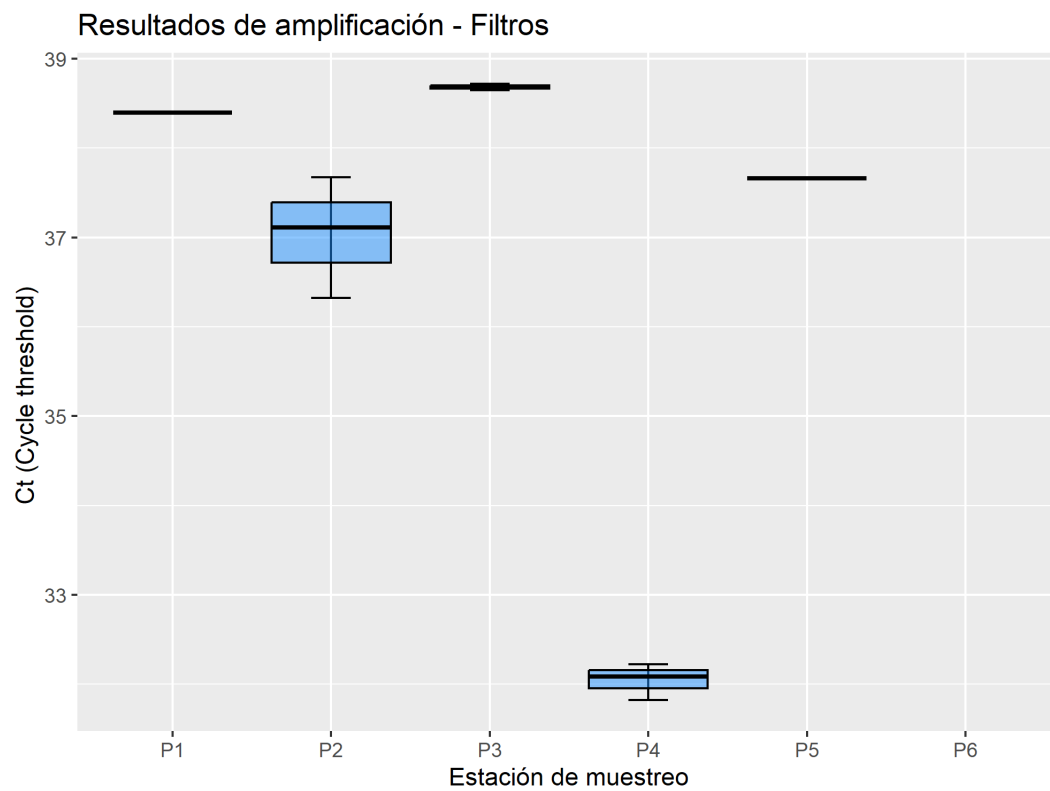


Figura 4. Boxplot con los valores de Ct (Cycle threshold) en el qPCR para la detección de *Geotria australis* en muestras de agua para cada estación de muestreo.

La eficiencia de los partidores para este ensayo medida con la curva estándar, fue de 88.5%, lo que concuerda con lo medido en su publicación de origen (Nardi et al., 2020). Casi todos los filtros que amplificaron, estuvieron fuera del rango de la dilución seriada excepto por P4 (Figura 4).

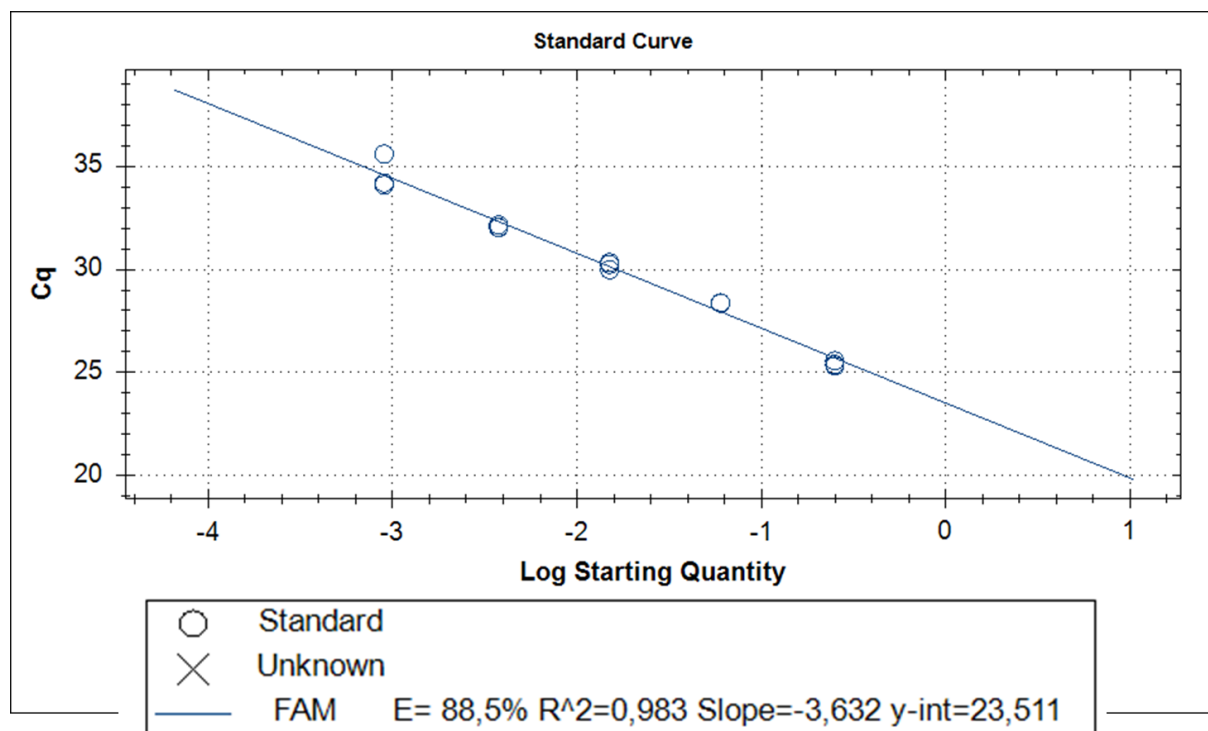


Figura 5. Curva estándar de 5 puntos realizada a partir de una dilución seriada con ADN extraído de tejido de *Geotria australis*. Gráfico obtenido con BioRad CFX Manager 2.1

4.6. Análisis estadístico

Con el análisis bioinformático se midió un coeficiente de correlación entre la abundancia relativa medida en captura por unidad de esfuerzo (CPUE) y dos variables obtenidas del ensayo con ADN ambiental, la concentración de ADN ambiental específica de *Geotria australis* así como el valor de Ct para cada muestra ambiental. En el caso de la concentración de ADN ambiental, el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.1810254 ($R^2 = 0.03277$, p-value = 0.61679), lo que indica una relación débil (Figura 5). Por otro lado, con los valores de Ct, el coeficiente de correlación de Pearson fue de -0.05414981 ($R^2 = 0.00293$ p-value = 0.88189), lo que prácticamente indica una relación nula entre las variables (Figura 6).

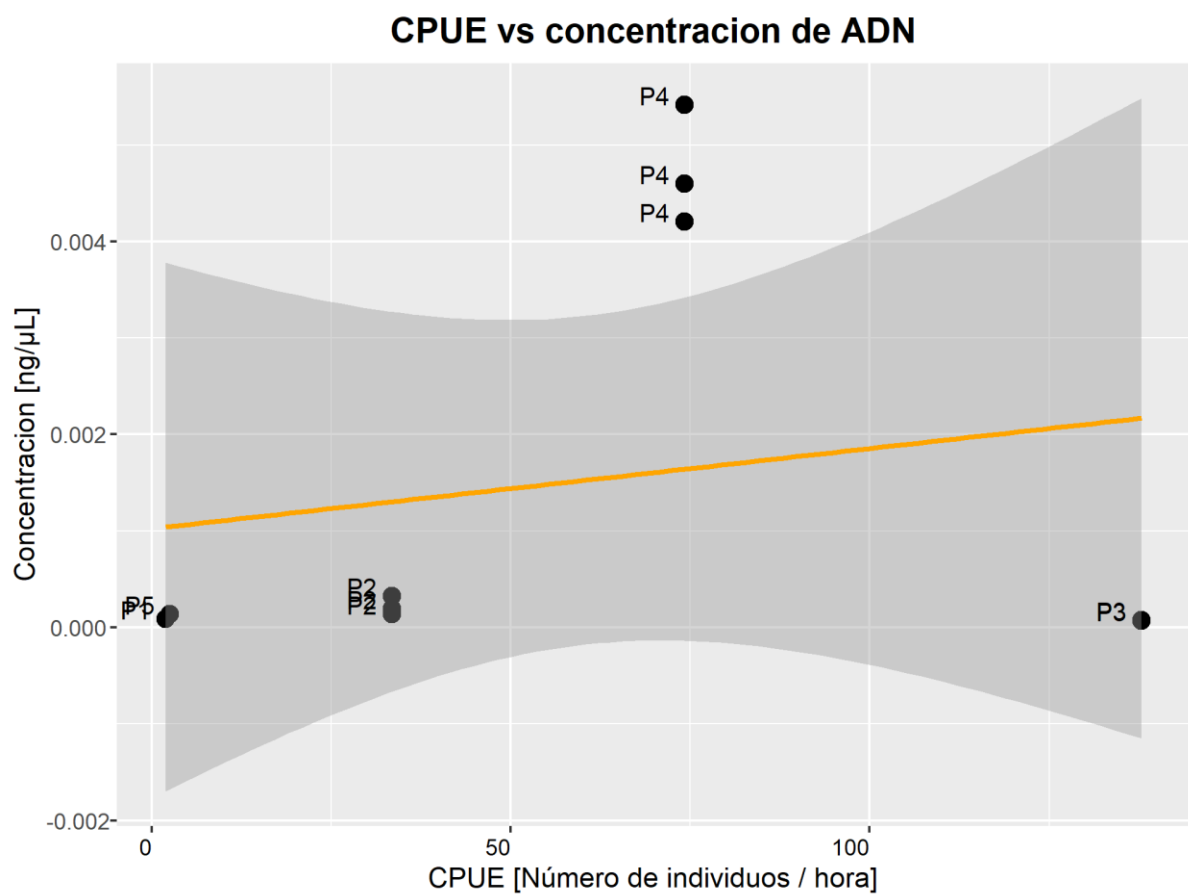


Figura 6. Scatterplot para visualizar la relación entre las variables CPUE y concentración de ADN ambiental ($R^2 = 0.03277$).

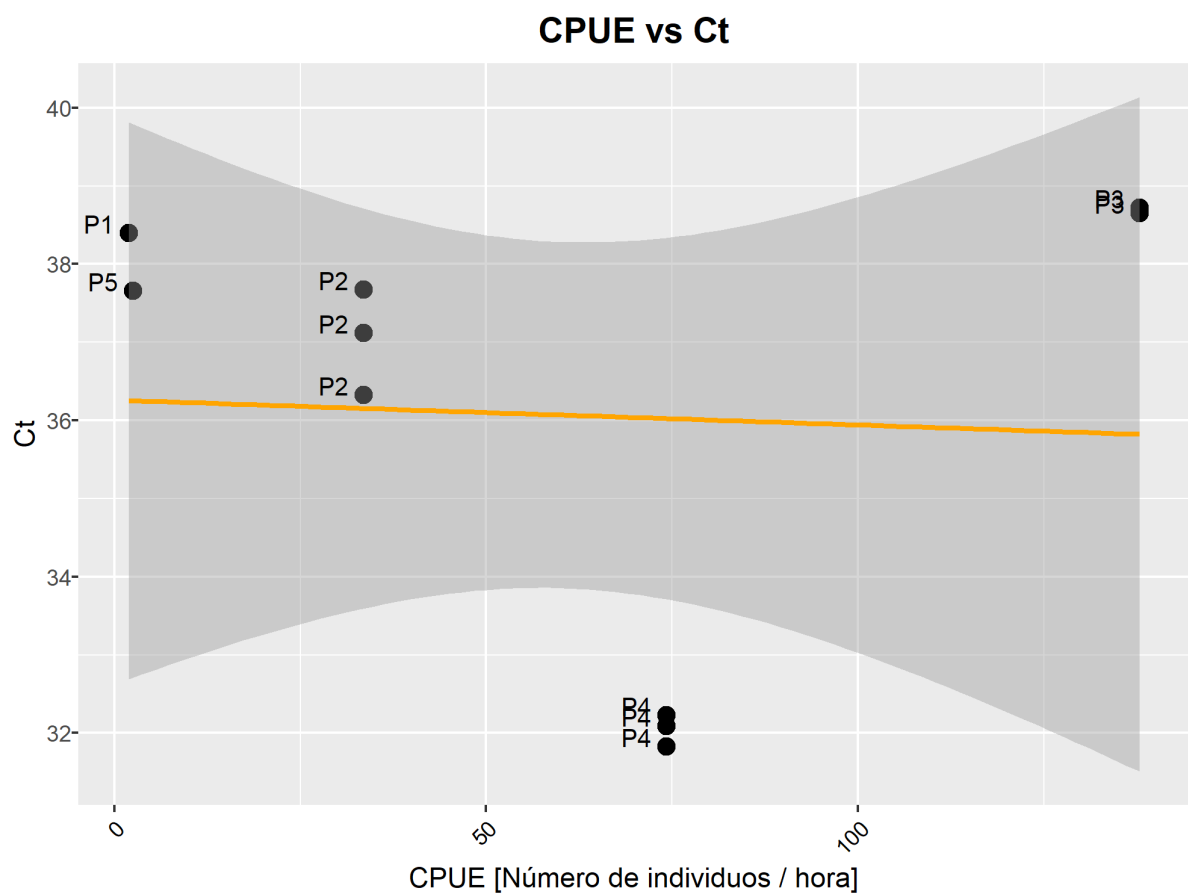


Figura 7. Scatterplot para visualizar la relación entre las variables CPUE y Ct (cycle threshold) ($R^2 = 0.00293$).

5. Discusión

El presente estudio aplicó dos metodologías para monitorear especies de agua dulce en dos cuencas hidrográficas de la región del Biobío. Una metodología de captura, mediante pesca eléctrica, para medir la riqueza y abundancia relativa de los individuos en las estaciones de muestreo, y una metodología molecular, que empieza con la recolección de muestras ambientales de agua a un ensayo cuantitativo basado en PCR en tiempo real para detectar una especie en específico, la lamprea de bolsa. El objetivo fue comparar ambas metodologías, para evaluar si los ensayos moleculares con ADN ambiental pueden brindar información acerca de la presencia, distribución y tamaño relativo de población de una especie como *Geotria australis*.

La captura con pesca eléctrica resultó ser un método eficaz para capturar individuos de lampreas y el río Lia mostró ser una excelente área para estudiar especies nativas dado su alto nivel de endemismo. Por su parte, el diseño experimental con ADN ambiental logró mostrar la presencia de individuos en cada una de las estaciones de muestreo en donde fueron capturadas, no obstante, la correlación entre la abundancia relativa de la población y la concentración de ADN ambiental medida en las muestras de agua no fue significativa.

5.1. Análisis de terreno y captura de individuos

En terreno, la pesca tomó en cuenta el vadeo de toda la envergadura de los tramos de río en cada estación de muestreo, visitando cada hábitat en el tramo sin discriminar, pues se buscó caracterizar la riqueza de especies en cada estación. Dicho esto, las lampreas en el río Lia (P1, P2, P3, P4), aparecieron principalmente en las orillas y los hábitats concuerdan con lo documentado para los estadios larvales de las lampreas y se podrían describir bajo las clasificaciones “Tipo I”, arena fina con material orgánico fino, en donde se encuentra la mayor densidad larval, “Tipo II”, arena mezclada con grava con menor densidad larval y “Tipo III” todo sustrato en donde la larva no pueda excavar y que por lo tanto, no se encuentren individuos (Dawson et al., 2015; Slade et al., 2003).

En el caso del río Andalién (P5), la única lamprea observada se encontraba en una franja media, con una mayor elevación con respecto a las orillas en ese tramo de río, el sustrato se podría definir como “Tipo II” y la velocidad de corriente no era mayor a 0.2 m/s. La presencia de un individuo de *Geotria australis* en la estación P5 contrasta con lo discutido por Moraga et al., (2022) quien sugiere la remoción de las lampreas en la cuenca además de la presencia de un individuo de *Odontesthes mauleanum*, especies la cual establecen que no tenía capturas históricas desde 2007.

No hubo captura de adultos o juveniles de *Geotria australis* en las estaciones de muestreo, sin embargo, dada la abundancia de larvas y metamórficos de la especie en el área, se maneja la posibilidad de que río arriba, si existen zonas de rápidos, cuyo sustrato sea mayormente bolones de roca, puedan existir áreas de anidamiento para adultos (Baker et al., 2017). Un avistamiento de un adulto de la especie, posiblemente ya desovado, se hizo en el río Lia entre las estaciones de muestreo P3 y P4, cuya aparición reportada a través de un video online (lalo fishing Chile, 2022).

Las lampreas no eran visibles previo a la inducción de corriente al agua y en muchos casos fue necesario enterrar las redes de inmersión al sedimento para capturar los individuos que reaccionaron a la corriente eléctrica. Este estudio no consideró la probabilidad de captura de lampreas mediante pesca eléctrica, que en estadios larvales puede variar entre 13% a 82% y depende de tantas variables como las características del curso de agua, variables ambientales, la conductividad del sustrato y la experiencia de los operarios (Clemens et al., 2022). Es por eso que también es necesario establecer el sesgo de capturabilidad de las lampreas capturadas, así como en los otros individuos de menor tamaño en los terrenos de este trabajo. Hubo un sesgo importante en las estaciones P1 y P2 debido a las redes de inmersión usadas en dichas estaciones de muestreo. Dado el ancho de red de 20mm y el reducido ancho de las lampreas, eventualmente se volvió difícil mantener los individuos en la red, que podían escapar antes de ser trasladadas a un balde. Esto se corrigió eventualmente en las siguientes estaciones de muestreo con las redes de inmersión

con un ancho de malla $< 5\text{mm}$, lo que evitó el escape de las lampreas capturadas y además permitió la captura de individuos más pequeños en las siguientes estaciones, como lo fueron los individuos la familia Trichomycteridae en la estación P5 y los individuos de *Galaxias maculatus* en la estación P6 cuya captura no hubiera sido posible con las redes anteriores. Cabe destacar que la maniobrabilidad de estas redes era muy baja, lo que aumentó la dificultad de movimiento a los operarios, lo cual también pudo haber significado un sesgo de capturabilidad en individuos de otras especies con una mayor velocidad de escape.

La elevada abundancia de individuos de *Geotria australis* encontrada en el río Lia difiere en gran medida la abundancia relativa promedio comunicada en la ficha de antecedentes de la especie (MMA). Lo que también es importante dado el estado de conservación “insuficiente de información” de la especie. El alto porcentaje de especies nativas y endémicas en el río Lia, fortalece la idea de los ríos tributarios como santuarios de biodiversidad (Soria et al., 2019). Esto también aplica como un llamado de atención a la conservación de estos espacios que, al encontrarse usados para actividades de camping, parece ser común las alteraciones de los sustratos para fomentar el turismo y la pesca recreativa en la zona.

5.2. Validación de partidores y diseño de sonda

Este diseño experimental no contempló el uso de este par de partidores para el monitoreo de la especie en todo su rango de distribución en el país. Primer-BLAST no mostró posibles alineaciones con ninguna otra entrada en la base de datos sesgada a la lista de especies de la cordillera de la costa ni tampoco cuando se utilizaba la base de datos global de “Nucleotide”. Sin embargo, dado que se trabaja con un par de partidores específicos, para estandarizar el uso de este marcador genético como herramienta para detectar la especie en otras cuencas, es necesaria la validación In vitro con material genético de las especies esperadas en las zonas en donde se quiera utilizar (Langlois et al., 2021).

Los partidores funcionaron excelentes con muestras de tejido y muestran una buena amplificación en algunas de las muestras ambientales. Sumar una sonda al diseño experimental contribuyó enormemente a aumentar la especificidad del ensayo para el estudio de especies raras (Xia et al., 2021). No obstante, en este caso específico, la curva estándar fue realizada a partir de una dilución seriada de ADN total extraído de una muestra de tejido y cuantificado mediante espectrofotómetro. El uso de ADN total para cuantificar una concentración y no un número de copias cuando se trabaja con un amplicón específico, tan pequeño y proveniente de ADN mitocondrial, también es un sesgo importante a considerar. En una muestra de tejido, la proporción de ADN mitocondrial y nuclear puede variar en gran medida, por lo que calcular la

concentración de ADN en muestras ambientales y el límite de detección de los partidores a partir de muestras de tejido se vuelve un reto (Langlois et al., 2021).

5.3. Detección de *Geotria australis* en muestras ambientales

Como se observó en los resultados de amplificación, en cada sitio en que se encontró *Geotria australis*, hubo al menos una amplificación en el ensayo de PCR en tiempo real. Todos los filtros positivos quedaron fuera del rango de la curva de calibración excepto por P4. Se intentó calcular el límite de detección del diseño experimental utilizando la calculadora propuesta por Klymus et al., (2020) pero al emplear la calculadora en R, se estimó que no fue posible medir el límite de detección del ensayo, debido a que es menor a la menor concentración de la dilución seriada en la curva de calibración, lo que significa que no fue posible determinar con más precisión la presencia de falsos positivos.

Dado que los individuos larvales y metamórficos de lampreas mantienen varios años de su desarrollo en sedimento y que no se observaron adultos en el sistema, la baja concentración de ADN en las muestras podría explicarse en que solo un porcentaje reducido de material biológico de los individuos residiendo en sedimento termine finalmente en la columna de agua. En cuanto al filtro correspondiente a la estación P4, la alta concentración de las muestras podría deberse al transporte y acumulación

del material genético bajo corriente, pero tampoco se observa una tendencia notable de aumento de concentración hacia las estaciones río abajo.

Schloesser et al., (2018) realizó un estudio de correlación entre ADN ambiental y densidad de individuos para la lamprea de mar (Sea lamprey, *Petromyzon marinus*) en laboratorio, con individuos en varios estados de desarrollo, densidades de organismos volúmenes y parámetros ambientales determinados. Encontró una correlación significativa con la concentración y la densidad solo en lampreas adultas. La concentración en las muestras de agua de los tanques con larvas no mostró correlación significativa, y las amplificaciones estuvieron cerca al límite de detección de su ensayo. En dicho estudio también se establece que dicho comportamiento pudo deberse principalmente a la tendencia de las larvas de mantenerse únicamente en sedimento, siendo fecas la fuente principal de material genético, siendo incierta la cantidad que finalmente se resuspende al agua.

La estimación de abundancia de especies a partir de muestras ambientales es un tópico controversial. En terreno, la cantidad de material genético en la matriz dependerá de las condiciones ambientales, temperatura y sucesos biológicos como el desove lo que podría dar correlaciones más claras, dada la presencia de adultos (Bracken et al., 2019; Tsuji & Shibata, 2021) así como la vida media del ADN en la matriz ambiental (Baltazar-Soares et al., 2022; Turner et al., 2015). Tampoco se

consideró la presencia de inhibidores de la reacción PCR debido al master mix utilizado para las amplificaciones (Piggott et al., 2021; Uchii et al., 2019).

La correlación de Pearson entre la CPUE de lampreas medida con pesca eléctrica y la concentración de ADN ambiental en las muestras ambientales muestra que no hubo una correlación significativa. La cantidad de eDNA medida desde muestras ambientales no se ajustan a la abundancia relativa medida en terreno y las muestras que menos se ajustan son las correspondientes a la estación P3, que tuvo la abundancia relativa más alta de todas, pero la concentración más baja, mientras que la estación P4 tuvo una concentración muy alta. El tamaño muestral de este trabajo fue pequeño, por lo que sus implicaciones son limitadas. En síntesis, dados los resultados del análisis cuantitativo basado en PCR en tiempo real, la hipótesis planteada para este estudio es rechazada. Pese a ello, el uso de ADN ambiental como metodología de monitoreo en especies raras y/o deficientes de información, aún tiene camino por recorrer y existen muchas oportunidades y retos para la aplicación y estandarización.

5.4. Oportunidades a futuro

El diseño experimental usado, demostró la capacidad del marcador molecular diseñado por Nardi et al., (2020) en conjunto a la sonda de hidrólisis diseñada en este trabajo para su uso en la detección de *Geotria australis* en muestras de tejido y también detectando en muestras ambientales. Sin embargo, el agua como matriz ambiental en este estudio no mostró los resultados esperados, ya sea por interacciones ambientales o el estado de desarrollo de los organismos. Para eso, se puede recomendar que, para trabajos futuros de monitoreo para esta especie, se sume el sedimento como una matriz ambiental o se filtren mayores volúmenes de agua (>1L), además muestreos a largo plazo para evaluar tendencias temporales (Baltazar-Soares et al., 2022; Bracken et al., 2019).

Validar los partidores y sonda con una dilución seriada más grande y linealizada con DNA sintético o amplicones purificados permitiría, además, la determinación del límite de detección para el ensayo. Aumentar el número de réplicas tanto de recolección ambiental como de amplificación permitiría mejores conclusiones, así como el uso de otras técnicas de PCR como Digital Droplet PCR (Wang et al., 2021). Sin embargo, estas metodologías específicas tienen un costo muy elevado a considerar para el monitoreo de una especie única.

Otras metodologías como *metabarcoding*, permitiría detectar más especies con el mismo tamaño de muestra y permitiría, además, evaluar y trabajar con marcadores genéticos en especies chilenas. Recientemente, Lefiqueo, (s. f.) utilizó *metabarcoding*, qPCR y pesca eléctrica para evaluar la riqueza y abundancia de peces en el estero Nonguén, tributario de la cuenca del río Andalién. Sus resultados indican una correlación no significativa entre la abundancia de peces medida con depleción y los resultados de los métodos moleculares, lecturas de secuencias únicas medidas con *metabarcoding* y concentración de ADN medida con qPCR. Sin embargo, el metabarcoding detectó secuencias correspondientes a *Geotria australis* en el área alta del estero Nonguén tanto en muestras de agua como sedimento, área en donde no fue capturada ni tampoco tiene capturas históricas y podría indicar la presencia de individuos de *Geotria australis* en la zona que eludieron la captura (Lefiqueo, s. f.).

Dada la experiencia de este trabajo y lo descrito en literatura, si lo que se requiere es evaluar los individuos larvales de lampreas, también existen otros métodos aparte de la pesca eléctrica detallados por Clemens et al., (2022) Otras metodologías para capturar lampreas o la adicción de métodos de depleción podrán ayudar a medir índices de abundancia más detallados (Lefiqueo, s. f.)

6. Conclusiones

El diseño experimental empleado en este estudio encontró que la correlación entre la abundancia relativa de *Geotria australis* en un ecosistema con abundancia de individuos larvales y metamórficos y la concentración de ADN de la especie en muestras ambientales no fue significativa. Para llegar a ello, se evaluó la viabilidad del uso de set de partidores específicos para una especie nativa chilena en dos cuencas de la región del Biobío. Además de diseñar y validar una sonda de hidrólisis (FAM) específica para los partidores.

El ensayo podría servir para detectar la presencia de la especie, sin embargo, el diseño experimental toma muchos supuestos y libertades que limitan sus implicaciones. Entender las limitaciones de este estudio permite visualizar las oportunidades y retos para futuras investigaciones que quieran aplicar diseños experimentales similares y dar los primeros pasos a la estandarización de métodos moleculares para monitorizar *Geotria australis* dentro de su rango de distribución en Chile.

Referencias

- Baker, C., & Bice, C. (2021). IUCN Red List of Threatened Species: *Geotria australis*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Baker, C. F., Jellyman, D. J., Reeve, K., Crow, S., Stewart, M., Buchinger, T., & Li, W. (2017). First observations of spawning nests in the pouched lamprey (*Geotria australis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 74(10), 1603–1611. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0292>
- Baltazar-Soares, M., Pinder, A. C., Harrison, A. J., Oliver, W., Picken, J., Britton, J. R., & Andreou, D. (2022). A noninvasive eDNA tool for detecting sea lamprey larvae in river sediments: Analytical validation and field testing in a low-abundance ecosystem. *Journal of Fish Biology*, 100(6), 1455–1463. <https://doi.org/10.1111/jfb.15056>
- Bracken, F. S. A., Rooney, S. M., Kelly-Quinn, M., King, J. J., & Carlsson, J. (2019a). Identifying spawning sites and other critical habitat in lotic systems using eDNA “snapshots”: A case study using the sea lamprey *Petromyzon marinus* L. *Ecology and Evolution*, 9(1), 553–567. <https://doi.org/10.1002/ece3.4777>
- Bracken, F. S. A., Rooney, S. M., Kelly-Quinn, M., King, J. J., & Carlsson, J. (2019b). Identifying spawning sites and other critical habitat in lotic systems using eDNA “snapshots”: A case study using the sea lamprey *Petromyzon marinus* L. *Ecology and Evolution*, 9(1), 553–567. <https://doi.org/10.1002/ece3.4777>
- Cantera, I., Decotte, J.-B., Dejean, T., Muriénne, J., Vigouroux, R., Valentini, A., & Brosse, S. (2022). Characterizing the spatial signal of environmental DNA in river systems using a community ecology approach. *Molecular Ecology Resources*, 22(4), 1274–1283. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13544>
- Caza-Allard, I., Laporte, M., Côté, G., April, J., & Bernatchez, L. (2022). Effect of biotic and abiotic factors on the production and degradation of fish environmental DNA: An experimental evaluation. *Environmental DNA*, 4(2), 453–468. <https://doi.org/10.1002/edn3.266>
- Clemens, B. (2019). A Call for Standard Terminology for Lamprey Life Stages. *Fisheries*, 44. <https://doi.org/10.1002/fsh.10227>
- Clemens, B. J., Arakawa, H., Baker, C., Coghlan, S., Kucheryavyy, A., Lampman, R., Lança, M. J., Mateus, C. S., Miller, A., Nazari, H., Pequeño, G., Sutton, T.

- M., & Yanai, S. (2021). Management of anadromous lampreys: Common threats, different approaches. *Journal of Great Lakes Research*, 47, S129–S146. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.09.005>
- Clemens, B. J., Harris, J. E., Starcevich, S. J., Evans, T. M., Skalicky, J. J., Neave, F., & Lampman, R. T. (2022). Sampling Methods and Survey Designs for Larval Lampreys. *North American Journal of Fisheries Management*, 42(2), 455–474. <https://doi.org/10.1002/nafm.10762>
- Colin, N. (2021). IUCN Red List of Threatened Species: *Mordacia lapicida*. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>
- Dawson, H., Quintella, B., Almeida, P., Treble, A., & Jolley, J. (2015). The Ecology of Larval and Metamorphosing Lampreys. *Lampreys: Biology, Conservation and Control*, 1, 75–137. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9306-3_3
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81(2), 163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Elosegui, A. (2009). *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. Fundacion BBVA.
- Estragues Núñez, R. C. (2018). *Caracterización de la riqueza íctica en ecosistemas lacustres y fluviales de Chile comparando metabarcoding de ADN ambiental (eDNA) con un método tradicional de captura*. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/159290>
- Evans, N. T., & Lamberti, G. A. (2018). Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool. *Fisheries Research*, 197, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.09.013>
- Fondo de Investigación Pesquera y Acuicultura & Centro de Ecología Aplicada. (2016). *Guía metodológica y protocolos de muestreo de flora y fauna acuática en aguas continentales de Chile—FIPA. SUBPESCA. Fondo de Investigación Pesquera y de Acuicultura*. <https://www.subpesca.cl/fipa/613/w3-article-95814.html>
- Habit, E., Belk, M., Victoriano, P., & Castillo, E. (2007). Spatio-temporal distribution patterns and conservation of fish assemblages in a Chilean coastal river. *Biodiversity and Conservation*, 16, 3179–3191. <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9171-9>

- Habit, E., Dyer, B., & Vila, I. (2006). Estado de conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. *Gayana (Concepción)*, 70(1), 100–113. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382006000100016>
- Habit, E., Górski, K., Alò, D., Ascencio, E., Astorga, A., Colin, N., Contador, T., De Los Ríos-Escalante, P., Delgado, V., Dorador, C., Fierro, P., García, K., Parra, O., Quezada-Romegialli, C., Reid, B., Rivera, P., Azat, C., Valdovinos, C., Vera-Escalona, I., & Woelfl, S. (2019). *Biodiversidad de ecosistemas de agua dulce*.
- Habit, E., Górski, K., Vila, I., Manosalva, A., Díaz, G., Toledo, B., Rojas, P., & Zurita, A. (2024). Efectos de las presiones antrópicas sobre la fauna nativa de peces y lampreas de Chile. *Gayana*, 88(1), Article 1.
- Habit, E., & Victoriano, P. (2005). *Peces de agua dulce de la Cordillera de la Costa*. https://www.travelchiloe.com/sites/default/files/content/peces_de_agua_dulce_cordillera_de_costa.pdf
- OligoAnalyzer™ program, IDT, Coralville, Iowa, USA. <https://www.idtdna.com/SciTools>.
- PrimerQuest™ program, IDT, Coralville, Iowa, USA. <https://www.idtdna.com/SciTools>.
- Kamoroff, C., & Goldberg, C. S. (2018). Environmental DNA quantification in a spatial and temporal context: A case study examining the removal of brook trout from a high alpine basin. *Limnology*, 19(3), 335–342. <https://doi.org/10.1007/s10201-018-0551-5>
- Kawato, M., Yoshida, T., Miya, M., Tsuchida, S., Nagano, Y., Nomura, M., Yabuki, A., Fujiwara, Y., & Fujikura, K. (2021). Optimization of environmental DNA extraction and amplification methods for metabarcoding of deep-sea fish. *MethodsX*, 8, 101238. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101238>
- Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E., Jackson, C. A., Lance, R. F., Mangan, A. M., Monroe, E. M., Piaggio, A. J., Stokdyk, J. P., Wilson, C. C., & Richter, C. A. (2020). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2(3), 271–282. <https://doi.org/10.1002/edn3.29>
- Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., & Bernatchez, L. (2016). Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: Variability among

- capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 16(6), 1401–1414. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12522>
- Ialo fishing chile (Director). (2022, febrero 23). *Río lía Santa juana truchas Grande y pequeñas y un MONSTRUO de Río (Iambrea)* [Video recording]. <https://www.youtube.com/watch?v=6efZ16KBF6w>
- Langlois, V. S., Allison, M. J., Bergman, L. C., To, T. A., & Helbing, C. C. (2021). The need for robust qPCR-based eDNA detection assays in environmental monitoring and species inventories. *Environmental DNA*, 3(3), 519–527. <https://doi.org/10.1002/edn3.164>
- Lefiqueo, V. (s. f.). Estimación de abundancia de ensambles de peces de agua dulce mediante métodos de pesca y ADN ambiental.
- Litts, R., Clemens, B. J., Vonderohe, G., & Schaefer, J. (2023). Backpack electrofishing can be used to collect adult lamprey. *North American Journal of Fisheries Management*, 43(6), 1623–1630. <https://doi.org/10.1002/nafm.10900>
- Lobao-Tello, P. R., Vazquez, M., & Hüne, M. (2014). *La relación del Filoko o “Lamprea de Bolsa” (Geotria australis) con la comunidad Mapuche de Gorbea, sur de Chile; una mirada desde la Antropología y la Biología Marina.*
- Lucas, M. C., Hume, J. B., Almeida, P. R., Aronsuu, K., Habit, E., Silva, S., Wang, C. J., & Zampatti, B. (2021). Emerging conservation initiatives for lampreys: Research challenges and opportunities. *Journal of Great Lakes Research*, 47, S690–S703. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2020.06.004>
- Lundberg, J. G., Kottelat, M., Smith, G. R., Stiassny, M. L. J., & Gill, A. C. (2000). So Many Fishes, So Little Time: An Overview of Recent Ichthyological Discovery in Continental Waters. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 87(1), 26–62. <https://doi.org/10.2307/2666207>
- Lynch, T. F. (2023). *Comparing qPCR and eDNA-metabarcoding for detection of elusive lampreys.* https://www.duo.uio.no/bitstream/handle/10852/102361/MC_Lynch.pdf?sequence=14
- McColl-Gausden, E. F., Weeks, A. R., Coleman, R., Song, S., & Tingley, R. (2023). Using hierarchical models to compare the sensitivity of metabarcoding and qPCR for eDNA detection. *Ecological Informatics*, 75, 102072. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2023.102072>

- Miller, A. K., Baker, C., Kitson, J. C., Yick, J. L., Manquel, P. E. I., Alexander, A., & Gemmell, N. J. (2021). The Southern Hemisphere lampreys (Geotriidae and Mordaciidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 31(2), 201–232. <https://doi.org/10.1007/s11160-021-09639-x>
- Miller, A. K., Timoshevskaya, N., Smith, J. J., Gillum, J., Sharif, S., Clarke, S., Baker, C., Kitson, J., Gemmell, N. J., & Alexander, A. (2022). Population Genomics of New Zealand Pouched Lamprey (kanakana; piharau; *Geotria australis*). *Journal of Heredity*, 113(4), 380–397. <https://doi.org/10.1093/jhered/esac014>
- Ministerio del Medio Ambiente, *FICHA DE ANTECEDENTES DE ESPECIE - Geotria australis*.
- Ministerio del Medio Ambiente. (2004). *Informe “Cuenca del Rio Andalién”*. <https://mma.gob.cl/wp-content/uploads/2017/12/Andalien.pdf>
- Ministerio del Medio Ambiente. (2024a). *Listado de Especies Clasificadas desde el 1º al 19º Proceso de Clasificación RCE (actualizado a mayo de 2024)* [Dataset]. https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2024/05/NominaDeEspecies_SegunEstadoConservacion-Chile_actualizado_19noProcesoRCE_rev06mayo2024.xlsx
- Ministerio del Medio Ambiente, S. D. I. Y. M. D. B. (2024b). *Región “Biobío”* [Dataset]. <https://simbio.mma.gob.cl/DPA/VistaImpresionRegion/10>
- MMA–ONU Medio Ambiente. (2022). *Guía de monitoreo de humedales*. <https://gefhumedales.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2022/08/Guia-Monitoreo-de-humedales-03-05-24.pdf>
- Moraga, D., Vivancos, A., Ruiz, V. H., Rojas, O., Díaz, G., Manosalva, A., Vega, P., & Habit, E. (2022). A century of anthropogenic river alterations in a highly diverse river coastal basin: Effects on fish assemblages. *Frontiers in Environmental Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.943586>
- Nakao, R., Inui, R., Akamatsu, Y., Goto, M., Doi, H., & Matsuoka, S. (2021). Illumina iSeq 100 and MiSeq exhibit similar performance in freshwater fish environmental DNA metabarcoding. *Scientific Reports*, 11(1), 15763. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95360-5>
- Nardi, C. F., Sánchez, J., Fernández, D. A., Casalnuovo, M. Á., Rojo, J. H., & Chalde, T. (2020). Detection of lamprey in Southernmost South America by environmental DNA (eDNA) and molecular evidence for a new species. *Polar Biology*, 43(4), 369–383. <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02640-3>

National Center for Biotechnology Information. (s. f.). *BLAST* [Software]. National Center for Biotechnology Information.

Neira, F. J. (1984). Biomorfología de las lampreas parásitas chilenas *Geotria australis* Gray, 1851 y *Mordacia lapicida* (Gray, 1851). *Gayana Zoología*. <https://archive.org/details/biostor-118317/biostor-118317>

Ortiz-Sandoval, J. J., Ortiz, N., Cifuentes, R., González, J., & Habit, E. (2009). RESPUESTA DE LA COMUNIDAD DE PECES AL DRAGADO DE RIOS COSTEROS DE LA REGION DEL BIOBIO (CHILE). *Gayana (Concepción)*, 73(1), 64–75. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382009000100010>

Piggott, M. P., Banks, S. C., Broadhurst, B. T., Fulton, C. J., & Lintermans, M. (2021). Comparison of traditional and environmental DNA survey methods for detecting rare and abundant freshwater fish. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 31(1), 173–184. <https://doi.org/10.1002/aqc.3474>

Potter, I. C., Hilliard, R. W., & Bird, D. J. (1980). Metamorphosis in the Southern Hemisphere lamprey, *Geotria australis*. *Journal of Zoology*, 190(3), 405–430. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1980.tb01435.x>

QGIS.org. QGIS Geographic Information System. QGIS Association. <http://www.qgis.org>

R Core Team (2024). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Radinger, J., Britton, J. R., Carlson, S. M., Magurran, A. E., Alcaraz-Hernández, J. D., Almodóvar, A., Benejam, L., Fernández-Delgado, C., Nicola, G. G., Oliva-Paterna, F. J., Torralva, M., & García-Berthou, E. (2019). Effective monitoring of freshwater fish. *Fish and Fisheries*, 20(4), 729–747. <https://doi.org/10.1111/faf.12373>

Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., Smol, J. P., Taylor, W. W., Tockner, K., Vermaire, J. C., Dudgeon, D., & Cooke, S. J. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, 94(3), 849–873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>

Ren, J., Pu, J., Buchinger, T., Zhu, X., Baker, C., & Li, W. (2016). The mitogenomes of the pouched lamprey (*Geotria australis*) and least brook

- lamprey (*Lampetra aepyptera*) with phylogenetic considerations. *Mitochondrial DNA. Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(5), 3560–3562. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1074218>
- Rivera, S. F., Vasselon, V., Bouchez, A., & Rimet, F. (2023). eDNA metabarcoding from aquatic biofilms allows studying spatial and temporal fluctuations of fish communities from Lake Geneva. *Environmental DNA*, 5(3), 570–581. <https://doi.org/10.1002/edn3.413>
- Rourke, M. L., Fowler, A. M., Hughes, J. M., Broadhurst, M. K., DiBattista, J. D., Fielder, S., Wilkes Walburn, J., & Furlan, E. M. (2022). Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4(1), 9–33. <https://doi.org/10.1002/edn3.185>
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Ruiz, V. H. (1993). *Ictiofauna del Rio Andalien (Concepción, Chile)*. <https://www.scienceopen.com/document?vid=9e6b6997-70ef-4377-b878-d8d98e3b9133>
- Sard, N. M., Herbst, S. J., Nathan, L., Uhrig, G., Kanefsky, J., Robinson, J. D., & Scribner, K. T. (2019). Comparison of fish detections, community diversity, and relative abundance using environmental DNA metabarcoding and traditional gears. *Environmental DNA*, 1(4), 368–384. <https://doi.org/10.1002/edn3.38>
- Schloesser, N. A., Merkes, C. M., Rees, C. B., Amberg, J., Steeves, T. B., & Docker, M. F. (2018). Correlating sea lamprey density with environmental DNA detections in the lab. *Management of Biological Invasions*, 9(4), 483–495. <https://doi.org/10.3391/mbi.2018.9.4.11>
- Slade, J. W., Adams, J. V., Christie, G. C., Cuddy, D. W., Fodale, M. F., Heinrich, J. W., Quinlan, H. R., Weise, J. G., Weisser, J. W., & Young, R. J. (2003). Techniques and Methods for Estimating Abundance of Larval and Metamorphosed Sea Lampreys in Great Lakes Tributaries, 1995 to 2001. *Journal of Great Lakes Research*, 29, 137–151. [https://doi.org/10.1016/S0380-1330\(03\)70483-3](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(03)70483-3)
- Snyder, D. E. (2003). Invited overview: Conclusions from a review of electrofishing and its harmful effects on fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13(4), 445–453. <https://doi.org/10.1007/s11160-004-1095-9>

- Soria, M., Díaz, M. E., Beltrán, M., & Figueroa, R. (2019). Importancia de la conservación de ríos tributarios de cabecera como fuente de biodiversidad: Río Lía (Santa Juana, región del Biobío, Chile): *Ecosistemas*, 28(3), Article 3. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1797>
- Tsuji, S., & Shibata, N. (2021). Identifying spawning events in fish by observing a spike in environmental DNA concentration after spawning. *Environmental DNA*, 3(1), 190–199. <https://doi.org/10.1002/edn3.153>
- Turner, C. R., Uy, K. L., & Everhart, R. C. (2015). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *BIOLOGICAL CONSERVATION*, 183, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.017>
- Uchii, K., Doi, H., Okahashi, T., Katano, I., Yamanaka, H., Sakata, M. K., & Minamoto, T. (2019). Comparison of inhibition resistance among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA. *Environmental DNA*, 1(4), 359–367. <https://doi.org/10.1002/edn3.37>
- Villagrán, C., Videla, M. A., Villagrán, C., & Videla, M. A. (2018). El mito del origen en la cosmovisión mapuche de la naturaleza: Una reflexión en torno a las imágenes de filu - filoko - piru. *Magallania (Punta Arenas)*, 46(1), 249–266. <https://doi.org/10.4067/S0718-22442018000100249>
- Wang, S., Yan, Z., Hänfling, B., Zheng, X., Wang, P., Fan, J., & Li, J. (2021). Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of The Total Environment*, 755, 142622. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142622>
- WoRMS Editorial Board. (2024). *World Register of Marine Species*. Available from <https://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed yyyy-mm-dd. [Dataset]. VLIZ. <https://doi.org/10.14284/170>
- Wu, L., Yamamoto, Y., Yamaguchi, S., & Minamoto, T. (2022). Spatiotemporal changes in environmental DNA concentrations caused by fish spawning activity. *Ecological Indicators*, 142, 109213. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109213>
- Xia, Z., Zhan, A., Johansson, M. L., DeRoy, E., Haffner, G. D., & MacIsaac, H. J. (2021). Screening marker sensitivity: Optimizing eDNA-based rare species detection. *Diversity and Distributions*, 27(10), 1981–1988. <https://doi.org/10.1111/ddi.13262>
- Yates, M. C., Cristescu, M. E., & Derry, A. M. (2021). Integrating physiology and environmental dynamics to operationalize environmental DNA (eDNA) as a

means to monitor freshwater macro-organism abundance. *Molecular Ecology*, 30(24), 6531–6550. <https://doi.org/10.1111/mec.16202>

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

ANEXOS

Anexo 1. Lista de especies usadas en la validación in silico de los partidores por “BLAST”.

Especie	Tanonomy ID (txid)	Especie	Tanonomy ID (txid)
<i>Acipenser baerii</i>	NA	<i>Mordacia lapicida</i>	682881
<i>Acipenser transmontanus</i>	NA	<i>Mugil cephalus</i>	48193
<i>Ameiurus nebulosus</i>	27778	<i>Nematogenys inermis</i>	245786
<i>Australoheros facetus</i>	318676	<i>Notocheirus hubbsi</i>	1144222
<i>Basilichthys australis</i>	1643406	<i>Odontesthes bonariensis</i>	219752
<i>Basilichthys microlepidotus</i>	598662	<i>Odontesthes brevianalis</i>	1643409
<i>Brachygalaxias bullocki</i>	89580	<i>Odontesthes mauleanum</i>	1334930
<i>Brevoortia maculata</i>	691795	<i>Odontesthes regia</i>	598664
<i>Bullockia maldonadoi</i>	390385	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	8022
<i>Carassius carassius</i>	217509	<i>Paralichthys microps</i>	NA
<i>Cheirodon australe</i>	930240	<i>Percichthys melanops</i>	364156
<i>Cheirodon galusdae</i>	NA	<i>Percichthys trucha</i>	270566
<i>Cheirodon kiliani</i>	1315317	<i>Percilia gillissi</i>	364157
<i>Cheirodon pisciculus</i>	2608155	<i>Percilia irwini</i>	270588
<i>Cyprinus carpio</i>	7962	<i>Salmo trutta</i>	8032
<i>Eleginops maclovinus</i>	56733	<i>Seriolella porosa</i>	458610
<i>Engraulis ringens</i>	217494	<i>Strangomera bentincki</i>	249026
<i>Galaxias globiceps</i>	NA	<i>Tinca tinca</i>	27717
<i>Galaxias maculatus</i>	61620	<i>Trichomycterus areolatus</i>	245746
<i>Gambusia holbrooki</i>	37273	<i>Trichomycterus chiltoni</i>	2563361
<i>Geotria australis</i>	71168	<i>Nematogenys inermis</i>	245786
<i>Leptonotus blainvillianus</i>	NA	<i>Notocheirus hubbsi</i>	1144222

Anexo 2. Tabla con número de capturas por especie y estación.

	Lia				Andalién			
Especie	P1	P2	P3	P4	P5	P6		Total
G. australis	1	12	42	19	1	0		75
Nematogenys inermis	3	2	1	0	0	0		6
Oncorhynchus mykiss	4	0	1	0	1	0		6
Percilia sp.	6	5	2	1	0	0		14
Trichomycteridae	21	2	1	1	14	0		39
Diplomystes sp.	0	2	0	0	0	0		2
Salmo trutta	0	0	0	2	0	0		2
Odontesthes mauleanum	0	0	0	0	1	0		1
Percichthys trucha	0	0	0	0	1	0		1
Basilichthys australis	0	0	0	0	0	1		1
Galaxias maculatus	0	0	0	0	0	14		14
Total	35	23	47	23	18	15		
Esfuerzo de pesca (segundos)	1816.6	1288.7	1097	921.1	1398.6	864.7		

Anexo 3. Fotografías de individuos larvales y metamórficos (Ammocoete y Macroftalmia) de *Geotria australis*.



