

Evaluación en la detección de peces y anfibios a través del uso de la técnica de ADN ambiental en Chile central: implicancias para el monitoreo ambiental

Evaluation of the detection of fish and amphibians using environmental DNA techniques in central Chile: implications for environmental monitoring

Hugo Salinas^{1,*}, Gianina Tapia¹, Juan Carlos Trujillo¹, Nicolás Rebolledo¹, Alejandra Alzamora^{1,2}, Jesús Cornejo-Campos¹, Juan Sanchez¹ & Gabriel Lobos^{1,2}

¹Ecodiversidad Consultores, Santiago, Chile.

²Centro de Gestión Ambiental y Biodiversidad, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

*Corresponding author: hugo.salinas.m@gmail.com

RESUMEN

La detección de ADN ambiental (eDNA) es un método molecular no invasivo que ha sido propuesto como una alternativa a los métodos convencionales de campo para el muestreo de la biodiversidad. En el presente estudio se realizó una comparación entre la técnica de eDNA y los métodos convencionales para la detección de peces y anfibios en tres esteros de la cuenca del río Aconcagua (El Gallo, El Sauce y El Cobre). Mediante la técnica de eDNA se logró identificar un total de seis especies de peces y cuatro de anfibios. Los resultados fueron congruentes con los registros mediante métodos convencionales. No obstante, se observaron algunas diferencias, por ejemplo, en el estero El Sauce los anfibios *Rhinella arunco* y *Pleurodema thaul* fueron detectados solamente utilizando métodos convencionales. Estos hallazgos muestran la utilidad de la técnica de eDNA en estudios de biodiversidad, particularmente para la detección de especies poco abundantes o elusivas, aunque es menos efectiva para anfibios que presentan una fase acuática restringida en el tiempo.

Palabras clave: ADN ambiental, biodiversidad, métodos de muestreo.

ABSTRACT

Environmental DNA (eDNA) detection is a non-invasive molecular method proposed as an alternative to conventional field techniques for biodiversity sampling. In this study we compared the eDNA technique with conventional methods for detecting fish and amphibians in three streams of the Aconcagua River basin (El Gallo, El Sauce, and El Melón streams). Using eDNA we identified a total of six fish species and four amphibian species, with results consistent with conventional method records. However, some discrepancies were observed. For instance, the species *Rhinella arunco* and *Pleurodema thaul* in El Sauce stream were only detected through conventional methods. These findings highlight the utility of eDNA in biodiversity studies, particularly for detecting low-abundance or elusive species, though it appears less effective for amphibians with temporally restricted aquatic life stages.

Keywords: biodiversity, environmental DNA, sampling methods.

INTRODUCCIÓN

Las aguas continentales de Chile central presentan un alto grado de endemismo a nivel de peces y anfibios (Habit *et al.* 2006, Correa 2019), los que se encuentran sometidos a fuertes presiones de origen antrópico, tales como modificación de caudales (pérdida y fragmentación de hábitat), contaminación, introducción de especies invasoras, cambio climático y sobreexplotación de recursos hídricos (Habit *et al.* 2006, Soto-Azat & Valenzuela-Sánchez 2012). La creciente presión antrópica sobre estos ecosistemas demanda la implementación de métodos de monitoreo que sean eficientes y prácticos. En este contexto, los rápidos avances de las técnicas moleculares que permiten la detección de ADN (ácido desoxirribonucleico) presente en el ambiente (eDNA, por sus siglas en inglés) se ha masificado a partir del año 2008 (Ficetola *et al.* 2008). Este enfoque se ha posicionado por su carácter innovador para el estudio de la biodiversidad, superando algunas limitaciones de los métodos convencionales que tradicionalmente se han sustentado en el registro directo de los organismos (Outhwaite *et al.* 2020, Burivalova *et al.* 2019).

El eDNA es una técnica de detección rápida, eficiente y de bajo costo (en relación con los estudios tradicionales de campo), por lo que permite realizar análisis a una gran escala espacial (Ficetola *et al.* 2019). Esta técnica destaca por no ser invasiva (Mora *et al.* 2019), es ideal para la detección de especies elusivas o que presentan bajas densidades (Franklin *et al.* 2019, Kurte *et al.* 2020), permite la detección temprana de especies invasivas (Rishan *et al.* 2023, Sanz *et al.* 2023) y permite muestrear simultáneamente a un amplio rango de organismos (Sawaya *et al.* 2019).

Los resultados del eDNA pueden verse afectados por el tiempo de persistencia del material genético en el ambiente, el que puede ir desde horas hasta meses en el agua, llegando a cientos o miles de años en el permafrost (Ficetola *et al.* 2008, Thomsen & Willerslev 2015). Estas diferencias se explican por condiciones particulares como la temperatura, radiación ultravioleta, pH, salinidad y contaminación microbiana. Por ejemplo, la temperatura ambiental influye en que animales poiquilotermos liberen menos ADN en condiciones frías (Lacoursière-Roussel *et al.* 2016, Clarke & Fraser 2004).

La degradación del eDNA puede traer como consecuencia la detección de falsos positivos (presencia de eDNA, pero no del organismo objetivo) y falsos negativos (presencia del organismo y no de su eDNA) (Ficetola *et al.* 2008). Por otro lado, las especies de talla grande, longevas y que están activas

a lo largo del año tendrían una mayor probabilidad de ser detectadas por eDNA (Andersen *et al.* 2012).

Para Chile central, se considera que el eDNA tendría un tiempo de residencia corto en las aguas continentales, debido a la estacionalidad, los periodos de estiaje (régimen pluvio-nival) y los efectos antropogénicos (Kurte *et al.* 2020). En este contexto, hay escasos estudios que evalúen la eficacia del eDNA para detectar la diversidad de peces y anfibios en Chile (Kurte *et al.* 2020, Saenz-Agudelo *et al.* 2021, Erazo 2019, Lefiqueo 2024), con solo un estudio para Chile central (Estragues 2018). Por esto se hace imperativo sumar fuentes de evidencia sobre la efectividad de esta técnica para el monitoreo de la biodiversidad en esta región del país. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de la técnica de eDNA para detectar la diversidad de peces y anfibios que habitan en las aguas continentales de Chile central y validar su uso para futuros programas de monitoreo.

MATERIALES Y METODOS

ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en un gradiente altitudinal en los esteros El Gallo, El Sauce y El Cobre, los que forman parte de la cuenca del Río Aconcagua, Región de Valparaíso. Los esteros El Sauce y El Gallo constituyen sistemas de primer orden, ubicados en la cordillera El Melón (Cordillera de la Costa), y dan origen al estero El Cobre, sistema de segundo orden (Fig. 1). El área de estudio se inserta en una zona semiárida, la que presenta un período seco de siete a ocho meses y un período húmedo de dos a cuatro meses (Santibáñez *et al.* 2008). El estudio comprendió nueve estaciones de muestreo, tres en el estero El Gallo, cuatro en el estero El Sauce y dos en el estero El Cobre. La vegetación está representada por bosques esclerófilos en la parte alta y matorrales en las zonas más bajas de la cuenca (Fig. 1).

MUESTREOS DE PECES Y ANFIBIOS CON MÉTODOS CONVENCIONALES

Los muestreos de peces y anfibios mediante métodos convencionales se realizaron de forma semestral durante 2018 y 2019 y estacional entre 2020 y 2022, totalizando 15 campañas de muestreo. Para ello se realizaron transectos de 100 metros de largo por 10 de ancho donde se capturaron individuos utilizando técnicas clásicas como: pesca eléctrica (Samus Rich P-2000), redes de manos o "dipnet" y encuentros visuales para anfibios. Todos los organismos capturados fueron liberados en el mismo sitio de captura.

TABLA 1. Estaciones de monitoreo en relación con el sistema hídrico al que pertenecen. / Monitoring stations, in relation to the water system to which they belong.

		Coordenadas	
		Datum: WGS84 UTM, Huso: 19H	
Esteros	Sitios de monitoreos	Este	Norte
El Gallo	GAL-1	298.455	6.384.802
	GAL-2	299.682	6.385.205
	GAL-3	301.079	6.386.373
El Sauce	SAU-0	298.936	6.382.720
	SAU-1	300.604	6.381.714
	SAU-2	301.432	6.382.152
	SAU-3	302.255	6.383.257
El Cobre	CO-1	294.938	6.386.664
	CO-4	297.571	6.384.786

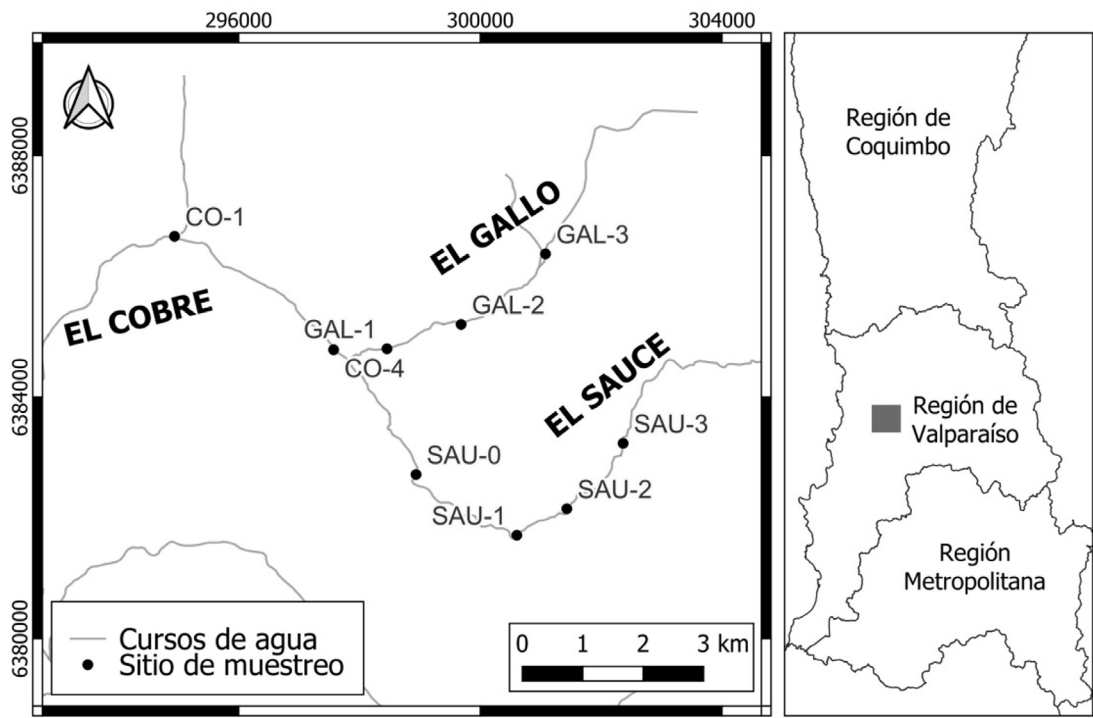


FIGURA 1. Cuencas hidrográficas y estaciones de monitoreo. / Watersheds and monitoring stations.

Para cada una de las especies se registró la frecuencia de encuentro por sitio de muestreo, expresada como el número de campañas con registros de las especies en relación con el total de campañas realizadas, valor que fue multiplicado por 100 para su expresión porcentual. Para esta estimación no se consideró aquellas campañas donde los sitios de muestreo se encontraron secos.

Para evaluar la eficiencia de los métodos convencionales, se construyeron curvas de acumulación de especies, utilizando 100 permutaciones y el estimador Chao 1 mediante el software EstimateS 9.1.0 (Colwell 2013).

TOMA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO DE eDNA

Para el estudio de eDNA se realizaron dos muestreos, el primero en primavera 2021 (noviembre) y el segundo en invierno 2022 (agosto). Las muestras se tomaron con el kit comercial “Metabarcoding” (NatureMetrics Ltd.). En cada sitio se filtró un volumen de 2.000 ml de agua utilizando una jeringa de 100 ml. Luego se fijó la muestra con una solución conservante de lisis estable a temperatura ambiente (solución salina que contiene detergentes que desnaturalizan las proteínas).

Las muestras fueron almacenadas en frío y enviadas al laboratorio NatureMetrics, donde se realizó el procedimiento de “metabarcoding” con el fin de identificar los distintos taxones. Para ello se purificó el ADN y se amplificó una región hipervariable del gen 12S rRNA para vertebrados (eDNA - Vertebrate pipeline). Para cada análisis de PCR, se realizó un control negativo, para descartar contaminación de la muestra, y un control positivo con una comunidad simulada de composición conocida. Los fragmentos de ADN amplificados (amplicones) se purificaron y verificaron mediante electroforesis en gel para su posterior cuantificación por medio del kit Qubit™ de rango amplio. Los productos de PCR purificados se llevaron a igual concentración (10,5 pM) para la secuenciación con el kit Illumina MiSeq V3, con un aumento de PhiX del 20%. Las asignaciones taxonómicas se realizaron mediante búsquedas de similitud de secuencias en NCBI nucleotide (GenBank), Barcode of Life Database (BOLD), SILVA y NatureMetrics Database of Life. El Global Biodiversity Information Facility (GBIF) fue utilizado para determinar la consistencia taxonómica entre las distintas bases de datos. A cada unidad operacional taxonómica (OTU) se le asignó el nivel taxonómico más bajo posible. Se utilizaron umbrales mínimos de similitud del 99%, 97% y 95% para las asignaciones de especies, géneros y niveles superiores, respectivamente.

COMPARACIÓN DEL MUESTREO ENTRE eDNA Y TÉCNICAS CONVENCIONALES

El grado de similitud entre los registros obtenidos por técnicas tradicionales y moleculares se obtuvo a partir de la estimación de un porcentaje de coincidencia. Este valor correspondió al porcentaje obtenido a partir de las especies registradas mediante eDNA con respecto al total de especies registradas por métodos tradicionales para cada estación de muestreo.

RESULTADOS

REGISTROS DE PECES Y ANFIBIOS CON MÉTODOS CONVENCIONALES

Detectamos nueve taxa de vertebrados acuáticos, cinco peces y cuatro anfibios. Entre los peces tres fueron nativos, *Basilichthys microlepidotus* (Jenys 1841), *Cheirodon pisciculus* (Girard 1855) y *Trichomycterus aerolatus* (Valenciennes 1846) y dos invasores, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns 1842) y *Gambusia holbrooki* (Girard 1859) (Tabla 2). Entre los anfibios registramos tres especies nativas, *Alsodes nodosus* (Duméril & Bibron 1841), *Rhinella arunco* (Molina 1782) y *Pleurodema thaul* (Schneider 1799), y una introducida *Xenopus laevis* (Daudin 1802).

La curva de acumulación de especies por estero mostró una estabilización en el número de las especies registradas, a partir de la novena campaña (Fig. 2). Las zonas bajas de los esteros presentaron las mayores riquezas de especies. En la Tabla 3 se señala la frecuencia de ocurrencia de las especies registradas y la riqueza por sitio de muestreo y estero.

REGISTRO DE PECES Y ANFIBIOS CON TÉCNICA DE ADN AMBIENTAL (eDNA)

La técnica de eDNA permitió detectar todas las especies de peces y anfibios registradas mediante los métodos convencionales. Para la asignación de las secuencias de *T. aerolatus*, se tuvo en consideración su distribución histórica, puesto que esta especie no se pudo discriminar de otro siluriforme, *Bullockia maldonadoi* (Eigenmann 1920). Por otra parte, en la estación de muestreo SAU-0 se registró un taxón perteneciente a la familia Salmonidae (introducida), el que no pudo ser asignado a nivel de especie.

Al igual que con las técnicas tradicionales, la mayor riqueza de especies se registró en la parte baja de los esteros (CO-1, CO-4, SAU-0 y SAU-1) (Tabla 4).

COMPARACIÓN ENTRE LOS REGISTROS OBTENIDOS CON TÉCNICAS CONVENCIONALES Y DETECCIÓN DE eDNA

A pesar de que se realizaron solo dos campañas de monitoreo mediante eDNA, se observó una gran coincidencia entre las especies registradas con este método y las detectadas por técnicas tradicionales (donde los registros se estabilizaron luego de 9 campañas), con un valor máximo de 100% en los sitios GAL-2 y CO-4, y un mínimo de 50% en las cabeceras de los ríos (GAL-3 y SAU-3), donde solo se registraron anfibios (Tabla 5).

Tres especies fueron detectadas mediante la técnica de eDNA en todos los sitios que contaban con registros convencionales: *C. decemmaculatus*, *A. nodosus* y *X. laevis*. Además, *T. aerolatus* fue detectada mediante eDNA en seis de los siete sitios con registros convencionales, *C. pisciculus* fue detectada en tres de los cuatro sitios con registros convencionales y *R. arunco* fue detectada en cuatro de los seis

sitios con registros convencionales. En general, las especies que no fueron detectadas mediante eDNA se asociaron a sitios de muestreo donde su frecuencia mediante técnicas convencionales fue baja (menor a 30%), como el caso de *T. aerolatus* en CO-1, *B. microlepidotus* en SAU-0 y SAU-1, *C. pisciculus* en SAU-2, *R. arunco* en GAL-1 y SAU-3, y *P. thaul* en GAL-1 y GAL-3 (Tabla 3). La excepción fue *G. holbrooki* en CO-1 que no fue detectada por eDNA, a pesar de presentar una frecuencia moderada (46,67%) (Tabla 5). Esto podría atribuirse a que esta especie no fue registrada posterior a la primavera de 2021 (Tabla 2).

La familia Salmonidae (invasora) fue el único taxón detectado exclusivamente por eDNA. De la misma forma, otras especies invasoras como *G. holbrooki* y *Xenopus laevis* fueron detectadas en puntos de muestreo donde no se obtuvieron registros con técnicas tradicionales (Tabla 5).

TABLA 2. Peces y anfibios identificados con métodos convencionales por estero y campaña. O=otoño, I=invierno, P=primavera, V=verano. / Fish and amphibians identified in records with conventional methods by stream and campaign. O=autumn, I=winter, P=spring, V=summer.

		2018 O	2018 I	2019 V	2019 I	2020 V	2020 I	2020 P	2021 V	2021 O	2021 I	2021 P	2022 V	2022 O	2022 I	2022 P
Esteros	Especie															
El Cobre	<i>Basilichthys microlepidotus</i>		X	X				X	X	X	X	X	X			
	<i>Cheirodon pisciculus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
	<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
	<i>Gambusia holbrooki</i>	X	X	X	X	X			X		X					
	<i>Trichomycterus aerolatus</i>						X	X	X		X		X			
	<i>Rhinella arunco</i>			X			X	X	X	X	X	X	X	X		X
	<i>Xenopus laevis</i>		X			X									X	
El Gallo	<i>Trichomycterus aerolatus</i>	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	<i>Alsodes nodosus</i>	X	X	X				X	X		X	X	X	X		X
	<i>Pleurodema thaul</i>	X							X							
	<i>Rhinella arunco</i>								X							
	<i>Xenopus laevis</i>		X												X	
El Sauce	<i>Basilichthys microlepidotus</i>	X	X													
	<i>Cheirodon pisciculus</i>	X						X								
	<i>Trichomycterus aerolatus</i>	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X		
	<i>Alsodes nodosus</i>	X		X		X		X	X			X	X	X		X
	<i>Pleurodema thaul</i>	X									X					
	<i>Rhinella arunco</i>	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X
	<i>Xenopus laevis</i>							X				X				

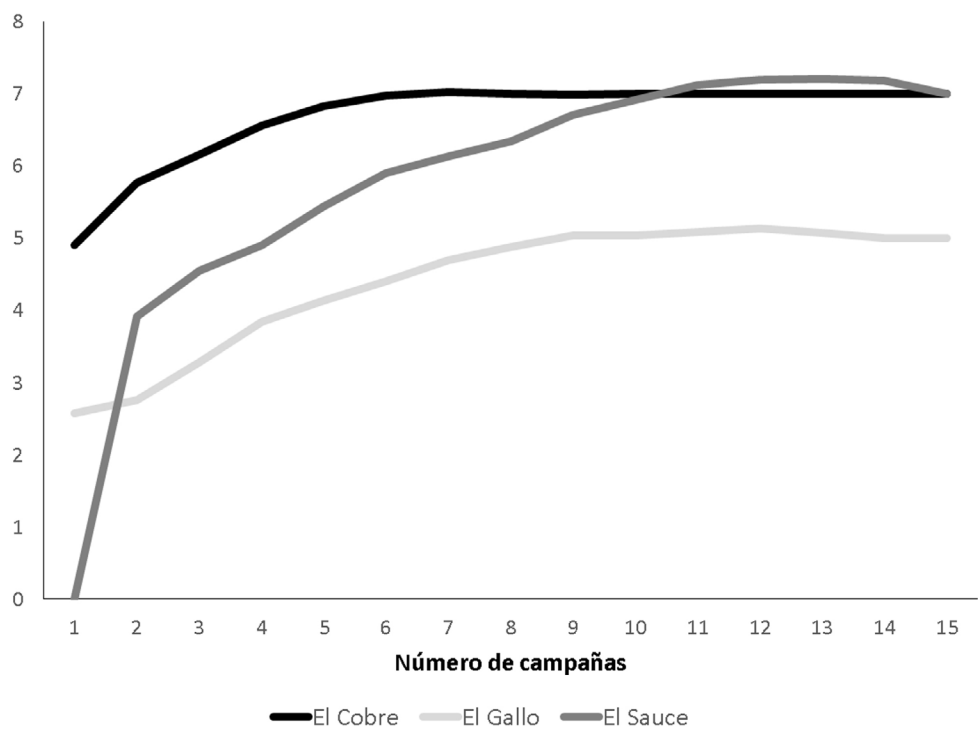


FIGURA 2. Curva de acumulación de especies para registros con métodos convencionales en los distintos esteros. / Species accumulation curve for conventional methods in the different streams.

TABLA 3. Frecuencia de registros con métodos convencionales por sitios de muestreo y esteros. / Frequency of records with conventional methods by sampling sites and streams.

Estación de muestreo	Número de muestreos	<i>Trichomycterus aerolatus</i>	<i>Basilichthys microlepidotus</i>	<i>Cheirodon pisciculus</i>	<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	<i>Gambusia holbrooki</i>	<i>Alsodes nodosus</i>	<i>Rhinella arunco</i>	<i>Pleurodema thaul</i>	<i>Xenopus laevis</i>	Riqueza	Riqueza por estero
GAL-1	15	26,7	0	0	0	0	6,7	6,7	6,7	13,3	5	5
GAL-2	15	86,7	0	0	0	0	66,7	0	0	0	2	
GAL-3	15	0	0	0	0	0	6,7	0	6,7	0	2	
SAU-0	7	42,9	28,6	14,3	0	0	0	57,1	0	28,6	5	7
SAU-1	9	44,4	11,1	0	0	0	33,3	88,9	11,1	0	5	
SAU-2	14	78,6	0	7,1	0	0	42,9	78,6	14,3	0	5	
SAU-3	14	0	0	0	0	0	50	21,4	0	0	2	7
CO-1	15	13,3	26,7	86,7	93,3	46,7	0	60	0	20	7	
CO-4	9	44,4	66,7	88,9	0	0	0	0	0	0	3	

TABLA 4. Peces y anfibios identificados con ADN ambiental por sitios de muestreo y períodos (P=primavera, I=invierno). / Fish and amphibians identified with environmental DNA by sampling sites and period (P=spring, I=winter).

Estación de muestreo	<i>T. aerolatus</i>	<i>B. microlepidotus</i>	<i>C. pisciculus</i>	<i>C. decemmaculatus</i>	<i>G. holbrooki</i>	<i>Salmonidae</i>	<i>A. nodosus</i>	<i>R. arunco</i>	<i>P. thaul</i>	<i>X. laevis</i>	Riqueza	Riqueza por estero
GAL-1	P-I						I			P	3	3
GAL-2	P-I						P-I				2	
GAL-3							P-I				1	
SAU-0	I		P-I			I		P-I		P	5	8
SAU-1	I				I		I	P-I	P		5	
SAU-2	P-I						P-I	P-I	P		4	
SAU-3							P				1	
CO-1		P	P	P				P		P	5	6
CO-4	P-I	P-I	P-I					P-I		I	5	

TABLA 5. Similitud en el registro de especies identificadas con ambas técnicas; registros convencionales (C), registros mediante eDNA (E) y registros con ambos métodos (CE). / Similarity in the record of species identified with both methods; conventional records (C), records using eDNA (E) and records with both methods (CE).

Estación de muestreo	<i>T. aerolatus</i>	<i>B. microlepidotus</i>	<i>C. pisciculus</i>	<i>C. decemmaculatus</i>	<i>G. holbrooki</i>	<i>Salmonidae</i>	<i>A. nodosus</i>	<i>R. arunco</i>	<i>P. thaul</i>	<i>X. laevis</i>	% similitud	Hallazgos nuevos (solo eDNA)	% similitud por estero
GAL-1	CE						CE	C	C	CE	60%		60%
GAL-2	CE						CE				100%		
GAL-3							CE		C		50%		
SAU-0	CE	C	CE			E		CE		CE	80%	1	75%
SAU-1	CE	C			E		CE	CE	CE		80%	1	
SAU-2	CE		C				CE	CE	CE		80%		
SAU-3							CE	C			50%		
CO-1	C	CE	CE	CE	C			CE		CE	71%		86%
CO-4	CE	CE	CE					E		E	100%	2	
Registros convencionales	7	4	4	1	1	0	6	6	4	3			
Presencia mediante eDNA	6	2	3	1	1	1	6	5	2	4			

DISCUSIÓN

La curva de acumulación de especies registradas por métodos convencionales indica que se requirió al menos nueve campañas para un conocimiento completo de la riqueza de anfibios y peces presente en los esteros. Por otra parte, el eDNA fue capaz de detectar, en solo dos campañas, entre un 60% y 86% de la riqueza de especies por estero, dando cuenta de una efectividad parecida a la registrada por métodos convencionales, si consideramos que la curva de acumulación de especies muestra que en dos campañas con métodos convencionales se habría registrado un 55% de la riqueza en el estero El Gallo, un 56% en El Sauce y un 82% en El Cobre.

El análisis por sitio de muestreo indica una alta coincidencia entre las especies reportadas mediante ambas técnicas. La técnica eDNA no detectó a *G. holbrooki* en el estero El Cobre y a *B. microlepidotus* en el estero El Sauce, las cuales, mediante técnicas convencionales no fueron registradas en los años más recientes del estudio. En este sentido, la técnica de eDNA aporta una nueva línea de evidencia que soporta la idea de que estas especies ya no se encontrarían en dichos sitios. En el caso de la especie nativa *B. microlepidotus*, su ausencia podría relacionarse con el efecto de la sequía en el estero El Sauce, donde las estaciones con registros de *B. microlepidotus* (SAU-0 y SAU-1) quedaron completamente secas durante tres campañas consecutivas del 2019 (verano, otoño e invierno) y, adicionalmente, por la ejecución de obras que podrían generar interrupciones en el desplazamiento de la especie (por ejemplo, el entubamiento del cauce con fines viales).

Otro resultado interesante fue la detección de especies invasoras en sitios que no tenían registros por métodos convencionales, como *G. holbrooki* en la estación SAU-1 y *X. laevis* en la estación CO-4. Estos hallazgos muestran el potencial de la técnica de eDNA para detectar especies que se encuentran en baja densidad y que pueden estar en un proceso de expansión (Furlan *et al.* 2019, Dougherty *et al.* 2016, Ficetola *et al.* 2008), lo cual sería especialmente relevante para el control de especies invasoras de forma temprana.

Los peces *C. pisciculus*, *T. aerolatus* y *C. decemmaculatus* presentaron una alta detección por medio de eDNA, lo que probablemente se relaciona con la mayor frecuencia en el área de estudio. En cuanto a los anfibios, la detección de especies mediante eDNA podría relacionarse con sus rasgos de historia de vida. Así, para las especies de hábitos acuáticos como *X. laevis* (Lobos & Jaksic 2005) y/o que presentan largos periodos de desarrollo larval en el agua, como *A. nodosus* (Díaz & Valencia 1985), la técnica de eDNA mostró una alta eficacia en su detección. Por otro lado, para las especies

con estadios larvales más cortos y adultos de vida terrestre, como *R. arunco* y *P. thaul*, (Díaz 1986, Alzamora & Lobos 2021), la técnica de eDNA fue menos eficiente, lo que podría explicarse fundamentalmente por la presencia temporal de los individuos en el agua. Estos resultados muestran la relevancia de considerar la ecología de las especies cuando se realizan estudios con eDNA y la necesidad de realizar un mayor número de muestreos en diferentes épocas del año para detectar especies que abandonan los cuerpos de agua en épocas no reproductivas (Sun *et al.* 2023, Bálint *et al.* 2018), además de un mayor número de réplicas para disminuir la probabilidad de falsos negativos e interpretar correctamente los resultados (Kurte *et al.* 2020).

Otro aspecto que destacar fue el registro de eDNA de un taxón indeterminado de la familia Salmonidae, la cual no se reportó en el monitoreo con técnicas convencionales. Las especies de esta familia son invasoras en Chile y se encuentran ampliamente distribuidas (Bravo *et al.* 2021, Lobos *et al.* 2020). Si bien el uso de eDNA puede entregar información temprana sobre una invasión biológica (Schumer *et al.* 2019), el hallazgo de esta especie debería validarse *in situ* ya que podría corresponder a un falso positivo.

La técnica del eDNA surge como una herramienta atractiva y de bajo costo para la generación de inventarios rápidos de biodiversidad en relación con los estudios tradicionales, especialmente cuando la diversidad de organismos es alta o bien para la detección de especies raras o amenazadas (Rees *et al.* 2014, Bálint *et al.* 2018). A pesar de esto, aún se requiere de la supervisión de especialistas, debido a que su efectividad puede variar por distintos factores, tales como falsos positivos por contaminación de la muestra, eDNA degradado, errores del PCR (resolución de los marcadores moleculares), tiempo de persistencia del ADN en el ambiente, entre otros. Por otra parte, las técnicas convencionales siguen siendo fundamentales para estimar otros aspectos de la biodiversidad, tales como la densidad, biomasa, estado sanitario, aspectos ecológicos, biológicos, conductuales, edad, género, tamaño y estudios comparativos (Rishan *et al.* 2023, Beng & Corlett 2020, Ficetola *et al.* 2014).

CONCLUSIÓN

La implementación de las técnicas con eDNA para el estudio de la biodiversidad ha mostrado ser un método eficiente y rápido, especialmente para especies elusivas. Nuestros resultados sugieren una alta efectividad de la técnica eDNA para el monitoreo de especies en Chile central, obteniéndose resultados similares a los monitoreos con métodos convencionales. Además, se pudieron detectar especies

invasoras en sitios donde los métodos convencionales no tuvieron éxito. Sin embargo, los alcances del eDNA siguen siendo limitados, por lo que los estudios tradicionales siguen siendo irremplazables. Sin duda la investigación en eDNA seguirá avanzando, en especial en lo relativo a la estimación de abundancia, razón por la cual los monitoreos a largo plazo son esenciales para las futuras validaciones de estas nuevas técnicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Gerencia de Sustentabilidad de Anglo American, quienes facilitaron la realización de este trabajo. También a Javier Salazar por el apoyo en la revisión del documento.

REFERENCIAS

- Alzamora, A., Lobos, G. 2021. Assessing the threat of a South American cichlid on anurans in the Chilean Mediterranean region. *BioInvasions Records* 10(3): 669-682.
- Andersen, K., Bird, K., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H., Kjaer, K., Orlando, L., Gilbert, M., Willerslev, E. 2012. Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology* 21(8): 1966-1979.
- Bálint, M., Nowak, C., Márton, O., Pauls, S.U., Wittwer, C., Aramayo, J.L., Schulze, A., Chambert, T., Cocchiara, B., Jansen, M. 2018. Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. *Molecular Ecology Resources* 18(6): 1415-1426.
- Beng, K.C., Corlett, R.T. 2020. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation* 29(3): 2089-2121.
- Bravo, S., Whelan, K., Silva, M.T. 2021. Assessment of trout populations inhabiting the Palena River, southern Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research* 49(1): 29-39.
- Burivalova, Z., Game, E.T., Butler, R.A. 2019. The sound of a tropical forest. *Science* 363(6422): 28-29.
- Buxton, A.S., Groombridge, J.J., Zakaria, N.B., Griffiths, R.A. 2017. Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Scientific Reports* 7(46294): 1-9.
- Clarke, A., Fraser, K.P. 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology* 18(2): 243-251.
- Colwell, R.K. 2013. EstimateS 9.1.0. Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version, 9. User's Guide and application. <http://purl.oclc.org/estimates>
- Correa, C. 2019. Nueva lista comentada de los anfibios de Chile (Amphibia, Anura). *Boletín Chileno de Herpetología* 6: 1-14.
- Díaz, N.F., Valencia, J. 1985. Larval morphology and phenetic relationships of the Chilean Alsodes, Telmatobius, Caudiverbera and Insuetophrynus (Anura: Leptodactylidae). *Copeia* 1985(1): 175-181.
- Díaz, N. 1986. Biosistemática de los Leptodactylidae chilenos. *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso* 17: 65-85.
- Dougherty, M.M., Larson, E.R., Renshaw, M.A., Gantz, C.A., Egan, S.P., Erickson, D.M., Lodge, D.M. 2016. Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. *Journal of Applied Ecology* 53(3): 722-732.
- Erazo, F.E. 2019. Optimización de técnicas moleculares basadas en ADN ambiental para la detección indirecta de peces en sistemas acuáticos continentales del sur de Chile Undergraduate Thesis. Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Estragares, R.C. 2018. Caracterización de la riqueza íctica en ecosistemas lacustres y fluviales de Chile comparando metabarcoding de ADN ambiental (eDNA) con un método tradicional de captura Undergraduate Thesis. Univ de Chile, Santiago, Chile.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4(4): 423-425.
- Ficetola, G.F., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguët-Covex, C., De Barba, M., Gielly, L., Lopes, C. M., Boyer, F., Pompanon, F., Rayé, G., Taberlet, P. 2014. Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources* 15(3): 543-556.
- Ficetola, G.F., Manenti, R., Taberlet, P. 2019. Environmental DNA and metabarcoding for the study of amphibians and reptiles: species distribution, the microbiome, and much more. *Amphibia-Reptilia* 40(2): 129-148.
- Franklin, T.W., McKelvey, K.S., Golding, J.D., Mason, D.H., Dysthe, J.C., Pilgrim, K.L., Squires, J., Aubry, K., Long, R., Greaves, S., Raley, C., Jackson, S., Mackay, P., Lisbon, J., Saudes, J., Pruss, M., Heffington, D., Schwartz, M. 2019. Using environmental DNA methods to improve winter surveys for rare carnivores: DNA from snow and improved noninvasive techniques. *Biological Conservation* 229(2): 50-58.
- Furlan, E.M., Gleeson, D., Wisniewski, C., Yick, J., Duncan, R.P. 2019. eDNA surveys to detect species at very low densities: A case study of European carp eradication in Tasmania, Australia. *Journal of Applied Ecology* 56(11): 2505-2517.
- Habit, E., Dyer, B., Vila, I. 2006. Estado de conocimiento de los

- peces dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70(1): 100-113.
- Kurte, L., Llanquín-Rosas, F., Quezada-Romegialli, C. 2020. Potencial uso y aplicaciones del ADN ambiental en humedales: una novedosa aproximación al estudio de la biodiversidad íctica en Chile. *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso* 33: 1-10.
- Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., Bernatchez, L. 2016. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources* 16(6): 1401-1414.
- Lefiqueo, V.E. 2024. Estimación de abundancia de ensambles de peces de agua dulce mediante métodos de pesca y ADN ambiental Undergraduate Thesis. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Lobos, G., Jaksic, F.M. 2005. The ongoing invasion of African clawed frogs (*Xenopus laevis*) in Chile: causes of concern. *Biodiversity & Conservation* 14: 429-439.
- Lobos, G., Sáez, P.A., Villablanca, R., Prado, M., Cruz-Jofré, F., Fibla, P., Méndez-Torres, M.A. 2020. Invasion of salmonids in the Puna and Southern Chilean Altiplano: patterns and threats to the biodiversity. *BioInvasions Records* 9(4): 853-864.
- Mora, A.J., Prosse, S.W., Mora, J.A. 2019. DNA metabarcoding allows non-invasive identification of arthropod prey provisioned to nestling Rufous hummingbirds (*Selasphorus rufus*). *PeerJ* 7: e6596
- Outhwaite, C.L., Gregory, R.D., Chandler, R.E., Collen, B., Isaac, N.J.B. 2020. Complex long-term biodiversity change among invertebrates, bryophytes and lichens. *Nature Ecology & Evolution* 4(3): 384-392.
- Rees, H.C., Maddison, B.C., Middleditch, D.J., Patmore, J.R., Gough, K.C. 2014. 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.
- Rishan, S.T., Kline, R.J., Rahman, M.S. 2023. Applications of environmental DNA (eDNA) to detect subterranean and aquatic invasive species: a critical review on the challenges and limitations of eDNA metabarcoding. *Environmental Advances* 12: 100370.
- Saenz-Agudelo, P., Delrieu-Trottin, E., DiBattista, J.D., Martínez-Rincon, D., Morales-González, S., Pontigo, F., Ramirez, P., Silva, A., Soto, M., Correa, C. 2022. Monitoring vertebrate biodiversity of a protected coastal wetland using eDNA metabarcoding. *Environmental DNA* 4(1): 77-92.
- Santibañez, F., Roa, P., Santibañez, P. 2008. El medio físico. En: Rovira, J., Ugalde, J., Stutzin, M. (Eds). *Biodiversidad en Chile*. CONAMA, Santiago, Chile.
- Sanz, N., Franch, N., Araguas, R.M., Viñas, J., Vidal, O. 2023. Environmental DNA Assay for the Detection of the American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in the Early Stages of the Invasion in the Ebre Delta. *Animals* 13(4): 683.
- Sawaya, N.A., Djurhuus, A., Closek, C.J., Hepner, M., Olesin, E., Visser, L., Kelble, C., Hubbard, K., Breetbart, M. 2019. Assessing eukaryotic biodiversity in the Florida Keys National Marine Sanctuary through environmental DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution* 9(3): 1029-1040.
- Schumer, G., Crowley, K., Maltz, E., Johnston, M., Anders, P., Blankenship, S. 2019. Utilizing environmental DNA for fish eradication effectiveness monitoring in streams. *Biological Invasions* 21(11): 3415-3426.
- Soto-Azat, C., Valenzuela-Sánchez, A. 2012. Conservación de anfibios de Chile: memorias del taller de conservación de anfibios para organismos públicos. Universidad Nacional Andrés Bello, Santiago, Chile.
- Sun, X., Guo, N., Gao, J., Xiao, N. 2023. Using eDNA to survey amphibians: Methods, applications and challenges. *Biotechnology and Bioengineering* 121(2): 456-471.
- Thomsen, P.F., Willerslev, E. 2015. Environmental DNA—an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183: 4-18.

Received: 29.04.2024

Accepted: 30.06.2025

Editor: Fulgencio Lisón