

Marzo 2022

CARACTERIZACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD DE LOS HUMEDALES DEL RÍO QUEULE (REGIÓN DE LA ARAUCANÍA), USANDO ADN AMBIENTAL



Ministerio del
Medio
Ambiente

Gobierno de Chile



Ecología y Genética Ambiental SpA
VÍCTOR LAMAS #491, CONCEPCIÓN
REGIÓN DEL BÍO-BÍO – CHILE
www.ecogen.cl



CARACTERIZACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD DE LOS HUMEDALES DEL RÍO QUEULE (REGIÓN DE LA ARAUCANÍA), USANDO ADN AMBIENTAL

ECOLOGÍA Y GENÉTICA AMBIENTAL SPA
Víctor Lamas #491, Concepción
Concepción- Chile
www.ecogen.cl



ecogen



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo general	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. METODOLOGÍA	6
3.1. Sitios de estudio	6
3.2. Colecta y filtración de muestras ambientales	7
3.3. Extracción del material genético	8
3.4. Elaboración librerías genéticas y secuenciación masiva	9
3.5. Análisis bioinformático	10
3.6. Análisis de diversidad	11
4. RESULTADOS	12
4.1. Índices de diversidad de ASV y específica en las matrices ambientales	12
4.2. Diversidad y asignación taxonómica en las matrices ambientales	13
4.2.1. Invertebrados	14
4.2.2. Peces	16
4.2.3. Anfibios	19
4.2.4. Mamíferos	21
4.3. Comparación de la biodiversidad entre muestras ambientales	23
5. CONCLUSIONES	24
6. LITERATURA CITADA	26
7. REFERENCIAS CONSULTADAS	29
8. ANEXO A. PRESENCIA DE FAMILIAS DE INVERTEBRADOS.	30
9. ANEXO B. LISTA SISTEMÁTICA DE VERTEBRADOS REGISTRADOS USANDO ADN AMBIENTAL	33
10. ANEXO: DESCRIPCIÓN DE ARCHIVOS	37
11. ECOGEN SPA – RESUMEN DE ACTIVIDADES	37



RESUMEN

El monitoreo ambiental identifica genéticamente las especies de macroinvertebrados, peces, anfibios y mamíferos presentes en todas las muestras de agua asociadas a los humedales del río Queule. Los resultados de los análisis de ADN ambiental mostraron una alta diversidad y baja dominancia en los grupos estudiados con un total de 383 especies identificadas. El grupo más representativo fueron los macroinvertebrados (326 especies), seguido por mamíferos (24 especies), peces (19 especies) y anfibios (14 especies). Los grupos de macroinvertebrados más importantes en términos de abundancia relativa fueron los artrópodos, nemátodos y anélidos. De las especies de peces identificadas, 15 corresponden a especies nativas, entre las cuales destaca la alta frecuencia de ocurrencia del puye (*Brachygalaxias bullocki*), el puye chico (*Galaxias maculatus*), la perca trucha (*Percichthys trucha*) y la lamprea de bolsa (*Geotria australis*). De las especies no-nativas, los salmónidos *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo trutta* y el ciprínido *Cyprinus carpio* estuvieron presentes en todas (o casi todas) las estaciones de monitoreo. Las especies de anfibios registradas en los humedales del río Queule fueron 14, todas especies nativas, con siete de ellas endémicas. Las especies más frecuentes en las estaciones de monitoreo fueron la rana chilena (*Calyptocephallela gayi*), la rana moteada (*Batrachyla leptopus*) y la rana de antifaz (*Batrachyla taeniata*), mientras que el sapo austral (*Telmatobufo australis*) mostró la mayor abundancia relativa, con abundancias restringidas a estaciones cordilleranas. Los mamíferos identificados fueron 24, de las cuales 11 fueron especies exóticas, 10 fueron nativas, y tres correspondieron a taxa identificados a nivel de familia (Cervidae, Chiroptera y Felidae). Las mayores abundancias relativas provienen de especies introducidas y domesticadas. La comparación entre áreas de los humedales del río Queule mostró diferencias en términos de composición de especies, mostrando las mayores diferencias entre áreas con influencia marina y áreas con influencia cordillerana. Los resultados indican que la identificación de especies mediante ADN ambiental es un método óptimo para caracterizar sistemas naturales complejos que puedan apoyar políticas medioambientales relacionadas con la gestión de la biodiversidad en conservación y protección ambiental local y su desarrollo a nivel global.



1. INTRODUCCIÓN

El ADN ambiental (eDNA por su acrónimo en inglés), está referido al material genético libre que puede ser recuperado desde una matriz ambiental (i.e., agua, suelo, sedimento, nieve, entre otros), el cual proviene de una variedad de organismos en diferentes fuentes ambientales, las cuales van desde secreciones corporales (sangre, mucus, propágulos reproductivos, excreciones, desechos celulares, cabello, tejido), o desde microorganismos, incluyendo el material genético como moléculas libres de ADN (Taberlet et al. 2018). Este material genético puede ser extraído y aislado del ambiente usando métodos convencionales de biología molecular. Una vez extraído, la información inherente incorporada dentro del ADN proporciona una “lupa” a través de la cual se pueden estudiar los organismos que están presentes en el ambiente desde donde fueron obtenidas las muestras. Los métodos basados en ADN ambiental ofrecen ventajas comparativas con respecto a métodos tradicionales, ya que pueden ser aplicados a una amplia gama de hábitats y grupos, sin requerir de una amplia especialización y/o experiencia taxonómica (Ficetola et al. 2008). Los métodos son extremadamente flexibles y adaptables a distintos grupos objetivos, ambientes como acuáticos o terrestres, y ecosistemas como humedales, bosques, desiertos, lagunas, ríos, o incluso microbioma (Ficetola et al. 2008, Taberlet et al. 2018). En general, la explotación del ADN ambiental para monitorear la biodiversidad se basa en el principio de que es posible reconocer cada una de las especies existentes en el planeta a partir de un segmento del material genético, el cual es conocido hoy en día como “*DNA barcoding*”. A nivel técnico, es posible encontrar marcadores moleculares que cumplen bastante bien el principio (e.g., segmentos parciales del gen COI mitocondrial, y ribosómico mitocondrial de los genes 16s y 12s), y que se utilizan de forma rutinaria para identificar y catalogar metazoos (Taberlet et al. 2018, Valentini et al. 2018). A nivel práctico, ha habido un desarrollo sin precedentes de catálogos de biodiversidad que incluyen secuencias de ADN (i.e., BOLD, GenBank, WoRMs, Biocode, Midori), que son la columna vertebral de las técnicas que utilizan eDNA.

En el área de macro-biología esta metodología es relativamente reciente, sin embargo, ha sido usada exitosamente para detectar especies invasoras, estimar características poblacionales de especies objetivo de interés comercial, monitorear especies amenazadas y generar inventarios de biodiversidad en varias partes del mundo. Existen varios métodos para catalogar especies a partir del ADN ambiental, no obstante, el método más eficaz, tanto para procariotas como eucariotas, consiste en la amplificación selectiva de fragmentos de uno o varios genes provenientes desde una muestra ambiental que contiene el material genético de toda una comunidad. Una vez amplificado, el producto resultante es descifrado usando secuenciación masiva de próxima generación (NGS), la cual es denominada “*metabarcoding*” y, hoy en día, representa una aproximación muy prometedora para realizar levantamientos de información de biodiversidad con una alta resolución taxonómica, de forma eficiente, precisa, sensible, costo-efectiva, y no-invasiva en comparación a métodos tradicionales.



El proyecto GEF humedales costeros del centro-sur de Chile es un proyecto ejecutado por el Ministerio del Medio Ambiente del Gobierno de Chile, implementado en colaboración con la ONU Medio Ambiente y financiado por Global Environment Facility (GEF). Este proyecto tiene por objetivo “mejorar el estado ecológico y de conservación de ecosistemas costeros del centro-sur de Chile, incluyendo no solo humedales, sino también sus cuencas adyacentes, integrándolas al desarrollo local a través de un manejo sustentable”. El proyecto ha focalizado sus esfuerzos en cinco humedales piloto, los cuales corresponden a la desembocadura del río Elqui en la región de Coquimbo; el humedal de Mantagua en la región de Valparaíso, el humedal laguna de Cáhuil en la región Libertador Bernardo O’Higgins, el humedal Rocuant-Andalién en la región del Biobío, y los humedales del río Queule en la región de La Araucanía (GEF, 2021); este último, foco del presente estudio. El presente documento contiene los resultados del monitoreo de macroinvertebrados y vertebrados (peces, anfibios y mamíferos) mediante el análisis de metabarcoding de ADN ambiental realizado por ECOGEN SPA como producto de la colecta de muestras realizadas durante el mes de octubre de 2021 en los humedales del río Queule, región de la Araucanía.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Identificar genéticamente las especies de macroinvertebrados y vertebrados (peces, anfibios, mamíferos) usando ADN ambiental proveniente de muestras de agua colectadas desde los humedales asociados al río Queule, el cual corresponde a uno de los ecosistemas piloto del programa GEF-humedales costeros.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar la biodiversidad de macroinvertebrados, peces, anfibios y mamíferos asociados a muestras ambientales de agua provenientes de los humedales asociados al río Queule en la región de La Araucanía.
2. Comparar la biodiversidad entre las áreas identificadas en los humedales a lo largo del río Queule y sus tributarios adyacentes.

3. METODOLOGÍA

3.1. Sitios de estudio

El programa GEF-humedales costeros tiene como piloto los humedales del río Queule en la región de la Araucanía (Figura 1). Estos humedales incluyen arroyos, esteros, ríos, pantanos de agua dulce, bosques pantanosos, lagunas costeras de agua dulce, estuarios, marismas y extensas playas arenosas y rocosas (Hernández et al. 2020). El principal cuerpo de agua es el río Queule, el cual tiene un régimen pluvial con fluctuaciones estacionales comunes de climas templados. Sin embargo, el río Queule nace en la cordillera de la costa, al sur de la comuna de Gorbea y atraviesa varios sistemas naturales, iconos de la región, los cuales tienen una importancia ecológica y social, tales como las vegas de Mahuidanche y hualves a lo largo de la mayor parte de su recorrido, especialmente en las zonas altas. En este ecosistema, fueron colectadas y filtradas muestras ambientales desde la superficie del cuerpo de agua para realizar los procesos de extracción y aislación del material genético. La localización y ubicación espacial de las estaciones de monitoreo con respecto a la línea de costa (desembocadura del río), son indicadas en la Tabla 1 y Figura 1.

Tabla 1. Coordenadas geográficas (Huso 18H, WGS 84) de las estaciones de monitoreo de los humedales asociados al río Queule agrupadas en ocho áreas predefinidas, donde fueron colectadas muestras ambientales de agua para el análisis de ADN ambiental.

Áreas	Estaciones de monitoreo	*Ubicación referencial a la línea de costa (m)	Latitud (S)	Longitud (O)
A1	1A	1150	39°23'46.71"S	73°12'37.76"O
	1B	1486	39°23'39.27"S	73°12'19.18"O
	1C	1869	39°23'30.20"S	73°12'01.83"O
A2	2A	3533	39°22'20.36"S	73°11'20.33"O
	2B	4028	39°22'70.04"S	73°11'08.07"O
	2C	4352	39°21'50.73"S	73°11'07.25"O
A3	3A	13750	39°16'14.71"S	73°11'07.81"O
	3B	14200	39°16'02.81"S	73°10'53.45"O
	3C	14638	39°15'50.57"S	73°10'39.84"O
A4	4A	16498	39°15'32.13"S	73°08'06.37"O
	4B	16967	39°15'15.75"S	73°08'03.57"O
	4C	17411	39°14'59.56"S	73°08'05.09"O
A5	5A	23774	39°11'02.55"S	73°09'08.58"O
	5B	24272	39°10'46.15"S	73°09'06.12"O
	5C	24768	39°10'30.12"S	73°09'04.25"O
A6	6A	30011	39°09'38.30"S	73°02'26.14"O
	6B	29993	39°09'46.79"S	73°02'08.51"O
	6C	30189	39°09'50.08"S	73°01'47.88"O
A7	7A	32571	39°14'01.67"S	72°54'12.04"O
	7B	32809	39°14'09.36"S	72°53'54.01"O
	7C	32967	39°14'14.08"S	72°53'42.48"O
A8	8A	26210	39°16'15.72"S	72°57'37.31"O
	8B	26308	39°16'12.70"S	72°57'34.86"O
	8C	26430	39°16'08.80"S	72°57'31.93"O

*Línea de costa para medir distancia fue centrada en la desembocadura del río Queule.

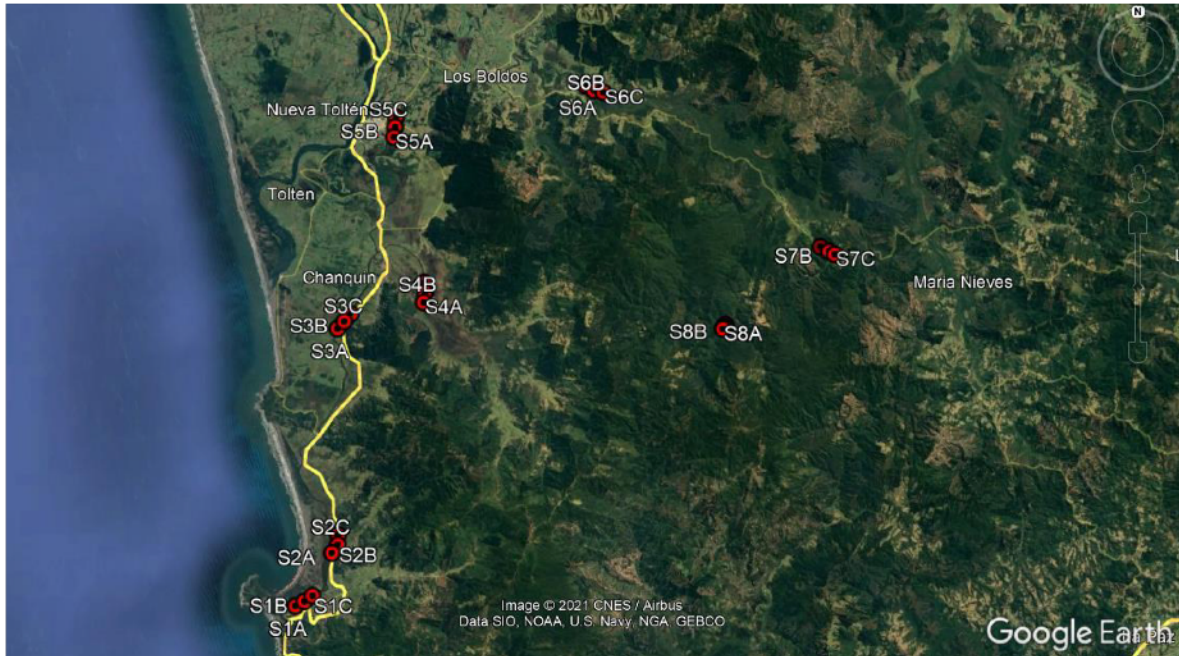


Figura 1. Ubicación espacial de las estaciones de monitoreo donde fueron colectadas las muestras ambientales de agua para la realización del análisis de ADN ambiental.

3.2. Colecta y filtración de muestras ambientales

Desde los hábitats (estaciones de monitoreo), se obtuvieron muestras ambientales colectadas desde la superficie de la columna de agua hasta 0,5 m de profundidad en 24 estaciones de monitoreo agrupadas en ocho áreas a lo largo del río Queule y tributarios adyacentes (i.e., A1-A8, con estaciones en triplicado: A, B, C separadas cada 500 ± 20 metros, con excepción de las zonas A7 y A8 donde las estaciones fueron separadas por 100 a 300 m dependiendo de la disponibilidad de llegada ingreso). En cada estación, bidones de plástico con capacidad de 5 litros y previamente esterilizados en una solución de Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 10%, fueron usados para coleccionar agua desde cada punto. En forma paralela, un control de muestreo (agua ultrapura) fue incluido siguiendo el mismo procedimiento utilizado con las muestras de agua, usando un kit de muestreo de ECOGEN (2021). Posterior a la colecta, las muestras fueron conservadas en un buffer solución y transportadas en frío y oscuridad para luego ser filtradas *in vitro* en un sistema de filtración por vacío, usando filtros de 47 mm de diámetro y $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, bajo condiciones esterilizadas de laboratorio (Figura 2). El proceso analítico generalizado es mostrado en Figura 3.



Figura 2. Sistema de filtración por vacío para retener fragmentos genéticos desde muestras ambientales de agua colectadas desde los humedales del río Queule y tributarios adyacentes.

3.3. Extracción del material genético

Las muestras filtradas fueron sometidas a una etapa de desprendimiento y “*lisis*” en la cual el ADN es liberado desde la membrana mediante un proceso de ruptura mecánica, para luego ser sometidas a una solución con detergentes y enzimas como proteinasas que liberan y disuelven proteínas celulares. Usando un kit comercial (ver Sáenz et al. 2021), la mezcla del proceso es sometida a una solución salina de alta concentración para unir el material genético a una membrana de sílice, evitando, la unión del material no-genético. La recuperación del ADN es realizada a través de procesos continuos de hidratación y centrifugación que elimina proteínas contaminantes y otros residuos como sal residual, ácido húmico y otros contaminantes, mientras el ADN permanece unido a la membrana. Finalmente, mediante una solución amortiguadora se re-hidrata el ADN, mientras que un nuevo proceso de centrifugación permite re-suspender y recuperar el material genético disponible (Tabla 2). Las extracciones de las muestras fueron realizadas en una sola tanda con su respectivo control negativo de extracción.

Tabla 2. Concentración de material genético (ADN) en las muestras ambientales de agua colectadas desde los humedales asociados al río Queule, región de La Araucanía.

Áreas	Estaciones de monitoreo	Concentración de ADN (ng/μl)
A1	1A	3,76
	1B	4,36
	1C	3,76
A2	2A	FRM
	2B	4,16
	2C	6,38
A3	3A	4,66
	3B	5,36
	3C	4,36
A4	4A	4,90
	4B	5,50
	4C	9,22
A5	5A	2,40
	5B	0,54
	5C	2,58
A6	6A	2,72
	6B	4,38
	6C	2,56
A7	7A	5,42
	7B	4,80
	7C	4,04
A8	8A	2,06
	8B	3,20
	8C	3,92

FRM = Fuera del rango de medición.

3.4. Elaboración librerías genéticas y secuenciación masiva

Siguiendo el protocolo “*Illumina metagenomic sequencing library preparation*” regiones genéticas de tres amplicones de genes mitocondriales (ver detalles Deagle et al. 2007, Taylor, 1996, Leray et al. 2013) fueron amplificadas usando partidores universales adaptados y modificados de acuerdo con Sáenz-Agudelo et al. (2021). Las muestras, incluidos controles negativos de extracción para cada amplicón, fueron amplificadas en forma independientemente en una reacción de PCR, donde controles negativos de PCR fueron agregados para descartar contaminación. Cada muestra fue individualizada mediante una secuencia identificadora que permite posteriormente multiplexar/demultiplexar las muestras en la secuenciación. Para 16S se usaron protocolos de amplificación descritos por Saenz-Agudelo (2021) y para COI, los descritos en Bourlat et al. (2016). Estos grupos de partidores han mostrado ser confiables y efectivos en amplificar grupos objetivos en diferentes ambientes (e.g., Nguyen et al. 2020, Saenz-Agudelo et al. 2021). Las amplificaciones fueron agrupadas equimolar y luego re-amplificados con adaptadores *ad-hoc* Illumina. Posteriormente, una cuantificación fue realizada mediante un Qubit 4.0® para determinar la dilución a realizar para lograr la concentración de carga adecuada. La secuenciación fue realizada en la plataforma Miseq Illumina en kit de 600 ciclos V3 en formato pair-end y a una concentración de 12pM.



3.5. Análisis bioinformático

Demultiplexing. El proceso de demultiplexing fue realizado desde secuencias crudas (formato fastq y pareadas) entregadas por Illumina MiSeq usando el programa Geneious Prime 2019.2.3 (Biomatters Inc.) en función de los códigos de barras incorporados en cada uno de los partidores usados para amplificación. En forma posterior, el paquete bioinformático ANACAPA fue usado de acuerdo siguiendo el protocolo descrito en Saenz-Agudelo et al. (2021). Primero, se creó una biblioteca de referencia CRUX para cada uno de los conjuntos de partidores usando las bases de datos públicas NCBI_blast_nt y EMBL std. Esto se hizo siguiendo las instrucciones en (https://github.com/limey-bean/CRUX_Creating-Reference-libraries-Using-eXisting-tools). Una vez que se construyeron estas bibliotecas de referencia personalizadas, se agregaron secuencias de nuestra biblioteca de secuencias de referencia. Luego se ejecutó la primera canalización de Anacapa "Anacapa_QC_dada2.sh" para filtrar la calidad de los datos de secuencia y generar variantes de secuencia de amplicones (ASV) (Callahan et al. 2016, 2017). Brevemente, para cada archivo demultiplexado, los adaptadores y partidores se recortaron con cutadapt (Martin, 2011), luego se eliminaron las lecturas de baja calidad ($Q < 30$) y las lecturas se clasificaron por secuencia de partidor usando un kit rápido de herramientas (Gordon & Hannon 2010). Luego, estas secuencias se pasaron a través de un script personalizado que clasifica las lecturas como archivos de lectura *forward*, *backward* y sin fusionar, las que luego son ingresadas en el programa DADA2 donde se fusionan (cuando fue posible), se elimina el ruido, se prueban las secuencias químéricas y finalmente se agrupan como ASV. Como medida conservadora, una secuencia tenía que ocurrir al menos cuatro veces en el conjunto de datos para ser retenida como ASV. Luego ingresamos los archivos ASV.fasta en el segundo módulo de Anacapa "Anacapa_classifier.sh" para asignar la taxonomía a cada ASV. Aquí, todos los ASV se alinearon globalmente con los catálogos de referencia CRUX usando bowtie2 (Langmead & Salzberg 2012), y se retuvieron los 100 mejores resultados. Estos ASV y aciertos se ingresaron luego en BCLA, donde se asignaron probabilidades posteriores a las asignaciones taxonómicas (Gao et al. 2017). El resultado consistió en tablas de resumen de ASV y datos de conteo de taxonomía para cada muestra y cada conjunto de partidores. Las variaciones en las secuencias parciales (i.e., bases nitrogenadas) fueron asignadas a nivel específico usando BLAST y una probabilidad de identidad mayor o igual a 0,95 (probabilidad de error = 0,05) entre la secuencia de cada ASV y las referencias. El nivel de confianza estadístico de la mejor asignación taxonómica (a distintos niveles taxonómicos) para cada ASV fue estimada con el método BCLA usando el criterio de que, para reportar una asignación taxonómica, esta debía tener una probabilidad posterior de al menos 75%.

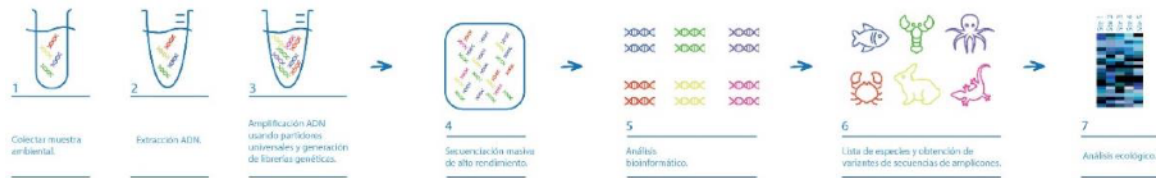


Figura 3. Esquema del proceso generalizado de etapas del análisis de ADN ambiental, desde la colecta de muestras ambientales hasta el desarrollo del análisis ecológico.

3.6. Análisis de diversidad

La diversidad- α fue estimada separadamente para cada muestra ambiental, a partir de todos las especies de vertebrados usando *vegan* de R (Oksanen et al. 2013). La riqueza específica e índices de diversidad de Shannon-Wiener, uniformidad de Pielou y dominancia de Simpson fueron calculados por muestra (Magurran 2004). El análisis de ordenación de diversidad- β fue explorado a través de una visualización espacial generada sobre un análisis de coordenadas principales (PCoA) usando matrices de similitud de Bray-Curtis más una variable “dummy” (valor 1), a partir de datos transformados a la forma $y = \sqrt{1/x}$, con el objetivo de disminuir el sesgo de fragmentos dominantes y generar mayor peso a fragmentos poco abundantes. Desde el análisis se obtienen las distancias (o similitudes) entre muestras para representar diferencias entre las mismas. Un análisis de varianza permutado (PERMANOVA, Anderson 2001) fue realizado para comparar la estructura comunitaria de las especies de vertebrados entre matrices ambientales asociando cada área a un tratamiento diferente, y usado como factor fijo en el análisis (Quinn & Keough, 2002). Los análisis estadísticos y aproximaciones multivariadas fueron realizados usando PERMANOVA+ sobre la plataforma estadística PRIMER 7 (Clarke & Gorley 2006, Anderson et al. 2008). En forma adicional, las especies de vertebrados fueron clasificados de acuerdo con su origen o su endemismo de acuerdo con la información disponible, las cuales fueron asignadas a cada especie en cada grupo focalizado a la menor resolución taxonómica descrita en el análisis.

4. RESULTADOS

4.1. Índices de diversidad de ASV y específica en las matrices ambientales

Un total de 4.473.510 lecturas de variantes de secuencias de los diferentes amplicones (ASVs), las cuales corresponden a la salida *paired-end* de una corrida 2x300 en MiSeq Illumina. Con las secuencias ensambladas, la identificación y remoción de quimeras fue realizada, para obtener desde todo el proceso, el número de lecturas para la asignación taxonómica, el cual varió para vertebrados entre 2.332 lecturas en la estación de monitoreo 2A y 267.494 lecturas en la estación de monitoreo 1C (Tabla 3), mostrando que casi el 99% de las lecturas totales correspondieron a fragmentos genéticos de especies de vertebrados. El otro 1% correspondieron a lecturas genéticas para macroinvertebrados. Basado en los parámetros de diversidad, la muestra 7A fue la más rica en especies, mayor diversidad y uniformidad (distribución de fragmentos genéticos en función de las especies) y la menos dominante, mientras que las muestras 5A y 6C fueron las muestras menos diversas y más dominantes. Para el caso de esta última (i.e., 6C), también mostró la menor riqueza específica (Tabla 3).

Tabla 3. Diversidad- α para las especies de vertebrados registradas en las muestras ambientales de agua en los humedales asociados al río Queule en la región de La Araucanía.

Áreas	α -diversidad Muestras	Riqueza (S)	Abundancia (lecturas ASV)	Shannon-Wiener (H')	Pielou (J')	Simpson (λ)
A1	1A	23	246059	0,93	0,68	0,18
	1B	16	81876	0,83	0,69	0,17
	1C	36	267494	0,89	0,57	0,22
A2	2A	18	2332	0,65	0,52	0,30
	2B	30	182352	0,90	0,61	0,15
	2C	37	222152	1,03	0,66	0,15
A3	3A	28	236039	0,73	0,50	0,26
	3B	33	187850	0,69	0,45	0,29
	3C	28	220798	0,74	0,51	0,28
A4	4A	22	107441	0,56	0,41	0,37
	4B	32	232746	0,82	0,55	0,22
	4C	31	228068	0,85	0,57	0,19
A5	5A	30	174950	0,29	0,19	0,70
	5B	30	71345	0,36	0,24	0,52
	5C	31	220297	0,56	0,38	0,46
A6	6A	22	188237	0,69	0,52	0,26
	6B	28	181779	0,77	0,53	0,23
	6C	15	139758	0,31	0,26	0,64
A7	7A	38	202246	1,05	0,66	0,12
	7B	33	172256	0,96	0,63	0,14
	7C	28	229493	0,79	0,55	0,21
A8	8A	31	234461	0,95	0,64	0,15
	8B	23	175429	0,77	0,56	0,21
	8C	28	212845	0,77	0,53	0,20
	Promedio	28	184095	0,74	0,28	0,52

4.2. Diversidad y asignación taxonómica en las matrices ambientales

El análisis mostró que los grupos de macroinvertebrados, peces, anfibios y mamíferos estuvieron presentes en todas las estaciones de monitoreo, mostrando una frecuencia de ocurrencia del 100%. El análisis de ADN ambiental sobre las categorías taxonómicas mayores (grupos) mostró un total de 383 especies pertenecientes a 276 géneros, 212 familias, 86 órdenes, 31 clases y 10 phyla diferentes, de los cuales nueve corresponden a invertebrados y un phylum (Chordata) representado por tres grupos (clases) de vertebrados (Actinopteri, Amphibia y Mammalia). El grupo con mayor riqueza de especies fue el de invertebrados con 326 entidades específicas, seguido por mamíferos con 24 entidades específicas (Tabla 4). De estos grupos, los peces aportaron con las mayores abundancias relativas en las estaciones de monitoreo con un 52,1% de la abundancia total, seguido por mamíferos con un 42,3% (Figura 4).

Tabla 4. Diversidad taxonómica de los grupos analizados provenientes desde muestras ambientales de agua colectadas en las estaciones de monitoreo de los humedales asociados al río Queule en la región de La Araucanía.

Reino	Grupos	Phyla	Clases	Órdenes	Familias	Géneros	Especies
Animalia	Macroinvertebrados	9	27	69	185	236	326
Animalia	Peces		2	12	12	16	19
Animalia	Anfibios	1	1	1	6	7	14
Animalia	Mamíferos		1	4	9	17	24
Totales		10	31	86	212	276	383

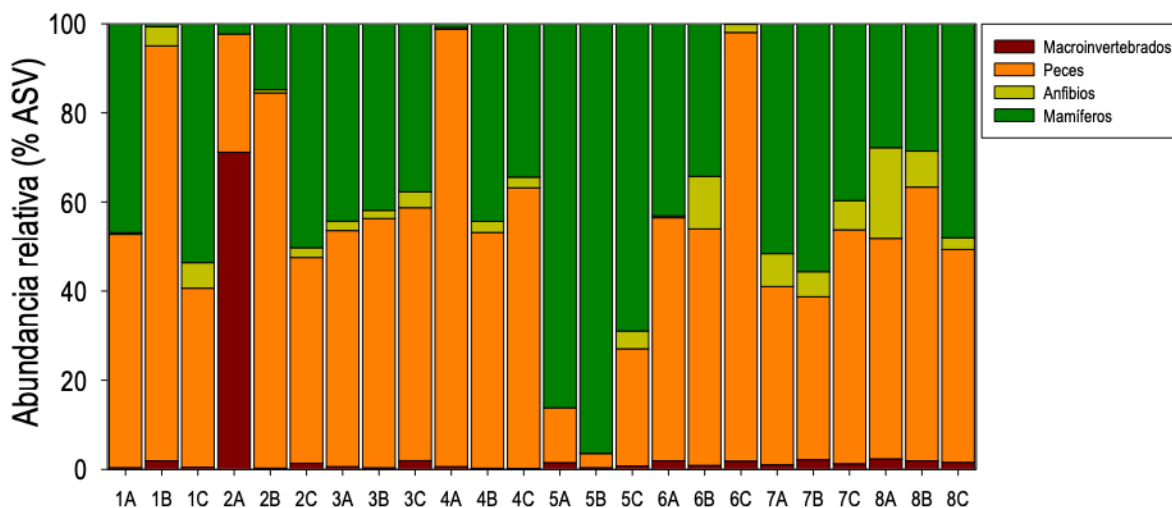


Figura 4. Abundancia relativa (%) de los grupos registrados en muestras ambientales de agua colectadas en las estaciones de monitoreo de los humedales asociados al río Queule en la región de La Araucanía.

4.2.1. Invertebrados

El análisis de ADN ambiental mostró que, en todas las estaciones de monitoreo, hubo presencia de distintos phyla de invertebrados. En particular, de los nueve phyla registrados, Annelida mostró la mayor frecuencia de ocurrencia con valores que superaron el 95% (Tabla 5). Los phyla que aportaron con las mayores contribuciones relativas en todas las estaciones de monitoreo fueron Arthropoda, Nematoda y Annelida con abundancias relativas totales de 35,1%, 28,5% y 20,5%, respectivamente. Los otros grupos de invertebrados mostraron abundancias relativas que no superaron el 10%, variando desde 0,03% al 10% (Figura 5 y Tabla 6). En detalle, el grupo de los invertebrados fue el más diverso con 185 familias perteneciente a 69 órdenes, 27 clases y 9 phyla, de las cuales 127 fueron familias de artrópodos presentes en muestras ambientales de agua, siendo el grupo mayormente representado, seguido por moluscos con 24 familias, anélidos con 14 familias y nemátodos con 10 familias; los demás grupos estuvieron menos representados, aunque fueron de gran importancia ecológica (ver Anexo A).

Tabla 5. Presencia/ausencia de invertebrados registrados en muestras ambientales de agua colectadas desde estaciones de monitoreo de los humedales del río Queule.

Phyla / Muestras	Áreas																							
	A1			A2			A3			A4			A5			A6			A7			A8		
	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C	5A	5B	5C	6A	6B	6C	7A	7B	7C	8A	8B	8C
Annelida	■																							
Arthropoda	■																							
Cnidaria	■																							
Ctenophora	■																							
Mollusca	■																							
Nematoda	■																							
Nemertea	■																							
Platyhelminthes	■																							
Tardigrada	■																							

Tabla 6. Familias de invertebrados y su contribución al total de fragmentos genéticos registrados en las muestras ambientales de agua colectadas en los humedales del río Queule.

Phyla	Familias	Fragmentos	Porcentaje (%)
Annelida	14	11342	20,5
Arthropoda	127	19370	35,1
Cnidaria	3	151	0,30
Ctenophora	1	19	0,03
Mollusca	24	1744	3,20
Nematoda	10	15761	28,5
Nemertea	1	21	0,04
Platyhelminthes	3	5517	10,0
Tardigrada	3	1282	2,30
	185	55207	100

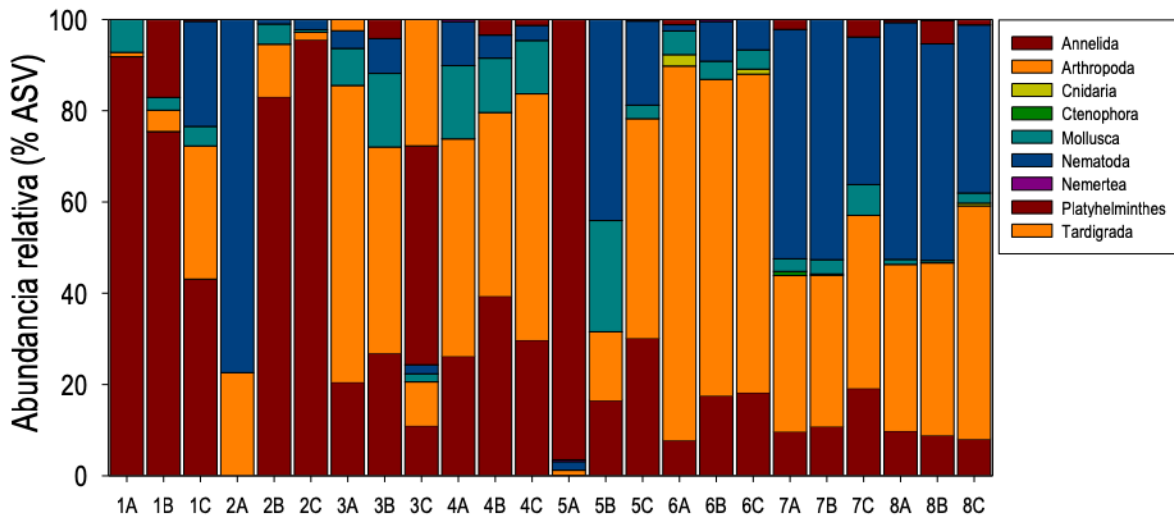


Figura 5. Abundancia relativa (%) de los phyla de invertebrados identificados desde la matriz ambiental de agua en las estaciones de monitoreo de los humedales del río Queule.



4.2.2. Peces

Para el grupo de peces, el análisis mostró que, a nivel específico, 19 especies fueron registradas, de las cuales cuatro corresponden a especies exóticas invasoras (o introducidas): la pocha *Cheirodon interruptus*, la carpa *Cyprinus carpio*, y dos truchas ampliamente distribuidas en Chile continental, la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* y la trucha café *Salmo trutta*, de las cuales, las tres últimas estuvieron presentes en todas (o casi todas) las estaciones de monitoreo. Sólo *C. interruptus* tuvo baja frecuencia de ocurrencia, alcanzando sólo el 25% en las estaciones, además de mostrar muy bajas densidades genéticas. Las otras 15 especies corresponden a especies nativas, de las cuales se destaca la alta frecuencia de ocurrencia de las especies el puye *Brachygalaxias bullocki* y el puye chico *Galaxias maculatus* con presencia del 100%, y de las especies la perca trucha *Percichthys trucha* presente en el 96% de las muestras y la lamprea de bolsa *Geotria australis* con ocurrencia en el 87,5% de las muestras, aunque está última con baja abundancia de fragmentos (Tabla 8, Figura 6A). Las especies que mostraron las mayores abundancias relativas en todo el humedal fueron las especies nativas *B. bullocki* (25,5%), *G. maculatus* (18,9%) y *P. trucha* (8,0%) y las especies exóticas *S. trutta* (24,9%), y *O. mykiss* (10,6%). El resto de las especies, tanto nativas como exóticas, no superaron el 5% de la abundancia relativa individual con respecto al total (Figura 6A). A nivel genérico, 16 géneros fueron identificados con altas abundancias relativas (promedio del 17-30%) de los géneros *Brachygalaxias*, *Galaxias* y *Salmo*. No obstante, *Oncorhynchus* y *Percichthys* también mostraron abundancias relativas importantes en todas las estaciones de monitoreo, bordeando un promedio de 9% del total (Figura 6B). Cabe destacar que especies de influencia marina como la lamprea de bolsa *G. australis*, el róbalo *Eleginops maclovinus* y la lisa *M. cephalus* han mostrado grandes fluctuaciones en su distribución debido a su tolerancia eurihalina y han sido reportadas como especies que generalmente habitan aguas estuarinas recorriendo grandes distancias río arriba (Habit et al. 2006, Zunino et al. 2009). Por otro lado, la detección de la merluza austral *Merluccius australis* puede deberse a la alta sensibilidad del método que puede reconocer fragmentos genéticos de alimentos semiprocados arrojados en aguas del humedal. Detalles de la sistemática del grupo puede ser revisada en Anexo B.

Tabla 8. Presencia/ausencia de peces registrados en muestras ambientales de agua colectadas desde estaciones de monitoreo en los humedales del río Queule, región de La Araucanía.

Origen	Nombre común	Phyla /	Áreas																							
			Muestras	A1			A2			A3			A4			A5			A6			A7			A8	
			1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C	5A	5B	5C	6A	6B	6C	7A	7B	7C	8A	8B	8C
Nativa	Peladilla	<i>Aplochiton taeniatus</i>																								
Nativa	Peladilla listada	<i>Aplochiton zebra</i>																								
Nativa	Puye	<i>Brachygalaxias bullocki</i>																								
Nativa	Reineta	<i>Brama australis</i>																								
Exótica	Pocha/mojarra	<i>Cheirodon interruptus</i>																								
Exótica	Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>																								
Nativa	Róbalo	<i>Eleginops maclovinus</i>																								
Nativa	Puye chico	<i>Galaxias maculatus</i>																								
Nativa	Puye grande	<i>Galaxias platei</i>																								
Nativa	Lamprea de bolsa	<i>Geotria australis</i>																								
Nativa	Merluza austral	<i>Merluccius australis</i>																								
Nativa	Lisa	<i>Mugil cephalus</i>																								
Nativa	Cauque del norte	<i>Odontesthes brevianalis</i>																								
Exótica	Trucha arcoiris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>																								
Nativa	Perca trucha	<i>Percichthys trucha</i>																								
Nativa	Carmelita	<i>Percilia gillissi</i>																								
Nativa	Carmelita de Concepción	<i>Percilia irwini</i>																								
Exótica	Trucha café	<i>Salmo trutta</i>																								
Nativa	Bagre chico	<i>Trichomycterus areolatus</i>																								

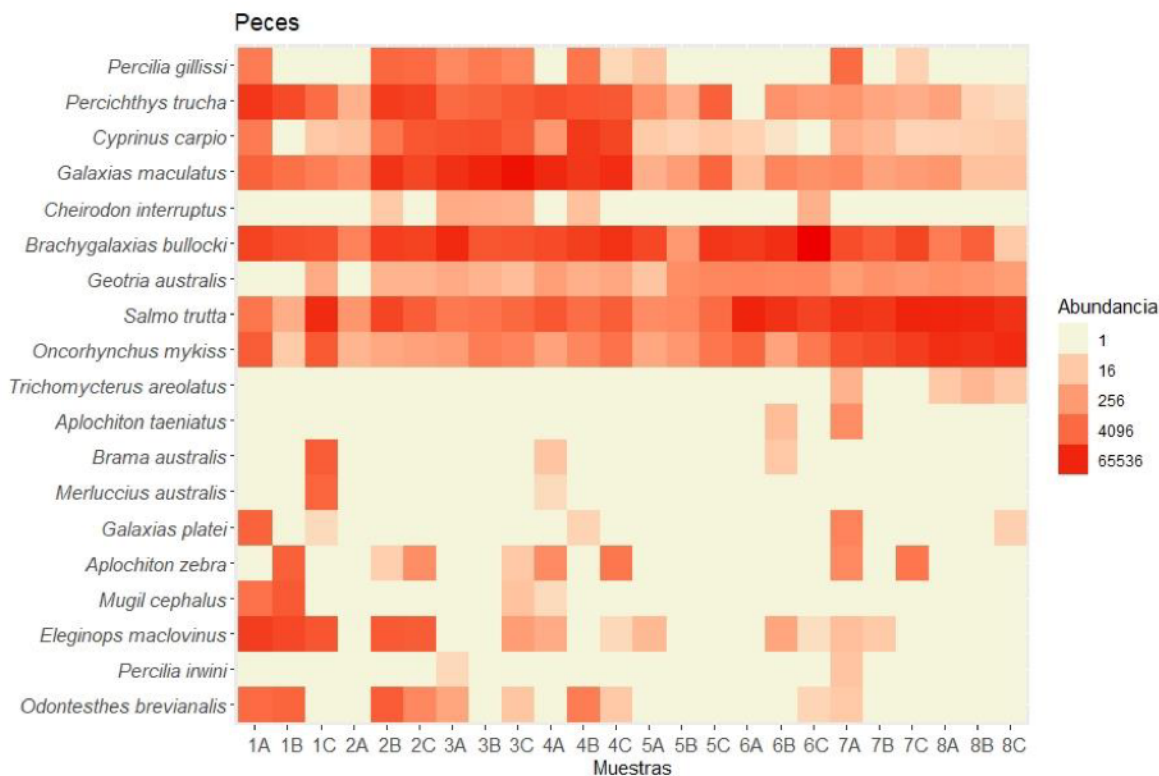


Figura 6A. Abundancia absoluta de fragmentos genéticos (lecturas de ASV por especie) de peces encontrados en las muestras ambientales de agua de los humedales asociados al río Queule en la región de la Araucanía.

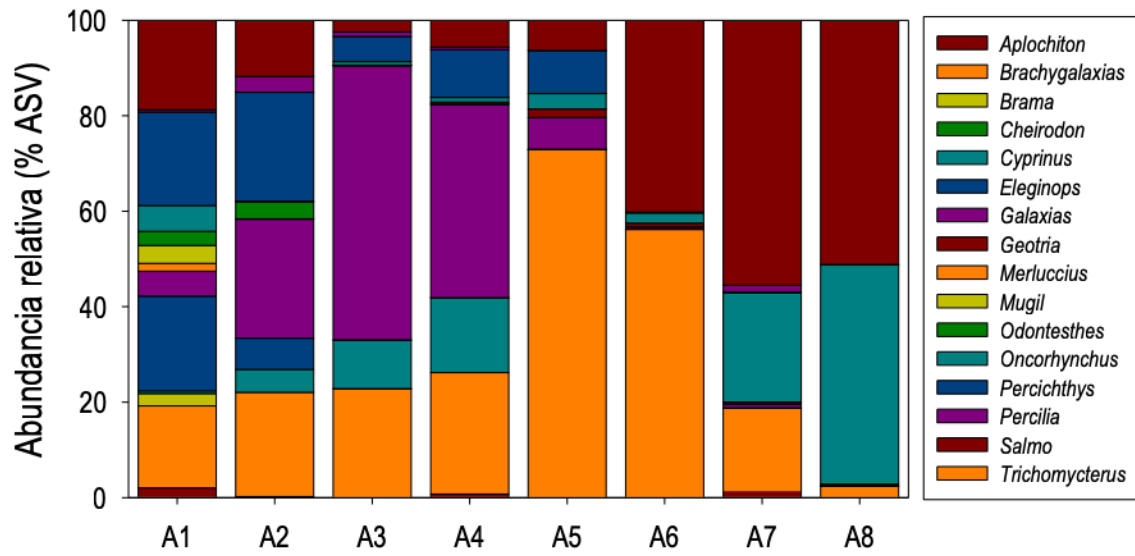


Figura 6B. Abundancia relativa (%) de los géneros de peces identificados desde muestras ambientales de agua en las ocho áreas de monitoreo de los humedales asociados al río Queule.

4.2.3. Anfibios

Para el grupo de anfibios, el análisis mostró que este grupo estuvo presente en todas las estaciones de monitoreo con al menos una especie (i.e., muestras 1B y 2A). El resto de las estaciones mostraron la presencia de dos o más especies. A nivel específico, 14 especies de anfibios fueron registradas, todas especies nativas, y siete de ellas también endémicas (*Alsodes monticola*, *Calyptocephallela gayi*, *Eupsophus migueli*, *Eupsophus roseus*, *Insuetophrynus acarpicus*, *Telmatobufo australis* y *Telmatobufo bullocki*) (Tabla 9). Los análisis mostraron que las especies más frecuentes fueron la rana chilena (*C. gayi*) con un 79,2% de representación y las especies no-endémicas la rana moteada *Batrachyla leptopus* y la rana de antifaz *Batrachyla taeniata* con 70,8% ambas especies. En relación con su abundancia, las especies que mostraron las mayores abundancias relativas fueron el sapo austral *T. australis*; 18,0% con abundancias restringidas a las estaciones cordilleranas (áreas A7 y A8), la rana de antifaz *B. taeniata*; 14,4%, la rana moteada *B. leptopus*; 11,9% y la rana chilena *C. gayi*; 11,6%, con abundancias “repartidas” entre las áreas A1 y A8, aunque la rana de antifaz y la rana chilena con muy pocos fragmentos en las áreas A7 y A8, y el sapo de Miguel *E. migueli*; 11,5% con altas abundancias en las áreas A6, A7 y A8 (Tabla 9, Figura 7A). A nivel genérico, siete géneros fueron identificados, de los cuales las mayores abundancias relativas fueron los géneros *Batrachyla* (promedio de 35,9%), *Eupsophus* (promedio 22,0%) y *Calyptocephallela* (promedio de 21,4%). Además, aunque con menores abundancias, también fueron importantes las abundancias de los géneros *Pleurodema* y *Telmatobufo*, ambos con abundancias que bordearon el 9% promedio del total (Figura 7B). Cabe destacar que las principales abundancias de los géneros *Alsodes*, *Insuetophrynus* y *Telmatobufo* estuvieron restringidas a estaciones de monitoreo asociadas a zonas cordilleranas (i.e., A7 y A8) (ver detalles de distribución en Tabla 9 y Figura 7A). Detalles de la sistemática del grupo puede ser revisada en Anexo B.

Tabla 9. Presencia/ausencia de anfibios registrados en muestras ambientales de agua colectadas en las estaciones de monitoreo en los humedales del río Queule, región de La Araucanía.

Endémica	Nombre común	Phyla /	Muestras	Áreas																							
				A1			A2			A3			A4			A5			A6			A7			A8		
			1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C	5A	5B	5C	6A	6B	6C	7A	7B	7C	8A	8B	8C	
NO	Rana del Catedral	<i>Alsodes gargola</i>																									
SI	Rana de arroyo	<i>Alsodes monticola</i>																									
NO	Sapo con verrugas	<i>Alsodes verrucosus</i>																									
NO	Rana moteada	<i>Batrachyla leptopus</i>																									
NO	Rana de antifaz	<i>Batrachyla taeniata</i>																									
SI	Rana chilena	<i>Calyptocephallela gayi</i>																									
NO	Rana de párpados verdes	<i>Eupsophus emiliopugini</i>																									
SI	Sapo de Miguel	<i>Eupsophus migueli</i>																									
SI	Sapo rosado	<i>Eupsophus roseus</i>																									
NO	Sapo terrestre de Valdivia	<i>Eupsophus vertebralis</i>																									
SI	Sapo de Mehuín	<i>Insuetophrynus acarpicus</i>																									
NO	Sapo de cuatro ojos	<i>Pleurodema thaul</i>																									
SI	Sapo austral	<i>Telmatobufo australis</i>																									
SI	Sapo de Bullock	<i>Telmatobufo bullocki</i>																									

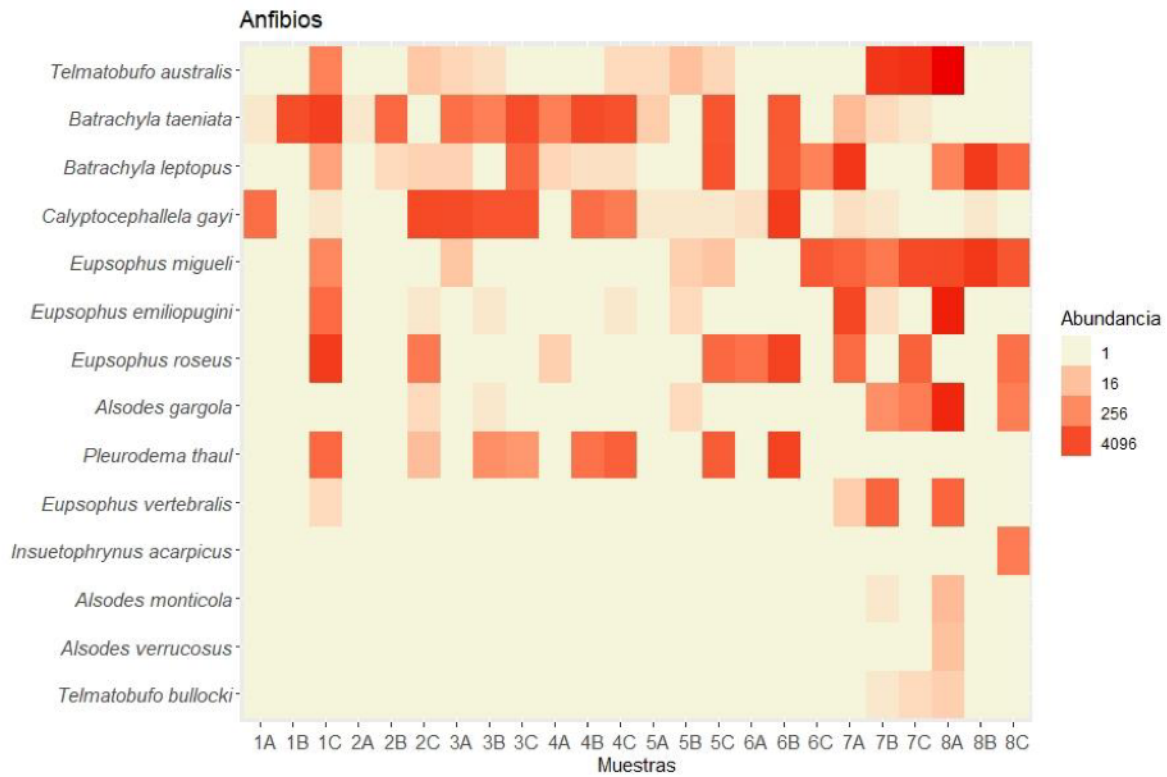


Figura 7A. Abundancia absoluta de fragmentos genéticos (lecturas de ASV por especie) de anfibios encontrados en las muestras ambientales de agua de los humedales asociados al río Queule en la región de la Araucanía.

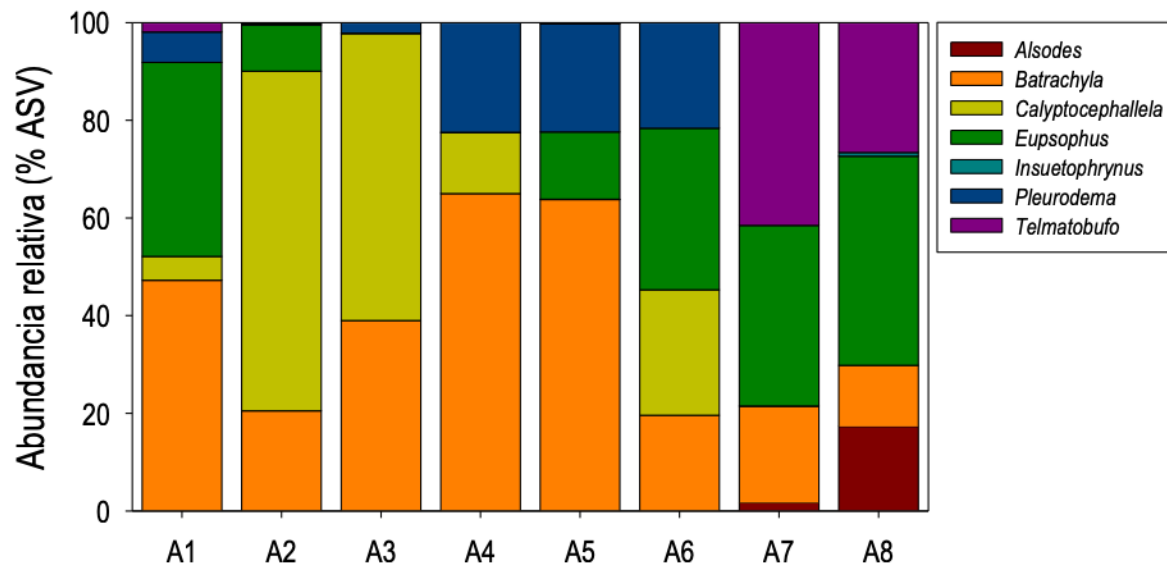


Figura 7B. Abundancia relativa (%) de los géneros de anfibios identificados desde muestras ambientales de agua en las ocho áreas de monitoreo de los humedales asociados al río Queule.

4.2.4. Mamíferos

El análisis evidenció 24 especies de mamíferos, pertenecientes a 17 géneros, nueve familias y cuatro órdenes taxonómicos, representando el segundo grupo más diversos dentro del análisis (Tabla 10). De estas especies, 11 fueron reconocidas como especies exóticas o introducidas, 10 como especies nativas, y tres taxa identificados solo a nivel de familia (i.e., Cervidae, Chiroptera y Felidae). De las especies exóticas/introducidas cabe destacar las altas abundancias relativas encontradas para el ganado vacuno *Bos taurus* (69,4%), el cerdo *Sus scrofa* (7,1%), la cabra *Capra hircus* (4,7%), y la oveja *Ovis aries* (4,2%), todas especies altamente domesticadas a nivel nacional y presentes en todas o casi todas las estaciones de monitoreo dentro de los humedales asociados al río Queule (Tabla 10, Figura 8). Cabe destacar la presencia del visón *Neovison vison* (1,5%), especie exótica que ha extendido rápidamente su rango de distribución desde Patagonia al norte, alcanzando actualmente hasta la zona cordillerana de la región del Biobío (ECOGEN, otro estudio). Entre las especies nativas registradas, el ratón colilargo *Oligoryzomys longicaudatus* (3,1%) y el coipo *Myocastor coypus* (1,3%) fueron las más abundantes. En forma adicional, y a pesar de su baja abundancia (<1%), es importante destacar la presencia de especies icónicas en nuestro país como el gato de Geoffroy *Leopardus geoffroyi*, la güiña *L. guigna*, el huillín *Lontra provocax*, y el pudú *Pudu puda*, todas especies asociadas principalmente a estaciones cordilleranas (áreas A7 y A8). A nivel genérico, el género introducido *Bos* fue el dominante con un 68,9%, seguido muy distante (<7%) por géneros también introducidos como *Sus*, *Ovis*, y *Capra*, todos organismos domesticados. Detalles de la sistemática del grupo puede ser revisada en Anexo B.

Tabla 10. Presencia/ausencia de mamíferos registrados en muestras ambientales de agua en las estaciones de monitoreo de los humedales asociados al río Queule, región de La Araucanía.

Origen	Nombre común	Áreas Phyla / Muestras	Áreas																							
			A1			A2			A3			A4			A5			A6			A7			A8		
			1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C	5A	5B	5C	6A	6B	6C	7A	7B	7C	8A	8B	8C
Nativa	Ratón de pelo largo	<i>Abrothrix longipilis</i>																								
Nativa	Ratón de Mann	<i>Abrothrix manni</i>																								
Exótica	Ciervo moteado	<i>Axis axis</i>																								
Exótica	Bovino	<i>Bos grunniens</i>																								
Exótica	Bovino	<i>Bos taurus</i>																								
Exótica	Búfalo de agua	<i>Bubalus bubalis</i>																								
Exótica	Perro	<i>Canis lupus</i>																								
Exótica	Cabra/Chivo	<i>Capra hircus</i>																								
-	Ciervos	Cervidae indet.																								
-	Murciélagos	Chiroptera indet.																								
-	Felinos	Felidae indet.																								
Nativa	Gato de Geoffroy	<i>Leopardus geoffroyi</i>																								
Nativa	Gato güiña	<i>Leopardus guigna</i>																								
Nativa	Huillín	<i>Lontra provocax</i>																								
Nativa	Pericote austral	<i>Loxodontomys micropus</i>																								
Nativa	Coipo	<i>Myocastor coypus</i>																								
Exótica	Visón	<i>Neovison vison</i>																								
Nativa	Ratón colilargo	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>																								
Exótica	Oveja	<i>Ovis aries</i>																								
Nativa	Lobo marino	<i>Otaria byronia</i>																								
Nativa	Pudú	<i>Pudu puda</i>																								
Exótica	Rata parda	<i>Rattus norvegicus</i>																								
Exótica	Rata negra	<i>Rattus rattus</i>																								
Exótica	Cerdo	<i>Sus scrofa</i>																								

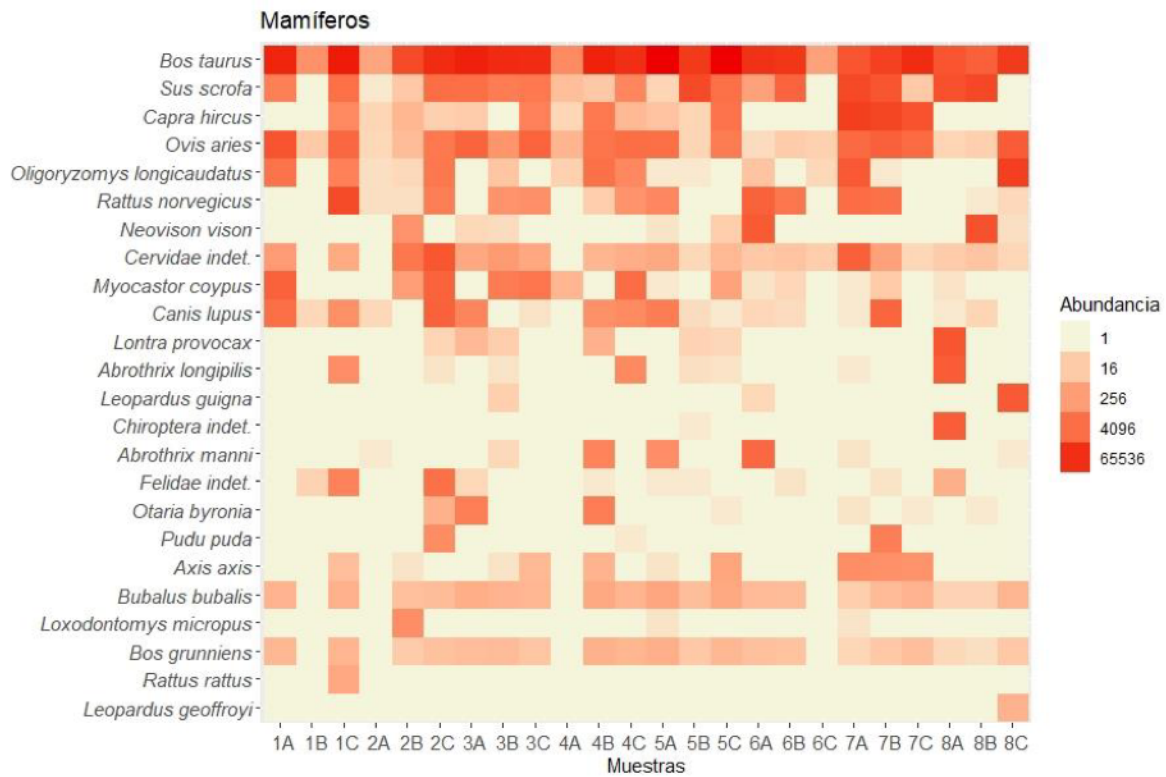


Figura 8A. Abundancia absoluta de fragmentos genéticos (lecturas de ASV por especie) de mamíferos encontrados en las muestras ambientales de agua de los humedales asociados al río Queule en la región de la Araucanía.

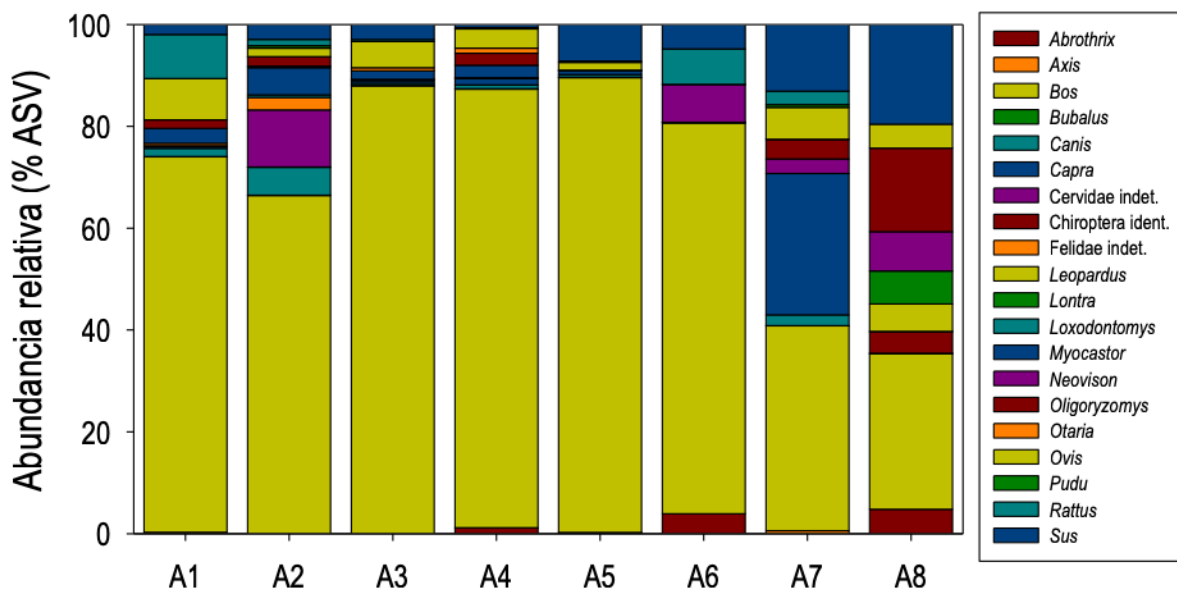


Figura 8. Abundancia relativa (%) de géneros de mamíferos identificados desde muestras ambientales de agua en las ocho áreas de monitoreo de los humedales asociados al río Queule.

4.3. Comparación de la biodiversidad entre muestras ambientales

La comparación entre áreas de los humedales asociados al río Queule mostró que las diferentes porciones del río y sus tributarios adyacentes mostraron diferencias en la estructura comunitaria de vertebrados (riqueza, composición y abundancia) (PERMANOVA, pseudo- $F_{(7,16)} = 2,33$; $P_{perm} < 0,001$ - Figura 9), mostrando que las similitudes intra-área (comparación entre A, B, C) fueron menores en las áreas A1 y A2, es decir, estas muestras mostraron mayor variabilidad específica dentro del área. Por otro lado, la mayor similitud inter-áreas fue evidenciada entre A3 y A4 con un 70,9% de similitud, mientras que las mayores diferencias inter-áreas fueron observadas entre las áreas A1 y A8 con 37,1% de similitud y entre las áreas A2 y A8 con 37,3% de similitud (Tabla 11), mostrando mayor dispersión multivariada (análisis de muchas especies) en estaciones de monitoreo asociadas a zonas con mayor influencia marina, que aquellas orientadas espacialmente en áreas cordilleranas (ver distancias entre muestras en Figura 9).

Tabla 11. Matriz de similitudes (%) dentro y entre áreas de los humedales asociados al río Queule. Valores en diagonal (negrita) corresponden a porcentajes de similitud intra-áreas (comparación entre A, B, C), mientras que valores en rojo corresponden a las menores y mayores similitudes inter-áreas.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
A1	49,4	-	-	-	-	-	-	-
A2	50,5	46,0	-	-	-	-	-	-
A3	54,7	58,1	78,5	-	-	-	-	-
A4	55,8	57,5	70,9	64,5	-	-	-	-
A5	48,6	52,4	61,8	56,6	61,5	-	-	-
A6	44,5	46,6	51,9	51,5	55,3	56,9	-	-
A7	48,0	46,9	53,2	51,1	57,8	53,3	68,7	-
A8	37,1	37,3	42,4	39,3	48,9	52,0	58,0	57,9

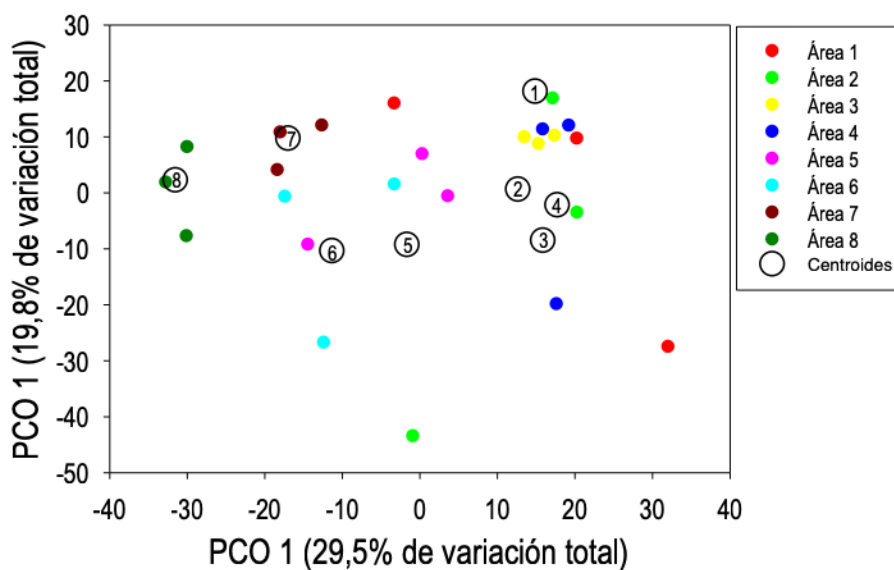


Figura 9. Análisis de ordenación (PCoA) para la composición específica de especies de vertebrados registradas en muestras ambientales de agua en estaciones de monitoreo de humedales asociados al río Queule. Cada color representa un área dentro de los humedales, y cada círculo blanco representa el “promedio” (centroide) de la estructura comunitaria entre muestras de la misma área.



5. CONCLUSIONES

1. Un total de 383 especies fueron registradas en los humedales del río Queule, las cuales corresponden a 326 especies de macroinvertebrados, 19 especies de peces, 14 especies de anfibios y 21 especies de mamíferos. Todos los grupos estuvieron presentes en todas las estaciones de monitoreo.
2. Altos valores de diversidad y bajos valores de dominancia fueron encontrados en la mayoría de las estaciones de monitoreo, mostrando que la muestra con mayor número de especies, mayor diversidad y uniformidad (distribución de fragmentos genéticos en función de las especies) y la menos dominante fue 7A, mientras que 5A y 6C fueron las muestras menos diversas y más dominantes.
3. Annelida mostró la mayor frecuencia de ocurrencia dentro de macroinvertebrados, mientras que Arthropoda, Nematoda y Annelida mostraron las mayores contribuciones relativas, respectivamente.
4. Fueron identificadas 19 especies de peces, de las cuales 15 corresponden a especies nativas y cuatro corresponden a especies no-nativas, con el puye (*Brachygalaxias bullocki*), el puye chico (*Galaxias maculatus*), la perca trucha (*Percichthys trucha*) y la lamprea de bolsa (*Geotria australis*) con las mayores ocurrencias. Las especies de peces no-nativas fueron identificadas como la pocha (*Cheirodon interruptus*), la carpa (*Cyprinus carpio*), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y la trucha café (*Salmo trutta*), con las tres últimas presentes en todas (o casi todas) las estaciones de monitoreo. Las especies más abundantes en los humedales del río Queule fueron *B. bullocki*, *S. trutta* y *G. maculatus*.
5. Todas las especies de anfibios identificadas corresponden a especies nativas, además, siete de ellas fueron categorizadas como endémicas. Los anfibios estuvieron presentes en todas las estaciones de monitoreo con al menos una especie. Las especies con mayor frecuencia de ocurrencia fueron la rana chilena (*Calyptocephallela gayi*), la rana moteada (*Batrachyla leptopus*) y la rana de antifaz (*Batrachyla taeniata*), mientras que el sapo austral (*Telmatobufo australis*) fue la especie más abundante, pero restringida a estaciones cordilleranas.
6. Fueron identificados 24 taxa de mamíferos, de las cuales 11 fueron reconocidas como especies no-nativas, 10 como especies nativas, y tres taxa identificados a nivel de familia (Cervidae, Chiroptera y Felidae). Las especies más abundantes fueron especies domesticadas como la vaca (*Bos taurus*), el cerdo (*Sus scrofa*), la cabra (*Capra hircus*) y la oveja (*Ovis aries*). Entre las especies nativas registradas destacan el ratón colilarga (*Oligoryzomys longicaudatus*) y el coipo (*Myocastor coypus*) como las más abundantes. Además, fueron registradas el gato de Geoffroy (*Leopardus geoffroyi*), la güiña (*Leopardus guigna*), el huillín (*Lontra provocax*) y el pudú (*Pudu puda*), principalmente en áreas cordilleranas. También fue registrado el visón (*Neovison vison*), como especie exótica.
7. La comparación entre áreas de los humedales mostró diferencias en términos de composición de especies, siendo mayores las diferencias entre áreas con influencia marina y áreas cordilleranas.



8. El estudio demuestra que el ADN ambiental tiene ventajas claras por sobre otras técnicas tradicionales de monitoreo, debido a su precisión basada en secuencias genéticas únicas, siendo altamente sensible para identificar especies crípticas o de baja densidad, además de tener la ventaja de ser un método no-invasivo, ya que no requiere observación, captura, manipulación o sacrificio de los organismos.



6. LITERATURA CITADA

- Anderson MJ. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26:32–46.
- Anderson MJ, RN Gorley, KR Clarke. 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: guide to software and statistical methods. Plymouth: PRIMER-E Ltd, Plymouth Marine Laboratory.
- Bourlat S, J Quiterie Haenel, J Finnman, M Leray. 2016. Preparation of amplicon libraries for metabarcoding of marine Eukaryotes using Illumina MiSeq: The Dual-PCR Method. *Methods in Molecular Biology* 1452:197–207. DOI:10.1007/978-1-4939-3774-5_13.
- Deagle BE, NJ Gales, K Evans, SN Jarman, S Robinson, R Trebilco, MA Hindell. 2007. Studying seabird diet through genetic analysis of faeces: a case study on Macaroni penguins (*Eudyptes chrysolophus*). *PLoS ONE* 2(9):e831. DOI:10.1371/journal.pone.0000831
- Callahan BJ, PJ McMurdie, MJ Rosen, AW Han, AJA Johnson, SP Holmes. 2016. DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data". *Nature Methods* 13:581–583.
- Callahan BJ, PJ McMurdie, SP Holmes. 2017. Exact Sequence Variants Should Replace Operational Taxonomic Units in Marker-Gene Data Analysis. *The ISME Journal* 11:2639–2643.
- Campos H, G Dazarola, B Dyer et al. 1998. Categorías de conservación de peces nativos de aguas continentales de Chile. *Boletín del Museo de Historia Natural* 47:101-122.
- Curd EE, Z Gold, GS Kandlikar, J Gomer, M Ogden, T O'Connell, L Pipes, et al. 2019. Anacapa Toolkit: An Environmental DNA Toolkit for Processing Multilocus Metabarcoding Datasets." Edited by D Yu. *Methods in Ecology and Evolution* 10(9):1469–75. DOI:10.1111/2041-210X.13214.
- Ficetola GFF, C Miaud, F Pompanon, P Taberlet. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4(4):423–425. DOI:10.1098/rsbl.2008.0118
- Gao X, H Lin, K Revanna, Q Dong. 2017. A Bayesian taxonomic classification method for 16S rRNA gene sequences with improved species-level accuracy. *BMC Bioinformatics* 18(247). DOI:10.1186/s12859-017-1670-4
- Gordon A, GJ Hannon. 2010. Fastx-toolkit. Computer Program distributed by the Author. Retrieved from http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html
- Habit E, B Dyer, I Vila. 2006. Estado del conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70:100–113. DOI:10.4067/S0717-65382006000100016
- Hernández M, A Bejcek, A Muñoz-Pedrerros. 2020. Humedales: la importancia de su valorización y conservación en la región de La Araucanía. 2nd edition, CEA ediciones, 80pp.



- Klindworth A, E Pruesse, T Schweer, T Peplies, C Quast, M Horn, FO Glöckner. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 7(41):e1. DOI:10.1093/nar/gks808.
- Langmead B, SL Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9(4):357-9. DOI:10.1038/nmeth.1923.
- Leray M, JY Yang, CP Meyer, SC Mills, N Agudelo, V Ranwez, JT Boehm, RJ Machida. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology* 10:34. DOI:10.1186/1742-9994-10-34
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal* 17:10–12.
- McMurdie PJ, S Holmes. 2013. Phyloseq: An R Package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8 (4):e61217.
- Montoya G, A Jara-Flores, K Solis-Lufí, N Colin, E Habit. 2012. Primeros estadios del ciclo de vida de peces nativos del Río San Pedro (Cuenca del Río Valdivia, Chile). *Gayana* 76:86-100.
- Nguyen BN, EW Shen, J Seemann, AMS Correa, JL O'Donnell, AH Altieri, N Knowlton, KA Crandall, SP Egan, W Owen MacMillan, M Leray. 2020. Environmental DNA survey captures patterns of fish and invertebrate diversity across a tropical seascape. *Science Report* 10:6729. DOI:10.1038/s41598-020-63565-9
- Oksanen J, FG Blanchet, R Kindt et al. 2013. Community Ecology Package. *R Package Version*, 2–0.
- Quinn GP, MJ Keough. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, United Kingdom, 537pp.
- R Core Team. 2020. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Sáenz-Agudelo P, E Delrieu-Trottin, JD Dibattista, D Marínez-Rincon, S Morales-González, F Pontigo, P Ramírez, A Silva, M Soto, C Correa. 2021. Monitoring vertebrate biodiversity of a protected coastal wetland using eDNA metabarcoding. *Environmental DNA* 4:77-92. DOI:10.1002/edn3.200
- Taberlet P, A Bonin, L Zinger, E Coissac. 2018. Environmental DNA for biodiversity research and monitoring. Oxford University Press, UK, 253pp.
- Taylor PG. 1996. Reproducibility of ancient DNA sequences from extinct Pleistocene fauna. *Molecular Biology Evolution* 13:283-285. DOI:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025566
- Valentini A, P Taberlet, C Miaud, R Civade, J Herder, PF Thomsen, E Bellemain, A Besnard, E Coissac, F Boyer, C Gaboriaud, P Jean, N Poulet, N Roset, GH Copp, P Geniez, D Pont, C Argillier, J-M Baudoin, T Peroux, AJ Crivelli, A Olivier, M Acqueberge, M Le Brun, PR Møller, E Willerslev, T Dejean. 2016. Next-generation



monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25(4):929–942. DOI:10.1111/mec.13428

Zunino S, C Aliaga, P Da Venezia. 2009. Comunidades de peces en desembocaduras de ríos y esteros de la región de Valparaíso, Chile central. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44:123-130.



7. REFERENCIAS CONSULTADAS

- Cassini MH, M Sepúlveda. 2006. El huillín *Lontra provocax*: Investigaciones sobre una nutria patagónica en peligro de extinción. Serie Fauna Neotropical 1, Publicación de la Organización PROFAUNA, Buenos Aires, 162pp.
- Fierro P, C Bertrán, M Mercado, F Peña-Cortés, J Tapia, E Hauenstein, L Vargas-Chacoff. 2012. Benthic macroinvertebrate assemblages as indicators of water quality applying a modified biotic index in a spatio-seasonal context in a coastal basin of Southern Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 47: 23-33.
- Fierro P, L Quilodrán, C Bertrán, I Arismendi, J Tapia, F Pena-Cortés, E Hauenstein, R Arriagada, E Fernandez, L Vargas-Chacoff. 2016. Rainbow trout diets and macroinvertebrates assemblages responses from watersheds dominated by native and exotic plantations. *Ecological Indicators* 60: 655-667.
- Gallardo CS. 1993. Reproductive habits and life cycle of the small clam *Kingiella chilensis* (Bivalvia: Cyamiidae) in an estuarine sand flat from the South of Chile. *Marine Biology* 115:595-603.
- GEF Humedales costeros del centro sur de Chile. 2021. <https://gefhumedales.mma.gob.cl/> consultada 29/11/2021.
- González-Wevar CA, P Salinas, M Hüne, NI Segovia, L Vargas-Chacoff, M Astorga, JI Cañete, E Poulin. 2015. Phylogeography in *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1848) along two biogeographical provinces in the Chilean coast. *PLoS One* 10:e0131289.
- Medina-Vogel G, VS Kaufman, R Monsalve, V Gomez. 2003. The influence of riparian vegetation, woody debris, stream morphology and human activity on the use of rivers by southern river otters in *Lontra provocax* in Chile. *Oryx* 37:422-430.
- Peña-Cortés F, J Pincheira-Ulbrich, C Bertrán, J Tapia, E Hauenstein, E Fernandez, D Rozas. 2011. A study of the geographic distribution of swamp forest in the coastal zone of the Araucanía Region, Chile. *Applied Geography* 31:545-555.
- Sepúlveda MA, JL Bartheld, R Monsalve, V Gómez, G Medina-Vogel. 2007. Habitat use and spatial behaviour of the endangered Southern river otter (*Lontra provocax*) in riparian habitats of Chile: conservation implications. *Biological Conservation* 140: 329-338.
- Suazo CG, AM Arriagada, JR Rau. 2012. Ephemeral aquatic bird assemblages in estuarine wetlands from south-central Chile: using an intertidal flat habitat during the austral summer. *Estuaries and Coasts* 35: 1137-1143.

8. ANEXO A. PRESENCIA DE FAMILIAS DE INVERTEBRADOS.

Phyla	Familia	Áreas de monitoreo							
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Annelida	Aeolosomatidae								
	Americobdellidae								
	Capitellidae								
	Enchytraeidae								
	Glossiphoniidae								
	Haemadipsidae								
	Lumbricidae								
	Lumbriculidae								
	Megascolecidae								
	Naididae								
	Nereididae								
	Onuphidae								
	Pectinariidae								
	Spionidae								
Arthropoda	Aegidae								
	Agelenidae								
	Agromyzidae								
	Alloclangonyctidae								
	Amaurobiidae								
	Anobiidae								
	Austroperlidae								
	Baetidae								
	Blephariceridae								
	Bourletiellidae								
	Brachytrichidae								
	Braconidae								
	Buprestidae								
	Calocalanidae								
	Calopterygidae								
	Camisiidae								
	Canthocamptidae								
	Carabidae								
	Cecidomyiidae								
	Cepheidae								
	Ceratophyllidae								
	Ceratopogonidae								
	Chiltoniidae								
	Chironomidae								
	Chrysomelidae								
	Chrysopidae								
	Chydoridae								
	Cicadellidae								
	Cixiidae								
	Coloburiscidae								
	Corydalidae								
	Crabronidae								
	Culicidae								
	Cyclopyrididae								
	Cyclopidae								
	Cylindropsyllidae								
	Cypridae								
	Delphacidae								
	Derocheilocarididae								
	Diamphipnoidae								
Diapriidae									
Dicyrtomidae									
Dinychidae									
Dytiscidae									
Ecnomidae									
Elateridae									
Entomobryidae									
Eupodidae									



9. ANEXO B. LISTA SISTEMÁTICA DE VERTEBRADOS REGISTRADOS USANDO ADN AMBIENTAL

Grupo: PECES

Clase: Hyperoartia

Orden: Petromyzontiformes

Familia: Petromyzontidae

Género: *Geotria*

Especie: *G. australis*

Clase: Actinopterygii

Orden: Galaxiformes

Familia: Galaxiidae

Género: *Aplochiton*, *Brachygalaxias*, *Galaxias*

Especie: *A. taeniatus*, *A. zebra*, *B. bullocki*, *G. maculatus*, *G. platei*

Orden: Scrombriformes

Familia: Bramidae

Género: *Brama*

Especie: *B. australis*

Orden: Characiformes

Familia: Characidae

Género: *Cheirodon*

Especie: *C. interruptus*

Orden: Cypriniformes

Familia: Cyprinidae

Género: *Cyprinus*

Especie: *C. carpio*

Orden: Perciformes

Familia: Eginopsidae

Género: *Eginops*

Especie: *E. maclovinus*

Orden: Gadiformes

Familia: Merlucciidae

Género: *Merluccius*

Especie: *M. australis*

Orden: Mugiliformes

Familia: Mugilidae

Género: *Mugil*

Especie: *M. cephalus*

Orden: Atheriniformes

Familia: Atherinopsidae

Género: *Odontesthes*

Especie: *O. brevianalis*



Orden: Salmoniformes
Familia: Salmonidae
Género: *Oncorhynchus*, *Salmo*
Especie: *O. mykiss*, *S. trutta*

Orden: Centrarchiformes
Familia: Percichthyidae
Género: *Percichthys*, *Percilia*
Especie: *P. trucha*, *P. gillissi*

Orden: Siluriformes
Familia: Trichomycteridae
Género: *Trichomycterus*
Especie: *T. areolatus*

Grupo: ANFIBIOS

Clase: Amphibia

Orden: Anura

Familia: Alsodidae
Género: *Alsodes*
Especie: *A. gargola*, *A. monticola*, *A. verrucosus*

Género: *Eupsophus*
Especie: *E. emiliopugini*, *E. migueli*, *E. roseus*, *E. vertebralis*

Familia: Batrachylidae
Género: *Batrachyla*
Especie: *B. leptopus*, *B. taeniata*

Familia: Rhinodermatidae
Género: *Insuetophrynus*
Especie: *I. acarpicus*

Familia: Leptodactylidae
Género: *Pleurodema*
Especie: *P. thaul*

Familia: Calyptocephalellidae
Género: *Telmatobufo*, *Calyptocephallela*
Especie: *T. australis*, *T. bullocki*, *C. gayi*



Grupo: MAMÍFEROS

Clase: Mammalia

Orden: Rodentia

Familia: Cricetidae

Género: *Abrothrix*

Especie: *A. longipilis*, *A. manni*

Género: *Loxodontomys*

Especie: *L. micropus*

Género: *Oligoryzomys*

Especie: *O. longicaudatus*

Familia: Myocastoridae

Género: *Myocastor*

Especie: *M. coypus*

Familia: Muridae

Género: *Rattus*

Especie: *R. norvegicus*, *R. rattus*

Orden: Carnivora

Familia: Canidae

Género: *Canis*

Especie: *C. lupus (familiaris)*

Familia: Otariidae

Género: *Otaria*

Especie: *O. byronia*

Familia: Felidae

Género: *Leopardus*

Especie: *L. geoffroyi*, *L. guigna*, Felidae indet.

Familia: Mustelidae

Género: *Lontra*

Especie: *L. provocax*

Género: *Neovison*

Especie: *N. vison*

Orden: Chiroptera

Familia: N.D.

Género: N.D.

Especie: Chiroptera indet.



Orden: Artiodactyla

Familia: Cervidae

Género: *Axis*, *Pudu*

Especie: *A. axis*, *Pudu puda*, Cervidae indet.

Familia: Bovidae

Género: *Bos*, *Bubalus*, *Capra*, *Ovis*

Especie: *B. taurus*, *B. grunniens*, *B. bubalis*, *C. hircus*, *O. aries*

Familia: Suidae

Género: *Sus*

Especie: *S. scrofa (domestica)*

N.D.: No determinado



10. ANEXO: DESCRIPCIÓN DE ARCHIVOS

Este informe viene acompañado de archivos complementarios, donde se pueden encontrar todos los documentos asociados al análisis de secuencias, además de las figuras usadas para la elaboración del reporte. Para el caso de los análisis moleculares aquí descritos, las especies son descritas en función de variantes de secuencias de amplicones (ASVs) dado que el análisis taxonómico identifica variaciones genéticas entre y dentro de especies.

Descripción del contenido de archivos complementarios contenidos en este informe.

Archivo	Descripción
<i>Alpha_richness.tsv</i>	Índices de diversidad- α por muestra
<i>ASV_taxonomy_brief</i>	Conteos de ASV para cada muestra
<i>ASV_taxonomy_detailed</i>	Asignación taxonómica de ASV
Figuras	Figuras en formato .pdf de alta calidad

11. ECOGEN SPA – RESUMEN DE ACTIVIDADES

Validación comercial	: Felipe Castillo
Colecta/filtración muestras ambientales	: Pedro G. Retamal / Roger D. Sepúlveda
Extracción y elaboración librerías genéticas	: Kennia Morales-Collío
Secuenciación masiva / bioinformática	: Andrea X. Silva / Pablo Sáenz-Agudelo
Revisión literatura e informe	: Pedro G. Retamal
Análisis datos / Validación informe	: Roger D. Sepúlveda