

Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Estimación de abundancia de ensambles de peces de agua dulce mediante
métodos de pesca y ADN ambiental

Seminario de Título presentado a la

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

para optar al título de Bióloga

Vasti Ester Lefiqueo Sáez

Concepción, septiembre 2024

Esta tesis ha sido realizada 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

Profesores Co-guía

Dr. Claudio Quezada-Romegialli

Dra Celia Fernandes de Lima

Profesores Evaluadores

Dr. Billy Ernst

Dr. Fernando Cruzat

Profesor Coordinador

Dr. Víctor Hernández

Concepción, septiembre 2024

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que estuvieron junto a mí durante este largo camino académico. A mis padres que desde el día uno me han apoyado y acompañado en cada paso que doy. A mi hermana por sus palabras de aliento y su contención en los momentos más difíciles. A mi bbJo que llegó a alegrar nuestras vidas. A los amigos que he hecho a lo largo de estos años con los que hemos compartido risas, penas y alegrías. A mi pareja por ser un compañero y un pilar fundamental en este proceso. A mi profesor guía por permitirme investigar algo muy distinto a lo que había hecho hasta ese entonces y por sus palabras de aliento cuando lo necesité. A mis compañeros de laboratorio que dedicaron su tiempo en ayudarme a lograr este objetivo. Agradezco además el financiamiento del Núcleo Milenio de Salmónidos Invasores Australes (INVASAL) ANID- Iniciativa Científica Milenio NCN2021_056 que permitió realizar las actividades experimentales y de terreno de esta tesis.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
<i>Las amenazas de los ecosistemas de agua dulce y su biodiversidad.....</i>	3
<i>Monitoreo de poblaciones de peces a través de métodos tradicionales.....</i>	4
<i>ADN ambiental en el estudio de los ensambles de peces.....</i>	5
<i>Sitio de estudio: Cuenca estero Nonguén</i>	6
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
<i>Objetivo general.....</i>	8
<i>Objetivos específicos.....</i>	8
METODOLOGÍA	9
<i>Área de estudio</i>	9
<i>Recolección de muestras y pesca eléctrica.....</i>	10
<i>Estimación de abundancia a través de un método de depleción</i>	11
<i>Toma de muestra ambiental de agua y sedimento.....</i>	12
<i>Extracción de ADN ambiental desde muestras de agua.....</i>	12
<i>Extracción de ADN ambiental desde muestras de sedimento.....</i>	13
<i>PCR cuantitativa en tiempo real para trucha arcoíris</i>	13
<i>Metabarcoding ADN ambiental: Preparación y secuenciación de la biblioteca Illumina .</i>	14
<i>Alícuotas</i>	14
<i>PCR Anidada</i>	14
<i>Limpieza con AMPure</i>	15
<i>Cuantificación.....</i>	16
<i>Análisis bioinformático de las secuencias</i>	16

<i>Relación entre abundancias estimadas mediante ADN ambiental y modelo de depleción a través de pesca eléctrica.....</i>	17
RESULTADOS.....	18
<i>Depleción mediante pesca eléctrica</i>	18
<i>Cambios en la composición de especies en el Estero Nonguén.....</i>	19
<i>Estimación de abundancia mediante el modelo de depleción de Carle & Strub (1978).....</i>	21
<i>Ensayo de PCR cuantitativa (qPCR) para detección de Trucha arcoíris en muestras de sedimento y filtros de agua</i>	23
<i>Metabarcoding de ADN ambiental: Procesamiento bioinformático y detección de especies</i>	24
<i>Detección de especies en el Estero Nonguén mediante pesca eléctrica y metabarcoding de eDNA.....</i>	26
<i>Relación entre abundancia inicial estimada por el método de depleción y técnicas de ADN ambiental.....</i>	27
DISCUSIÓN	31
<i>Caracterización del ensamble de peces mediante pesca eléctrica</i>	31
<i>Estimación de abundancia inicial y probabilidad de captura mediante el método de depleción de Carle & Strub (1978).....</i>	33
<i>Detección de trucha arcoíris (O. mykiss) utilizando un ensayo de qPCR en muestras de sedimento y filtros de agua</i>	34
<i>Detección de especies mediante metabarcoding de ADN ambiental.....</i>	34
<i>Uso de ADN ambiental para evaluar la abundancia relativa de peces en el estero Nonguén</i>	35
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXO.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa con puntos de muestreo en la cuenca del Estero Nonguén	10
Figura 2. Capturas de las especies registradas en el Estero Nonguén por puntos de muestreo y por cada run de pesca eléctrica.	19
Figura 3. Probabilidad de captura (A) y Abundancia incial (B) estimada mediante el modelo de depleción de Carle & Strub.	21
Figura 4. Umbral de ciclo (Ct por su nombre en inglés, Cycle threshold) de detección de presencia de ADN ambiental de Trucha arcoíris mediante qPCR en cuatro puntos de muestreo del Estero Nonguén.	23
Figura 5. Abundancia relativa de las secuencias únicas asociadas a especies del estero Nonguén (los números dentro de las barras corresponden al número de ASV asociado a cada especie)	26
Figura 6. Detección de especies del Estero Nonguén mediante técnicas de muestreo	27
Figura 7. Regresión lineal entre la abundancia inicial estimada por el modelo de depleción y el ciclo de umbral del ensayo de qPCR específico para Trucha arcoíris. $R^2= 0.043$	29
Figura 8. Regresión lineal entre Abundancia relativa de lecturas únicas (metabarcoding) y la Abundancia inicial estimada por el modelo de depleción. $R^2= 0.5591$	29

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación del número de captura de especies en los puntos de muestreo del Estero Nonguén entre el estudio de Habit et al. (2003) y el estudio actual (2023).....	20
Tabla 2. Estimación de la abundancia inicial y probabilidad de captura de cada especie en cada sitio de muestreo utilizando el modelo de Carle & Strub (1978)	22
Tabla 3. Resultados ANOVA de dos vías para los efectos de Sitio y Muestras sobre el umbral de ciclo (Ct) del análisis de eDNA de Trucha arcoíris (<i>O. mykiss</i>)	24
Tabla 4. ASV asignadas a fauna íctica y sus lecturas por sitio de muestreo y tipo de muestra (Filtro o Sedimento).....	25
Tabla 5. Comparación del índice de riqueza de especies mediante metabarcoding de eDNA y Pesca eléctrica en el Estero Nonguén	27

RESUMEN

Estudiar la diversidad y abundancia de las comunidades de peces nativos e introducidos es crucial para la gestión y conservación de los ecosistemas acuáticos, tanto para monitorear las poblaciones de especies nativas como para detectar la presencia de especies invasoras, comprender la estructura de las comunidades y cómo la presencia/ausencia de las especies pueden alterar las dinámicas de los ecosistemas. Recientemente, el ADN ambiental (eDNA) ha emergido como una herramienta eficaz para monitorear la biodiversidad sin necesidad de una captura directa del organismo. En algunos casos esta técnica ha demostrado ser más eficiente que los métodos tradicionales y ha generado gran interés en su integración en estrategias de conservación acuática. En esta investigación se estudió la diversidad y abundancia del ensamble de peces del estero Nonguén, uno de los tributarios más importantes del río Andalién, en cuatro estaciones combinando metabarcoding de eDNA, un ensayo de qPCR específico para trucha arcoíris, una especie introducida, y estimaciones de abundancia obtenidas mediante un modelo de depleción a través de pesca eléctrica. Los resultados mostraron que la pesca eléctrica capturó una mayor diversidad de especies que el metabarcoding de eDNA. El ensayo de qPCR específico para trucha arcoíris resultó ser más sensible en la detección de la especie en todos los sitios de muestreo en comparación con el metabarcoding de ADN ambiental. Sin embargo, los ensayos realizados con este último resultaron ser sensibles en la detección de especies que no fueron capturadas mediante pesca eléctrica; tales como *G. australis* y *P. irwinii*. Los resultados de la regresión lineal entre la abundancia relativa estimada por el método de depleción y los datos obtenidos mediante ADN ambiental no reveló una relación estadísticamente significativa. Finalmente, aunque cada método presenta sus propias limitaciones y sesgos, la combinación de ambos proporciona una visión más amplia de la dinámica y ecología de estas especies.

ABSTRACT

Studying the diversity and abundance of native and introduced fish communities is crucial for the management and conservation of aquatic ecosystems, both to monitor native species populations and to detect the presence of invasive species, understand community structure, and how the presence/absence of species can alter ecosystem dynamics. Recently, environmental DNA (eDNA) has emerged as an effective tool for monitoring biodiversity without the need for direct organism capture. In some cases, this technique has proven to be more efficient than traditional methods and has generated great interest in its integration into aquatic conservation strategies. In this research, the diversity and abundance of the fish assemblage in the Nonguén stream, one of the most important tributaries of the Andalién River, were studied at four stations, combining eDNA metabarcoding, a qPCR assay specific for rainbow trout, an introduced species, and abundance estimates obtained through a depletion model using electrofishing. The results showed that electrofishing captured a greater diversity of species than eDNA metabarcoding. The qPCR assay specific for rainbow trout was more sensitive in detecting the species at all sampling sites compared to environmental DNA metabarcoding. However, assays conducted with the latter were sensitive in detecting species that were not captured through electrofishing, such as *G. australis* and *P. irwinii*. The results of the linear regression between the relative abundance estimated by the depletion method and the data obtained through environmental DNA did not reveal a statistically significant relationship. Finally, although each method has its own limitations and biases, combining both provides a broader view of the dynamics and ecology of these species.

INTRODUCCIÓN

Las amenazas de los ecosistemas de agua dulce y su biodiversidad

El crecimiento de la población humana, el consumo y la rápida globalización, han causado una desproporcionada degradación y alteración de los ecosistemas naturales a nivel mundial, siendo los ecosistemas de agua dulce y su biodiversidad uno de los ecosistemas más afectados (IPBES, 2019). Entre sus principales amenazas se encuentra la degradación de hábitats, la contaminación, la modificación de los caudales naturales, la sobreexplotación de especies y la invasión de especies exóticas (Dudgeon et al., 2006). A ello se les suman los efectos del cambio climático global, las enfermedades infecciosas, el bloom de algas nocivas, la expansión de la energía hidroeléctrica, los contaminantes emergentes, resultado de actividades agroindustriales y mineras, y los microplásticos (Reid et al., 2019a). A pesar de la gran cantidad de amenazas, los ecosistemas de agua dulce se encuentran entre los más diversos y productivos, generando una gran cantidad de servicios ecosistémicos a la población (Convención de Ramsar sobre los Humedales, 2018). Desde el ámbito de la biodiversidad, los ecosistemas de agua dulce representan aproximadamente el 6% de las especies descritas a nivel global, lo que contrasta fuertemente con su representatividad en términos de área, ya que estos representan tan sólo el 0,8% de la superficie terrestre (Dudgeon et al., 2006).

En Sudamérica se ha descrito alrededor de un tercio de la diversidad de peces continentales, con 5160 especies, 20 órdenes, 69 familias y 739 géneros (Reis et al., 2016). En Chile, la diversidad de peces se compone de 44 especies registradas hasta la fecha, de las cuales la mayoría son exclusivas de las aguas chilenas caracterizando la ictiofauna local por sus altos grados de endemismo, además de sus tamaños corporales pequeños, y las adaptaciones a ríos de alta pendiente y caudal fluctuante (Dyer, 2000; Habit et al., 2006). La situación de conservación que presentan estas 44 especies nativas es motivo de preocupación ya que el 65% de ellas enfrentan problemas de conservación, destacando la necesidad urgente de medidas de protección y gestión en la preservación de la biodiversidad de los cuerpos de agua dulce, además de la necesidad de investigaciones adicionales sobre la fauna acuática, ya que se desconoce el estado de conservación del 18% de ellas (Habit et al., 2023).

Monitoreo de poblaciones de peces a través de métodos tradicionales

La evaluación de la biodiversidad de los ecosistemas es fundamental para establecer políticas, planes, programas y proyectos que garanticen su adecuado manejo y conservación. En este contexto conocer la composición, riqueza y abundancia de las especies es una de las principales aproximaciones para su estudio. Tradicionalmente, los estudios asociados a la composición de los ecosistemas se han realizado a través de las observaciones e identificaciones directas de las especies. En el caso del estudio de las poblaciones de peces una de las técnicas más comunes es el uso de la pesca eléctrica para estimar tanto la abundancia como la riqueza de las especies en ríos y pequeños arroyos (Ortiz-Sandoval et al., 2009). El muestreo de eliminación de múltiples pasadas o *depleción*, mediante pesca eléctrica, es una metodología frecuentemente utilizada para mejorar estas estimaciones en poblaciones demográficamente cerradas (Hedger et al., 2013; Herigan et al., 2021; Seber, 2002; Stewart et al., 2019). Este método consiste en realizar capturas sucesivas de una población de peces en un área específica en un corto período de tiempo, removiendo las capturas realizadas en cada pasada. La disminución en el número de capturas entre cada pasada se utiliza para estimar la probabilidad de captura y el tamaño original de la población. La precisión de los estimadores de la depleción está influenciada por la capturabilidad durante cada pasada de pesca eléctrica, que depende de la experiencia del equipo de trabajo, la complejidad del hábitat, la conductividad del sistema (Herigan et al., 2021), el tamaño de los peces, entre otros.

Se debe tener en cuenta que los resultados obtenidos a través de la pesca eléctrica muchas veces pueden subestimar la riqueza y abundancia de los ecosistemas, especialmente cuando se trata de especies raras o crípticas que son muy difíciles de capturar, debido a sus conductas elusivas, bajos tamaños poblacionales o sus pequeños tamaños corporales. Además, esta es una técnica que requiere ser llevada a cabo con tiempo y con un equipo de trabajo calificado para tal labor; en caso de no contar con ninguna de ellas se crean limitaciones y desafíos que conllevan a los profesionales de la pesca a priorizar los sitios en donde realizar el esfuerzo de muestreo, corriendo el riesgo del sesgo de la información. También se debe considerar que la técnica puede inducir algunos efectos negativos y dañinos en los peces (Pottier et al., 2020). De este modo, cualquier nueva estrategia o técnica que permitan mejorar la captura por unidad de esfuerzo tiene el potencial de aumentar la eficiencia del muestreo.

ADN ambiental en el estudio de los ensamblajes de peces

En los últimos años, el ADN ambiental (eDNA por sus siglas en inglés) se ha posicionado como una nueva herramienta, muy eficaz y prometedora en el monitoreo de la biodiversidad en diversos ecosistemas (Ficetola et al., 2008, 2019; Rishan et al., 2023). Esta técnica ha tomado gran relevancia dentro de los ecosistemas de agua dulce desde que Ficetola et al. (2008) detectó la presencia de la rana toro (*Rana catesbeiana*) en un entorno controlado y natural, demostrando la posible aplicación del eDNA para la detección de macroorganismos acuáticos. Desde entonces la aplicación de esta técnica ha generado un gran interés en su integración dentro de las estrategias de conservación acuática (Reid et al., 2019b). Esta técnica no invasiva, se basa en estudiar la composición genética de muestras ambientales (como aire, agua, hielo o sedimento) cuyo origen puede ser diverso; tejido celular, mucosas, deposiciones, gametos o ADN intra o extracelular (Strickler et al., 2015; Taberlet et al., 2012). El eDNA utiliza dos enfoques principales: para la identificación taxon-específica, se emplea una PCR cuantitativa (qPCR), una técnica muy sensible que permite detectar la presencia y distribución de las especies (Goldberg et al., 2011), mientras que cuando se trata de identificar un conjunto o ensamblaje de especies, se utiliza el metabarcoding de eDNA (Kawato et al., 2021; Olds et al., 2016).

La utilidad del eDNA para detectar la presencia o ausencia de especies en ecosistemas acuáticos marinos (Díaz-Ferguson & Moyer, 2014; Kawato et al., 2021), en ecosistemas lénticos (Balasingham et al., 2018; Hänfling et al., 2016) y lóticos (Olds et al., 2016; Piggott et al., 2020; Pont et al., 2023; Thomsen et al., 2012) ha sido bien establecida. Estas trazas de ADN que dejan los individuos tras su paso han permitido la detección de especies elusivas, en peligro de extinción y de especies invasoras (Balasingham et al., 2018; Goldberg et al., 2013; Mahon et al., 2013; Piaggio et al., 2014; Sanz et al., 2023; Thomsen et al., 2012; Wilcox et al., 2013, 2016). Recientemente, diversos estudios han demostrado una correlación positiva entre la cantidad de partículas de ADN en las muestras ambientales y la densidad o biomasa de diversos organismos en sistemas controlados (Lacoursière-Roussel et al., 2016; Takahara et al., 2012; Tillotson et al., 2018; Wilcox et al., 2016), como acuarios, en donde las concentraciones de ADN son altas (Lacoursière-Roussel et al., 2016). Sin embargo, en condiciones naturales, esta relación se vuelve difusa (Yates et al., 2019), debido a factores estocásticos que influyen en la producción y degradación del eDNA. Estos factores incluyen el pH, la temperatura, la actividad microbiana y la luz UV (Lacoursière-Roussel et al.,

2016; Strickler et al., 2015), así como los patrones de comportamiento animal, como el comportamiento del desove estacional que afectan la producción de eDNA (Tillotson et al., 2018).

La mayoría de los estudios sobre la detección de eDNA en peces se han realizado en muestras de agua (Hänfling et al., 2016; Kawato et al., 2021; Olds et al., 2016; Piggott et al., 2020; Pont et al., 2023; Thomsen et al., 2012; Valentini et al., 2016). Sin embargo, recientes estudios se han centrado en estudiar el eDNA en muestras de sedimentos (Buxton et al., 2018a; Sakata et al., 2020; Turner et al., 2015). Según Turner et al. (2015) la concentración de eDNA de peces en muestras de sedimento es mayor que en las de agua, tanto en estanques experimentales como en muestras recolectadas de río. Además, resultados indican que el eDNA de peces persiste más en muestras de sedimento que en muestras de agua (Sakata et al., 2020; Turner et al., 2015). En esta investigación se evaluó la detección de especies utilizando eDNA tanto en muestras de sedimento como en muestras de agua.

Sitio de estudio: Cuenca estero Nonguén

La cuenca del río Andalién, situada en la vertiente occidental de la cordillera de la costa, presenta un deterioro por las actividades antrópicas productivas. En 2004 los principales usos de suelos en la cuenca fueron plantaciones forestales (46%), seguido de terrenos intervenidos referidos a matorrales, praderas y rotación de cultivo (37,9%) y tan sólo un 11,8% de la cuenca era bosque nativo y mixto (MOP, 2004). A pesar de su alto grado de intervención, la cuenca del río Andalién es considerada una unidad de gran valor biogeográfico y de conservación biológica, debido a la alta proporción de diversidad nativa que alberga en su cauce, correspondiente a 17 especies de peces nativas y dos lampreas, más 8 especies marinas que ingresan en algunas épocas a la zona estuarina (Habit & Victoriano, 2005; Ruiz, 1993). Esta riqueza puede explicarse por la variedad de hábitats a lo largo de su desarrollo, que van desde zonas ritrales caracterizadas por una alta velocidad de corriente, substratos rocosos de bolones, con aguas de bajas temperaturas y muy ricas en oxígeno, hasta zonas potamales de baja velocidad de corriente, substratos arenosos, aguas más turbias y con presencia de algas (Habit & Victoriano, 2005).

El Estero Nonguén, por su parte, al ser el último tributario del río Andalién, alberga parte de esta riqueza específica con 13 especies nativas más 5 introducidas descritas a lo largo de su cauce. La composición del ensamble ha sido bien estudiada por Habit et al. (2003a), quienes describen que su

zona de rápidos (ritrales) se encuentra caracterizada por la presencia de las especies *O. mykiss*, *S. trutta* y *Nematogenys inermis*, mientras que en su zona de medias y bajas corrientes (potamales) son frecuentes las especies *Trichomycterus areolatus*, *Cheirodon galusdae*, *Galaxias maculatus*, *Percilia irwini*, *Basilychthys australis*, *Percichthys trucha*, *Bullockia maldonadoi* y *Gambusia holbrooki*. Parte de esta riqueza específica se ha visto drásticamente reducida a lo largo de los años debido a la falta de planificación urbana y a la ineficiencia de las regulaciones ambientales en materia de conservación y protección de los ecosistemas acuáticos. Las zonas de dragado del río Andalién, y de canalización del estero de Nonguén, han visto reducida la riqueza de especies nativas en un 60% y 81% respectivamente, mientras que la riqueza de especies introducidas se ha incrementado hasta en un 300% en el río Andalién y en un 100% en el estero de Nonguén (Moraga et al.,2022).

Basándonos en lo anterior, el estero Nonguén presenta una gran diversidad de especies nativas por lo que su monitoreo es importante para conocer el estado y conservación de las poblaciones. Es por ello que en esta investigación se realizó la estimación de abundancia y riqueza del ensamble de peces del estero Nonguén, combinando metabarcoding de ADN ambiental, un ensayo de qPCR específico para trucha arcoíris y estimaciones de abundancia obtenidas mediante un modelo de depleción utilizando pesca eléctrica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Conocer el estado de los ensamblajes de peces nativos e introducidos, y poder estimar una abundancia relativa mediante una técnica molecular basada en ADN ambiental nos permitirá obtener información crucial para la conservación de las especies nativas. Considerando estos antecedentes se planteó la siguiente hipótesis:

La riqueza y la abundancia relativa de peces estimada mediante muestras de ADN ambiental se encontrará positivamente relacionada con la abundancia inicial estimada a través de un modelo de depleción independientemente del tipo de muestra que sea (sedimento o filtros de agua).

Objetivo general

Estimar la riqueza y abundancia de ensamblajes de peces nativos y exóticos en el sistema lótico del estero Nonguén mediante el uso de un método tradicional de captura basado en pesca eléctrica cuantitativa y un método molecular basado en ADN ambiental (metabarcoding y qPCR) desde muestras de sedimento y agua.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la composición y abundancia por especie de la fauna de peces del estero Nonguén mediante pesca eléctrica cuantitativa.
2. Comparar sedimento y agua como fuentes de ADN ambiental de peces mediante un ensayo de qPCR en trucha arcoíris y metabarcoding de ADN ambiental para toda la comunidad de peces.
3. Determinar la relación entre abundancia inicial estimada mediante un modelo de depleción utilizando pesca eléctrica cuantitativa y técnicas de ADN ambiental.

METODOLOGÍA

Área de estudio

Esta investigación contempló como área de estudio la cuenca hidrográfica del estero Nonguén (36°49'–36°54' S, 72°57'–73°01' O), último tributario del río Andalién. Este sistema fluvial se caracteriza por presentar una gran variedad y contraste de hábitats a lo largo de su extensión, desde riberas con vegetación nativa, áreas de cultivo y plantaciones, hasta ambientes netamente urbanos (Fig. 1). La parte alta del Nonguén, se caracteriza por ser un ritrón, es decir, un sector de gran velocidad de corriente ($>0,5 \text{ m s}^{-1}$), con substrato rocoso de bolones y aguas oxigenadas de baja temperatura. Por su parte, la zona baja, se constituye de zonas potamales, o áreas de baja velocidad de corriente ($< 0,5 \text{ m s}^{-1}$), substrato de arena, de mayor conductividad y con presencia de macrófitas. Mientras que su zona media, corresponde a una zona de transición en donde el ambiente se estructura en áreas consecutivas de características ritrales y potamales. Esta cuenca se caracteriza por ser un sistema altamente intervenido, presentando una gran deforestación y urbanización en suelos no aptos en su zona media e inferior, mientras que su zona alta es utilizada para la generación de agua potable y su zona inferior para la recepción de efluentes domésticos (Habit et al., 2003b). Sin embargo, y a diferencia de la mayoría de las cuencas costeras, esta cuenca nace inserta en un fragmento de bosque nativo bien conservado, confiriendo un alto valor ambiental (Habit & Victoriano, 2005). Se muestrearon cuatro puntos del estero Nonguén representando los principales tipos de mesohábitat a lo largo de su distribución, con el fin de maximizar la representatividad de la comunidad de peces del sistema lótico.

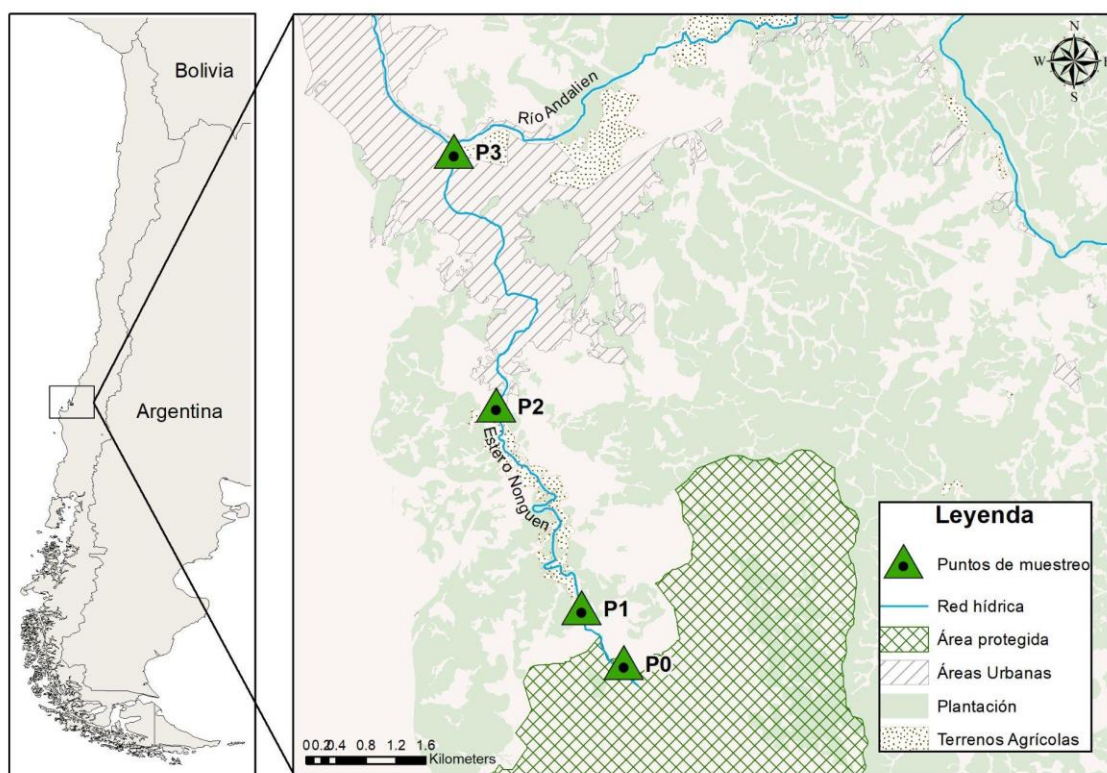


Figura 1. Mapa con puntos de muestreo en la cuenca del Estero Nonguén

La recolección de datos dentro de la cuenca del estero Nonguén se realizó durante jornadas de terreno entre los meses de noviembre y diciembre de 2023, enero y marzo de 2024, realizando un punto por día de muestreo.

Recolección de muestras y pesca eléctrica

La cuantificación de la abundancia de los ensambles de peces del estero Nonguén se realizó a través de la captura de individuos mediante pesca eléctrica (HT-2000, Halltech Environmental, Canada) en los 4 puntos mencionados anteriormente (Fig. 1). En los sitios de muestreo P0, P1 y P2 se estableció una unidad de muestreo de 50 metros, mientras que en el sitio P3 se estableció una unidad de muestreo de 36 m, debido a la accesibilidad del terreno. En cada punto se instaló una red río arriba y río abajo estableciendo una población demográficamente cerrada, impidiendo la emigración e inmigración de peces dentro del área de estudio, siguiendo el enfoque del modelo de depleción

propuesto por Carle & Strub (1978) que busca garantizar que las capturas reflejen de manera precisa la abundancia de la población en un espacio delimitado y cerrado, minimizando la interferencia de factores externos. La captura se realizó a través de tres pasadas a lo largo y ancho de la unidad de muestreo siendo el ciclo de trabajo y el voltaje utilizado con la pesca eléctrica ajustado in situ acorde a la conductividad del estero en cada punto. El movimiento del equipo de trabajo fue en zig-zag en dirección río arriba pasando por todos los hábitats disponibles dentro del área de muestreo (e.g., restos de madera, rápidos, vegetación acuática). Los peces capturados en cada una de las pasadas fueron almacenados en recipientes, para ser identificados posteriormente hasta el nivel de especie. Además, se midieron características del agua como pH, turbidez y conductividad y flujo de agua a través del uso de un multiparámetro, para así obtener parámetros específicos de cada sitio de muestreo.

Estimación de abundancia a través de un método de depleción

Para estimar el tamaño poblacional inicial de los ensambles de peces capturados a través de la pesca eléctrica, se utilizó un método de depleción propuesto por Carle & Strub (1978). Este método permite estimar la abundancia de una población cerrada a través del declive del número de individuos capturados en cada pasada con pesca eléctrica. En cada pasada o run de pesca eléctrica el número de los individuos capturados (C_i) es anotado y los individuos son físicamente removidos de la población. Si la probabilidad de captura (p) es constante para todos los peces en todos los eventos de depleción, entonces la estimación de la abundancia inicial de la población (N_0) es el valor más pequeño $N_0 \geq T$ que resuelve la ecuación:

$$\frac{N_0 + 1}{N_0 - T + 1} \prod_{i=1}^k \frac{kN_0 - X - T + \beta + k - i}{kN_0 - X + \alpha + \beta + k - i} \leq 1$$

Donde:

$T = \sum_{i=1}^k C_i$: es el total de individuos capturados en todos los eventos de depleción; $X = \sum_{i=1}^k (k - i)C_i$, α y β son parámetros de una distribución beta que forma una distribución a priori para la probabilidad de captura (Carle & Strub, 1978).

Este método se utilizó para estimar la abundancia inicial (N_0) y la probabilidad de captura (p) en cada punto de muestreo y para cada una de las especies capturadas. Para ello se utilizó la función

“removal” del paquete FSA versión 0.9.5 (D. H. Ogle et al., 2023) en R versión 4.3.2 (R Core Team, 2023).

Toma de muestra ambiental de agua y sedimento

La recolección de muestras de ADN ambiental de muestras de agua se realizó en conjunto con los muestreos de pesca eléctrica. La muestra de agua se recolectó antes de intervenir demasiado el estero, por lo que las muestras se recolectaron antes de realizar los muestreos de pesca eléctrica. La recolección de muestras de agua en cada punto se realizó en triplicado, es decir, se recolectaron 3 litros de agua por sitio en frascos de laboratorio de 1L previamente esterilizados. Estos fueron trasladados en un cooler con hielo hasta la estación de filtrado montada en la Cabina 10 de la Universidad de Concepción. Esta estación de filtrado consistió en un sector limpio y libre de contaminación, en donde se dispuso el sistema de filtrado que consiste en una bomba peristáltica marca *Alexis*, con sus cabezales de filtrado, porta filtro y filtros de celulosa nitrato estériles con poros de 0,45 μm . Para cada muestra se utilizó un filtro y portafiltro diferente para evitar la contaminación cruzada entre ellas. Una vez filtrada toda el agua los filtros fueron almacenados en criotubos con alcohol y fueron almacenados a temperatura ambiente hasta su extracción.

Las muestras de sedimento por su parte se recolectaron en marzo 2024. Para ello se utilizaron tubos Falcon estériles y cucharas de plástico esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10%. El protocolo de recolección consistió en sacar sedimento superficial con materia orgánica del sistema fluvial contra corriente. La toma de muestras también ocurrió en triplicado por sitio de muestreo, obteniendo un total de 3 muestras de sedimento por sitio de muestreo. Los tubos Falcon fueron rotulados y almacenados en un cooler con hielo en su traslado a la Universidad para ser posteriormente almacenados a 4°C.

Extracción de ADN ambiental desde muestras de agua

La extracción de ADN de las muestras ambientales de agua se realizó usando un protocolo modificado de las prácticas convencionales de extracción de eDNA propuesto por Kawato et al. (2021), en donde se realizó una incubación de los filtros de celulosa por dos horas en un buffer de lisis para una mayor eficiencia en la degradación del eDNA. Para llevar a cabo esta tarea se utilizó

el kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue. El protocolo de extracción utilizado se realizó acorde a lo descrito por el fabricante con algunas modificaciones en las concentraciones de los componentes del buffer de lisis, estas consistieron en: 450 µl de PBS, 410 µl buffer AL y 41 µl de proteinasa K.

Extracción de ADN ambiental desde muestras de sedimento

Para la extracción de eDNA desde las muestras de sedimento se utilizó el kit de extracción comercial FastDNA Spin Kit for soil. Este kit permite la extracción de ADN de muestras de sedimento de una manera rápida y eficiente ya que está diseñado para utilizarlo en conjunto con el instrumento FastPrep de MP Biomedical permitiendo la homogeneización de la muestra a través de movimientos multidireccionales de la muestra con las partículas de la matriz de lisis en tan sólo 40 segundos. La extracción de las muestras de sedimento se realizó al día siguiente de su recolección siguiendo el protocolo del fabricante. En la extracción sólo se utilizó una muestra por sitio.

PCR cuantitativa en tiempo real para trucha arcoíris

Una vez realizada la extracción del total de muestras ambientales, tanto de filtro como de sedimento se procedió a realizar una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para la identificación específica de la especie *O. mykiss* (trucha arcoíris) desde las muestras ambientales. Para llevar a cabo la reacción se utilizó un partidador que amplifica la región NADH del genoma mitocondrial, que fue utilizado ya que presenta una divergencia de secuencias relativamente altas y dado que es una de las secuencias mitocondriales más registradas para salmónidos (Wilcox et al., 2015). La qPCR se realizó en un volumen final de 20 µl, los que incluyeron 6 µl de ADN, 2 µl de Taqman Environmental Master Mix 2.0, 1 µl de cada primer específico para la especie F: 5'-AGTCTCTCCCTGTATATCGTC-3' y R: 5'-GATTTAGTTCATGAAGTTGCGTGAGTA-3' (Wilcox et al., 2015) y 10 µl de la enzima KAPPA. Cada muestra fue analizada por duplicado. Además de las muestras de filtro y sedimento, la reacción se realizó con un control negativo (sólo agua) y un control positivo que corresponde a extracción de ADN desde tejido de aleta de la especie objetivo (*O. mykiss*). Esta extracción se realizó utilizando el kit de extracción Wizard SY Genomic DNA siguiendo el protocolo del fabricante. Los ciclos de temperatura utilizados fueron los siguientes: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 57°C por 20 segundos y 60°C por 30 segundos.

Alícuotas

Luego de la extracción de eDNA, las muestras fueron alicuotadas antes de preparar la librería para la secuenciación. Para una mayor representación del estero se realizaron cuatro alícuotas por sitio, resultando las muestras de sedimento con 10 µl por alícuota mientras que las muestras de filtro quedaron con un total de 20 µl por sitio. Esta diferencia en la cantidad de muestra utilizada en las alícuotas se debe a la elución de ADN en la extracción de las muestras ambientales en donde sedimento y filtros fueron eluidos en 50 µl y 100 µl, respectivamente.

Para aquellos sitios en donde la extracción de ADN de muestras ambientales de filtro resultaron ser finalmente solo dos, las alícuotas se realizaron en duplicado por cada filtro extraído (esto corresponde a los sitios P0 y P1), mientras que para los sitios que representan 3 muestras de extracción de filtro (P2 y P3) se realizó una alícuota por cada tubo, obteniendo así 3 alícuotas con 20 µl de cada tubo de extracción, y la cuarta alícuota correspondió a una suma de las extracciones de los 3 tubos anteriores cargando 7 µl de cada uno.

Para las muestras ambientales de sedimento las alícuotas se realizaron similar a las descritas para las muestras de filtro del sitio P2 y P3 en donde se realizó una alícuota de 10 µl de cada tubo, con la diferencia que la cuarta alícuota no fue una suma de los 3 tubos sino que fue un duplicado del último tubo de extracción.

Para asegurar que no hubo contaminación durante el procedimiento, se utilizó un control negativo con 20 µl y 10 µl de agua para el procedimiento de filtros y sedimentos respectivamente.

PCR Anidada

Una vez alicuotadas todas las muestras se amplificó la región hipervariable del gen mitocondrial 16S utilizando el partidor *MarVer3* que genera amplicones cuyo tamaño se encuentra entre las 232 y 274 pares de bases. Este set de primers fue diseñado y testeado in silico e in vitro (Valsecchi et al., 2020). En primera instancia, la primera PCR se realizó en un volumen final de 10 µl que estuvo compuesta por 5 µl de MasterMix Amplitaq 360, 0.7 µl de Reactivo 360, 0.4 µl de cada primer (forward y reverse) y 3.5 µl de ADN. Los ciclos de temperatura utilizados siguieron un protocolo de hibridación con ajuste progresivo de temperatura (touch-up annealing en inglés) con

10/10/10/10/8 ciclos a 55/56/57/57/58°C. Luego de una fase inicial de 10 min a 95°C cada ciclo de amplificación consistió en 30 segundos a 95°C, 30 s a la temperatura de hibridación específica descrita anteriormente seguida de 15 segundos a 72°C a excepción de los primeros 10 ciclos en donde fueron 40 segundos a 72°C. La extensión final consistió en 15 minutos a 72°C. Para confirmar la amplificación del amplicón deseado, 5 µl de los productos de PCR fueron evaluados a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1,8% corridos a 90V por 30 minutos. Los amplicones obtenidos de cada sitio fueron posteriormente combinados en un pool de amplicones con el fin de homogeneizar las reacciones obteniendo un total de aproximadamente 30 µl que luego fueron separados en dos tubos con 15 µl cada uno para realizar la segunda PCR. Para ello se procedió a realizar la indexación de los cebadores o primers según el protocolo de Illumina, en este proceso se agregan a los cebadores una combinación de *barcódigos* únicos en cada extremo del amplicón, permitiendo que cada muestra correspondiente a cada punto de muestreo presente una secuencia de identificación única. La amplificación se realizó en duplicado con un volumen final de PCR de 30 µl compuesto por 15 µl de Mastermix Amplitaq 360, 2.4 µl de Reactivo 360, 3 µl de cada primer (F y R) y 6.6 µl de cada muestra. El perfil de ciclos térmicos utilizados fue el siguiente, 95°C por 10 min seguidos de 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30s y 72°C por 40s más una extensión final a 72°C por 10 min. Para confirmar el éxito de la amplificación 5 µl de cada muestra fue utilizado en una electroforesis en gel de agarosa al 1,8% por 30 min a 90V, el resto de las muestras por sitio fue combinado en un sólo tubo para su posterior limpieza.

Limpieza con AMpure

Antes de la secuenciación y para asegurarnos que sólo secuenciamos la porción de ADN de interés, el producto de la segunda PCR debe ser purificado utilizando el sistema de purificación AMpure. Este sistema utiliza partículas magnéticas que se adhieren a fragmentos de ADN permitiendo la selección de diferentes tamaños en presencia de un imán. Todo el procedimiento ocurre en una gradilla imantada. En primera instancia, se cuantificó la cantidad exacta de microlitros de cada muestra para calcular la cantidad de AMpure que se le agregará a cada una de ellas. La cantidad de este dependerá netamente del tamaño del fragmento que se desea eliminar, en este caso como el fragmento a eliminar fue de 200 pb se agregó 0,8x de AMpure (entre 36 a 37.6 µl de partículas AMpure). Una vez agregadas las partículas se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 minutos para luego eliminar el líquido remanente. Se realizaron dos lavados con 200 µl de etanol para eliminar las impurezas, la solución fue incubada por 3 minutos para posteriormente eliminar el

remanente y repetir el procedimiento por segunda vez. Se resuspendió el ADN en 45 µl de agua y fue incubado a temperatura ambiente por 5 minutos en una gradilla normal. Pasados los minutos las muestras fueron puestas nuevamente en la gradilla imantada y se incubó por 5 minutos más para eliminar las partículas imantadas del ADN de interés. El ADN purificado fue transferido a un nuevo tubo. Para verificar el resultado de la limpieza se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,8% por 30 min a 90V.

Cuantificación

Se midió la concentración de ADN de cada muestra purificada utilizando el fluorómetro Qubit, un instrumento que permite la cuantificación precisa de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y proteínas. La cuantificación se realizó siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez obtenida la cuantificación exacta de cada muestra, estas fueron combinadas en proporciones iguales basadas en las concentraciones medidas por el Qubit para luego ser analizadas mediante un analizador de fragmentos Qsep para verificar que los fragmentos se encuentren en el rango de tamaño deseado. Luego, para confirmar la concentración del pool de ADN se utilizó un espectrofotómetro Dnovix para posteriormente diluir el pool de ADN a la concentración requerida para la secuenciación. La secuenciación se realizó utilizando el secuenciador Illumina con una cantidad del pool de ADN de 100 picomoles.

Análisis bioinformático de las secuencias

Los análisis bioinformáticos se realizaron en R versión 4.3.2 (R Core Team, 2023), utilizando el pipeline de DADA2 version 1.30.0 (Callahan et al., 2016). En primera instancia se eliminaron partidores y se filtraron las secuencias dejando sólo las que se encontraban dentro del rango esperado, es decir, más de 100 pb. Posteriormente, se realizaron las correcciones de errores y la fusión de los pares de lectura para construir la tabla de Variante de Secuencia de Amplicones (o “ASV” por sus siglas en inglés, Amplicon Variant Sequence), que son secuencias únicas de ADN que representan las variantes exactas de los amplicones en la muestra. Una vez obtenida la tabla se removieron las quimeras, obteniendo así el total de ASV a las que, como paso final, se les asignó la taxonomía correspondiente a través de BLAST considerando un porcentaje de identidad mínimo del 95%. Luego de realizar la asignación taxonómica, las secuencias clasificadas como fauna íctica

fueron separadas, se determinó la cantidad de lecturas de las secuencias en cada muestra y fueron normalizadas con respecto al total de lecturas. Para descartar falsos positivos se eliminaron aquellas secuencias que presentaron una abundancia relativa menor o igual a 0,001.

Relación entre abundancias estimadas mediante ADN ambiental y modelo de depleción a través de pesca eléctrica

Para establecer la relación de las abundancias relativas de los métodos utilizados se realizó una regresión lineal en R con los datos obtenidos con cada una de las técnicas utilizadas. En el caso de los datos de ADN ambiental, se realizó una regresión lineal para cada tipo de muestra, es decir, se realizó una regresión para sedimento y una para filtros de agua por separado. En el caso de las especies detectadas mediante metabarcoding de ADN ambiental, la relación se estableció utilizando sólo aquellas especies que fueron capturadas mediante pesca eléctrica. En el caso del ensayo de qPCR de ADN ambiental específico para Trucha arcoíris la relación entre ambos métodos se estableció utilizando el ciclo de umbral obtenido por las lecturas de ADN. Finalmente, tanto para qPCR y metabarcoding de ADN ambiental, esta relación se estableció utilizando la abundancia inicial estimada por el método de depleción de Carle & Strub (1978).

RESULTADOS

Depleción mediante pesca eléctrica

La morfología del estero mostró una disminución en su ancho del cauce aguas abajo, mientras que el pH y la temperatura presentaron un leve aumento hacia el nacimiento del estero. La turbidez, el oxígeno y sólidos disueltos aumentaron aguas abajo (Anexo 1).

Se capturó un total de 82 individuos correspondientes a 8 especies, de las cuales 5 son nativas y 3 introducidas (Anexo 2). De acuerdo con las categorías de conservación del último proceso de clasificación publicado del Reglamento de Clasificación de Especies (RCE), la especie *Nematogenys inermis* se encuentra en peligro de extinción, mientras que *Percichthys trucha* está clasificada como preocupación menor. Las especies restantes corresponden a especies clasificadas como vulnerables.

El número de especies de peces capturadas aumentó río abajo: de 2 en P0 a 4 en P3 (Anexo 3). Sin embargo, el punto de muestreo que presentó un mayor número de especies capturadas fue el punto 1 (P1) presentando un total de 5 especies capturadas en el sitio, donde tres de ellas corresponden a especies nativas. El patrón de la distribución de las especies cambió a lo largo de las estaciones de muestreo; la especie dominante dentro del sistema fluvial corresponde a la especie introducida *Oncorhynchus mykiss*, que fue capturada en 3 de los 4 puntos de muestreo mostrando un incremento en el número de individuos río arriba, con un total de 32 individuos capturados en la zona alta perteneciente al Parque Nacional Nonguén (P0). Mientras que en la zona baja del estero (P3) la especie que predomina es *Trichomycterus areolatus*, seguida de *Galaxias maculatus*, con un total de 10 y 6 individuos capturados respectivamente (Anexo 2).

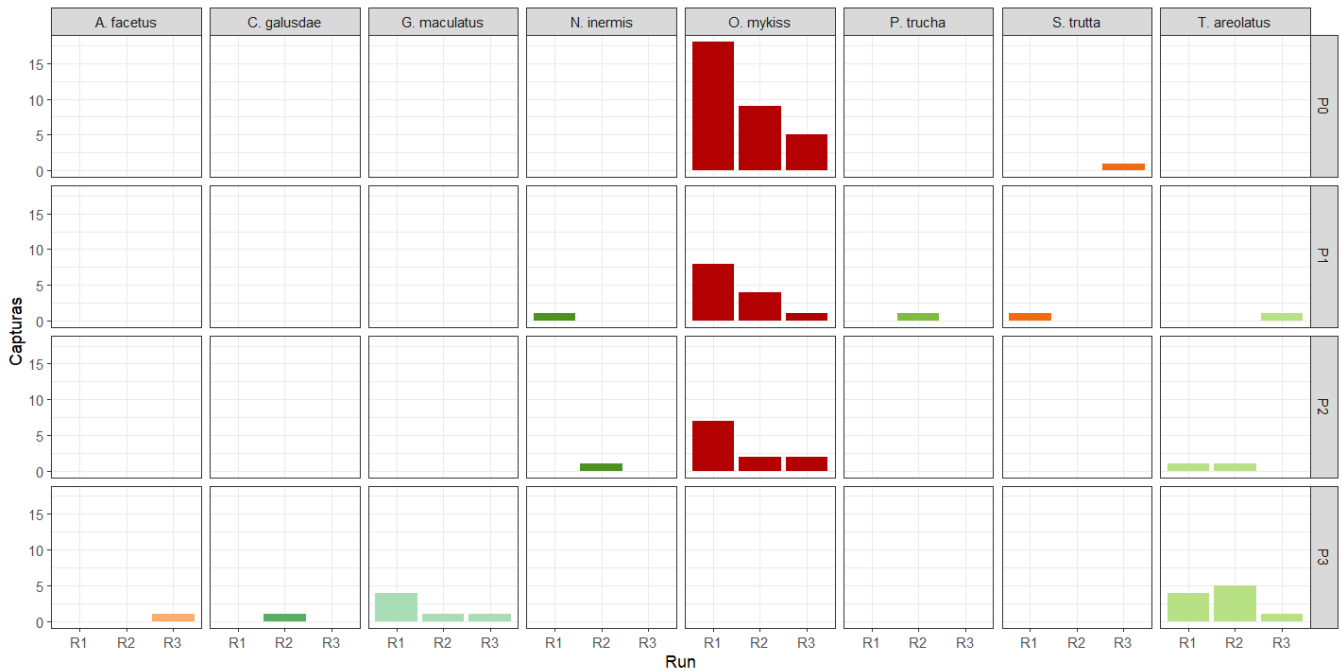


Figura 2. Capturas de las especies registradas en el Estero Nonguén por puntos de muestreo y por cada run de pesca eléctrica.

En cada sección del estero en donde se llevó a cabo el experimento de depleción, se efectuaron tres pasadas de pesca eléctrica, con el fin de observar cómo el número de capturas disminuyó a medida que aumentaban las pasadas o *run* de pesca eléctrica (Fig. 2). Se observó un patrón de disminución de las capturas sólo en la especie invasora trucha arcoíris, al menos en dos de los tres sitios en donde fue capturada. Las especies nativas en su mayoría no presentaron un declive en el número de individuos capturados con *runs progresivas*, más bien presentaron sus primeras capturas en la segunda o tercera pasada de pesca eléctrica.

Cambios en la composición de especies en el Estero Nonguén

Los muestreos con pesca eléctrica en este estudio permitieron la captura de 8 especies dentro del Estero Nonguén, de las cuales 5 corresponden a especies nativas y 3 a especies introducidas. Mientras que en el estudio de (Habit et al., 2003b) se capturaron un total de 12 especies, 9 nativas y 3 introducidas. En ambos estudios la especie dominante dentro del estero fue la especie *O. mykiss*, especie que presentó un incremento notable en el número total de capturas en todos los sitios de muestreo en el estudio actual. Por su parte, las especies nativas mostraron una drástica disminución

en el número de capturas entre los dos estudios, como es el caso de *T. areolatus* cuya captura en P2 disminuyó de 30 capturas en 2003 a sólo 2 en 2023. Además, algunas de las especies nativas no fueron capturadas en ciertos puntos de muestreo en este estudio, mientras que en el anterior sí se registraron capturas como es el caso de: *N. inermis*, *C. galusdae* y *G. maculatus* (Tabla 1). Con respecto a las demás especies introducidas se observa que las capturas de *S. trutta* disminuyeron en 3 de los 4 puntos a través de los años, y se destaca la aparición de *A. facetus* en 2023.

Tabla 1. Comparación del número de captura de especies en los puntos de muestreo del Estero Nonguén entre el estudio de Habit et al. (2003) y el estudio actual (2023).

Especie	P0		P1		P2		P3	
	2003	2023	2003	2023	2003	2023	2003	2023
<i>N. inermis</i>	1	0	3	1	2	1	0	0
<i>T. areolatus</i>	0	0	0	1	30	2	3	10
<i>G. maculatus</i>	0	0	0	0	18	0	5	6
<i>P. trucha</i>	0	0	0	1	0	0	1	0
<i>C. galusdae</i>	0	0	1	0	5	0	1	1
<i>O. mykiss</i>	14	32	2	13	0	11	1	0
<i>S. trutta</i>	7	1	1	1	1	0	3	0
<i>A. facetus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1

Estimación de abundancia mediante el modelo de depleción de Carle & Strub (1978)

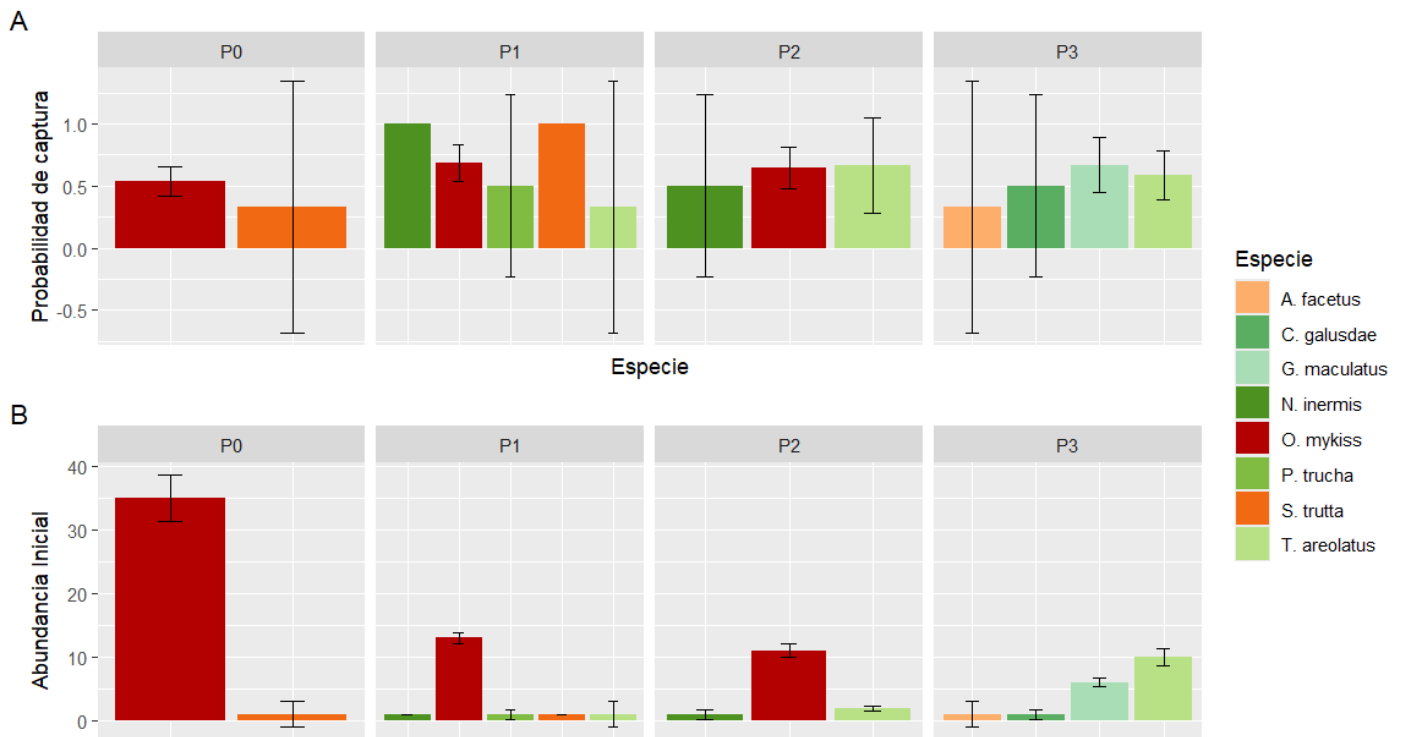


Figura 3. Probabilidad de captura (A) y Abundancia inicial (B) estimada mediante el modelo de depleción de Carle & Strub.

La abundancia inicial y la probabilidad de captura estimada por el modelo de Carle & Strub (1978) la podemos observar en la Fig. 3. En general, la probabilidad de captura (p) estimada por el modelo fue mayor a 0.5 en casi todas las especies, a excepción de aquellas cuyas únicas capturas fueron en la última pasada o *run* con pesca eléctrica. Sin embargo, en P0 dos de las especies capturadas (*N. inermis* y *S. trutta*) presentaron una estimación de la probabilidad de captura inesperada. Por otra parte, la abundancia inicial (N_0) estimada por el modelo de depleción en muchos de los sitios y para muchas de las especies corresponde a valores mayores o iguales a la captura total de las especies. Con respecto a los intervalos de confianza (95%) estimados por el modelo, tanto la probabilidad de captura como la abundancia inicial, incluyen valores negativos y positivos para la mayor parte de las especies, a excepción de aquellas que presentaron una captura total mayor a 6 (Tabla 2).

Tabla 2. Estimación de la abundancia inicial y probabilidad de captura de cada especie en cada sitio de muestreo utilizando el modelo de Carle & Strub (1978)

Sitio	Especie	Captura total	N_0	$N_{0.se}$	No.LCI	No.UCI	p	p.se	p.LCI	p.UCI
P0	<i>O. mykiss</i>	32	35	3.58	27.99	42.01	0.5	0.12	0.30	0.76
	<i>S. trutta</i>	1	1	2.03	-2.97	4.97	0.3	1.01	-1.65	2.32
	<i>O. mykiss</i>	13	13	0.88	11.28	14.72	0.7	0.15	0.4	0.97
	<i>S. trutta</i>	1	1	0	1	1	1	NaN	NaN	NaN
P1	<i>N. inermis</i>	1	1	0	1	1	1	NaN	NaN	NaN
	<i>P. trucha</i>	1	1	0.73	-0.44	2.44	0.5	0.73	-0.94	1.94
	<i>T. areolatus</i>	1	1	2.03	-2.97	4.97	0.3	1.01	-1.65	2.32
	<i>O. mykiss</i>	11	11	1.02	9.00	13.00	0.6	0.17	0.31	0.98
P2	<i>T. areolatus</i>	2	2	0.38	1.25	2.75	0.7	0.38	-0.09	1.42
	<i>N. inermis</i>	1	1	0.73	-0.44	2.44	0.5	0.73	-0.94	1.94
	<i>T. areolatus</i>	10	10	1.39	7.28	12.72	0.6	0.20	0.20	0.98
P3	<i>G. maculatus</i>	6	6	0.67	4.70	7.30	0.7	0.22	0.23	1.10
	<i>C. galusdae</i>	1	1	0.73	-0.44	2.44	0.5	0.73	-0.94	1.94
	<i>A. facetus</i>	1	1	2.03	-2.97	4.97	0.3	1.01	-1.65	2.32

Ensayo de PCR cuantitativa (qPCR) para detección de Trucha arcoíris en muestras de sedimento y filtros de agua

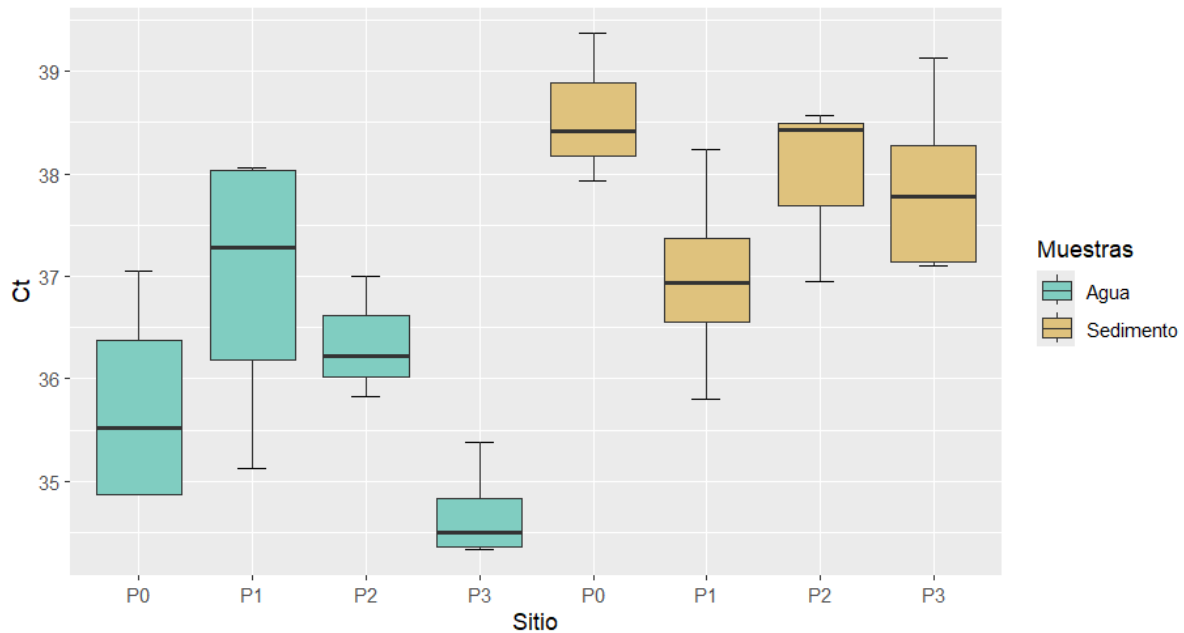


Figura 4. Umbral de ciclo (Ct por su nombre en inglés, Cycle threshold) de detección de presencia de ADN ambiental de Trucha arcoíris mediante qPCR en cuatro puntos de muestreo del Estero Nonguén.

Se detectó eDNA de Trucha arcoíris en todas las muestras recolectadas dentro del estero Nonguén, tanto en muestras de filtro de agua como en muestras de sedimento (Fig. 4). Los valores del umbral de ciclo en los que la reacción cruzó el umbral de fluorescencia detectando la señal del ácido nucleico de interés (Ct por sus siglas en inglés, cycle threshold) fue bastante alta en todas las muestras, observándose una señal de detección desde el ciclo 35 al 39 dependiendo de la muestra y del sitio de muestreo. Estos resultados reflejan que existe una baja cantidad de copias de ADN del fragmento de interés en las muestras, sin embargo, es posible observar que las muestras de filtros de agua presentan una mayor cantidad de copias de lecturas dado que los umbrales de ciclos detectados para cada sitio son menores en comparación con los umbrales de ciclo de las muestras de sedimento. Estos resultados se confirman con el análisis de varianza de dos vías (Tabla 3), el cual presentó un efecto significativo del tipo de muestra ($p < 0.05$), indicando que existe una diferencia estadísticamente significativa en los umbrales de ciclo entre las muestras de sedimento y agua, siendo estas últimas las que presentan los valores de Ct más bajos, sugiriendo que existe una mayor cantidad de copias de ADN detectadas en comparación con las muestras de sedimento. Por otro lado, no se observó un efecto significativo del Sitio ($p > 0.05$) en el valor del umbral de ciclo. También fue posible observar que, dada la sensibilidad del ensayo de qPCR, se logró detectar la

presencia de trucha arcoíris en el punto 3, sitio en donde esta especie no fue capturada mediante pesca eléctrica.

Tabla 3. Resultados ANOVA de dos vías para los efectos de sitio y muestras sobre el umbral de ciclo (Ct) del análisis de eDNA de Trucha arcoíris (*O. mykiss*)

Factor	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	p-value
Muestras	1	27.182	27.182	21.575	9.35e-05
Sitio	3	3.296	1.099	0.872	0.469
Residuals	25	31.497	1.260		

Metabarcoding de ADN ambiental: Procesamiento bioinformático y detección de especies

Producto de la secuenciación masiva de 8 muestras se obtuvieron 1.196.442 secuencias. Luego de eliminar y filtrar las secuencias de baja calidad, eliminar los errores de secuenciación y secuencias quiméricas, se obtuvo un total de 29.189 lecturas (Anexo 4) pertenecientes a 67 ASV que luego fueron asignadas taxonómicamente mediante BLAST. Del total de 67 secuencias únicas obtenidas, sólo 9 ASV fueron clasificadas como fauna íctica del estero Nonguén con un total de 13.817 lecturas (Tabla 4).

Tabla 4. ASV asignadas a fauna íctica y sus lecturas por sitio de muestreo y tipo de muestra (F= Filtro; S= Sedimento)

N° ASV	Asignación taxonómica	Lecturas totales por ASV	P0F	P0S	P1F	P1S	P2F	P2S	P3F	P3S
1	<i>Geotria australis</i>	9143	5	9103	4	5	9	10	1	6
4	<i>O. mykiss</i>	3692	0	0	3068	0	1	0	623	0
7	<i>Salmo trutta</i>	646	0	0	0	0	2	549	93	2
15	<i>G. maculatus</i>	134	0	0	0	0	0	0	134	0
18	<i>Geotria australis</i>	108	0	108	0	0	0	0	0	0
29	<i>Percilia irwini</i>	35	0	0	0	0	0	0	35	0
34	<i>Percilia irwini</i>	26	0	0	0	0	0	0	26	0
37	<i>Geotria australis</i>	24	0	24	0	0	0	0	0	0
41	<i>G. maculatus</i>	9	0	0	0	0	0	0	9	0
		13817	5	9235	3072	5	12	559	921	8

De las muestras analizadas a través de metabarcoding de eDNA utilizando el partidor *MarVer3* (Valsecchi et al., 2020) se pudieron identificar cinco especies: tres nativas y dos introducidas (Fig. 5). Los resultados indican que las muestras de filtro de agua amplificaron una mayor diversidad de especies con un total de detección de 5 especies, a diferencia de las muestras de sedimento, donde se detectaron dos especies. Las especies que presentaron una mayor abundancia relativa en las muestras de filtro de agua fueron *G. australis* y *O. mykiss*, siendo la primera identificada en el sitio P0 y P2, mientras que la segunda fue identificada en los sitios P1, P2 y P3. De estas muestras, el sitio en donde se detectó una mayor riqueza de especies fue el sitio de muestreo P3, en donde también se identificó la presencia de *P. irwini*, especie que no fue capturada mediante pesca eléctrica. En las muestras de sedimento por su parte, la especie que presentó una mayor abundancia

relativa de lecturas fue la especie *G. australis*, especie que no fue capturada en los muestreos con pesca eléctrica en ninguno de los sitios.

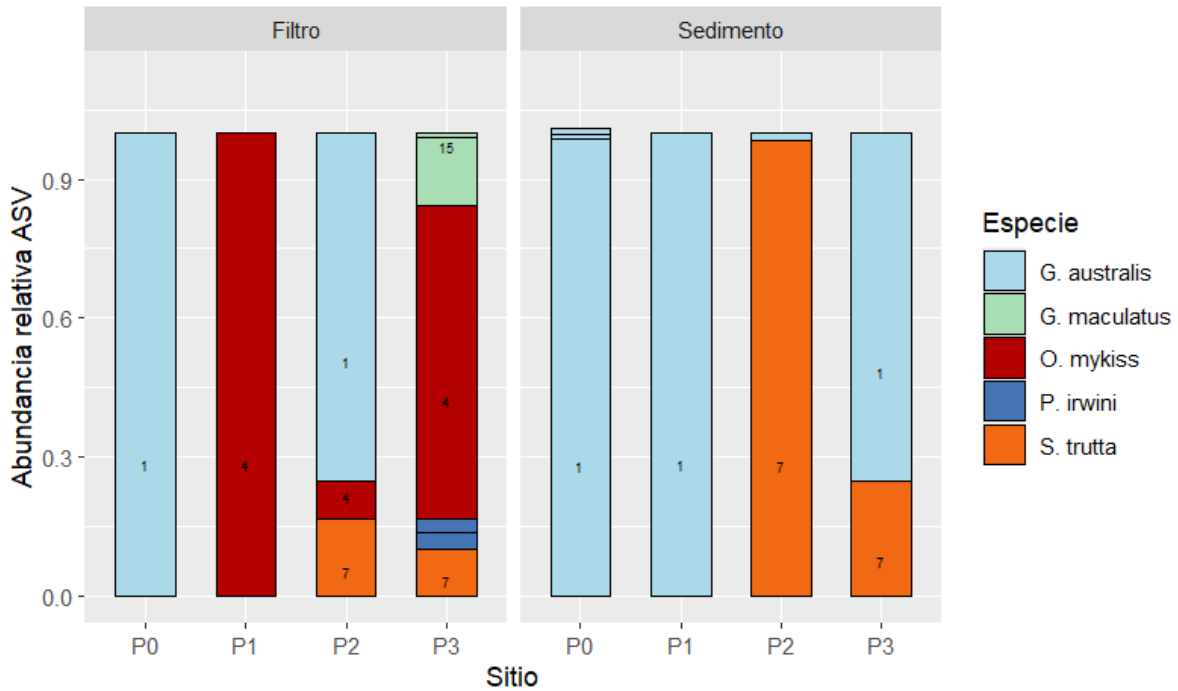


Figura 5. Abundancia relativa de las secuencias únicas asociadas a especies del estero Nonguén (los números dentro de las barras corresponden al número de ASV asociado a cada especie)

Detección de especies en el Estero Nonguén mediante pesca eléctrica y metabarcoding de eDNA

La riqueza de las especies presentes a lo largo del Estero Nonguén se evaluó utilizando dos técnicas: pesca eléctrica y metabarcoding de eDNA. A lo largo de la cuenca del estero se logró capturar 8 especies mediante pesca eléctrica, de las cuales 5 corresponden a especies nativas y 3 a especies introducidas. Mientras que con metabarcoding de eDNA se capturaron 5 especies (Fig. 6) correspondientes a 3 especies nativas y 2 introducidas. De las especies halladas sólo *S. trutta* y *G. maculatus* fueron capturadas tanto por eDNA y pesca eléctrica. Los resultados obtenidos presentan diferencias entre los métodos en cada uno de los sitios de muestreo cómo es posible observar en la Tabla 4. La pesca eléctrica mostró una mayor riqueza de especies que el metabarcoding de eDNA en los sitios P0 y P1 con un índice de 2 y 5 especies capturadas respectivamente, mientras que en P2 la cantidad de especies detectadas por ambas técnicas fue la misma, en tanto que en P3 el

metabarcoding de eDNA detectó 5 especies en comparación con las 4 especies detectadas por la pesca eléctrica.

Tabla 5. Comparación del índice de riqueza de especies mediante metabarcoding de eDNA y Pesca eléctrica en el Estero Nonguén

	P0	P1	P2	P3
Riqueza de especies mediante pesca eléctrica	2	5	3	4
Riqueza de especies mediante metabarcoding de ADN ambiental	1	2	3	5

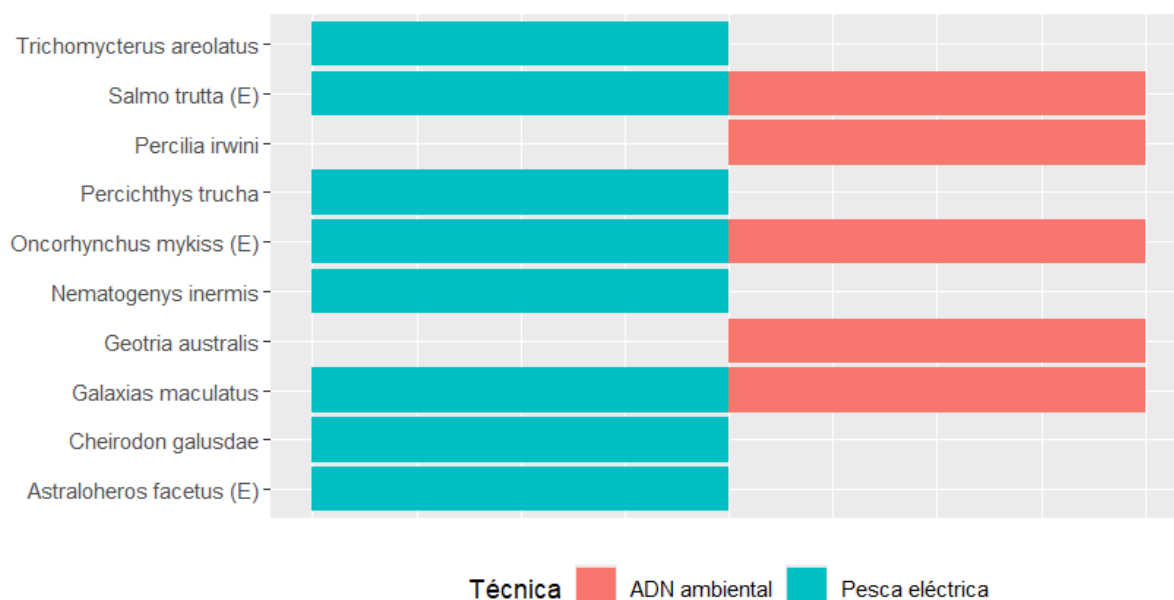


Figura 6. Detección de especies del Estero Nonguén mediante técnicas de muestreo

Relación entre abundancia inicial estimada por el método de depleción y técnicas de ADN ambiental

Los resultados sobre la regresión lineal entre el umbral de ciclo detectado por la qPCR de eDNA y la abundancia inicial estimada por el método de depleción de Carle & Strub (1978) para la especie

O. mykiss es posible observarla en la Fig. 7. El valor del intercepto de la recta es de 36.59 ($p=4.65 \times 10^{-9}$) y la pendiente de la recta es 0.01 ($\rho = 0.6$), demostrando una leve relación positiva entre las variables. El R^2 fue de 0.043, es decir, sólo el 4.3% de la variabilidad en el Umbral de ciclo puede ser explicada por la Abundancia inicial estimada por el modelo de depleción. el R-cuadrado ajustado obtuvo un valor de -0.111, y el estadístico F obtuvo un valor de 0.27 con un valor p de 0.6. Estos resultados nos indican que la relación observada entre la abundancia inicial estimada de Trucha arcoíris y el ciclo de umbral en donde se detectó ADN de la misma no es estadísticamente significativa.

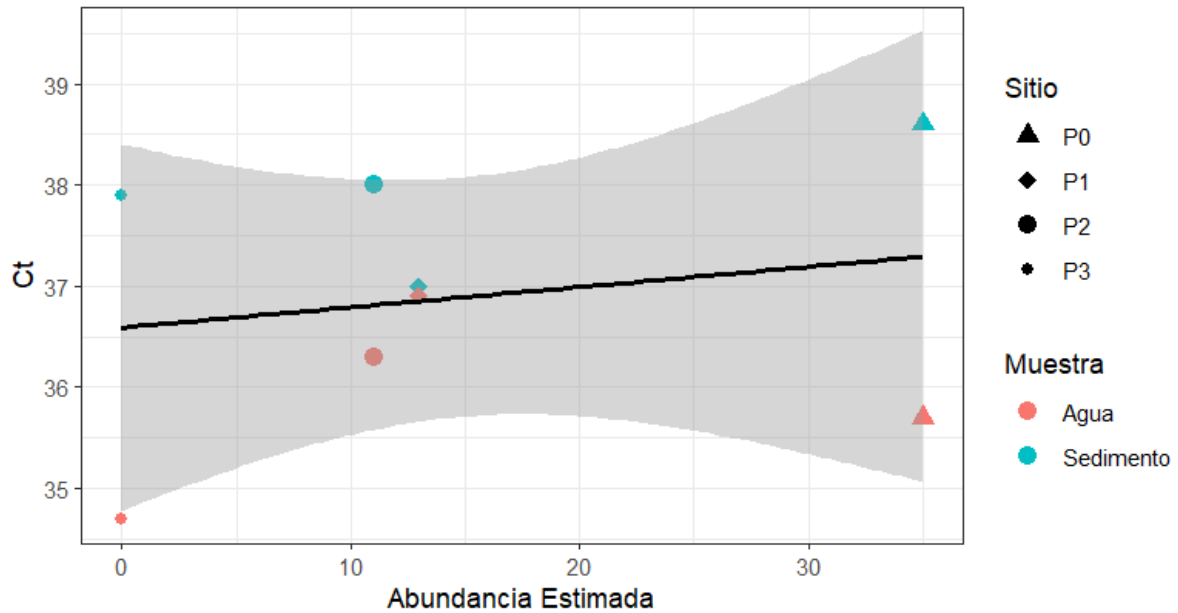


Figura 7. Regresión lineal entre la abundancia inicial estimada por el modelo de depleción y el ciclo de umbral del ensayo de qPCR específico para Trucha arcoíris. $R^2= 0.043$

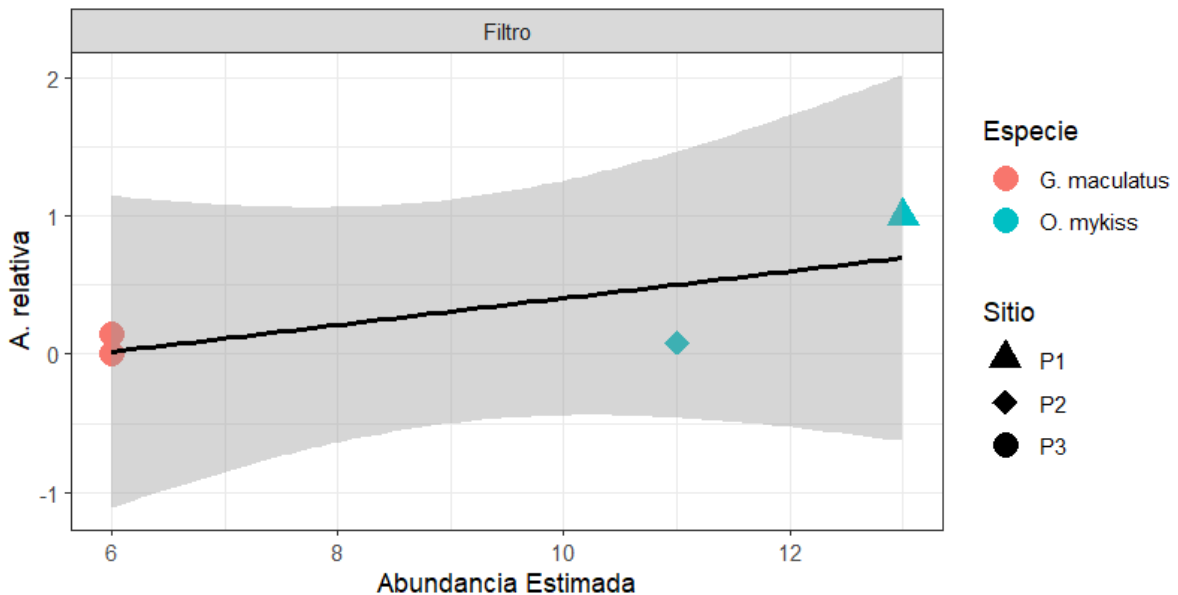


Figura 8. Regresión lineal entre Abundancia relativa de lecturas únicas (metabarcoding) y la Abundancia inicial estimada por el modelo de depleción. $R^2= 0.5591$

Por su parte, el modelo de regresión lineal para la abundancia inicial estimada y la abundancia relativa de secuencias únicas de metabarcoding de eDNA (Fig. 8) nos indica que la relación entre estas variables es levemente positiva (0.09), sin embargo esta no es significativa puesto que el valor ρ es de 0.2; El R^2 del modelo fue de 0.5591, lo que indica que aproximadamente el 55.91% de la

variabilidad en la Abundancia relativa de las secuencias únicas puede ser explicada por la variabilidad en el número de peces capturados. Sin embargo, su valor ρ de la relación entre la Abundancia estimada por el modelo de depleción y la Abundancia relativa de las secuencias únicas de metabarcoding de eDNA fue de 0.252 lo que indica que no existe una relación estadísticamente significativa. El R-cuadrado ajustado fue de 0.3; el estadístico F obtuvo un valor de 2.536 ($\rho = 0.2$) lo que indica que el modelo en su conjunto no fue significativo.

DISCUSIÓN

En esta investigación se estudió la diversidad y abundancia del ensamble de peces del estero Nonguén combinando metabarcoding de eDNA, un ensayo de qPCR específico para trucha arcoíris y estimaciones de abundancia obtenidas mediante un modelo de depleción utilizando pesca eléctrica. Nuestros resultados demuestran que la pesca eléctrica sigue siendo una de las mejores técnicas para estimar diversidad y abundancia de especies dentro de ecosistemas demográficamente cerrados, ya que detectó una mayor riqueza de especies que el método de metabarcoding de eDNA. Sin embargo, los ensayos con eDNA, debido a su sensibilidad, permitieron detectar la presencia de especies que no fueron capturadas mediante pesca eléctrica, tales como *Geotria australis* y *Percilia irwini*. Sin embargo, la relación entre la abundancia relativa proporcionada por un método de depleción y los métodos de eDNA no fue significativa. Finalmente, nuestros resultados sugieren que la implementación del eDNA en conjunto con métodos tradicionales de captura pueden proporcionar una evaluación de la comunidad de peces más completa.

Caracterización del ensamble de peces mediante pesca eléctrica

En los eventos de pesca efectuados en los puntos de muestreo dentro del estero Nonguén se capturaron 5 de las 13 especies nativas descritas para el sistema (Habit et al, 2023). Nuestros resultados indican una distribución de especies marcada a lo largo del estero, con una dominancia de las especies introducidas (*O. mykiss* y *S. trutta*) en la zona alta del estero, mientras que en sus zonas medias y baja existe una mayor prevalencia de especies nativas, cambiando la composición de estas a lo largo del estero, por ejemplo la especie *N. inermis* la encontramos sólo en las zonas medias al igual que a *P. trucha*, mientras que *G. maculatus* y *C. galusdae* sólo fueron capturadas en la zona baja a diferencia de *T. areolatus* que fue capturada tanto en zonas medias como en la zona baja. Esta distribución de las especies capturadas concuerda con lo esperado según la literatura, estudios realizados anteriormente en la cuenca han descrito un patrón de zonación con un ensamble característico de la zona ritral, en donde las aguas presentan una mejor calidad, dominado por salmónidos y otro dominado por especies nativas en los tramos más deteriorados del sistema, es decir, en sus zonas medias y bajas (Habit et al., 2003a). Con respecto a este mismo trabajo las especies *O. mykiss*, *T. areolatus*, *N. inermis* y *S. trutta* fueron capturadas anteriormente a lo largo de todo el estero, mientras que las especies *P. trucha* y *C. galusdae* son consideradas parte del grupo de especies que pueden ser encontradas en las zonas de transición o potamal, pero no en las zonas

ritrales, en tanto que la especie *Galaxias maculatus* sólo es posible encontrarla en la zona baja del estero (Habit et al., 2007). Si contrastamos esta información con nuestros resultados, llama la atención que no existió captura de las especies nativas en la zona alta del estero, lo que podría deberse a un desplazamiento propiciado por las especies invasoras. Lo cual nos lleva nuevamente a la distribución de las especies nativas en las zonas más deterioradas de los sistemas de agua dulce, que según Soto et al. (2006) funcionan como refugio para las especies nativas dada la baja abundancia de especies introducidas.

Con respecto a la abundancia de las capturas de las especies, *O. mykiss* fue la más abundante dentro del estero, seguida de *T. areolatus* y *G. maculatus*. Estos resultados también son consistentes con estudios anteriores en donde la mayor abundancia de *O. mykiss* dentro del estero se presentó en primavera en su zona ritral, sugiriendo una dominancia ya establecida de la especie en la zona protegida del Parque Nacional Nonguén presente dentro del sistema. En cuanto a las especies nativas, el bajo número de capturas observadas en los muestreos son atribuidas a la baja densidad y disponibilidad de las especies. La pérdida de la riqueza y abundancia de especies nativas a lo largo del estero ha sido estudiada por Moraga et al. (2022), en donde estudios comparativos entre campañas de terreno desde 1999 a 2018 relacionaron la drástica pérdida de la abundancia y riqueza de las especies nativas con impactos de origen antropogénico. Las alteraciones directas más drásticas se reflejaron en la zona baja o potamal del estero debido a la canalización y su cercanía con las zonas urbanas. Sin embargo, la reducción más drástica en la riqueza de especies se encontró en la zona media del estero, en donde el uso de suelo agrícola y forestal han contribuido al deterioro y a la vulnerabilidad de las especies. A esto se suma la presencia de especies introducidas a lo largo del estero cuyas riquezas han incrementado en un 100% a lo largo de los años (Moraga et al., 2022), y se ha encontrado que la presencia de especies introducidas en cuencas chilenas presentan efectos negativos en la distribución y abundancia de las especies nativas (Habit et al., 2010). Estos antecedentes se confirman con nuestros resultados dado que tanto la riqueza (Anexo 6) como la abundancia (Tabla 1) de las especies capturadas en el Estero en comparación con los resultados previos de Habit et al. (2003a) mostraron una drástica disminución en las especies nativas, y un incremento en la abundancia de las especies introducidas, por ejemplo hace 20 años atrás *O. mykiss* en el nacimiento del estero (P0) presentaba una abundancia de 14 individuos capturados tras 20 minutos de pesca eléctrica en 50 metros (Habit et al. 2003a), mientras que en la actualidad en el mismo sitio tras el mismo esfuerzo de captura (20 min en 50 metros) el número de individuos capturados aumentó a 18 individuos (Anexo 1).

Estimación de abundancia inicial y probabilidad de captura mediante el método de depleción de Carle & Strub (1978)

Sobre el método de depleción utilizado en este estudio podemos observar que no todas las especies mostraron un declive en el número de individuos capturados a medida que aumentaban las pasadas con la pesca eléctrica. La mayoría de las especies nativas, a excepción de *Trichomycterus areolatus* y *Galaxias maculatus*, presentaron sus primeras capturas recién en la segunda o tercera pasada de pesca eléctrica, indicando una baja capturabilidad de las especies. Si bien los resultados de la probabilidad de captura estimada por el modelo indicó todo lo contrario, es decir, una alta probabilidad de captura puesto que los valores eran mayor a 0.5 en casi todas las especies (Fig. 3), el intervalo de confianza de la mayor parte de los datos no fue estadísticamente significativo a excepción de las especies que presentaron un mayor número de capturas y que presentaron capturas desde la primera *run* de pesca eléctrica (e.g. *G. maculatus*, *T. areolatus* y *O. mykiss*). Por otra parte, si bien los intervalos de confianza de la Abundancia inicial estimada por el modelo de depleción presentan valores más acotados en la mayor parte de las especies es necesario ser rigurosos con la interpretación de estos resultados, puesto que los modelos de depleción utilizan la probabilidad de captura para estimar el valor de la población original.

Estos resultados también podrían sugerir un mayor esfuerzo de muestreo para poder estimar correctamente la abundancia de las especies nativas. Herigan et al. (2021) indica que más de tres pasadas de pesca eléctrica serían necesarias si el objetivo de nuestro estudio es capturar todas las especies presentes incluidas las especies con comportamientos elusivos. Sin embargo, también llegan a la conclusión de que, si sólo las especies dominantes son de importancia, una pesca eléctrica de tres pasadas estandarizadas podría ser suficiente en arroyos de baja conductividad. En este caso, esto podría explicar por qué el modelo pareciera ajustarse sólo a la especie trucha arcoíris (*O. mykiss*), y no a las especies nativas, puesto que según este y estudios anteriores, es la especie dominante del estero (Habit et al., 2003a). También cabe señalar que todos los métodos de depleción son susceptibles a la violación del supuesto de igual capturabilidad (D. Ogle, 2015), puesto que existe una heterogeneidad en las capturas asociadas al tamaño y la edad de los peces (Hedger et al., 2013; Korman et al., 2009). Estos antecedentes sugieren la implementación de un mejor diseño de muestreo para futuros estudios, donde se podrían realizar estudios piloto para conocer los comportamientos de las especies y adaptar el método de captura en función de ellas.

Detección de trucha arcoíris (O. mykiss) utilizando un ensayo de qPCR en muestras de sedimento y filtros de agua

El ensayo de qPCR específico para trucha arcoíris fue efectivo para detectar la presencia de la especie en todos los sitios de muestreo, tanto en las muestras de sedimento, como en las muestras de filtros de agua. Los resultados obtenidos indican que existe un menor Ct (número de ciclos en el que la reacción cruza el umbral de fluorescencia detectando el ácido nucleico de interés) en aquellas muestras extraídas desde filtros de agua en comparación con las extracciones de sedimento (Fig. 4). Como existe una relación inversamente proporcional entre el Ct y la concentración de ADN de una muestra, se puede establecer que las muestras de filtros de agua presentan una mayor concentración de ADN que las muestras de sedimento, resultado que fue confirmado con la ANOVA de dos vías realizada para las muestras (Tabla 3). Sin embargo, en este estudio no se pudo cuantificar la cantidad de ADN de trucha arcoíris en las muestras ambientales debido a que no se realizó una curva de calibración. Sólo podemos suponer que debido al alto número de Ct que presentaron las muestras, la concentración de ADN presente en ellas era muy pequeña. Estos hallazgos son consistentes con el estudio de Buxton et al. (2018b), en donde las muestras de agua presentaron una mayor probabilidad de detección que las muestras de sedimento. No obstante, debemos recordar que las muestras no fueron recolectadas bajo las mismas condiciones ambientales, dado que las muestras de Sedimento fueron obtenidas en Marzo 2024 y las de Agua entre los meses de Noviembre y Diciembre 2023, por lo que declarar que las muestras de Agua presentan mayor cantidad que las muestras de eDNA de Trucha arcoíris debe realizarse con cautela. Sin embargo, estos resultados también reflejan la dinámica estacional de la especie, dado que los salmónidos suelen migrar durante el verano o el otoño para reproducirse en los cursos de agua dulce. Habit et al. (2003a) documentó la presencia de ejemplares adultos reproductores durante verano y otoño en del estero, con una mayor captura de individuos en verano que otoño, lo que podría explicar nuestros resultados de la qPCR observados en nuestras muestras de sedimento y agua.

Detección de especies mediante metabarcoding de ADN ambiental

La detección de especies mediante metabarcoding de ADN ambiental en las muestras analizadas del estero Nonguén permitió identificar la presencia de 5 especies, 3 de ellas capturadas en los muestreos realizados mediante pesca eléctrica, más la presencia de 2 especies que no fueron identificadas por este método: *Geotria australis* y *Percilia irwini*, ambas especies nativas del estero

Nonguén. La detección de *P. irwini* solo se realizó en la muestra de filtro de P3 correspondiente a la zona potamal o baja del estero. Esta detección es consistente con estudios anteriores en donde la especie fue capturada en la zona de transición y potamal del estero (Habit et al., 2003a, 2007). La baja cantidad de lecturas de la especie puede deberse a: (i) baja abundancia de la especie, ya que en estudios anteriores la captura de individuos fue escasa (Habit, 2003); (ii) tamaño pequeño de la especie, puesto que el tamaño de los individuos que componen la población presente en el estero Nonguén es pequeño (Aedo et al., 2008); o (iii) diversos factores ambientales que puedan intervenir en la degradación del ADN ambiental (Barnes, 2014).

Por otra parte, la detección del ciclóstomo *G. australis* con una mayor abundancia relativa de lectura en las muestras de sedimento que en las de agua es coherente con el ciclo de vida de esta especie anádroma, puesto que en su fase larval los individuos viven enterrados en el sedimento hasta su metamorfosis (Miller et al., 2021). Esta especie ha sido anteriormente capturada dentro del estero en las zonas de transición y potamon (Habit et al., 2003b, 2007), sin embargo, su presencia en la zona alta o ritron del estero no ha sido documentada, por lo que los resultados presentes en este estudio ayudan a conocer un poco más sobre la ecología y el rango de distribución de la especie dentro del estero.

Sin embargo, una de las principales limitaciones del ADN ambiental para generar detecciones de especies en los ecosistemas está asociada al diseño de los ensayos, específicamente a la elección de los partidores. En esencia, estos deben ser universales, específicos y estar asociados a una biblioteca de referencia que permita la identificación taxonómica de las especies de interés (Collins et al., 2019). En nuestro caso, la detección de especies utilizando el partidor *MarVer3* (Valsecchi et al., 2020) que secuencia una región del gen 16S, fue baja, dado que se identificaron sólo 5 especies de las 18 descritas para el estero. Además, se detectaron otras especies no específicas del partidor como anfibios y aves, lo que sugiere que el primer utilizado amplifica secuencias de organismos no objetivo contribuyendo a la baja detección de las especies de interés. Esto resalta la necesidad de utilizar primers más específicos para las especies presentes en el estero en futuros estudios.

Uso de ADN ambiental para evaluar la abundancia relativa de peces en el estero Nonguén

Estimar la abundancia a partir de la cuantificación de eDNA es uno de los grandes objetivos de los estudios en esta materia. Diversas investigaciones han logrado establecer una correlación positiva entre las copias de lecturas de las muestras de ADN ambiental con la abundancia o biomasa de las

especies en ecosistemas naturales y en sistemas controlados (Lacoursière-Roussel et al., 2016; Rourke et al., 2022; Takahara et al., 2012; Wilcox et al., 2016). Siendo estos últimos los experimentos en donde se encontró una correlación mucho más fuerte que en los ambientes naturales (Yates et al., 2019), puesto que las condiciones ambientales (e.g. temperatura, pH, luz) son controlables. Nuestros resultados indicaron una leve relación positiva entre las muestras de eDNA y la Abundancia Inicial Estimada por el modelo de depleción. Sin embargo, los valores estadísticos presentados por el modelo de regresión lineal entre la abundancia inicial estimada y las muestras de eDNA no fue significativa para ninguna de las técnicas (qPCR y metabarcoding de eDNA) por lo que nuestra hipótesis planteada es rechazada. Aunque estos resultados ofrecen algunas perspectivas sobre el uso del eDNA para estimar la abundancia de las especies en ecosistemas naturales, es crucial interpretarlos con cautela ya que la muestra utilizada en este experimento (4 sitios de muestreo) fue muy pequeña lo que puede haber sesgado nuestros resultados.

CONCLUSIONES

La investigación llevada a cabo reveló que la pesca eléctrica sigue siendo la técnica más robusta para estimar la diversidad y abundancia de especies en comparación con el metabarcoding de eDNA puesto que fue posible capturar 8 de las 18 especies descritas en el estero, en comparación con las 5 detectadas por el eDNA. Sin embargo, este último, debido a su alta sensibilidad, permitió detectar dos especies que no fueron capturadas por la pesca eléctrica: *Geotria australis* y *Percilia irwini*. Aunque la hipótesis inicial fue rechazada, nuestros resultados reflejan la importancia de emplear ambos métodos para obtener una visión más completa de la biodiversidad de peces.

Con respecto a la abundancia y riqueza de las especies nativas, es un hecho que estas se han visto afectadas por los impactos antropogénicos dentro de la cuenca y por la presencia de las especies introducidas que aumentan cada vez más con el pasar de los años. Esto resalta la necesidad de implementar planes de conservación eficaces para la protección de la biodiversidad nativa y la mitigación de los efectos negativos de las especies introducidas.

Finalmente, es esencial que en futuras investigaciones se realice un mejor diseño de muestreo enfocados en mejorar la precisión de los métodos aquí utilizados, con el fin de obtener mejores resultados que permitan una adecuada estimación de la riqueza y abundancia de los ensambles de peces nativos.

BIBLIOGRAFÍA

- Balasingham, K. D., Walter, R. P., Mandrak, N. E., & Heath, D. D. (2018). Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology*, *27*(1), 112-127. <https://doi.org/10.1111/mec.14395>
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., & Griffiths, R. A. (2018a). Seasonal variation in environmental DNA detection in sediment and water samples. *PLOS ONE*, *13*(1), e0191737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191737>
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., & Griffiths, R. A. (2018b). Seasonal variation in environmental DNA detection in sediment and water samples. *PLOS ONE*, *13*(1), e0191737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191737>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carle, F. L., & Strub, M. R. (1978). A New Method for Estimating Population Size from Removal Data. *Biometrics*, *34*(4), 621-630. <https://doi.org/10.2307/2530381>
- Collins, R. A., Bakker, J., Wangenstein, O. S., Soto, A. Z., Corrigan, L., Sims, D. W., Genner, M. J., & Mariani, S. (2019). Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI. *Methods in Ecology and Evolution*, *10*(11), 1985-2001. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13276>
- Díaz-Ferguson, E. E., & Moyer, G. R. (2014). History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Revista de Biología Tropical*, *62*(4), Article 4. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i4.13231>
- 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>

Dyer, B. (2000). Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Estudios Oceanológicos*, 19, 77-98.

Ficetola, G. F., Manenti, R., & Taberlet, P. (2019). Environmental DNA and metabarcoding for the study of amphibians and reptiles: Species distribution, the microbiome, and much more. *Amphibia-Reptilia*, 40, 1-20. <https://doi.org/10.1163/15685381-20191194>

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology letters*, 4, 423-425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>

Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2011). Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. *PLOS ONE*, 6(7), e22746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022746>

- Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P. (2013). Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32(3), 792-800. <https://doi.org/10.1899/13-046.1>
- 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. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382006000100016>
- Habit, E., Piedra, P., Ruzzante, D. E., Walde, S. J., Belk, M. C., Cussac, V. E., Gonzalez, J., & Colin, N. (2010). Changes in the distribution of native fishes in response to introduced species and other anthropogenic effects. *Global Ecology and Biogeography*, 19(5), 697-710. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00541.x>
- Habit, E., & Victoriano, P. (2005). Peces de agua dulce de la Cordillera de la Costa. *Historia, Biodiversidad y Ecología de la Cordillera de la Costa de Chile*, 392-406.
- Habit, E., Victoriano, P., & Rodríguez-Ruiz, A. (2003a). Variaciones espacio-temporales del ensamble de peces de un sistema fluvial de bajo orden del centro-sur de Chile. *Revista chilena de historia natural*, 76(1), 3-14. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2003000100001>
- Habit, E., Victoriano, P., & Rodríguez-Ruiz, A. (2003b). Variaciones espacio-temporales del ensamble de peces de un sistema fluvial de bajo orden del centro-sur de Chile. *Revista chilena de historia natural*, 76(1), 3-14. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2003000100001>
- Habit, E., Vila, I., L, M. C., Dyer, B., Correa, C., Naretto, J., Contreras, V., Amaya, L., Naretto, J., & Contreras, V. (2023). *Fauna Íctica Nativa Continental de Chile*. <https://doi.org/10.15468/cxb957>
- Hänfling, B., Lawson Handley, L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R. C., Oliver, A., & Winfield, I. J. (2016). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 25(13), 3101-3119. <https://doi.org/10.1111/mec.13660>

Hedger, R. D., De Eyto, E., Dillane, M., Diserud, O. H., Hindar, K., McGinnity, P., Poole, R., & Rogan, G. (2013). Improving abundance estimates from electrofishing removal sampling. *Fisheries Research*, *137*, 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.09.015>

Herigan, G. M., Crane, D. P., Scott, M. C., Rohde, F. C., & Smith, D. W. (2021). Comparison of Two Fish Sampling Techniques for Low-Conductivity, Lowland Headwater Streams. *North American Journal of Fisheries Management*, *41*(6), 1781-1788. <https://doi.org/10.1002/nafm.10702>

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>

Korman, J., Yard, M., Walters, C., & Coggins, L. (2009). Effects of Fish Size, Habitat, Flow, and Density on Capture Probabilities of Age0 Rainbow Trout Estimated from Electrofishing at Discrete Sites in a Large River. *Transactions of The American Fisheries Society - TRANS AMER FISH SOC*, *138*, 58-75. <https://doi.org/10.1577/T08-025.1>

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>

Mahon, A. R., Jerde, C. L., Galaska, M., Bergner, J. L., Chadderton, W. L., Lodge, D. M., Hunter, M. E., & Nico, L. G. (2013). Validation of eDNA Surveillance Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments. *PLOS ONE*, *8*(3), e58316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058316>

Miller, A. K., Baker, C., Kitson, J. C., Yick, J. L., Manquel, P. E. I., Alexander, A., & Gemmill, 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>

MOP. (2004). *DIAGNOSTICO Y CLASIFICACION DE LOS CURSOS Y CUERPOS DE AGUA*

SEGUN OBJETIVOS DE CALIDAD: CUENCA DEL RÍO ANDALIEN.

Moraga, D., Vivancos, A., Ruiz, V., 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>

Ogle, D. (2015). *Introductory Fisheries Analyses with R*. <https://doi.org/10.1201/9781315371986>

Ogle, D. H., Doll, J. C., Powell Wheeler, A., & Dinn, A. (2023). *FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods*. <https://CRAN.R-project.org/package=FSA>

Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., Deiner, K., Mahon, A. R., Brueseke, M. A., Shirey, P. D., Pfrender, M. E., Lodge, D. M., & Lamberti, G. A. (2016). Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 6(12), 4214-4226. <https://doi.org/10.1002/ece3.2186>

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>

Piaggio, A. J., Engeman, R. M., Hopken, M. W., Humphrey, J. S., Keacher, K. L., Bruce, W. E., & Avery, M. L. (2014). Detecting an elusive invasive species: A diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 14(2), 374-380. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12180>

Piggott, M., Banks, S., Broadhurst, B., Fulton, C., & Lintermans, M. (2020). Comparison of traditional and environmental DNA survey methods for detecting rare and abundant freshwater fish. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 31. <https://doi.org/10.1002/aqc.3474>

Pont, D., Meulenbroek, P., Bammer, V., Dejean, T., Erős, T., Jean, P., Lenhardt, M., Nagel, C., Pekarik, L., Schabuss, M., Stoeckle, B. C., Stoica, E., Zornig, H., Weigand, A., & Valentini, A. (2023). Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA

metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*, 23(2), 396-409. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13715>

Pottier, G., Nevoux, M., & Marchand, F. (2020). Electrofishing eel, salmon and trout: Impact of waveform and frequency on capture-per-unit-effort and spinal damage. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, 421, Article 421. <https://doi.org/10.1051/kmae/2020034>

R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [Software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>

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. (2019a). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, 94(3), 849-873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>

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. (2019b). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews*, 94(3), 849-873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>

Reis, R., Albert, J., Di Dario, F., Mincarone, M., Petry, P., & Rocha, L. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, 89. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>

Rishan, S. T., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2023). Applications of environmental DNA (eDNA) to detect subterranean and aquatic invasive species: A critical review on the challenges and limitations of eDNA metabarcoding. *Environmental Advances*, 12, 100370. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100370>

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>

Ruiz, V. (1993). Ictiofauna del río Andalién. *Gayana Zoología (Concepción)*, 57, 109-278.

Sakata, M. K., Yamamoto, S., Gotoh, R. O., Miya, M., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2020). Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA*, 2(4), 505-518. <https://doi.org/10.1002/edn3.75>

Sanz, N., Franch, N., Araguas, R.-M., Viñas, J., & Vidal, O. (2023). Environmental DNA Assay for the Detection of the American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in the Early Stages of the Invasion in the Ebre Delta. *Animals*, 13(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ani13040683>

Seber, G. (2002). The Estimation of Animal Abundance and Related Parameters. En *Int Stat Rev* (Vol. 60).

Soto, D., Arismendi, I., González, J., Sanzana, J., JARA, F., Jara, C., GUZMAN, E., & Lara, A. (2006). Southern Chile, trout and salmon country: Invasion patterns and threats for native species. *Revista chilena de historia natural*, 79, 97-117. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2006000100009>

Stewart, D. R., Butler, M. J., Johnson, L. A., Cajero, A., Young, A. N., & Harris, G. M. (2019). Efficacy of depletion models for estimating abundance of endangered fishes in streams. *Fisheries Research*, 209, 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.09.026>

Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.038>

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789-1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>

Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. (2012). Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLOS ONE*, 7(4), e35868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035868>

Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., Orlando, L., & Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11), 2565-2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>

Tillotson, M. D., Kelly, R. P., Duda, J. J., Hoy, M., Kralj, J., & Quinn, T. P. (2018). Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*, *220*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.01.030>

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>

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, *25*(4), 929-942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>

Valsecchi, E., Bylemans, J., Goodman, S. J., Lombardi, R., Carr, I., Castellano, L., Galimberti, A., & Galli, P. (2020). Novel universal primers for metabarcoding environmental DNA surveys of marine mammals and other marine vertebrates. *Environmental DNA*, *2*(4), e72. <https://doi.org/10.1002/edn3.72>

Wilcox, T. M., Carim, K. J., McKelvey, K. S., Young, M. K., & Schwartz, M. K. (2015). The Dual Challenges of Generality and Specificity When Developing Environmental DNA Markers for Species and Subspecies of *Oncorhynchus*. *PLoS ONE*, *10*(11), e0142008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142008>

Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Jane, S. F., Lowe, W. H., Whiteley, A. R., & Schwartz, M. K. (2013). Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLOS ONE*, *8*(3), e59520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059520>

Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Sepulveda, A. J., Shepard, B. B., Jane, S. F., Whiteley, A. R., Lowe, W. H., & Schwartz, M. K. (2016). Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation*, *194*, 209-216. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.12.023>

Yates, M. C., Fraser, D. J., & Derry, A. M. (2019). Meta-analysis supports further refinement of eDNA for monitoring aquatic species-specific abundance in nature. *Environmental DNA*, 1(1), 5-13. <https://doi.org/10.1002/edn3.7>

ANEXO

Anexo 1. Variación de las características físicas y químicas de los sitios de muestreo del estero Nonguén

Parámetro	Estación de muestreo			
	P0	P1	P2	P3
Profundidad media (cm)	28	24	21	26
Profundidad máxima (cm)	58	112	41	54
Ancho cauce (m)	3 - 10	6 - 9	4 - 8	4 - 6
Temperatura (°C)	12.9 - 13	9.9 - 10	9.4	12.5
pH	7.95 - 8	6 - 7.4	6.7 - 7.3	7.1 - 7.3
Conductividad (μS cm-1)	65 - 66	58	53 - 70	70 - 83
Oxígeno disuelto (mg/L-1)	-	10 - 10.6	12.5 - 14.7	12.8 - 14
Sólidos disueltos	33	29	27 - 35	37 - 41
Turbidez	4.3 - 5.2	5.1	9 - 11.1	9.8 - 11.5
Flujo promedio	0.5	0.4	-	0.3

Anexo 2. Listado de especies capturadas mediante pesca eléctrica en el estero Nonguén y su estado de conservación.

Familia	Nombre científico	Nombre común	Origen	Categoría de conservación
Galaxiidae	<i>Galaxias maculatus</i>	Puye	Nativa	Vulnerable
Trichomycteridae	<i>Nematogenys inermis</i>	Bagre grande	Nativa	En peligro
Percichthyidae	<i>Percichthys trucha</i>	Perca trucha	Nativa	Preocupación menor
Trichomycteridae	<i>Trichomycterus areolatus</i>	Bagrecito	Nativa	Vulnerable
Characidae	<i>Cheirodon galusdae</i>	Pocha	Nativa	Vulnerable
Cichlidae	<i>Astraloheros facetus</i>	Chanchito	Introducida	-
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoíris	Introducida	-
Salmonidae	<i>Salmo trutta</i>	Trucha café	Introducida	-

Anexo 3. Datos de pesca por sitio

Sitio	Fecha de muestreo	Especie	Run	Capturas	Captura total	Esfuerzo de pesca (min)
P0	02/12/2023	<i>O. mykiss</i>	R1	18	32	20.8
			R2	9		15.1
			R3	5		14.5
		<i>Salmo trutta</i>	R1	0	1	20.8
			R2	0		15.1
			R3	1		14.5
P1	25/11/23	<i>O. mykiss</i>	R1	8	13	20.4
			R2	4		17.6
			R3	1		16.6
		<i>S. trutta</i>	R1	1	1	20.4
			R2	0		17.6
			R3	0		16.6
		<i>N. inermis</i>	R1	1	1	20.4
			R2	0		17.6
			R3	0		16.6
		<i>P. trucha</i>	R1	0	1	20.4
			R2	1		17.6
			R3	0		16.6
		<i>T. areolatus</i>	R1	0	1	20.4
			R2	0		17.6

Sitio	Fecha de muestreo	Especie	Run	Capturas	Captura total	Esfuerzo de pesca (min)		
			R3	1		16.6		
P2	08/11/23	<i>O. mykiss</i>	R1	7	11	20.1		
			R2	2		14.6		
			R3	2		11.5		
		<i>T. areolatus</i>	R1	1	2	20.1		
			R2	1		14.6		
			R3	0		11.5		
		<i>N. inermis</i>	R1	0	1	20.1		
			R2	1		14.6		
			R3	0		11.5		
		P3	10/11/23	<i>T. areolatus</i>	R1	4	10	12
					R2	5		10.8
					R3	1		11.4
<i>G. maculatus</i>	R1			4	6	12		
	R2			1		10.8		
	R3			1		11.4		
<i>C. galusdae</i>	R1			0	1	12		
	R2			1		10.8		
	R3			0		11.4		
<i>A. facetus</i>	R1			0	1	12		

Sitio	Fecha de muestreo	Especie	Run	Capturas	Captura total	Esfuerzo de pesca (min)
			R2	0		10.8
			R3	1		11.4

Anexo 4. Número de lecturas producto de la secuenciación masiva y posterior procesamiento bioinformático

Sitio	input	filtered	denoisedF	denoisedR	merged	nonchim
E0F	125214	48802	48776	48704	353	350
E0S	39086	17457	17436	17397	9294	9294
E1F	135792	70869	70852	70848	10883	10471
E1S	33072	23083	23026	23035	393	391
E2F	660466	514429	514324	513752	1837	1738
E2S	65301	24186	24149	24128	1482	1419
E3F	45643	35550	35520	35469	5189	4873
E3S	91868	38250	38195	38194	694	653

Anexo 5. Número de lecturas totales y lecturas asociadas a ictiofauna

Lecturas	P0		P1		P2		P3	
	Agua	Sedimento	Agua	Sedimento	Agua	Sedimento	Agua	Sedimento
Totales	350	9294	10471	391	1738	1419	4873	653
Asignadas a ictiofauna	5	9235	3072	5	12	559	921	8

Anexo 6. Comparación de la riqueza de especies capturadas en Habit et al. (2003) y este estudio en la cuenca del Estero Nonguén

Sitio de muestreo	Riqueza de especies	
	Habit et al. 2003	Este estudio
P0	4	2
P1	7	5
P2	7	3
P3	10	4