



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

“CARACTERIZACIÓN DE LA RIQUEZA ÍCTICA EN ECOSISTEMAS  
LACUSTRES Y FLUVIALES DE CHILE  
COMPARANDO METABARCODING DE ADN AMBIENTAL (eDNA)  
CON UN MÉTODO TRADICIONAL DE CAPTURA”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Título de Bióloga con mención medio ambiente

ROCÍO CAROLINA ESTRAGUES NÚÑEZ

Director del Seminario de Título:

Claudio Quezada-Romegialli

Co-Director: David Véliz Baeza

Septiembre de 2018

Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Rocío Carolina Estragues Núñez

“CARACTERIZACIÓN DE LA RIQUEZA ÍCTICA EN ECOSISTEMAS  
LACUSTRES Y FLUVIALES DE CHILE  
COMPARANDO METABARCODING DE ADN AMBIENTAL (eDNA)  
CON UN MÉTODO TRADICIONAL DE CAPTURA”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Bióloga con mención en Medio Ambiente

**Director Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:** \_\_\_\_\_

**Evaluador:** \_\_\_\_\_

Santiago de Chile, .....

## BIOGRAFÍA



Nací en el extremo norte de Chile, durante mi niñez y adolescencia viví en Arica, Copiapó y La Serena. En el año 2008, sin pensarlo mucho, decidí estudiar Química en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Al paso de los semestres noté el desgano de estudiar algo que te gusta, pero no te apasiona y decidí congelar. Después de un año de reflexión asumí en mí el amor profundo por la naturaleza, amor que me llevo a ver con interés y curiosidad todos los lugares donde viví, que me impulsó a ser Scout en La Serena, a disfrutar la playa, el valle, el bosque y el desierto, a valorar la vivo y lo inerte del mundo. En ese descubrimiento hallé el norte que me guio hasta Biología Ambiental, carrera a la que ingresé el año 2011 y que, a lo largo de estos años, se ha convertido en algo hermoso y desafiante, llevándome a conocer aún más nuestro país y la extensa diversidad de ecosistemas y realidades.

Fue a fines del año 2014, en el curso de Limnología impartido por la profesora Irma Vila que descubrí en los ecosistemas acuáticos la complejidad y conectividad de los ecosistemas, pensándolos desde lo molecular a lo global.

*“Necesitamos especialmente de la imaginación en las ciencias.  
No todo es matemáticas y no todo es simple lógica, también se trata de  
un poco de belleza y poesía.”*

María Montessori

*“La ciencia no sólo es una disciplina de la razón, sino también del romance  
y de la pasión.”*

Stephen Hawking

Dedicada a Magdalena, Lourdes y Maite, desde pequeñas las invito a descubrir el mundo con curiosidad y convicción de que ustedes pueden ser lo que quieran ser.

## Agradecimientos

A mis padres Filomena y Marcial por enseñarme y guiarme durante toda mi vida, por confiar en mí y darme las herramientas para ser autónoma, independiente y comprometida.

A mis hermanos Nicolás, Sebastián, Marcela y Massiel que de alguno u otra forma han contribuido a mi crecimiento personal.

A mi pareja Andrés por ser un compañero y pilar fundamental en todo este proceso.

A Claudia y Hector por su apoyo y amabilidad, a quienes admiro y considero dos personas muy especiales.

A mis Amigos y compañeros de Universidad con quienes viví momentos muy bellos, y a quienes hoy veo transformados en excelentes profesionales y personas llenas de amor y pasión por el cuidado y protección a la naturaleza

A Violeta y Francisco por acompañarme a terreno y especialmente Noemí por su ayuda y colaboración al enseñarme técnicas moleculares.

A todos los integrantes del laboratorio de Ecología y Genética molecular, especialmente a Sandra y Caren por generar un excelente ambiente en el laboratorio.

A la profesora Irma Vila por sus enseñanzas y entrega.

A Claudio Quezada-Romegialli y a David Véliz Baeza por su apoyo, confianza y compromiso al guiar este seminario de título.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	8
2.1.	Objetivo general.....	8
2.2.	Objetivos específicos .....	8
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1.	Experimento de laboratorio .....	9
3.1.1.	Montaje de Acuario.....	9
3.1.2.	Protocolo de toma de muestra ambiental .....	9
3.1.3.	Transporte y extracción de eDNA.....	10
3.1.4.	Control de calidad .....	11
3.2.	Experimento de Campo .....	11
3.2.1.	Áreas de estudio .....	11
3.2.2.	Caracterización de comunidad potencial: .....	17
3.2.3.	Toma de Muestras.....	18
3.3.	Caracterización comunitaria: Metabarcoding de eDNA .....	18
3.3.1.	Análisis bioinformático.....	19
3.4.	Comparación de metodologías: eDNA y Pesca eléctrica .....	21
3.4.1.	Ecosistemas Lénticos y Acuario Control.....	21

3.4.2. Ecosistema Lótico .....	21
IV. RESULTADOS .....	22
4.1. Experimento de laboratorio: Protocolo de toma de muestras ambientales y detección de eDNA de peces .....	22
4.2. Experimento de campo .....	23
4.2.1. Detección de especies ícticas desde eDNA .....	23
4.2.2. Detección de especies en sistemas lénticos: Lago Chungará y Laguna Paquisa.....	26
4.2.3. Detección de especies en ecosistemas lóticos: Cuenca del Río Maipo .....	28
V. DISCUSIÓN.....	34
5.1. Método de muestreo de eDNA.....	35
5.2. Detección de especies y comparación de ambas metodologías .....	36
5.3. Aproximación técnica al uso del marcador COI y los partidores de Universales. ....	39
5.4. Valor para la conservación.....	44
VI. CONCLUSIONES .....	47
VII. BIBLIOGRAFIA .....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Coordenadas y altura de los dos ecosistemas lénticos estudiados del Altiplano Chileno .....	11
Tabla 2: Coordenadas, altura y metodología usada de los puntos de muestreo en cada área natural dentro de la cuenca del Río Maipo .....	15
Tabla 3. Calidad y concentración de eDNA obtenidas experimento de laboratorio.....	22
Tabla 4. Número de lecturas producto de secuenciación masiva y posterior procesamiento bioinformático.....	24
Tabla 5: Matriz de distancia entre OTUs del género Cheirodon detectadas en Acuario Control.....	26
Tabla 6: Distancia entre OTUs de género Trichomycterus detectadas en la Laguna Paquiza .....	27
Tabla 7: Presencia (1) y ausencia (0) de especies detectadas en la cuenca del Río Maipo con eDNA de acuerdo con lo esperado .....	33
Tabla 8: Presencia (1) y ausencia (0) de especies detectadas en la cuenca del río Maipo con pesca eléctrica en relación con lo esperado .....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Equipo de filtración manual.....	10
Figura 2 : Mapa con puntos de muestreo en Altiplano de la Región de Arica y Parinacota... ..	12
Figura 3: Fotografía de Punto de muestreo en el Lago Chungará.....	13
Figura 4: Fotografía de punto de muestreo en la Laguna Paquisa.....	13
Figura 5 Mapa con puntos de muestreo en la cuenca del Río Maipo.....	14
Figura 6: Fotografía de área alta Estero El Manzano (EM) .....	15
Figura 7: Fotografía de punto Muestreado en Río Clarillo (RC) .....	15
Figura 8: Fotografía de punto muestreado en Canal en Fundo Miraflores, Isla de Maipo .....	16
Figura 9: Fotografía del punto de muestreo en Río Mapocho el Monte (RM) .....	17
Figura 10: Fotografía de Estero Cholqui .....	17
Figura 11: Fotografías de ecosistemas muestreados en Melipilla. ....	17
Figura 12: Procesamiento Bioinformático de metabarcoding de ADN ambiental.....	19
Figura 13: Gel de agarosa de PCR en duplicado con partidores 12S .....	23
Figura 14: Porcentaje de lecturas clasificadas como taxa de peces presentes en el Acuario Control y número de individuos por especie.....	25
Figura 15: Porcentaje de lecturas de la secuenciación masiva por taxón de pez detectado en el Lago Chungará.....	26
Figura 16: Porcentaje de lecturas de cada de OTUs clasificado como pez y abundancia estimada para cada taxa presente en la Laguna Paquisa.....	27
Figura 17: Especies detectadas mediante Pesca eléctrica y metabarcoding de ADN ambiente en la Cuenca de río Maipo. ....	28

Figura 18: Riqueza Especifica detectada en cuenca del Río Maipo en las áreas alta, media y refugio .....	30
Figura 20: Riqueza especifica detectada la Cuenca del Río Maipo en los tres puntos muestreados en el área media inferior. ....	31
Figura 19: Diagrama de venn de EM RC y CIM. ....	32
Figura 21: Diagrama de venn RM y ME. ....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

pb	Pares de bases
ADN	Ácido desoxirribonucleico
eDNA	ADN ambiental o environmental DNA
COI	Citocromo Oxidasa I
AC	Acuario Control
PCR	Polymerase Chain Reaction
SEIA	Servicio de Evaluación de Impacto Ambiental
EIA	Estudio de Impacto Ambiental
DIA	Declaración de Impacto Ambiental
NGS	Next Generation Sequencing
OTU	Operational Taxonomic Unit (en español Unidad Taxonómica Operacional)
sp.	Una especie en singular
spp.	Varías especies en plural

Muestras ambientales = Muestras de ADN ambiental = muestras de eDNA

## RESUMEN

Conocer la composición y riqueza de especies que componen un ecosistema dado es uno de los factores más relevantes al realizar estudios de biodiversidad, tanto como para satisfacer los requerimientos legales, como por su valor intrínseco, único e incalculable. Los estudios que contienen información sobre la riqueza y composición íctica en ecosistemas acuáticos continentales se realizan habitualmente con un equipo de pesca eléctrica que deja inconsciente a los peces y estos se pueden capturar e identificar, metodología sesgada por el esfuerzo de muestreo, abundancia y tamaño corporal de los peces, además de ser potencialmente mortal. En los últimos años, se ha usado el ADN extraído desde una muestra ambiental de agua para detectar la presencia de macroorganismos en sistemas acuáticos (e.g. peces, anfibios, macroinvertebrados). Utilizando herramientas de genómica comunitaria, se realiza la técnica de metabarcoding en muestras de ADN ambiental, que consiste en amplificar mediante PCR una porción específica del ADN comunitario usando partidores universales, para secuenciar de forma masiva con tecnologías de próxima generación (Next Generation Sequencing, NGS). En este estudio se evaluó la riqueza y composición íctica en dos ecosistemas lénticos del altiplano chileno y en seis puntos lo largo de la cuenca del Río Maipo realizando metabarcoding del gen COI (Citocromo Oxidasa I) en muestras de ADN ambiental y se comparó lo obtenido con la metodología estándar de pesca eléctrica. Además, se evaluó el desempeño de estas metodologías al comparar la riqueza y composición esperada con información de capturas históricas y recientes. Los resultados mostraron que el metabarcoding de ADN ambiental es una herramienta altamente

sensible al detectar igual o mayor riqueza que lo obtenido con pesca eléctrica y detectando los taxa esperados en los ecosistemas estudiados. Un aspecto relevante es que se pudo (i) identificar y diferenciar las especies crípticas *Trichomycterus areolatus* y *Trichomycterus maculatus*, (ii) detectar al bagre *Nematogenis inermis* (EN) y (iii) detectar a especies exóticas invasoras tales como *Salmo trutta* y *Oncorhynchus mykiss*. Estos resultados sugieren que el metabarcoding de ADN ambiental es una herramienta con el potencial de aumentar la tasa de detección de especies raras, crípticas, en baja abundancia y/o exóticas en ecosistemas acuáticos continentales de Chile, pudiendo ser en el futuro un elemento importante para el monitoreo de la diversidad con bajo impacto.

## ABSTRACT

Knowing species composition and richness of an ecosystem is one of the key issues in biodiversity studies, to satisfy legal requirements and due to its intrinsic, unique and incalculable value. Studies that contain information about fish species composition and richness in freshwater environments are usually made using an electrofishing equipment. This technique paralyzes fish, and afterwards they can be captured and identified. Unfortunately, this method is biased by sampling effort, body size and abundance, and can be life threatening for fish. In recent years, DNA extracted from an environmental sample of water has been used to detect the presence of macroorganisms in aquatic systems (e.g. fish, amphibians and macroinvertebrates). Using a community genomic approach with environmental DNA (eDNA), the metabarcoding technique consists in amplify a small portion of community DNA through conventional PCR using universal primers, and then sequencing the PCR product using next-generation sequencing technologies (NGS). After a series of computational steps, the identity and taxonomy of each sequence within samples can be known. In this study, fish richness and composition was evaluated with metabarcoding of the gen COI (cytochrome c oxidase subunit I) in two lentic ecosystems of the Chilean Altiplano and from six sites along the Maipo river basin. Number of species obtained through metabarcoding was compared to what was obtained using electro-fishing. Additionally, performance of these methodologies was evaluated by comparing observed with expected richness and composition, as reviewed by data gathered through historical and recent fish survey. Results showed that eDNA metabarcoding is a highly sensitive tool that detects equal or greater species richness than electrofishing, and all expected taxa were identified in the ecosystems studied. It is

noteworthy to mention that (i) the cryptic species *Trichomycterus areolatus* and *Trichomycterus maculatus* could be identified and differentiated, (ii) the catfish *Nematogenis inermis* (EN) and (iii) the invasive alien species such as *Salmo trutta* and *Oncorhynchus mykiss* could be also detect. These results suggest that environmental DNA metabarcoding is a promising tool with potential to increase detection rates of rare, cryptic, low abundance and exotic species in freshwater ecosystems in Chile, which could be, in the near future, an important element for monitoring diversity with low impact.

## I. INTRODUCCIÓN

La diversidad biológica o biodiversidad es un concepto que se refiere a la variedad y variabilidad entre los organismos vivos y los complejos ecológicos donde estos se encuentran (OTA, 1987). Ésta es una característica de los sistemas biológicos que puede ser evaluada en distintos niveles jerárquicos, siendo posible establecer la diversidad genética inter e intra-especie, la diversidad de especies, poblaciones, comunidades, ecosistemas hasta llegar a la diversidad a nivel de paisaje. Además, al momento de evaluar la biodiversidad de un ecosistema se reconocen tres atributos principales o marcos: composición, estructura y función (Noss, 1990), pudiendo ser evaluados en cada uno de los niveles jerárquicos y de organización, y que en conjunto determinan y constituyen la biodiversidad de un área dada (Franklin y col., 1981).

El evaluar correctamente la biodiversidad es primordial para entender los efectos que tiene la actividad humana sobre el paisaje a nivel mundial. Ya que la biodiversidad es un concepto complejo, al ser evaluable desde tantas aristas puede ser difícil de entender y aún más difícil de valorar, por lo que muchas veces se comete el error de subestimar su importancia, al no considerar que tanto los componentes presentes en un sistema como sus interacciones y procesos constituyen un pilar fundamental para el funcionamiento de las comunidades. Junto a esto, la utilización y explotación extensiva de los recursos naturales ha llevado a una situación de crisis mundial en la que se enfrenta la pérdida de biodiversidad, la degradación de los ecosistemas, la disminución de los servicios ecosistémicos y la pérdida de especies. Convirtiendo a la conservación de la biodiversidad en uno de los mayores desafíos que se enfrentan en la actualidad.

En nuestro País, la Constitución Política de 1980 en el artículo 19 n° 8 establece: “El derecho a vivir en un medio ambiente libre de contaminación” y que “Es deber del Estado velar para que este derecho no sea afectado y tutelar la preservación de la naturaleza.” Esta garantía estatal es el primer eslabón de la legislación ambiental en Chile, la cual se ha robustecido luego de la Cumbre Mundial de Río de Janeiro (1992) donde Chile adscribió el Convenio sobre Diversidad Biológica, dando pie a la promulgación de la ley 19.300 sobre Bases Generales del Medio Ambiente y al Reglamento del Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (SEIA). Esta Base General constituye el marco legal que busca evaluar los proyectos o actividades que sean susceptibles a causar impacto ambiental y establece cuales actividades y proyectos deberán ser sometidos a evaluación de impacto ambiental a través del SEIA. Dependiendo de la envergadura del proyecto o actividad, se llevará a cabo en el proceso de evaluación ambiental una Declaración de Impacto Ambiental (DIA) o un Estudio de Impacto Ambiental (EIA). Por lo tanto, de acuerdo al artículo 11 de la ley, deberán realizar un EIA todos aquellos proyecto o actividades que causen “Efectos adversos significativos sobre la cantidad y calidad de los recursos naturales renovables, incluidos el suelo, agua y aire y aquellos que se localicen próximos a poblaciones, recursos y áreas protegidas, sitios prioritarios para la conservación, humedales protegidos y glaciares, susceptibles de ser afectados, así como el valor ambiental del territorio en que se pretende emplazar”. En el artículo 12 de la misma ley se indica que el EIA deberá incluir una Línea de base, la que debe contener una descripción detallada de todos los componentes bióticos y abióticos que puedan ser afectados por dicho proyecto o actividad y contener un plan de seguimiento de las variables ambientales relevantes, teniendo especial atención en la cantidad de fauna silvestre intervenida y/o alterada además del estado de conservación en el que se encuentren dichas especies.

Pese a los esfuerzos legales, políticos y acuerdo internacionales a los que ha suscrito Chile, el escenario actual es similar a lo que ocurre a nivel mundial ya que la pérdida histórica de especies atribuible a la actividad humana ha persistido (e.g. Gay, 2001), sin tener aún una metodología clara que permita describir de forma precisa la diversidad de especies presentes en un lugar determinado y sus variaciones en el tiempo.

Dentro de todos los ecosistemas amenazados a nivel mundial, los ecosistemas acuáticos continentales y la diversidad de especies que estos albergan son los que se encuentran bajo mayor amenaza (MEA, 2005), debido a la pérdida continua de hábitats a través de cambios en el uso de suelos, construcción de represas, contaminación del agua, minería, urbanización y malas prácticas agrícolas, además de la sobrepesca la que ha causado disminuciones rápidas, amenazando de extinción a muchas especies, principalmente de peces (Reis y col., 2003; Barletta y col., 2010).

En términos de área, los ecosistemas acuáticos continentales representan el 0,8% de la superficie terrestre, conteniendo cerca del 6% de la diversidad de especies a nivel mundial (Dudgeon y col., 2006). En Sudamérica se ha descrito aproximadamente un tercio de la diversidad de peces continentales conocidas, existiendo alrededor 5160 especies, 739 géneros, 69 familias y 20 ordenes (Reis y col., 2016). En Chile, esta alta diversidad de peces a nivel continental no se ve reflejada, lo que se debería, principalmente a las características geográficas, salinas, edáficas y climáticas de los ecosistemas límnicos de nuestro país. Estando descritas 43 especies, 17 géneros, 11 familias pertenecientes a 7 órdenes de peces actinopterigios (Vila & Quezada-Romegialli, 2018), caracterizados por sus tamaños corporales pequeños, mantener rasgos primitivos y poseer un alto grado de endemismo (Campos y col., 1993; Ruiz & Berra, 1994; Vila y col., 1999). De estas especies, el 80% se encuentran amenazadas y

más de la mitad es considerado en peligro de extinción (MMA, 2007, Habit y col., 2006, Campos y col., 1998). Además, se describe la presencia de 28 especies de peces exóticos asilvestrados/naturalizadas (PNUD, 2017), siendo la presencia de especies introducidas una de las mayores causas de la declinación de especies nativas (Naiman y col., 2006).

Considerando lo anterior, resulta evidente que evaluar la biodiversidad de un ecosistema es algo fundamental, tanto por satisfacer los requerimientos legales como para establecer las medidas y planes de manejo que garanticen la conservación de las especies. En este contexto, conocer la composición y riqueza de especies es uno de los pasos principales para realizar estudios de biodiversidad en un ecosistema dado. Los estudios que contienen información sobre la composición íctica de los ecosistemas límnicos se realizan usando, generalmente, un equipo de pesca eléctrica, método considerado no invasivo y que consiste en generar pulsos de descarga eléctrica dentro del agua con una batería de 12V la cual deja inconsciente a los peces y si estos tienen el tamaño adecuado pueden ser capturados utilizando una red. Esta metodología es cuestionable, por un lado, puede llevar a subestimar la riqueza de un ecosistema, ya que el éxito de captura depende del esfuerzo de muestreo y la abundancia (Reynolds y col., 2003), además, desde el punto de vista ético resulta no ser un método del todo inocuo o no invasivo ya que puede ser nocivo para los peces, dependiendo su efecto de factores como del tamaño corporal, la especie y los ciclos de descarga eléctrica que se apliquen, estando descrito que la utilización de pesca eléctrica puede causar hemorragia, daño espinal y en los peores casos la muerte (Dolan & Miranda, 2004).

En las últimas décadas se ha usado una aproximación basada en el ADN ambiental (en adelante eDNA por sus siglas en inglés) presente en muestras de agua para detectar la

presencia de especies en diversos ecosistemas acuáticos, donde se extrae el ADN comunitario para estudiar su composición genética. Inicialmente esta perspectiva permitió la descripción de comunidades microscópicas desde eDNA proveniente de una muestra de agua (e.g. Venter y col. 2004), pero Ficetola y col. (2008) detectaron ADN de rana toro (*Lithobates catesbeianus*) a partir de una muestra ambiental y desde entonces el eDNA ha sido utilizado para la detección de macroinvertebrados (e.g. Douglas y col., 2012; Vamos y col., 2017; Elbrecht y col., 2017) y vertebrados presentes en ecosistemas acuáticos de variadas partes del mundo (Rees y col., 2014). Utilizando un enfoque grupo o especie específico, basados en pruebas moleculares como PCR y RFLP, se ha logrado establecer la presencia/ausencia y distribución de especies exóticas en sus estados tempranos del proceso de invasión, como también la detección de especies amenazadas que se encuentran en muy baja abundancia dentro de ecosistemas acuáticos continentales (Goldberg y col., 2013; Wilcox y col., 2013; Laramie y col., 2015; Clusa y col., 2017). Por otro lado, desde la perspectiva de la genómica comunitaria (o metagenómica) se ha usado el metabarcoding de ADN ambiental, metodología que permite hacer un escaneo simultáneo de toda la comunidad biológica a partir de eDNA (e.g. Miya y col. 2015; Zaiko y col. 2015). Esta aproximación se basa en que la identificación de las especies se puede inferir en base a criterios genéticos (e.g. gen COI, 12S o 16S), al considerar que ciertas porciones del genoma de los seres vivos serían lo suficientemente conservadas entre organismos emparentados para relacionarlos entre ellos, por ejemplo: de un mismo orden o familia, pero lo suficientemente variables para diferenciar a nivel de género y/o especies. Dichas porciones son usadas como un marcador molecular que es secuenciado y usado como código de barras genético, que permite identificar y asignar la taxonomía a un individuo a partir de su ADN (en inglés "DNA barcoding") (Cristescu, 2014), sin considerar necesariamente criterios

morfológicos. El metabarcoding de eDNA consiste en amplificar mediante PCR una porción específica del ADN comunitario usando partidores universales, para luego secuenciar miles o millones de fragmentos de ADN en forma paralela a través de secuenciación masiva con tecnologías de próxima generación (Next Generation Sequencing, NGS), las secuencias obtenidas son procesadas y, luego de una serie de pasos bioinformáticos, la identidad y taxonomía de cada secuencia es conocida (Goodwin y col., 2016; Thermes, 2014). Bajo esta aproximación Hänfling y col. (2016) lograron detectar a catorce de las dieciséis especies descritas en tres lagos de Inglaterra en relación a cuatro capturadas mediante redes de pesca. Goldberg y col. (2016) han indicado que el uso de código de barras genéticos en muestras de eDNA tendría el potencial de estimar la biodiversidad de forma más precisa, aumentar los datos disponibles sobre la aparición de especies raras o en peligro de extinción y permitir la detección temprana de especies invasoras.

Dada la alta sensibilidad que tendría el metabarcoding de eDNA, el procedimiento de toma de muestras debe ser el adecuado para evitar la contaminación entre sitios de muestreo y además que garantice la integridad del ADN. Para esto existen variadas metodologías, por ejemplo: se puede tomar la muestra de agua en terreno en botellas estériles, preservar en frío para luego filtrar en laboratorio y extraer el ADN con un kit comercial (Hänfling y col., 2016; Clusa y col., 2017) o filtrar en terreno y conservar el filtro en hielo, hasta llegar al laboratorio para luego proceder a extraer el eDNA. Lamentablemente, por las características geográficas de Chile, muchos ecosistemas acuáticos continentales se encuentran en sitios remotos donde el acceso a refrigeración o a un laboratorio es limitado o imposible, siendo así necesario establecer una metodología de toma de muestras ambientales que permita filtrar y preservar las

muestras in situ, evitando la contaminación entre sitios de muestreo. Renshaw y col. (2015) proponen utilizar el buffer Longmire (Longmire y col. 1997) para mantener muestras filtradas a temperatura ambiente, y luego extraer el ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico método que entregaría un mayor número de copias de ADN por muestra en comparación a kits de extracción.

Queda mucho trabajo por realizar principalmente ajustando técnicas y evaluando la efectividad de su uso en diferentes sistemas. Por ejemplo, en sistemas lénticos, la difusión del ADN ambiental puede ser limitada (Takahara y col., 2012) lo cual permitiría realizar buenas estimaciones de diversidad, sin embargo, en sistemas lóticos, la tasa de detección de especies podría ser alta, pero las inferencias espaciales pueden ser inciertas.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Considerando la alta sensibilidad que puede tener el metabarcoding de ADN ambiental, se espera que la diversidad de peces detectada desde muestras de ADN ambiental procedentes de ecosistemas lénticos y lóticos sea mayor o igual a una cuantificación de diversidad obtenida por un método tradicional de captura, en este caso: pesca eléctrica.

### 2.1. Objetivo general

Caracterizar y estimar la diversidad de peces nativos y exóticos en ecosistemas lénticos y lóticos de Chile usando una herramienta de muestreo no invasiva basada en eDNA, un método tradicional de captura (pesca eléctrica) e información histórica.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Evaluar si el protocolo de toma de muestras de ADN ambiental (eDNA) y esterilización del equipo de muestreo basado en Hänfling y col. (2016) permite evitar la contaminación entre muestras.
2. Determinar si el método de extracción y purificación de eDNA desarrollado por Renshaw y col. (2015) garantiza la integridad del ADN y permite detectar ADN de peces.
3. Describir la diversidad de especies ícticas en ecosistemas lénticos y lóticos utilizando una metodología tradicional de captura y compararla con una metodología basada en ADN ambiental
4. Describir la diversidad y composición íctica potencial en cada ecosistema, y comparar con lo obtenido con el método de captura tradicional y con metabarcoding de ADN ambiental.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Experimento de laboratorio

##### 3.1.1. Montaje de Acuario

Con el fin de establecer sí el protocolo planteado permite la detección de especies de peces en un sistema controlado, se montó un acuario control de composición conocida, compuesto por especies pertenecientes a cuatro familias de peces, cuatro individuos de *Cheirodon galusdae* (Pochas; Characiformes, Characidae), dos *Percilia irwini* (Carmelitas; Centrarchiformes, Perciliidae) y cinco individuos de *Bullockia maldonadoi* (Bagres; Siluriformes, Trichomycteridae). Estos fueron ubicados en un acuario de 20L a temperatura ambiente donde se les alimentó con productos de uso comercial, como hojuelas y tubifex deshidratado.

##### 3.1.2. Protocolo de toma de muestra ambiental

Para obtener la muestra ambiental es necesario filtrar agua para concentrar el ADN en un filtro de papel y proceder con la extracción. Para esto, se utilizó un equipo de filtración (Figura 1) compuesto por un embudo de filtración Nalgene de 250 ml y una bomba de vacío manual, el que fue esterilizado previo a la toma de muestras con luz UV durante 15 min. La filtración fue realizada en cuadruplicado con filtros estériles de celulosa nitrato de 47 mm de diámetro y poro de 0,45  $\mu\text{m}$  en sala de acuarios, para emular fuentes de contaminación posibles en terreno. El procedimiento consistió en realizar un control negativo filtrando 500 ml de agua milliQ, luego se tomó una muestra de agua de 1 l desde el acuario con una botella de vidrio

estéril y se filtró en el embudo de filtración previamente ambientado por inmersión. El equipo de filtración se esterilizó durante 10 min por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10%, luego se lavó vigorosamente con detergente de laboratorio Alcotabs (Alconox, Inc.) y se enjuagó con agua ultrapura ThermoFisher-UV (Hänfling y col., 2016). Este procedimiento fue repetido cuatro veces, obteniéndose cuatro controles negativos (C1, C2, C3 y C4) y cuatro muestras del acuario (M1, M2, M3 y M4).



Figura 1: Equipo de filtración manual. Compuesto por: 1.- Embudo de Filtración Nalgene de 250ml. 2.- Bomba de vacío manual. 3.- Piseta con detergente Alcotabs diluido en agua ultrapura. 4.- Piseta Agua ultrapura. 5.- Dilución de Hipoclorito comercial al 10%.

### 3.1.3. Transporte y extracción de eDNA

Los filtros obtenidos con el ADN fueron guardados a temperatura ambiente en tubos estériles de 2 ml, fijados buffer de lisis Longmire (Longmire y col. 1997) y trasladados al laboratorio para luego extraer y purificar el eDNA utilizando el método de extracción manual con Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamilico (PCI) y purificación con etanol al 70% (Renshaw y col. 2015). Finalizado el proceso se midió la calidad y concentración del ADN con el espectrofotómetro NanoDrop-1000 (Thermo Scientific).

### 3.1.4. Control de calidad

Para evaluar que el protocolo de limpieza del equipo de filtración, toma de muestras y extracción de eDNA es adecuado para detectar ADN de peces y evitar la contaminación entre muestras, se amplificó una porción de 212 pb del gen 12S usando los partidores clase específico para peces MiFish-U (Miya y col., 2015) tanto en las muestras como en controles provenientes del acuario.

## 3.2. Experimento de Campo

Se caracterizó la riqueza de la comunidad de peces en ecosistemas acuáticos continentales usando: eDNA, un método tradicional de captura (pesca eléctrica) y/o datos históricos de literatura, de tal forma de poder comparar y evaluar la información entregada por estas metodologías.

### 3.2.1. Áreas de estudio

#### 3.2.1.1. Ecosistemas lénticos:

Dos ecosistemas lénticos en el altiplano de la región de Arica y Parinacota (Figura 2, Tabla 1). Fueron estudiados tomando muestras de estos sitios entre el 29 de septiembre y el 2 de octubre del 2016.

Tabla 1: Coordenadas y altura de los dos ecosistemas lénticos estudiados del Altiplano Chileno

Punto de Muestreo	Coordenadas	Altura (m.s.n.m)	Metodología usada
Lago Chungará (LCH)	(18°13'S – 69°18'W)	4564	eDNA
Laguna Paquisa (PA)	(18°41'S – 69°06'W)	4180	eDNA + Pesca eléctrica

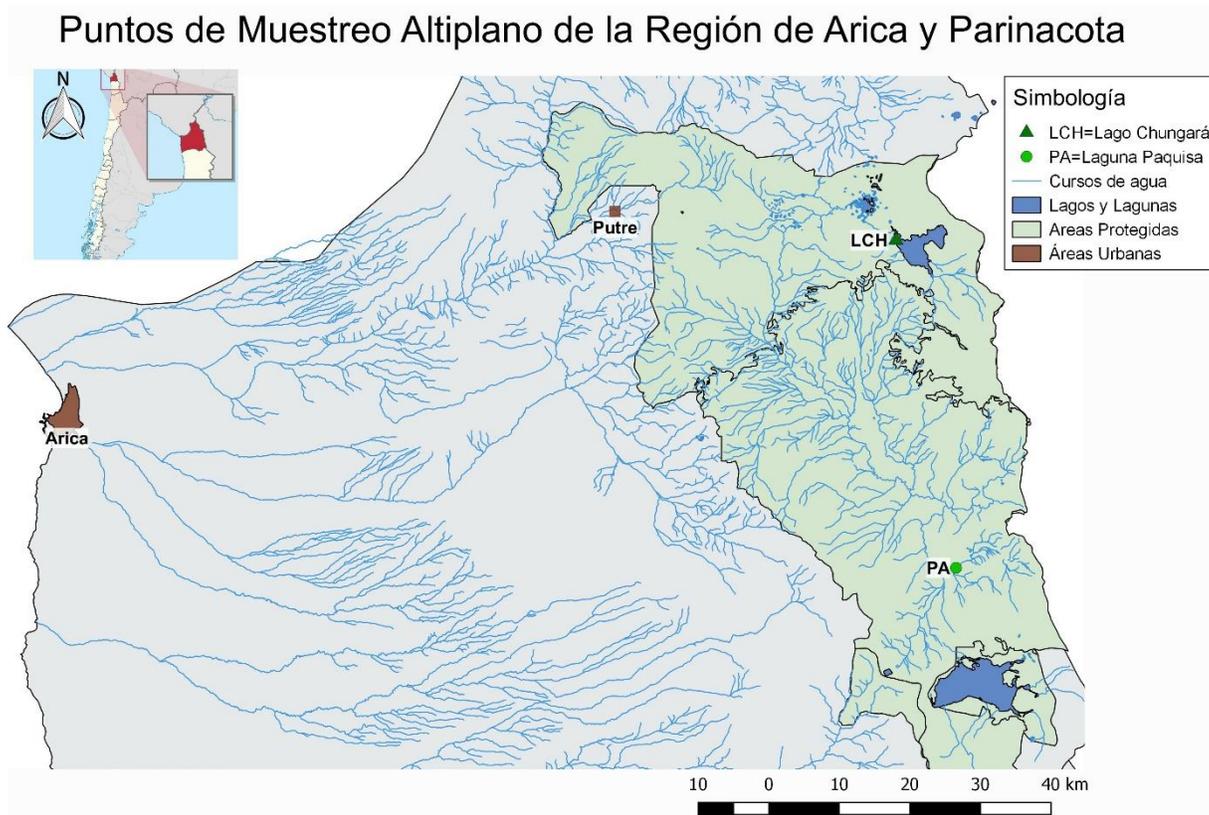


Figura 2 : Mapa con puntos de muestreo en Altiplano de la Región de Arica y Parinacota. LCH: Lago Chungará. PA: Laguna Paquisa. El símbolo indica la metodología usada en cada punto. ▲ : Sólo se realizó toma de muestra ambiental (eDNA) ● : Pesca eléctrica y Muestra ambiental (eDNA).

El Lago Chungará (Figura 3) ubicado a 4.500 m.s.n.m, es un lago de origen volcánico, que recibe las aguas del río homónimo y posee reservas importantes de flora y fauna autóctonas (CONAMA 2008). Es un sistema con baja intervención humana, con la presencia documentada de una especie introducida durante la década de 1990: *Oncorhynchus mykiss* y una especie endémica *Orestias chungarensis*.



Figura 3: Fotografía de Punto de muestreo en el Lago Chungará.



Figura 4: Fotografía de punto de muestreo en la Laguna Paquisa

A 54 km al sur de este Lago se encuentra la Laguna Paquisa (Figura 2 y Figura 4) ubicada a 4.180 m.s.n.m. Esta es una laguna alto andina caracterizada por la baja intervención humana, ausencia de especies invasoras y la presencia de dos taxa de peces: *Orestias* sp. y el género *Trichomycterus*

#### 3.2.1.2. Ecosistemas lóticos:

Seis puntos a lo largo de la cuenca hidrográfica del Río Maipo en la Región Metropolitana (Figura 5 y Tabla 2) fueron muestreados durante tres jornadas de terreno entre el 24 y 27 de enero de 2017, visitando 3 sitios por día. Esta cuenca se caracteriza por ser un sistema altamente intervenido, siendo el río Maipo la principal fuente de agua de la Región Metropolitana, abasteciendo alrededor del 70% de demanda actual de agua potable y cerca de un 90% de las demandas de regadío (DGA 2004). En este río se han descrito nueve especies nativas, de las cuales una se cree extinta dentro de la cuenca, y el resto son clasificadas como especies casi amenazadas, vulnerables o en peligro de extinción (Anexo 1); además existen ocho especies exóticas invasoras, entre las que destacan *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss* y *Cyprinus carpio*, las que están consideraras dentro de las “100 peores especies exóticas invasoras del Mundo”, lista de

especies exóticas, que incluye aquellas especies que causan impactos negativos graves sobre la diversidad biológica y/o las actividades humanas (Lowe y col., 2000).

### Puntos de Muestreo en la Cuenca de Río Maipo

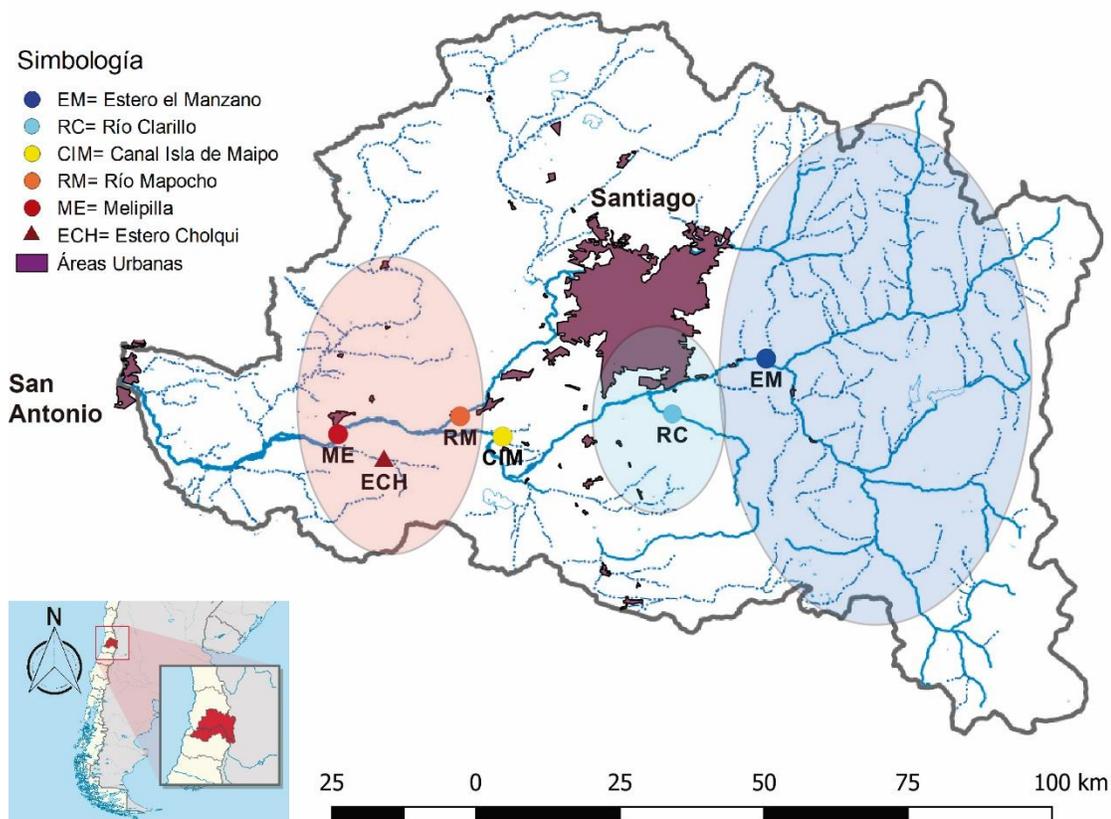


Figura 5: Mapa con puntos de muestreo en la cuenca del Río Maipo. Óvalos: Área alta (azul) Área media (celeste), Área refugio (amarillo) y Área media-inferior (rojizo). Puntos: **EM**: Estero el Manzano, **RC**: Río Clarillo, **CIM**: Canal de regadío en Isla de Maipo, **RM**: Río Mapocho, **ME**: Río Maipo en Melipilla y **ECH**: Estero Cholqui. El símbolo indica la metodología usada en cada punto ▲: Sólo se realizó toma de muestra ambiental (eDNA) ●: Pesca eléctrica y Muestra ambiental (eDNA).

Los sitios de muestreo dentro de la cuenca del río Maipo fueron clasificados de acuerdo con el área natural donde se emplazan, definidas por las características físicas y químicas del agua, como también por las condiciones fisiográficas y biológicas (Duarte y col. 1971); siendo posible catalogar 4 áreas (Tabla 2):

Tabla 2: Coordenadas, altura y metodología usada de los puntos de muestreo en cada área natural dentro de la cuenca del Río Maipo

Área Natural	Punto de Muestreo	Coordenadas	Altura (m.s.n.m)	Metodología usada
Área Alta	Estero el Manzano (EM) **	(33°34'S – 70°24'O)	912	eDNA + Pesca
Área Media	Río Clarillo (RC) **	(33°40'S – 70°34'O)	666	eDNA + Pesca
Área Refugio	Canal Isla de Maipo (CIM)**	(33°43'S – 70°54'O)	328	eDNA + Pesca
Área Media – Inferior	Río Mapocho (RM)**	(33°41'S – 70°59'O)	293	eDNA + Pesca
Área Media – Inferior	Melipilla (ME)*	(33°43'S – 71°21'O)	151	eDNA + Pesca
Área Media – Inferior	Estero Cholqui (ECH) **	(33°46'S – 71°07'O)	183	eDNA

(\*) Punto ubicado en curso principal, (\*\*) Punto ubicado en Afluente

*Área alta* dónde se muestreo el estero El Manzano (EM, Figura 6), un afluente del río Maipo caracterizado por poseer aguas claras que frecuentemente se remansan en grandes pozones rocosos que permiten el asentamiento de gran cantidad de larvas de insectos y otros invertebrados, así como de vegetación acuática superior (Duarte y col. 1971).



Figura 6: Fotografía de área alta Estero El Manzano (EM)



Figura 7: Fotografía de punto Muestreado en Río Clarillo (RC)

El *área media*, acá las características del ecosistema se ven modificadas y la diversidad de especies ícticas esperables aumenta, en esta zona se muestreó un afluente del Maipo correspondiente a río Clarillo (RC, Figura 7), el cual se encontraba reducido a pequeños charcos, con poco flujo de agua entre una abundante vegetación ribereña.



Figura 8: Fotografía de punto muestreado en Canal en Fundo Miraflores, Isla de Maipo

*Área Refugio:* El tercer punto de muestreo corresponde a un canal de Regadío en el Fundo Miraflores, cercano a Isla de Maipo (CIM, Figura 8), el que fue catalogado como área de Refugio, pues consiste en canal angosto, con profundidad mayor a un metro y que se encuentra separado del resto de la cuenca por zonas altamente contaminadas (Duarte y col., 1971).

*Área media-inferior:* Donde la estructura del río cambia, se ensancha y es posible notar el efecto antrópico por la remoción de arena y ripio. De acuerdo con lo definido por Duarte y col. (1971) la presencia de *Percichthys trucha* sería uno de los rasgos biológicos distintivos |de esta área, ya que esta especie no se encontraría en puntos superiores de la Cuenca. En esta área se tomó muestras en el Río Mapocho en El Monte (RM) (Figura 9) cercano a la confluencia con el Río Maipo, en el curso principal del Río Maipo en Melipilla (ME) tomando muestras en dos puntos debido la existencia de hábitats notablemente diferentes entre sí, una muestra fue del cauce principal (ME1) (Figura 11 a) que poseía el agua turbia y un cauce secundario (ME2) con agua cristalina y abundantes macrófitas (Figura 11 b). Finalmente se muestreo el Estero Cholqui (ECH) (Figura 10), un afluente del Maipo utilizado principalmente para regadío.



Figura 9: Fotografía del punto de muestreo en Río Mapocho el Monte (RM)



Figura 10: Fotografía de Estero Cholqui



Figura 11: Fotografías de ecosistemas muestreados en Melipilla. a: ME1 (Melipilla turbio) y b: ME2 (Melipilla claro)

### 3.2.2. Caracterización de comunidad potencial:

Basándose en las cuatro áreas definidas dentro de la cuenca del río Maipo se caracterizó la comunidad íctica potencial para cada uno de los puntos de muestreo, usando para esto información de capturas histórica y recientes (Duarte y col.,1971, Muñoz, 2007 y Quezada-Romegialli comunicación personal).

### 3.2.3. Toma de Muestras

#### 3.2.3.1. Muestreo con método tradicional de captura

La toma de muestras de peces se realizó en todos los sitios de muestreo, exceptuando el Lago Chungara (LCH) y estero Cholquí (CHO), en paralelo a la toma de muestras ambientales. Este muestreo consistió en la captura de peces a lo largo de un transecto de 50 metros durante 10 minutos usando un equipo de pesca eléctrica, para luego identificar, contar y finalmente liberar a los peces.

#### 3.2.3.2. Muestra ambiental:

La toma de muestras ambientales en terreno fue de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en Protocolo de toma de muestra ambiental (Pag. 9). El volumen de agua filtrado varió entre los sitios de muestreo debido a las condiciones de turbiedad y sólidos disueltos y suspendidos del agua, variando entre 0,25 l y 1,5 l (Anexo Tabla 2).

### 3.3. Caracterización comunitaria: Metabarcoding de eDNA

Una muestra de cada punto de muestreo y un control positivo del acuario de composición conocida (Anexo 3), fueron elegidas por su calidad y cantidad de ADN, para determinar la composición de la muestra ambiental usando secuenciación masiva y metabarcoding de eDNA. Esto consistió en amplificar una región del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) usando dos partidores degenerados: forward mICOLintF 5' GGW ACW GGW TGA ACW GTW TAY CCY CC -3' (Leray y col. 2013) y el partidore reverse jgHCO2198 5'-TAI ACY TCI GGR TGI CCR AAR AAY CA -3' diseñado por Geller y col. (2013), dando como resultado amplicones de 313 pb, que fueron secuenciados usando tecnología NGS Illumina MiSeq (300 paired end), en la empresa MR DNA (Molecular Research DNA) en Estados Unidos.

### 3.3.1. Análisis bioinformático

En la Figura 12 se detalla el procesamiento bioinformático de las lecturas brutas producto de la secuenciación masiva. Éstas fueron separadas por muestra usando el software libre de MrDNA FastQProcessor. Luego las lecturas forward y reverse de cada secuencia se unieron usando USEARCH (Edgar, 2010), se eliminaron partidores y se evaluó calidad con FastQC. Las secuencias se filtraron por calidad Q30 usando un marco de lectura de 5pb, eliminando secuencias de un largo no esperado ( $313 \pm 25$  pb) mediante el software Trimmomatic (Bolger y col. 2014). Se agruparon lecturas de secuencias en OTUs de un 100% de identidad y se eliminaron aquellas que tuvieran menos de 3 Secuencias, las quimeras y errores puntuales fueron removidas con los softwares UCHIME y UNOISE (Edgar y col. 2014; Edgar 2016).

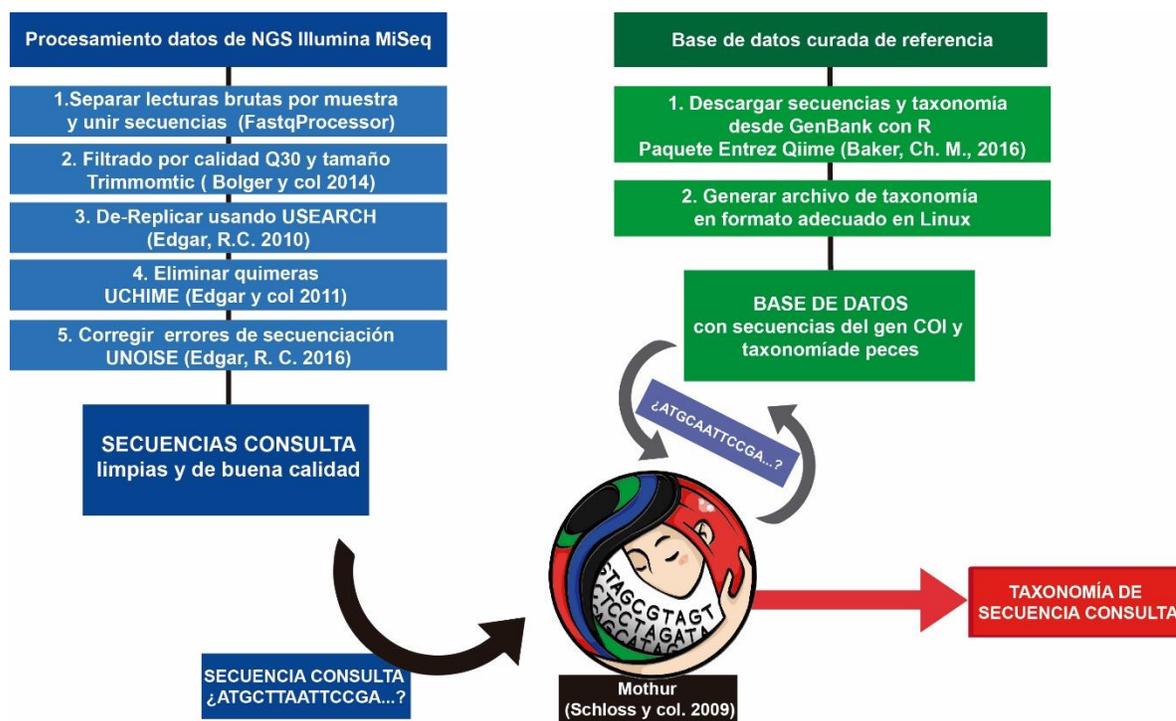


Figura 12: Procesamiento Bioinformático de metabarcoding de ADN ambiental: desde limpieza y filtrado de lecturas brutas producto de secuenciación masiva (derecha) y la generación de base de datos de referencia (izquierda) hasta la asignación taxonómica con Mothur (abajo).

La asignación taxonómica de las lecturas ya filtradas se hizo con MOTHUR (Schloss y col. 2009) contrastando las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva con una base de datos curada del gen COI, que contiene secuencias y estructura taxonómica de la clase Actinopterygii descargadas desde GenBank el 26 de septiembre de 2017, además se incluyeron secuencias no publicadas de *Cheirodon galusdae*, *Cheirodon pisciculus*, *Percilia gillissi*, *Trichomycterus maculatus*, y *Trichomycterus laucaensis*, este último proviene de la localidad de Caquena en el Altiplano Chileno.

Luego de hacer la asignación taxonómica, las OTUs clasificadas como peces actinopterigios fueron rescatadas y se determinó la cantidad de lecturas de estas secuencias en cada muestra y fueron normalizadas con respecto al total de lecturas. Para descartar falsos positivos solo se informan, para una muestra dada, aquellas especies que tengan una frecuencia que exceda cierto umbral. La elección de dicho umbral se basó en la frecuencia mínima que permitiría descartar todos los falsos positivos presentes en el Acuario control (AC) y así evitar la presencia de especies espurias, eliminando todas aquellas secuencias que estuviesen representadas en una frecuencia menor o igual a 0,001 (0,1%).

Las OTUs que fueron asignadas dentro de un mismo taxón, ya sea a nivel de género o especie, se alinearon y se calculó las distancias en una matriz de distancia usando el programa MEGA mediante el método de Tamura-Nei.

### 3.4. Comparación de metodologías: Detección de especies con eDNA y Pesca eléctrica en relación con la composición potencial.

#### 3.4.1. Ecosistemas Lénticos y Acuario Control

Se comparo la riqueza (S) y composición de especies obtenida con eDNA con la riqueza y composición de especies presentes en el acuario control y la laguna Paquiza, considerando la frecuencia de las OTUs obtenidas con eDNA y la abundancia en número de individuos de cada taxón. En el Lago Chungará se determinó si el eDNA puede retratar la riqueza de especies ícticas conocidas históricamente para dicho ecosistema.

#### 3.4.2. Ecosistema Lótico

En la cuenca del río Maipo se estimó la riqueza específica (S) con eDNA, pesca eléctrica y la riqueza total obtenida ambas metodologías (eDNA + Pesca). Mediante Diagramas de Venn se ilustró el porcentaje de la Riqueza total retratada por cada metodología en cada punto de muestreo.

Se evaluó el desempeño de ambas metodologías para retratar la composición de la cuenca del río Maipo. Para esto se comparó la composición obtenida con eDNA, pesca eléctrica con la composición potencial, establecida en base a capturas históricas dentro de la cuenca (Duarte y col.,1971; Muñoz, 2007; Quezada-Romegialli comunicación personal).

#### IV. RESULTADOS

##### 4.1. Experimento de laboratorio: Desarrollo de protocolo de toma de muestras ambientales y detección de eDNA de peces

Las concentraciones y calidades de las muestras de ADN del acuario control, luego de hacer la extracción con el método manual PCI, se detallan en la Tabla 3. Las calidades de las muestras m1, m2, m3 y m4 de eDNA están dentro de las razones de absorbancia esperadas (cercasas a 2). Las concentraciones de los controles negativos son menores a la concentración mínima de sensibilidad del equipo de medición (Nanodrop, User manual v3.5), si bien ésta es baja no permite descartar la presencia de contaminación en los controles, de acuerdo a este criterio.

Tabla 3. Calidad y concentración de eDNA obtenidas experimento de laboratorio: acuario control (AC). Donde m= muestras y c= blancos

Muestras ID	Concentración [ng/ $\mu$ l]	260/280	260/230
c1	1,5	1,0	0,6
c2	1,4	1,8	0,4
c3	2,0	1,0	0,2
c4	1,7	0,9	0,2
m1	109,9	2,0	2,2
m3	96,0	2,0	2,0
m2	96,5	2,1	2,1
m4	76,2	2,0	2,2

Al amplificar el gen 12S con los partidores específicos para peces diseñado por Miya y col. (2015) se visualizó en un gel de agarosa bandas de amplicones de 212 pb en todas las muestras provenientes del acuario (m1, m2, m3 y m4) y la ausencia de esta banda en todos los controles negativos (c1, c2, c3 y c4) y en el blanco de PCR (Figura 13).

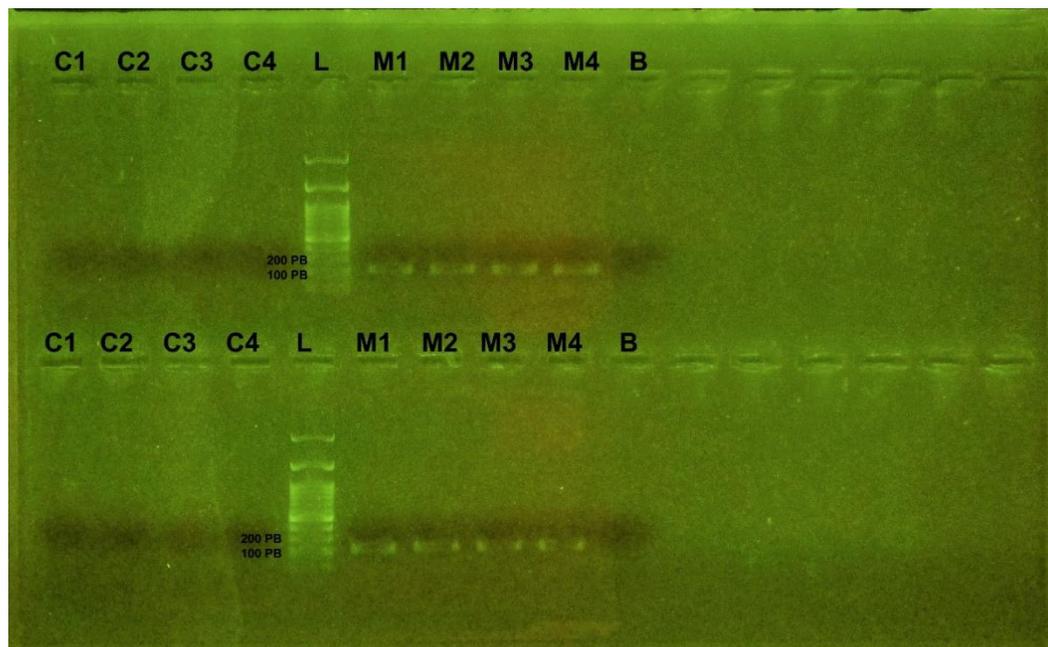


Figura 13: Gel de agarosa de PCR en duplicado con partidores 12S (Miya y col., 2015), para determinar la presencia de eDNA de Peces en muestras de Acuario (derecha) y ausencia de contaminación en controles (izquierda)

## 4.2. Experimento de campo

### 4.2.1. Detección de especies ícticas desde eDNA

Al amplificar el gen COI se pudo detectar en gel de agarosa la presencia de una banda a ~300 pb, en las muestras provenientes del altiplano y la cuenca del río Maipo, no se observó ninguna banda en los blancos de PCR y controles negativos, por lo que se descarta la contaminación entre muestras y se decidió no realizar secuenciación masiva en controles negativos.

#### 4.2.1.1. Procesamiento Bioinformático

Producto de la secuenciación masiva para diez muestras, se obtuvieron 1.427.935 secuencias, al filtrar por calidad Q30 y descartar las secuencias de tamaño no esperado quedaron 879.326 lecturas. Luego de eliminar errores de secuenciación y agrupar lecturas en OTUs con un 100% de identidad se obtuvieron 6.526 secuencias únicas, de estas 188 se consideraron quimeras y fueron removidas. Los 6.338 OTUs resultantes se contrastaron con la base de datos de actinopterigios de referencia que contiene 7.630 secuencias de genomas mitocondriales de peces y 133.277 secuencias del gen COI con tamaños entre 300 y 5.000 pb. Del total de OTUs 25 fueron clasificados como peces actinopterigios y corresponden al 2,9% de las lecturas totales. Estas OTUs fueron clasificados dentro de 7 órdenes, 8 familias, 11 géneros y 14 especies. (Anexo 4). Para cada una de las muestras y el control positivo la cantidad de secuencias asignadas a peces varió entre un 0.01% y 13,49% (Tabla 4), estando más representadas las secuencias de actinopterigios en la muestra proveniente del acuario control.

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

Muestra	AC	LCH	PA	RC	EM	CIM	RM	ME1	ME2	ECH
Lecturas Totales	188.407	232.847	69.667	176.222	140.530	26.048	63.432	49.258	128.183	40.360
Lecturas totales con calidad Q30	142.310	172.045	57.616	144.473	118.185	22.361	49.869	33.448	108.625	30.394
Lecturas asignadas a peces	19.203	35	2.906	253	1.519	584	422	408	5	426
Porcentaje de lecturas asignadas a peces	13,49%	0,02%	5,04%	0,18%	1,29%	2,61%	0,85%	1,23%	0,01%	1,40%

#### 4.2.1.2. Detección de especies usando eDNA: Control positivo

Las tres taxa de peces presentes en el acuario al momento de hacer la toma de muestras fueron identificados mediante eDNA (Figura 14) del total de lecturas asignadas a peces, un 36,7% correspondió a *Bullockia maldonadoi*, conformado por dos OTUs diferenciadas en un par de bases. Una única OTU, representada por el 7%, fue asignada a *Percilia irwini*; en cuanto al género *Cheirodon* no todas las OTUs pudieron ser clasificadas a nivel de especie, existiendo tres OTUs: dos catalogados como *Cheirodon* sp., y uno como *Cheirodon galusdae* representados por 34% y 22,3% respectivamente. Al hacer alineamiento de las secuencias del género *Cheirodon*, presentes en el acuario se obtiene que estas se diferencian en 4 pares de bases con similitud de un 98,72% (Tabla 5).

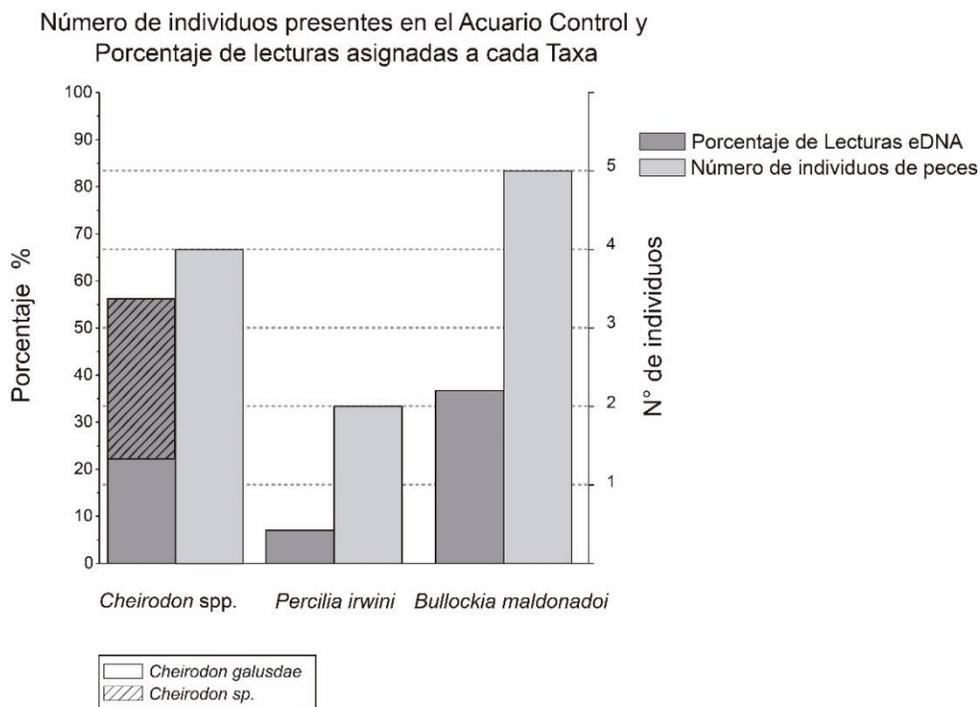


Figura 14: Porcentaje de lecturas clasificadas como taxa de peces presentes en el Acuario Control y número de individuos por especie. *Cheirodon* spp. podría corresponder a un OTU clasificado como *Ch. galusdae* y otros dos clasificados sólo hasta nivel de género.

Tabla 5: Matriz de distancia entre OTUs del género *Cheirodon* detectadas en Acuario Control

	<i>Otu_Ch. sp2</i>	<i>Otu_Ch. galusdae</i>	<i>Otu_Ch. sp1*</i>
<i>Otu_Ch. sp2</i>	0,000		
<i>Otu_Ch. galusdae</i>	0,023	0,000	
<i>Otu_Ch. sp1*</i>	0,010	0,013	0,000

#### 4.2.2. Detección de especies en sistemas lénticos: Lago Chungará y Laguna Paquiza

En los dos ecosistemas lénticos estudiados se encontró la presencia de peces mediante ADN ambiental. En el Lago Chungará (Figura 15), se pudo detectar a las dos taxa descritas en el Lago: *Oncorhynchus mykiss* y al cyprinodóntido del género *Orestias*, *Orestias chungarensis* representados respectivamente por un 11,4% y un 88,6% de total de lecturas asignadas a peces.

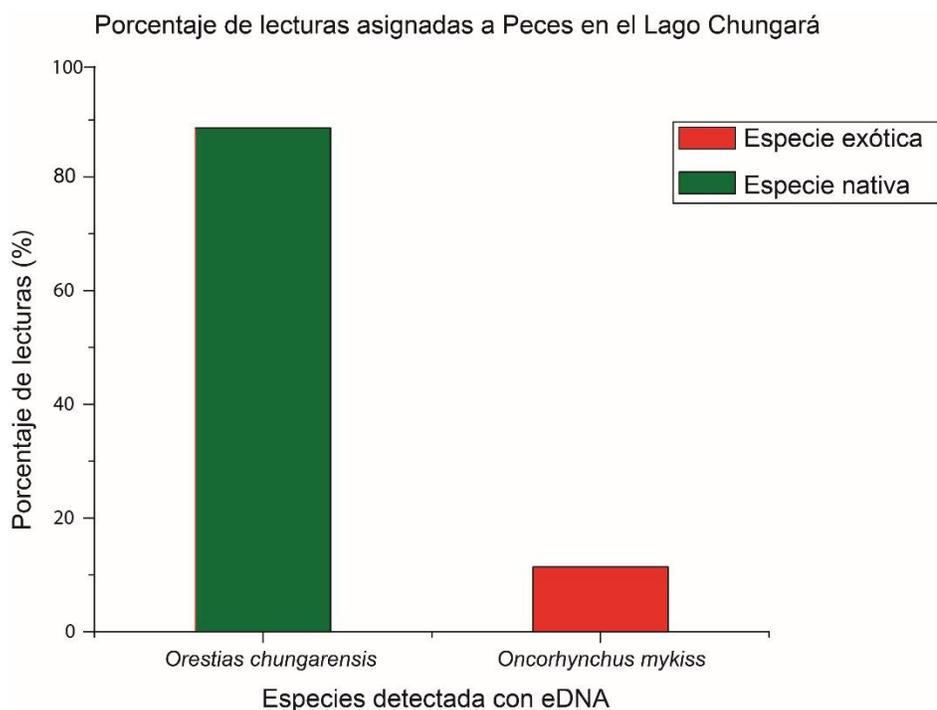


Figura 15: Porcentaje de lecturas de la secuenciación masiva por taxón de pez detectado en el Lago Chungará.

En la Laguna Paquisa (Figura 16) se Identificó la misma OTU de *Orestias* que en el Lago Chungará, estas Unidades Taxonómicas Operacionales son idénticas en un 100%. Ésta OTU estuvo presente en un 4,1% de lecturas de peces pertenecientes a Paquisa. Además, se detectó dos OTUs del género *Trichomycterus*, representadas en un 56,1% y 39,8% de las lecturas, estas dos OTUs de siluriformes poseen un 96,486% de similitud y contienen 11 pb diferentes entre ellas (Tabla 6).

Porcentaje de lecturas de peces detectadas con Metabarcoding de eDNA y Abundancia estimada en base a Pesca eléctrica en la Laguna Paquisa

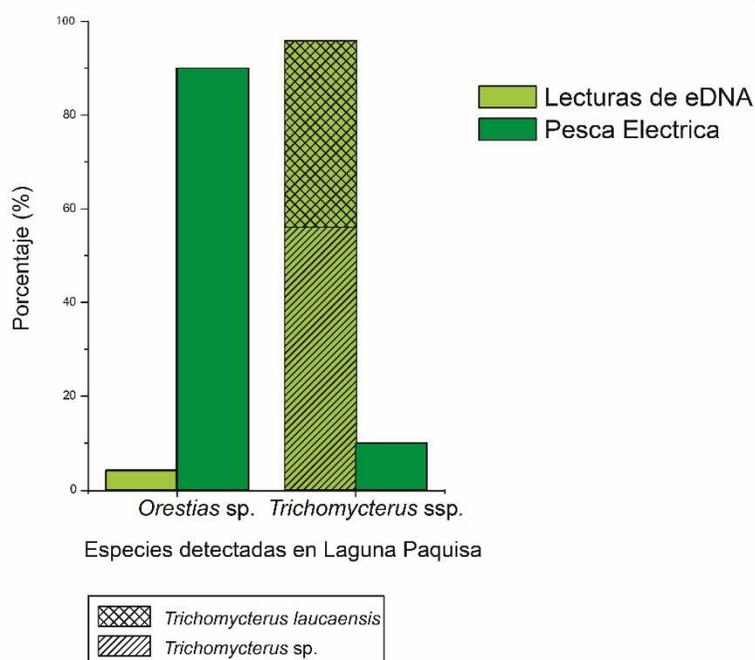


Figura 16: Porcentaje de lecturas de cada de OTUs clasificado como pez y abundancia estimada para cada taxa presente en la Laguna Paquisa. *Trichomycterus ssp.* Corresponde a dos OTUs clasificadas como *Trichomycterus* diferencias en más de un 3 %.

Tabla 6: Distancia entre OTUs de género *Trichomycterus* detectadas en la Laguna Paquisa

	<i>Trichomycterus laucaensis</i>	<i>Trichomycterus sp.</i>
<i>Trichomycterus laucaensis</i>	0,000	0,036
<i>Trichomycterus sp.</i>	0,036	0,000

Ambos taxa fueron capturados mediante pesca eléctrica en la Laguna Paquiza. Cualitativamente se observó una alta abundancia, siendo posible al momento del muestreo observar cardúmenes de *Orestias* de más de 100 individuos, estimando la abundancia de éstas como, aproximadamente, 10 veces mayor que la de bagres.

#### 4.2.3. Detección de especies en ecosistemas lóticos: Cuenca del Río Maipo

A lo largo de la Cuenca del Río Maipo, se logró capturar 7 de las 16 especies descritas previamente (Figura 17), cuatro de éstas son nativas y tres exóticas. Con metabarcoding del gen COI se detectaron 10 taxa, todos previamente descritos dentro de la cuenca del Río Maipo, nueve de estos se clasificaron a nivel de especie correspondiendo a 6 especies nativas y 3 especies exóticas invasoras; al igual que en el acuario control, la clasificación de *carácidos* fue ambigua, por lo que se procedió a clasificarlos sólo hasta nivel de género.

#### Presencia y ausencia de especies ícticas la cuenca del Rio Maipo Detectada con Metabarcoding de eDNA y Pesca Eléctrica

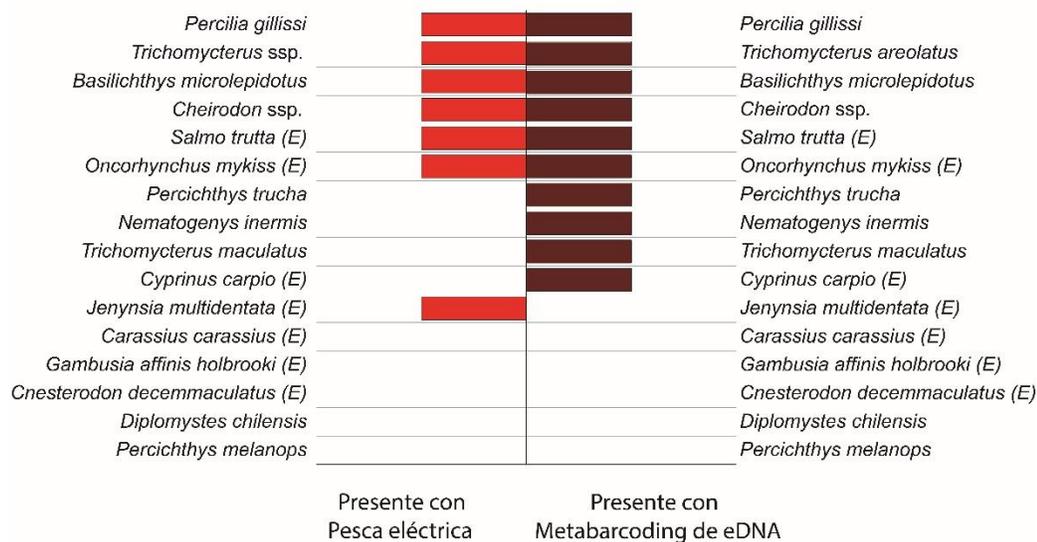


Figura 17: Especies detectadas mediante Pesca eléctrica y metabarcoding de ADN ambiente en la Cuenca de río Maipo. La barra indica presencia de la especie (E= Especie Exótica).

De las especies capturadas con pesca eléctrica en los muestreos paralelos a eDNA en la cuenca, sólo *Jenynsia multidentata* no pudo ser detectada con metabarcoding de ADN ambiental. Dos especies nativas fueron detectadas sólo con eDNA fueron: *Nematogenys inermis* catalogada en peligro de extinción y *Percichthys trucha*, además se pudo diferenciar entre las especies crípticas *Trichomycterus maculatus* y *T. areolatus*, y finalmente detectar a la especie exótica invasora *Cyprinus carpio*.

En todos los puntos a lo largo de la cuenca la riqueza obtenida con eDNA fue igual o mayor a la obtenida con pesca eléctrica (Figura 18 y Figura 19). En la Figura 18 se detalla la riqueza específica obtenida en EM, RC y CIM: En el área alta, en el Estero el Manzano (EM) se detectó cuatro especies con eDNA: *Trichomycterus maculatus*, *Trichomycterus areolatus*, *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo trutta*, de éstas las dos especies exóticas fueron capturadas con pesca eléctrica e identificadas mientras que los bagrecitos nativos fueron clasificados sólo a nivel de género; en RC se registró la presencia de dos taxa con eDNA: *Cheirodon* spp. y *Trichomycterus areolatus*, sólo Pochas (*Cheirodon* spp.) fueron capturadas con pesca. En el canal de isla de Maipo (CIM), se identificó a tres especies con pesca eléctrica: *Percilia gillissi*, *Basilichthys microlepidotus* y *Oncorhynchus mykiss*, y tres con ADN ambiental: *Nematogenys inermis*, *Cheirodon* spp y *Oncorhynchus mykiss*. Se obtuvo una riqueza total de cinco especies en CIM.

Riqueza Específica (S) obtenida con eDNA y Pesca eléctrica en la Cuenca el Río Maipo

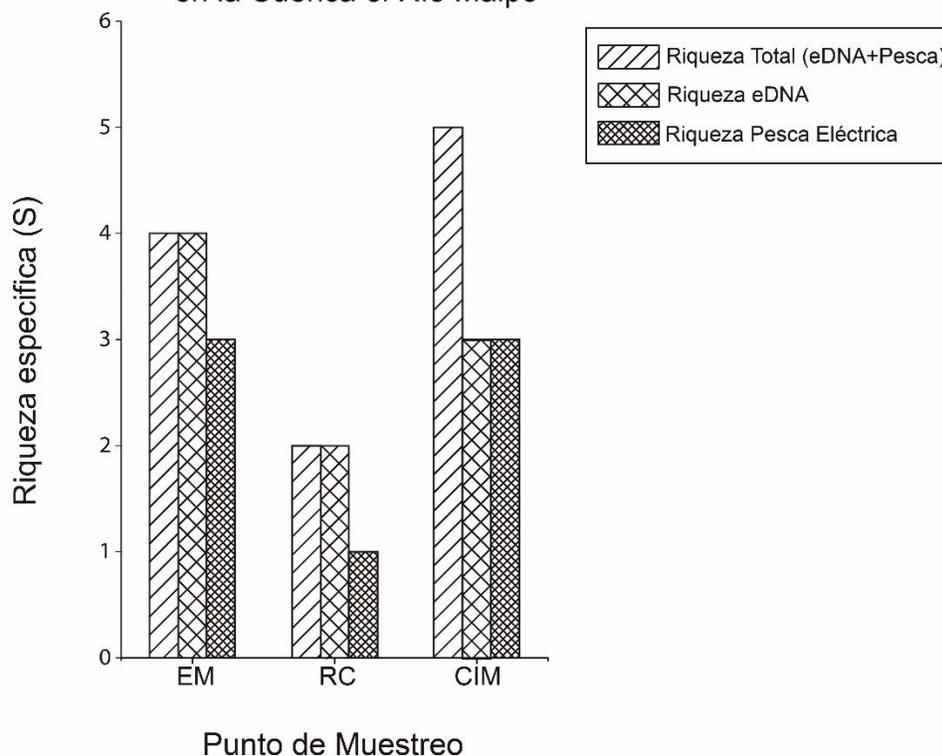


Figura 18: Riqueza Específica detectada en cuenca del Río Maipo en las áreas alta: EM (Estero el Manzano) media: RC (Río Clarillo) y refugio: CIM (Canal Isla de Maipo).

En el Río Mapocho en el Monte (RM) (Figura 19) se registró la presencia de cuatro especies con eDNA, *Percilia gillissi*, *Cheirodon* spp. *Cyprinus carpio* y *Trichomycterus areolatus*, de las cuales sólo la última fue capturada y clasificada como *Trichomycterus* spp. En Melipilla (ME) cinco especies nativas fueron detectadas con ADN ambiental *N. inermis*, *B. microlepidotus*, *P. trucha*, *T. maculatus* y *T. areolatus* y se capturó con pesca eléctrica a ejemplares de *Trichomycterus* spp. y la especie exótica *Jenynsia multidentata*. En el estero Choqui (ECH) sólo se realizó toma de muestra ambiental, detectándose tres especies *Trichomycterus maculatus*, *Cheirodon* spp. y la especie exótica *Cyprinus carpio*.

Riqueza Específica (S) obtenida con eDNA y Pesca eléctrica  
en el área media inferior de la Cuenca el Río Maipo

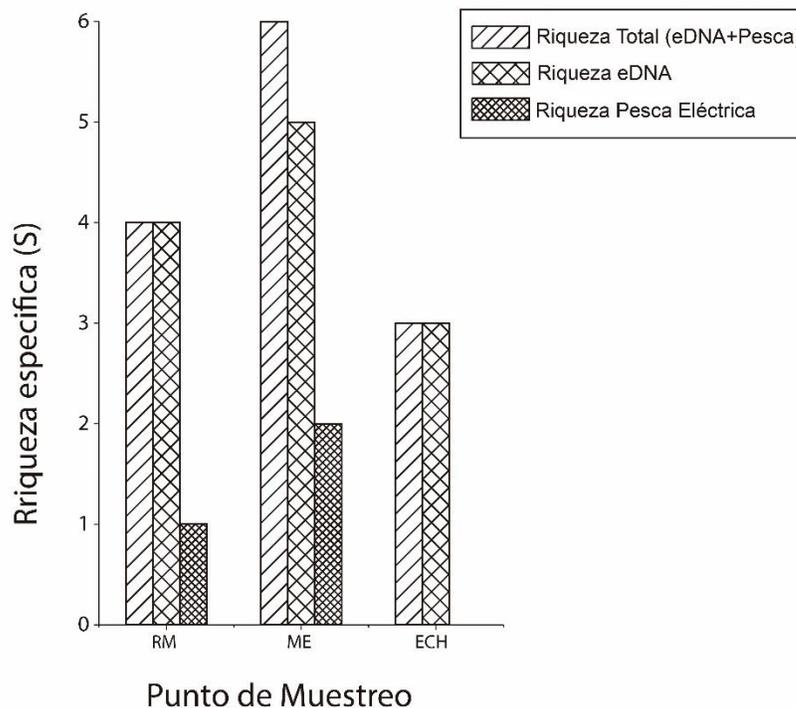


Figura 19: Riqueza específica detectada la Cuenca del Río Maipo en los tres puntos muestreados en el área media inferior. RM (Río Mapocho), ME (Río Maipo en Melipilla) y ECH (Estero Cholqui).

En cuanto a la riqueza total obtenida (eDNA + pesca eléctrica), el eDNA representa el 100% de la riqueza específica en las estaciones EM, RC (Figura 20). En cambio, en CIM cada metodología aporta, por si sola, un 40%, mientras que una especie fue detectada por ambos métodos, representando el 20% de total de la riqueza.

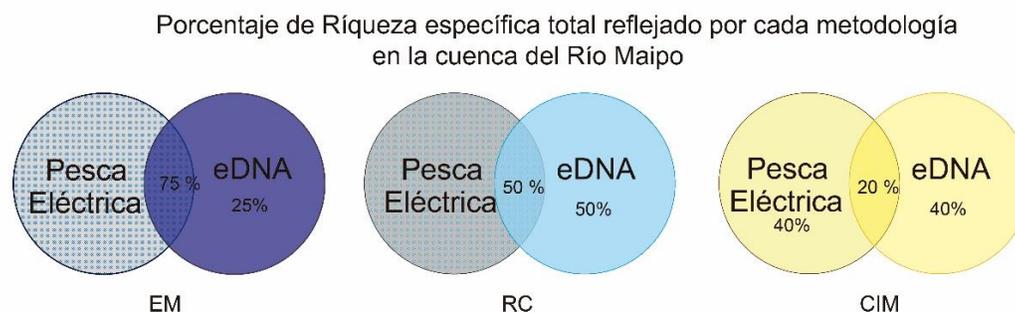


Figura 20: Diagrama de Venn de EM (Estero el Manzano) RC (Río Clarillo) y CIM (Canal Isla de Maipo). Representa el porcentaje de riqueza retratado por cada metodología en cada punto.

El eDNA retrata el 100% de la riqueza para el Río Mapocho en el Monte (Figura 21), en ME ambas metodologías aportan información diferente, donde el eDNA aportó un 66,67% (4/6) de la riqueza, la pesca eléctrica un 16,67% (1/6) y ambas un 16,67% (1/6).

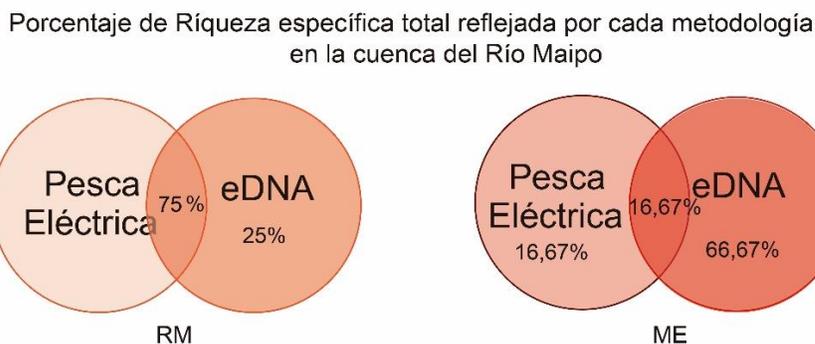


Figura 21: Diagrama de Venn. RM (Río Mapocho) y ME (Río Maipo en Melipilla). Representa el porcentaje de la riqueza retratado por cada metodología usada.

En cuanto a lo esperado para cada punto de muestreo y a lo obtenido con eDNA (Tabla 7) y con pesca eléctrica (Tabla 8) se obtuvo una correspondencia entre las especies esperadas para la cuenca y las obtenidas con eDNA y/o capturadas con pesca eléctrica. En RC se capturo a pochas y se detectó con ADN ambiental a solo a dos taxa (*Cheirodon* spp. y *Trichomycterus areolatus*) de los cinco potenciales. En el sitio CIM se

detecta sólo con eDNA a *Nematogenys inermis* especie esperable para dicho punto, además, se logró capturar mediante pesca e identificar con eDNA a *Oncorhynchus mykiss*, especie exótica invasora. En ME es detectada *Nematogenys inermis* cuando su presencia no es esperable para este punto de muestreo, mientras que la detección de *Percichthys trucha* coincide con lo descrito para esta área de la cuenca.

Tabla 7: Presencia (1) y ausencia (0) de especies detectadas en la cuenca del río Maipo con eDNA de acuerdo con lo esperado (en gris)

Especies descritas en la cuenca Maipo	EM	RC	CIM	RM	ME	ECH
<i>Basilichthys microlepidotus</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Cheirodon pisciculus</i>	0	1*	1*	1*	0	1*
<i>Nematogenys inermis</i>	0	0	1	0	1	0
<i>Percichthys melanops</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Percichthys trucha</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Percilia gillissi</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Trichomycterus areolatus</i>	1	1	0	1	1	0
<i>Trichomycterus maculatus</i>	1	0	0	0	1	1
<i>Carassius carassius</i> (E)	0	0	0	0	0	0
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (E)	0	0	0	0	0	0
<i>Cyprinus carpio</i> (E)	0	0	0	1	0	1
<i>Gambusia affinis holbrooki</i> (E)	0	0	0	0	0	0
<i>Jenynsia multidentata</i> (E)	0	0	0	0	0	0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (E)	1	0	1	0	0	0
<i>Salmo trutta</i> (E)	1	0	0	0	0	0

E= especie exótica \* = Clasificación sólo a nivel de genero

Tabla 8: Presencia (1) y ausencia (0) de especies detectadas en la cuenca del río Maipo con pesca eléctrica en relación con lo esperado (en gris).

Especies descritas en la cuenca maipo	EM	RC	CIM	RM	ME	ECH
<i>Basilichthys microlepidotus</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Cheirodon pisciculus</i>	0	1*	0	0	0	0
<i>Nematogenys inermis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Percichthys melanops</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Percichthys trucha</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Percilia gillissi</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Trichomycterus areolatus</i>	1*	0	0	1*	1*	0
<i>Trichomycterus maculatus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Carassius carassius</i> (E)	0	0	0	0	0	0
<i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (E)	0	0	0	0	0	0
<i>Cyprinus carpio</i> (E)	0	0	0	0	0	0
<i>Gambusia affinis holbrooki</i> (E)	0	0	0	0	0	0
<i>Jenynsia multidentata</i> (E)	0	0	0	0	1	0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (E)	1	0	1	0	0	0
<i>Salmo trutta</i> (E)	1	0	0	0	0	0

E= especie exótica \* = Clasificación sólo a nivel de genero

## V. DISCUSIÓN

En el presente seminario de título, se evaluó la capacidad y desempeño del metabarcoding de ADN ambiental usando el gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) para caracterizar la riqueza íctica en distintos ecosistemas acuáticos: Un acuario control, dos ecosistemas lénticos en la región de Arica y Parinacota y seis puntos a lo largo de la cuenca del río Maipo en la Región Metropolitana. Comparando la riqueza y composición obtenida usando la metodología basada en eDNA con lo conseguido a través de un método tradicional de captura; además se comparó cada metodología con lo esperado de acuerdo con registros de capturas históricas y recientes.

En general, con la técnica de metabarcoding de eDNA se pudo detectar igual o mayor riqueza de taxa que lo obtenido con pesca eléctrica. En el acuario control y en ambos ecosistemas altiplánicos existió concordancia entre las especies presentes, descritas previamente o capturadas con pesca eléctrica con lo obtenido usando eDNA. En la laguna Paquiza, se logró identificar secuencias de las dos taxa esperadas en este ecosistema (*Orestias* y *Trichomycterus*), particularmente para el género *Trichomycterus* se detectó dos OTUs diferenciadas en más de un 3%, lo que podría corresponder a dos especies distintas, situación que no fue advertida mediante pesca eléctrica e identificación morfológica *in situ*. En el Río Maipo, a nivel de cuenca se detectó mayor riqueza de especies con metabarcoding de ADN ambiental (10 taxa) que con pesca eléctrica (7 taxa); se destaca la detección de secuencias de especies no capturadas, *Nematogenys inermis*, especie endémica en peligro de extinción y *Percichthys trucha* considerada como casi amenazada para esta cuenca. Además, sobresale la clara diferenciación de secuencias pertenecientes a dos especies del género *Trichomycterus*:

*T. areolatus* y *T. maculatus*, algo no factible de hacer en terreno en base a rasgos morfológicos. De los peces capturados dentro de la cuenca, sólo *Jenynsia multidentata* no pudo ser detectada en muestras ambientales, ausencia explicada por los partidores usados en la PCR, factor que se discutirá más adelante. En relación con lo obtenido usando ambas metodologías y la información de capturas recientes e históricas a lo largo de la cuenca del río Maipo, es que llama la atención y preocupa la detección de eDNA y captura de un único individuo de la especie exótica invasora *Oncorhynchus mykiss* en el Canal de regadío en Isla de Maipo (CIM) (Tabla 7 y Tabla 8), área de refugio donde no había sido registrada esta especie con anterioridad (Duarte y col., 1971, Muñoz 2007).

#### 5.1. Método de muestreo de eDNA

La metodología planteada para la toma y traslado de muestras (Renshaw y col., 2015) resultó ser idónea para el muestreo en lugares remotos, logrando almacenar y trasladar las muestras desde terreno, manteniendo su integridad, sin necesidad de refrigerar. El procedimiento de extracción y purificación con Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico permitió obtener ADN de buena calidad y concentración, requisito importante al momento de usar tecnologías NGS, además usando esta metodología se logró detectar ADN de peces en todos los ecosistemas estudiados. Las medidas para evitar contaminación entre muestras (Hänfling y col. 2016) fueron suficientes para descartar la presencia de eDNA en controles negativos, y, por lo tanto, evitar la contaminación entre muestras, lo que es relevante al considerar que una cantidad baja de lecturas como es el caso del Lago Chungara (LCH, Tabla 4), donde sólo 35 lecturas son suficientes para retratar la presencia de las dos taxa descritas dentro de este ecosistema, *Orestias* y *Oncorhynchus mykiss*. Por otro lado, la metodología de limpieza planteada es fácil de implementar en

terreno y de bajo costo, resultando ser muy útil cuando no se tiene acceso a un equipo de autoclave o de esterilización UV.

## 5.2. Detección de especies y comparación de ambas metodologías

La utilización de metabarcoding del gen COI fue efectivo para caracterizar la comunidad íctica presentes en el acuario control, obteniéndose ADN de las tres especies presente: Las secuencias de carácidos se identificaron de forma ambigua, clasificando una OTU como *Cheirodon galusdae* y otros dos como *Cheirodon*, las secuencias de *Percilia irwini* y *Bullockia maldonadoi* se identificaron hasta nivel de especie correctamente.

En ambos ecosistemas lénticos estudiados existió concordancia entre lo obtenido con metabarcoding y lo esperado según literatura. En el Lago Chungará, se ha descrito previamente la presencia de *Oncorhynchus mykiss* y *Orestias chungarensis* y al caracterizar este ecosistema con eDNA, pese a la baja cantidad de lecturas asociadas a peces en el LCH se logra detectar a ambos taxa, clasificando a *O. mykiss* de forma exitosa hasta nivel de especie y llegando solo hasta nivel de género con las secuencias de *Orestias*. En la Laguna Paquiza fueron capturados con pesca eléctrica y clasificados a nivel de género a dos taxa: *Orestias* y *Trichomycterus*, con ADN ambiental se detectaron secuencias de cyprinodontiforme del género *Orestias* y dos OTUs de siluriformes del género *Trichomycterus*.

En la Laguna Paquiza (PA) y en el Acuario control (AC) no se observó una asociación entre el número de lecturas y la abundancia de individuos de una misma especie, al haber secuenciado sólo una muestra las conclusiones al respecto son limitadas; además el número de lecturas obtenidas para un taxón en particular no se relaciona necesariamente con el número de copias originales en la muestra, ya que esto responde a variables como la especificidad y sensibilidad de partidores con la secuencia objetivo

como con la cantidad de secuencias afines a dicho partidor en la muestra (MacDonald y Sarre 2016), por lo que el metabarcoding de ADN ambiental permitiría conocer la presencia o ausencia de especies, pero no su abundancia. Vale decir que esta correlación entre ADN ambiental y la abundancia de un organismo en un ecosistema natural no es clara, ya que en condiciones de campo se ha indicado que el eDNA cuantificado puede proporcionar un índice útil del tamaño de la población; sin embargo, se necesita más investigación antes de que este proceso se pueda usar en un contexto de gestión o restauración. (Kamoroff & Goldberg 2018). En cada uno de los puntos muestreados y a nivel de la cuenca del río Maipo, con ADN ambiental se logró detectar igual o mayor riqueza de especies ícticas que con pesca eléctrica, 10 y 7 taxa respectivamente, aplicando un esfuerzo de muestreo mucho menor. En el estero el Manzano, río Clarillo y el río Mapocho en el Monte (EM, RC y RM) la riqueza y composición total obtenida con ambas metodologías es representada completamente por el ADN ambiental, siendo la riqueza específica capturada mediante pesca eléctrica un subconjunto de la representada por el metabarcoding de eDNA. En el Canal de isla de Maipo (CIM) y en Melipilla (ME) la riqueza total (eDNA + Pesca) fué mayor a la riqueza obtenida por cada metodología por separado, por lo que cada método aportó información distinta sobre la riqueza de especies en esas áreas de muestreo. En particular en el CIM, se capturó a un individuo de *Percilia gillissi* y se observó un cardumen de pejerreyes (*B. microlepidotus*), presencia que no pudo ser registrada mediante ADN ambiental (Tabla 7 y Tabla 8), lo que puede deberse a la afinidad del partidor usado para PCR y será abordado más abajo. *Nematogenys inermis* pudo ser detectado en CIM y no capturado, lo cual podría estar asociado a una baja abundancia ya que esta es una especie en peligro de extinción que es poco abundante dentro de la cuenca, siendo sensible a actividades antrópicas como el dragado para la extracción de áridos (Ortiz-Sandoval y

col., 2009), pero no haberla capturado no significa necesariamente ausencia, ya que su aparición coincide con lo esperado para este sitio de muestreo que es considerado un área de refugio dentro de la cuenca. En ME también se detectó eDNA de *N. inermis*, aunque es posible que esta detección corresponde a un falso positivo, ya que esta área sufre una alta influencia antrópica por la extracción de áridos y contaminación de las aguas, condiciones no aptas para *Nematogenys*. Por otro lado, la detección de esta especie en ME proviene de la muestra ME1 (Anexo 4), la que fue tomada desde el curso principal del Río Maipo el que arrastraba una alta cantidad de sedimentos, en los que el ADN se almacena por más tiempo que en la superficie del agua, por lo que muestras donde exista re-suspensión y transporte de eDNA sedimentario implicaría una fuente de error en las inferencias espacio-temporales del muestreo de aguas superficiales (Turner y col., 2015). Otra especie nativa detectada sólo con eDNA fue *Percichthys trucha*, ésta no es capturada con pesca, pero sí detectada con eDNA en Melipilla (ME), coincidente con lo descrito por Duarte y col. (1971) donde indica que la presencia de esta especie es un rasgo biológico característico del área media-inferior de la cuenca. Además, se detectó en múltiples puntos de la cuenca de las especies crípticas del género *Trichomycterus*: *T. areolatus* y *T. maculatus*, mientras que los individuos capturados con pesca eléctrica sólo pudieron ser identificados hasta nivel de género. La especie exótica invasora, *Cyprinus carpio*, también, fue detectada con ADN ambiental en dos puntos dentro de la cuenca (RM y CHO) y no pudo ser capturada con pesca eléctrica.

En la Cuenca del Río Maipo, dos especies nativas no fueron capturadas con el método tradicional ni detectadas con eDNA, estas fueron: *Diplomystes chilensis* y *Percichthys melanops*, la primera es considerada extinta en la cuenca del Río Maipo (Arratia y Quezada-Romegialli 2017), de *P. melanops* no hay registro hace mucho tiempo (Duarte

y col., 1971). Otras especies exóticas, tales como *Cnesteredon decemmaculatus*, *Carassius carassius* y *Gambusia affinis* han sido previamente descritas en la cuenca del río Maipo, pero no fueron detectadas con ninguna de las dos metodologías utilizadas en este estudio.

### 5.3. Aproximación técnica al uso del marcador COI y los partidores Universales.

Para la caracterización comunitaria a partir de ADN ambiental se amplificaron porciones de 313 pares de bases del gen COI usando partidores universales (Leray y col. 2013; Geller y col., 2013). La información obtenida desde la secuenciación masiva de este producto de PCR es muy amplia, lográndose obtener secuencias de ADN de una gran variedad de organismos presentes en cada ecosistema, detectándose insectos, humanos, mamíferos, etc., esta información es relevante al develar los alcances que puede tener esta técnica y contribuye al desarrollo de preguntas futuras sobre el funcionamiento de los ecosistemas y su estudio a partir del ADN ambiental. Por otro lado, permitió identificar secuencias de ADN de peces en todos los ecosistemas estudiados, detectando a todos los taxa presentes en el AC, PA y LCH y sólo especies potenciales en el ecosistema lótico estudiado.

En la Cuenca del Río Maipo, con estos partidores se pudo detectar a todas las especies nativas que se han capturado dentro de los últimos 50 años. La especie exótica invasora *Jenynsia multidentata* fue capturada en ME y no pudo ser detectada con eDNA, al evaluar in silico la afinidad de los partidores universales usados con el sitio de unión de esta especie, se observó al menos 5 bases nitrogenadas que no coinciden, quedando esta especie fuera del universo de amplificación posible. En CIM ocurre algo similar ya que se capturó a *Percilia gillissi* y se identificaron cardúmenes de *Basilichthys microlepidotus*, pero ninguno fue detectado con ADN ambiental en este punto de

muestreo (Tabla 7y Tabla 8), pero si en otros dentro de la cuenca; al evaluar in silico la afinidad de los partidores se identifican hasta cuatro bases que no coinciden en el sitio de unión del partidior forward en *P. gillissi* y una para *B. microlepidotus*, en el pártidor reverse se detectan dos y una diferencia respectivamente en los sitios de unión de estas especies, siendo seguramente afectada la detección de estas taxa por la afinidad de los partidores, dado que especies con mayor afinidad se verán beneficiados durante la PCR, afectando esta poca especificidad de los partidores al éxito de detección de las especies objetivo, siendo necesario diseñar partidores más específicos para disminuir la proporción de productos de PCR de especies no-objetivo (Wilcox y col., 2013).

Otro factor asociado a la baja especificidad de los partidores usados es que, si bien se logró la detectar una amplia cantidad de especies, la proporción de lecturas asignadas a la clase Actinoptergii es baja en las muestras de sistemas naturales, no superando en promedio, el 1,4 %. Por ejemplo, en la muestra LCH sólo el 0,02% de las lecturas con calidad mayor a Q30 fue mapeado a peces y se detectaron sólo 4 lecturas de *Oncorhynchus mykiss* (Anexo 4) valor establecido como el límite mínimo en el procesamiento bioinformático para considerar a una secuencia como verdadera. Este umbral se estableció en base a lo recomendado Edgar (2016), el autor del algoritmo UNOISE que permite aumentar la sensibilidad de detección. Por otro lado, el tener una cantidad de lecturas tan bajas de las especies objetivos, puede aumentar el riesgo de error, ya que el algoritmo usado que corrige errores de secuenciación, (ej. error de asignación de bases o presencia de especies espurias por cambio de identificador entre las muestras) compara  $\beta(d)$ , donde  $\beta$  es una función de la distancia de Levenshtein  $d$  entre dos secuencias, que es el número de diferencias incluyendo sustituciones o gaps, y la razón entre el número de lecturas asociadas a dichas secuencias (Edgar 2016). Así,

si la razón obtenida es menor o igual al valor de  $\beta$ , la secuencia menos abundante será considerada un error y se agrupará junto a la más abundante, considerada verdadera. Entonces al tener secuencias verdaderas muy poco representadas estas pueden ser clasificadas, por el algoritmo usado, como un error cuando no lo es, lo que podría inducir a perder información sobre la diversidad a nivel de especie o género, al agrupar secuencias cercanas como una sola. Para evitar esto, sería útil la utilización de partidores clase específicos, que aumenten la profundidad de las lecturas asignadas a peces o al taxón de interés.

El uso del marcador mitocondrial COI como un código de barras para la identificación de peces a partir de ADN ambiental fue útil para detectar y clasificar secuencias correspondientes a distintas familias, clasificando exitosamente hasta nivel de género y, en la mayoría de los casos, hasta nivel especie. En este trabajo, 21 de los 25 OTUs obtenidos fueron clasificados hasta nivel de especie, y de estos, veinte se consideraron clasificaciones correctas y una errónea, dejándola hasta nivel de género. La resolución del metabarcoding de ADN ambiental para poder diferenciar entre especies y/o géneros de organismos altamente emparentados dependerá de los partidores de PCR y los marcadores moleculares a usar, ya que estos deben desarrollarse para cada taxón y validarse en cada sistema (Macdonald & Sarre 2016) como también se debe considerar la información disponible (o falta de esta) dentro de la base de datos. El gen COI ha sido ampliamente usado como código de barras genético dado que divergencias de secuencia en COI permiten la discriminación de especies estrechamente relacionadas en todos los animales (Hebert y col., 2003).

En este trabajo el uso del gen COI como un marcador molecular para detectar taxa con la máxima resolución posible fue exitosa para las especies del género *Trichomycterus*,

al diferenciar sin ambigüedad secuencias del *T. areolatus* y *T. maculatus* existiendo menos de un 1% de distancia para las OTUs asignadas a cada especie y un 93% de similitud entre ambas especies en la cuenca del Maipo (Anexo 6). En la laguna Paquisa, se identificaron dos OTUs altamente representadas (Figura 16), estas secuencias fueron clasificadas por MOTHR como *Trichomycterus laucaensis*. espécimen proveniente de Caquena, una de estas OTUs (*Trichomycterus laucaensis*) tiene un par de bases de diferencias con la secuencia de Caquena y por la baja distancia entre estas secuencias, se espera que esta corresponda a la misma especie. La segunda OTU del gen *Trichomycterus* (*Trichomycterus* sp.) que se encontró en Paquisa se diferenció en 11 pb con *Trichomycterus laucaensis* mostrando un 96,5% de similitud (Tabla 6), por lo que se podría esperar que sean especies diferentes, hipótesis que tendría que ser sustentada con información morfológica y otros marcadores moleculares.

No fue posible diferenciar especies del género *Orestias*, detectándose sólo una OTU para este género en los dos ecosistemas altiplánicos estudiados. Esta OTU fue 100% idéntica a la secuencia de *Orestias* de la base de datos de referencia y es clasificada por MOTHR como *Orestias ascotensis*, esto difiere de lo esperado por bibliografía, donde se describe la presencia de *Orestias chungarensis* (Arratia 1982) para el lago Chungará y *Orestias* sp. para la Laguna Paquisa. Como la OTU obtenida es idéntica a la de *O. ascotensis* se podría esperar baja o ausencia de variación en esa porción del gen COI para las especies *O. ascotanensis*, *O. chungarensis* y *Orestias* sp. Si bien, es necesario confirmar esto mediante la secuenciación del gen COI de especímenes provenientes de estos ecosistemas, queda en evidencia que las variaciones de este marcador son tan bajas que no entrega resolución para poder distinguir entre especies de *Orestias*, coincidiendo con lo publicado por Vila y col. (2013), donde indican que las especies de

*Orestias* del Parque Nacional Lauca conforman un clado monofilético, pero que las especies no pueden ser diferenciadas claramente por un análisis filogenético usando marcadores mitocondriales. Algo similar ocurre para las secuencias de carácidos, donde la variación del gen COI no es suficiente para clasificar hasta especie, clasificando sólo una de las OTUs detectadas como *Cheirodon galusdae*, mientras que para las dos OTUs restantes, la clasificación sólo llega hasta nivel de género. Vale destacar que las OTUs detectadas para este género no se diferenciaron en más de 7 pares de bases, mostrando entre 99,9 % y 97,8% de similitud, lo mismo ocurre con las secuencias de *Cheirodon* presentes en la base de datos de referencia (*Ch. interruptus*, *Ch. galusdae* y *Ch. pisciculus*) donde la diferencia no supera el 3% entre las secuencias.

La existencia de vacíos o a una baja cantidad de secuencias de referencia de un taxón, hace que el metabarcoding de ADN ambiental no pueda distinguir de manera confiable entre todos los taxa potencialmente muestreados, especialmente cuando los rangos de especies hermanas se superponen, lo que puede significar que algunas secuencias sólo puedan asignarse a un nivel taxonómico superior, como familia o género, en lugar de las especies (MacDonald & Sarre, 2016). Además, el vacío dentro de la base de datos no deja definir *a priori* cual será el mejor marcador molecular para detectar y diferenciar secuencias de especies, al no saber realmente si existe una diferencia clara entre estas (e.g. *Cheirodon* y *Orestias*). Por lo que se requiere aumentar la información disponible y explorar el uso de otros marcadores moleculares distintos al COI para la detección e identificación de secuencias *Cheirodon* y *Orestias*. Además de generar partidores de PCR especie específico o grupo específico para garantizar la detección de especies de interés y aumentar la profundidad de las lecturas obtenidas de los organismos objetivos.

#### 5.4. Valor para la conservación

Las dos metodologías usadas como herramientas para evaluar la diversidad biológica en ecosistemas acuáticos entregan información distinta y complementaria sobre la composición y riqueza específica. Por un lado, el metabarcoding de eDNA es una herramienta inocua y no invasiva que, como se observó en este trabajo, aumenta la tasa de detección de especies al ser un método de nivel forense y altamente sensible que puede detectar especies elusivas o que estén en baja abundancia, a diferencia de la pesca eléctrica que su éxito de captura dependerá del esfuerzo de muestreo, el tamaño corporal de los peces y el equipo encargado de realizar el muestreo. Reynolds y col. (2003) concluyeron que la riqueza de especies puede ser subestimada con un esfuerzo de muestreo menor al no capturar a especies vágiles (bentónicas), crípticas o raras. Hedger y col. (2018) indicaron que existen sesgos asociados al tamaño del cuerpo de los peces, ya que peces pequeños o juveniles son más propensos a evitar el arte de pesca eléctrica o a experimentar mortalidad. Desde otra perspectiva, hay que considerar en todo momento que el metabarcoding de ADN ambiental no reemplaza a métodos tradicionales de pesca, ya que el uso de eDNA permite saber el número de especies en un ecosistema, pero no entrega información sobre parámetros poblacionales como abundancia, estado reproductivo, sexo o estadio de los individuos detectados, parámetros que si se pueden conocer con la captura peces, por lo que sólo se podría detectar que una especie es vulnerable, amenazada o en peligro de extinción cuando esta no es detectada por eDNA y eso podría significar que ya ha desaparecido del ecosistema estudiado.

En cuanto a la información obtenida y los alcances de las metodologías usadas, con metabarcoding de ADN ambiental se obtienen secuencias de especies que componen

todo el ecosistema, desde la que se puede extraer información sobre la diversidad genética intra e inter especie, por ejemplo: de *Trichomycterus areolatus* y *Trichomycterus maculatus* se obtienen dos y tres haplotipos respectivamente los que son detectados a lo largo de toda la cuenca desde muestras ambientales. Esta información genética obtenida desde el metabarcoding de ADN ambiental es extrapolable a niveles jerárquicos superiores y, al igual que con la pesca eléctrica, permite conocer la riqueza específica y composición íctica de distintos ecosistemas acuáticos. Información sobre la composición del ecosistema que es esencial para la investigación a nivel comunitario, los inventarios bióticos y las evaluaciones de impacto ambiental, que puede ser usada con el fin de canalizar y proyectar los esfuerzos de conservación para proteger áreas donde se detecten e identifiquen especies raras, amenazadas o en peligro de extinción.

Bajo este contexto y en base a lo obtenido dentro de este estudio, es que es necesario considerar a Isla de Maipo (CIM) como un área particular dentro de la cuenca y prioritario para la conservación de las especies. En este sitio fue posible capturar a *Percilia gillisi* y principalmente porque se detecta con eDNA a *Nematogenys inermis*, especie en peligro de extinción (EN) que se podría encontrar dentro de los ecosistemas naturales cercanos a Isla de Maipo. Este sitio constituiría un área de refugio para especies sensibles a la contaminación, ya que estos sistemas acuáticos se originan por el surgimiento de aguas subterráneas y se caracterizan por poseer aguas claras con baja contaminación en relación al resto de la cuenca (Vega-Retter y col. 2014). Por otro lado, estas especies estarían siendo amenazadas por la presencia de la especie exótica invasora *Oncorhynchus mykiss* la que fue detectada usando las dos aproximaciones.

El potencial uso de ADN ambiental para detectar a macroorganismos en ecosistemas acuáticos queda en evidencia dentro de este estudio, dónde desde la perspectiva de la

genómica comunitaria (metagenómica), en ecosistemas lénticos y lóticos de Chile se pudo detectar a la misma o mayor cantidad de especies que con pesca eléctrica, permitiendo identificar a posibles especies no descritas dentro del territorio nacional, detectar especies crípticas difíciles de diferenciar y a especies elusivas no fáciles de capturar como *Cyprinus carpio*. Finalmente, se destaca que el Metabarcoding de ADN ambiental es una herramienta potente que permite retratar la composición de peces en ecosistemas acuáticos continentales y si la elección del marcador molecular es adecuada, permite tener mayor resolución en la identificación a nivel de especie que la pesca eléctrica.

## VI. CONCLUSIONES

En cuanto a la hipótesis planteada se concluye que el metabarcoding de gen COI en muestras de ADN ambiental detecta igual o mayor riqueza de especies ícticas que la pesca eléctrica tanto en ecosistemas lénticos como lóticos. La detección de taxa resultó ser mayor en el ecosistema menos conocido, la laguna Paquisa; mientras que en el lago Chungará, pese a no haber realizado pesca eléctrica, se logró retratar a las dos taxa históricamente descritos en este sistema. A nivel de cuenca en el río Maipo, se logra detectar mayor riqueza de peces usando la perspectiva de la genómica comunitaria que con el método tradicional de captura con pesca eléctrica.

La cuantificación de la composición y riqueza mediante metabarcoding de ADN ambiental dependerá de la sensibilidad, precisión de los partidores usados para PCR y afinidad de estos con las especies objetivo. Además, el marcador molecular usado tendrá efectos sobre la resolución taxonómica obtenida al clasificar las secuencias a nivel de género o especie.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Arratia, G., & Quezada-Romegialli, C. (2017). Understanding morphological variability in a taxonomic context in Chilean diplomystids (Teleostei: Siluriformes), including the description of a new species. *PeerJ*, 5, e2991.
- Barletta, M., Jaureguizar, A. J., Baigun, C., Fontoura, N. F., Agostinho, A. A., Almeida-Val, V. M. F. D., ... & Fabré, N. N. (2010). Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of Fish Biology*, 76(9), 2118-2176.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- Campos, H., Ruiz V. H., Gavilán J. F. & Alay, F. (1993). Peces del Río Bío-Bío. Serie Publicaciones de Divulgación EULA, Universidad de Concepción, Chile. 100 pp.
- Clusa, L., Ardura, A., Fernández, S., Roca, A., & García-Vázquez, E. (2017). An extremely sensitive nested PCR-RFLP mitochondrial marker for detection and identification of salmonids in eDNA from water samples. *PeerJ*, 5, e3045.
- CONAMA, 2008. Biodiversidad de Chile, Patrimonio y Desafíos, Ocho Libros Editores (Santiago de Chile), 640 pp.
- Cristescu, M. E. (2014). From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(10), 566-571.
- Dolan, C. R., & Miranda, L. E. (2004). Injury and mortality of warm water fishes immobilized by electrofishing. *North American Journal of Fisheries Management*, 24(1), 118-127.

- Douglas, W. Y., Ji, Y., Emerson, B. C., Wang, X., Ye, C., Yang, C., & Ding, Z. (2012). Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4), 613-623.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.H., Soto, D., Stiassny, M.L., & Sullivan, C.A. (2006). Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81, 163–182.
- Edgar, R. C. (2016). UNOISE2: Improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon reads. bioRxiv preprint first posted online Oct. 15, 2016; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/081257>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection, *Bioinformatics*, 27, 2194-200.
- Elbrecht, V., Vamos, E. E., Meissner, K., Aroviita, J., & Leese, F. (2017). Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, 1265-1275.
- Franklin, J. F., K. Cromack, W. Denison, et al. (1981). Ecological characteristics of old-growth Douglas-fir forests. USDA Forest Service General Technical Report PNW- 118. Pacific Northwest Forest and Range Experiment Station, Portland, Oregon.
- Gay, C. (2001) Sobre las causas de la disminución de los montes de la Provincia de Coquimbo. En: Squeo FA, G Arancio & JR Gutiérrez (eds) Libro rojo de la flora nativa y de los sitios prioritarios para su conservación: Región de Coquimbo: 281-286. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

- Goldberg, C., Turner, C., Deiner, K., Klymus, E., Thomsen, F., Murphy, A., & Laramie, B. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1299-1307.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351.
- Hänfling, B., Lawson Handley, L., Read, S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., & 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.
- Hedger, R. D., Diserud, O. H., Sandlund, O. T., Saksgård, L., Ugedal, O., & Bremset, G. (2018). Bias in estimates of electrofishing capture probability of juvenile Atlantic salmon. *Fisheries Research*, 208, 286-295.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270 (Suppl 1), S96-S99.
- Kamoroff, C., & Goldberg, C. S. (2018). Environmental DNA quantification in a spatial and temporal context: a case study examining the removal of brook trout from a high alpine basin. *Limnology*, 19(3), 335-342.
- Laramie, B., Pilliod, S., & Goldberg, C. S. (2015). Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biological Conservation*, 183, 29-37.

- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & De Poorter, M. (2000). 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. Auckland: IUCN/SSC Invasive Species Specialist Group (ISSG).
- Ministerio de Medio Ambiente (MMA) (2007). Lista de especies nativas según estado de conservación [http://www.mma.gob.cl/clasificacionespecies/lista\\_especies\\_nativas\\_segun\\_estado\\_conservacion.html](http://www.mma.gob.cl/clasificacionespecies/lista_especies_nativas_segun_estado_conservacion.html)
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., & Kondoh, M. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 150088.
- Muñoz B. (2007). Cambios en la riqueza íctica del río Maipo. Seminario de Título para optar al grado de Biólogo con Mención en Medio Ambiente. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Naiman R., Prieur-Richard A., Arthington A., Dudgeon D., Gessner M., Kawabata Z., Knowler D., O'Keefe J., Leveque C., Soto D., Stiassny M., Sullivan C. (2006). Challenges for freshwater biodiversity research: Science plan and implementation strategy. DIVERSITAS, Report No. 5. DIVERSITAS, Paris.
- Noss, R. F. (1990). Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology*, 4(4), 355–364.
- Office of Technology Assessment (OTA). 1987. Technologies to maintain biological diversity. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

- Ortiz-Sandoval, J. J., Ortiz, N., Cifuentes, R., González, J., & Habit, E. (2009). Respuesta de la comunidad de peces al dragado de ríos costeros de la Región del Biobío (Chile). *Gayana*, 73(1), 64-75.
- PNUD (2017). Catálogo de las especies exóticas asilvestradas/ naturalizadas en Chile. Laboratorio de Invasiones Biológicas (LIB) Universidad de Concepción, Proyecto GEF/MMA/PNUD Fortalecimiento de los Marcos Nacionales para la Gobernabilidad de las Especies Exóticas Invasoras: Proyecto Piloto en el Archipiélago de Juan Fernández. Santiago de Chile. 61 pp
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., & Gough, K. C. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450–1459.
- Reis, R., Albert, J., Di Dario, F., Mincarone, M., Petry, P., & Rocha, A. (2016). Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, 89(1), 12-47.
- Renshaw, M., Olds, B., Jerde, C., McVeigh, M., & Lodge, D. (2015). The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol–chloroform–isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, 15(1) 168-176.
- Reynolds, L., Herlihy, A., Kaufmann, Ph., Gregory, S. & Hughes, R. (2003). Electrofishing Effort Requirements for Assessing Species Richness and Biotic Integrity in Western Oregon Streams. *North American Journal of Fisheries Management*, 23:2, 450-461.
- Ruiz, V. H. & Berra, T. (1994). Fishes of the high Biobio river of south-central Chile with notes on diet and speculations on the origin of the ichthyofauna. *Ichthyology Exploration Freshwaters* 5: 5-18.

- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Sahl, J. W. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537-7541.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., Kawabata, Z. I. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 7, e35868.
- Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 30(9), 418–426.
- 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.
- Vamos, E. E., Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding (No. e3037v1). PeerJ Preprints.
- Vega-Retter C, Muñoz-Rojas, P., Vila, I., Copaja, S., Veliz, D. (2014). Living in a highly polluted environment: the case of the silverside *Basilichthys microlepidotus* (Teleostei: Atherinopsidae) in the Maipo River basin, central Chile. *Population Ecology*, 56(4), 569-579.
- Vila, I., Fuentes, L., Contreras, M. (1999). Peces Límnicos de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural, Chile*, 48, 61-75.
- Vila, I., Morales, P., Scott, S., Poulin, E., Véliz, D., Harrod, C., & Méndez, M. A. (2013). Phylogenetic and phylogeographic analysis of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) in the southern Chilean Altiplano: the relevance of ancient and recent divergence processes in speciation. *Journal of Fish Biology*, 82(3), 927-943.

Vila, I., Quezada-Romegialli, C. (2018). 5.2 Peces límnicos. In Ministerio del Medio Ambiente (Ed.), *Biodiversidad de Chile, Patrimonio y Desafíos* (Tercera ed, pp. 161–169). Santiago: Ministerio del Medio Ambiente.

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.

## ANEXO

Anexo 1: Taxonomía y estado de conservación de especies descritas en la cuenca del Río Maipo

Listado sistemático				Nombre Común	Categoría de conservación		
Chordata	Actinopteri	Cypriniformes	Cyprinidae	Carassius	<i>C. carassius</i>	Pez dorado	Exótica
		Cypriniformes	Cyprinidae	Cyprinus	<i>C. carpio</i>	Carpa	Exótica
		Characiformes	Characidae	Cheirodon	<i>Ch. pisciculus</i>	Pocha	Vulnerable (VU)
		Characiformes	Characidae	Cheirodon	<i>Ch. interruptus</i>	Pocha	Exótica
		Siluriformes	Diplomystidae	Diplomystes	<i>D. chilensis</i>	Bagre, Tollo de agua Dulce	En Peligro (EN), Extinta en la cuenca del Maipo
		Siluriformes	Trichomycteridae	Trichomycterus	<i>T. areolatus</i>	Bagre chico	Vulnerable (VU)
		Siluriformes	Trichomycteridae	Trichomycterus	<i>T. maculatus</i>	Bagre chico	Sin categoría
		Siluriformes	Nematogenyidae	Nematogenys	<i>N. inermis</i>	Bagre grande	En Peligro (EN)
		Salmoniformes	Salmonidae	Oncorhynchus	<i>O. mykiss</i>	Trucha arcoiris	Exótica
		Salmoniformes	Salmonidae	Salmo	<i>S. trutta</i>	Trucha café	Exótica
		Atheriniformes	Atherinopsidae	Basilichthys	<i>B. microlepidotus</i>	Pejerrey	Vulnerable (VU)
		Cyprinodontiformes	Poecillidae	Cnesterodon	<i>C. decemmaculatus</i>	Madrecita de agua, Gambusia manchada	Exótica
		Cyprinodontiformes	Poecillidae	Gambusia	<i>G. affinis holbrooki</i>	Gambusia	Exótica
		Cyprinodontiformes	Anablepinae	Jenynsia	<i>J. multidentata</i>	Madrecita, Panzona	Exótica
		Centrarchiformes	Percichthyidae	Percichthys	<i>P. melanops</i>	Perca, trucha negra	Vulnerable (VU)
		Centrarchiformes	Percichthyidae	Percichthys	<i>P. trucha</i>	Perca, trucha criolla	Casi amenazada (NT), Preocupación menor (LC)
		Centrarchiformes	Percichthyidae	Percilia	<i>P. gillissi</i>	Carmelita	En Peligro (EN)

Anexo 2: Características del agua, volumen filtrado y parámetros fisicoquímicos

<b>Sitio</b>	<b>Características del agua</b>	<b>Volumen Filtrado</b>
<b><i>Control positivo</i></b>		
<b>Acuario [AC]</b>	Clara	1,5
<b><i>Sistemas lénticos</i></b>		
<b>Chungara [LCH]</b>	Clara	1
<b>Paquisa [PA]</b>	Clara	1,5
<b><i>Sistema lótico: cuenca del Río Maipo</i></b>		
<b>Estero El manzano [EM]</b>	Clara	1
<b>Río Clarillo [RC]</b>	Clara	1
<b>Canal en Isla de Maipo [CIM]</b>	Clara	1
<b>Río Mapocho - El Monte [RM]</b>	Turbia	0,25
<b>*Río Maipo -Melipilla [ME1]</b>	Turbia	0,25
<b>*Río Maipo -Melipilla [ME2]</b>	Clara	1
<b>Estero Cholqui [ECH]</b>	Turbia	0,25

Tabla 3: Muestras seleccionadas por su calidad y concentración de ADN.

<b>Sitio</b>	<b>Concetración (ng/ul)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Acuario [AC]</b>	124,73	2	1,91
<b>Chungara [LCH]</b>	283,96	2,01	1,85
<b>Paquisa [PA]</b>	18,16	1,74	1,09
<b>Estero El manzano [EM]</b>	209,42	1,96	1,85
<b>Rio Clarillo [RC]</b>	215,03	2,02	1,7
<b>Canal en Isla de Maipo [CIM]</b>	565,37	1,27	1,35
<b>Río Mapocho - El Monte [RM]</b>	197,03	1,76	1,62
<b>*Río Maipo -Melipilla [ME1]</b>	23,26	1,66	1,35
<b>*Río Maipo -Melipilla [ME2]</b>	532,19	2,04	2,22
<b>Estero Cholqui [ECH]</b>	101,46	1,64	1,31

Anexo 4: Resultado de procesamiento bioinformático y número de lecturas cuantificadas para cada taxón

Muestra				AC	LCH	PA	RC	EM	CIM	RM	ME1	ME2	ECH	
<b>Lecturas Totales</b>				188407	232847	69667	176222	140530	26048	63432	49258	128183	40360	
<b>Lecturas totales con calidad Q30</b>				142310	172045	57616	144473	118185	22361	49869	33448	108625	30394	
<b>Lecturas asignadas a peces</b>				19203	35	2906	253	1519	584	422	408	5	426	
N° de OTUs	Clasificación sistemática de secuencias de peces de Actinopterygios (Orden, familia, género y especie)													
1	Cypriniformes	Cyprinidae	Cyprinus	<i>C. carpio</i>	0	0	0	0	0	0	93	0	0	155
1	Cypriniformes	Cyprinidae	Cyprinus	<i>C. SC</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37
2	Characiformes	Characidae	Cheirodon	<i>Ch. SC</i>	6513	0	0	244	0	5	14	0	0	174
1	Characiformes	Characidae	Cheirodon	<i>Ch. galusdae</i>	4249	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Siluriformes	Trichomycteridae	Bullockia	<i>B. maldonadoi</i>	7013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Siluriformes	Trichomycteridae	Trichomycterus	<i>T. areolatus</i>	31	0	0	5	1040	0	310	179	0	0
2	Siluriformes	Trichomycteridae	Trichomycterus	<i>T. sp.</i>	34	0	2786	0	27	0	0	0	0	0
3	Siluriformes	Trichomycteridae	Trichomycterus	<i>T. maculatus</i>	13	0	0	0	276	0	0	143	0	60
1	Siluriformes	Nematogenyidae	Nematogenys	<i>N. inermis</i>	0	0	0	0	0	428	0	18	0	0
2	Salmoniformes	Salmonidae	Oncorhynchus	<i>O. mykiss</i>	0	4	0	0	90	151	0	0	0	0
1	Salmoniformes	Salmonidae	Salmo	<i>S. trutta</i>	0	0	0	0	86	0	0	0	0	0
1	Atheriniformes	Atherinopsidae	Basilichthys	<i>B. microlepidotus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
1	Cyprinodontiformes	Cyprinodontidae	Orestias	<i>O. ascotanensis</i>	0	31	120	0	0	0	0	0	0	0
1	Centrarchiformes	Percichthyidae	Percichthys	<i>P. trucha</i>	0	0	0	0	0	0	0	68	0	0
1	Centrarchiformes	Percichthyidae	Percilia	<i>P. irwini</i>	1350	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Centrarchiformes	Percichthyidae	Percilia	<i>P. gillissi</i>	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0

\*SC= Sin Clasificar

Anexo 5: Porcentaje de lecturas normalizado y filtrado

				Porcentaje de Secuencias Normalizadas, filtradas con frecuencia > 0.001									
Clasificación sistemática de secuencias de peces Actinopterygios				AC	LCH	PA	RC	EM	CIM	RM	ME1	ME2	ECH
<b>Cypriniformes</b>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus</i>	<i>C. carpio</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	22,0	0,0	0,0	36,4
<b>Cypriniformes</b>	<i>Cyprinidae</i>	<i>Cyprinus</i>	<i>C. SC</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,7
<b>Characiformes</b>	<i>Characidae</i>	<i>Cheirondon</i>	<i>Ch. SC</i>	33,9	0,0	0,0	96,4	0,0	0,9	3,3	0,0	0,0	40,8
<b>Characiformes</b>	<i>Characidae</i>	<i>Cheirodon</i>	<i>Ch. galusdae</i>	22,1	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Siluriformes</b>	<i>Trichomycteridae</i>	<i>Bullockia</i>	<i>B. maldonadoi</i>	36,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Siluriformes</b>	<i>Trichomycteridae</i>	<i>Trichomycterus</i>	<i>T. areolatus</i>	0,0	0,0	0,0	2,0	68,5	0,0	73,5	43,9	0,0	0,0
<b>Siluriformes</b>	<i>Trichomycteridae</i>	<i>Trichomycterus</i>	<i>T. sp.</i>	0,0	0,0	95,9	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Siluriformes</b>	<i>Trichomycteridae</i>	<i>Trichomycterus</i>	<i>T. maculatus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	18,2	0,0	0,0	35,0	0,0	14,1
<b>Siluriformes</b>	<i>Nematogenyidae</i>	<i>Nematogenys</i>	<i>N. inermis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	73,3	0,0	4,4	0,0	0,0
<b>Salmoniformes</b>	<i>Salmonidae</i>	<i>Oncorhynchus</i>	<i>O. mykiss</i>	0,0	11,4	0,0	0,0	5,9	25,9	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Salmoniformes</b>	<i>Salmonidae</i>	<i>Salmo</i>	<i>S. trutta</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Atheriniformes</b>	<i>Atherinopsidae</i>	<i>Basilichthys</i>	<i>B. microlepidotus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100	0,0
<b>Cyprinodontiformes</b>	<i>Cyprinodontidae</i>	<i>Orestias</i>	<i>O. ascotanensis</i>	0,0	88,6	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Centrarchiformes</b>	<i>Percichthyidae</i>	<i>Percichthys</i>	<i>P. trucha</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,7	0,0	0,0
<b>Centrarchiformes</b>	<i>Percichthyidae</i>	<i>Percilia</i>	<i>P. irwini</i>	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Centrarchiformes</b>	<i>Percichthyidae</i>	<i>Percilia</i>	<i>P. gillissi</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0
				100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

\*SC= Sin Clasificar

Anexo 6: Distancia entre OTUs asignadas dentro del género *Trichomycterus* en la Cuenca del Río Maipo

	<i>T. maculatus1</i>	<i>T. maculatus2</i>	<i>T. maculatus3</i>	<i>T. areolatus1</i>	<i>T. areolatus2</i>
<i>T. maculatus1</i>	0,000				
<i>T. maculatus2</i>	0,010	0,000			
<i>T. maculatus3</i>	0,007	0,003	0,000		
<i>T. areolatus1</i>	0,083	0,080	0,077	0,000	
<i>T. areolatus2</i>	0,079	0,076	0,073	0,003	0,000